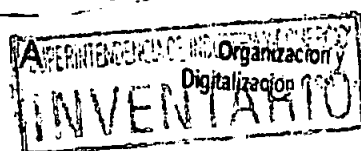


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION



21. EXPEDIENTE No.

08-138158

54. TÍTULO

ANTICUERPOS DE ALTA AFINIDAD PARA EL RECEPTOR

IL-6-HUMANO

1. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

4. SOLICITANTE

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

DOMICILIO

TARRYTOWN, NEW YORK, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

4. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

2. BOGOTÁ, D. C.,

1/73

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-138158- -00000-0000

Fecha: 2008-12-30 17:05:14 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

2 ene 2009

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **REGENERON
PHARMACEUTICALS, INC.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes del Estado de New York, Estados
Unidos de América.Dirección: 777 Old Saw Mill River Road,
Tarrytown,
New York 10591,
Estados Unidos de AméricaDomicilio: Tarrytown,
New York,
Estados Unidos de América**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

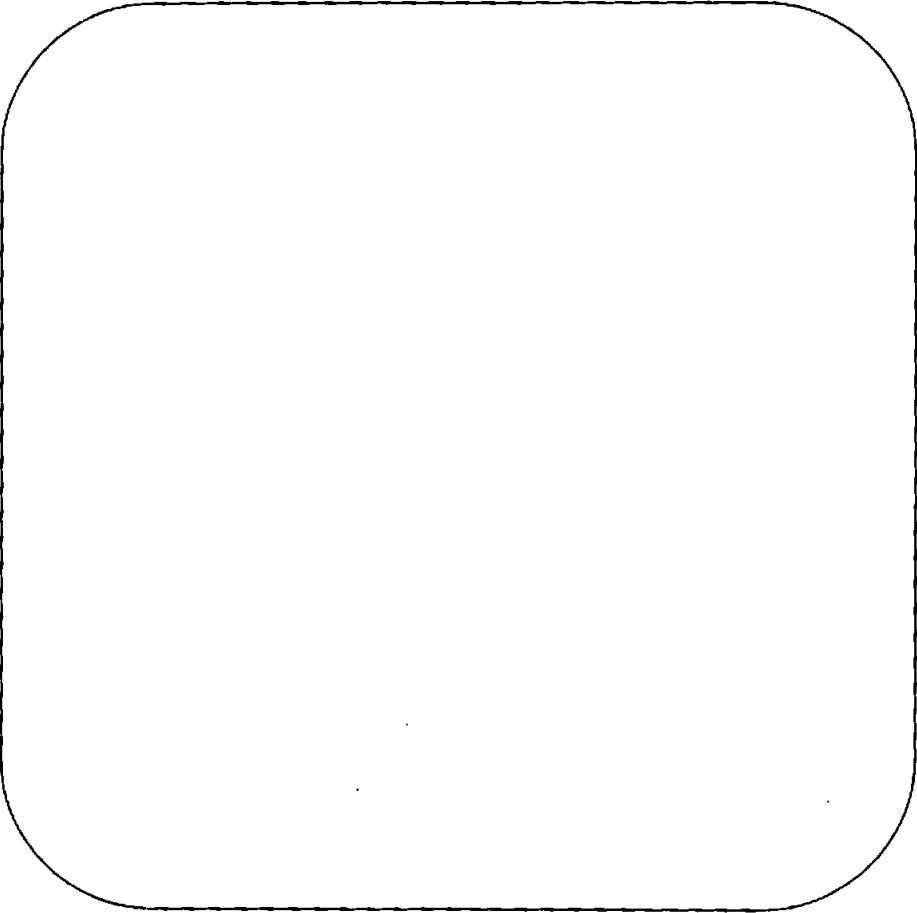
**INVENTOR (ES)
(72)**1. Sean **STEVENS**
3001 Lexington Avenue,
Mohegan Lake,
New York 10547,
Estados Unidos de América3. Joel H. **MARTIN**
244 Church Road,
Putnam Valley,
New York 10579,
Estados Unidos de América5. Ashique **RAFIQUE**
99 Franklin Avenue,
Yonkers,
New York 10705,
Estados Unidos de América7. Kevin J. **POBURY**
60 Anderson Street,
Beacon,
New York 12508,
Estados Unidos de América9. James P. **FANDL**
40 Amanda's Way,
Lagrangeville,
New York 12540,
Estados Unidos de América2. Tammy T. **HUANG**
10 Green Hill Road,
Golden Bridge,
New York 10526,
Estados Unidos de América4. Jeanette L. **FAIRHURST**
23 Parkview Court,
White Plains,
New York 10603,
Estados Unidos de América6. Eric **SMITH**
230 East 30th, Street, Apt. 5E,
New York,
New York 10016,
Estados Unidos de América8. Nicholas J. **PAPADOPOULOS**
59 Heritage Lane,
Lagrangeville,
New York 12540,
Estados Unidos de América10. Gang **CHEN**
2478 Mill Pond Road,
Yorktown Heights,
New York 10598,
Estados Unidos de América

11. Margaret KAROW 12655 Ridge Drive, Camarillo, California 93012, Estados Unidos de América			
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2007/013062</u> Fecha: <u>1 de junio de 2007</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2007/143168 A3</u> Fecha: <u>13 de diciembre de 2007</u>		
6	Título (54) <u>ANTICUERPOS DE ALTA AFINIDAD PARA EL RECEPTOR IL-6-HUMANO</u>		
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K 016/028</u>		
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u> <u>US</u>	(32) Fecha <u>2 de junio de 2006</u> <u>8 de septiembre de 2006</u>
			(31) Número de Solicitud <u>60/810,664</u> <u>60/843,232</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>08-95,319</u> Fecha: <u>9 de diciembre de 2008</u>		
10	Anexos: ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica. ☐ Poderes, si fuere el caso. ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. ☐ Declaraciones. ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos) ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA. ☐ Traducción del examen preliminar 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 12x12 ☐ 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. ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS		

3

11

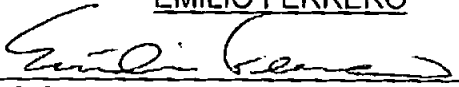
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

C166 / SCT

4

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/143168 A3

Descripción:

Páginas 18 en el idioma original

Páginas 34 en español

Reivindicaciones: Número (s) 19

Figuras: Número (s)

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA
FASE INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 December 2007 (13.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/143168 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(US). KAROW, Margaret [US/GH]; 12655 Ridge Drive,
Camarillo, CA 93012 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/013062

(74) Agent: GREGG, Vuleta; Regeneron Pharmaceuticals,
Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591
(US).

(22) International Filing Date: 1 June 2007 (01.06.2007)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
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, PG, PH, PL,
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, 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:
60/810,664 2 June 2006 (02.06.2006) US
60/843,232 8 September 2006 (08.09.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): REGEN-
ERON PHARMACEUTICALS, INC. [US/US]; 777 Old
Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): STEVENS, Sean
[US/US]; 3001 Lexington Avenue, Mohegan Lake, NY
10547 (US). HUANG, Tsunmy, T. [US/US]; 10 Green
Hill Road, Golden Bridge, NY 10526 (US). MARTIN,
Joel, H. [US/US]; 244 Church Road, Putnam Valley,
NY 10579 (US). FAIRHURST, Jeanette, L. [US/US];
23 Parkview Court, White Plains, NY 10603 (US).
RAFIQUE, Ashique [US/US]; 99 Franklin Avenue,
Yonkers, NY 10705 (US). SMITH, Eric [US/US]; 230
East 30th Street, Apt.5B, New York, NY 10016 (US).
POBURNKY, Kevin, J. [US/US]; 60 Anderson Street,
Beacon, NY 12508 (US). PAPADOPOULOS, Nicholas,
J. [US/US]; 59 Heritage Lane, Lagrangeville, NY 12540
(US). FANDI, James, P. [US/US]; 40 Amanda's Way,
Lagrangeville, NY 12540 (US). CHEN, Gang [US/US];
2478 Mill Pond Road, Yorktown Heights, NY 10598

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, 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
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments
- with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

(88) Date of publication of the international search report:
24 April 2008

(54) Title: HIGH AFFINITY ANTIBODIES TO HUMAN IL-6 RECEPTOR

(57) Abstract: A human antibody or an antigen-binding fragment which binds human IL-6 receptor (hIL-6R) with a K_D of about 500 pM or less and blocks IL-6 activity with an IC_{50} of 200 pM or less. The antibody or antibody fragment binds hIL-6R with an affinity at least 2-fold higher relative to its binding to monkey IL-6R.

WO 2007/143168 A3

6

HIGH AFFINITY ANTIBODIES TO HUMAN IL-6 RECEPTOR**Statement of Related Art**

[0001] Interleukin-6 (IL-6) is a pleiotropic cytokine produced by immune and non-immune cells that plays a crucial role in regulation of immune response, acute-phase reactions, and hematopoiesis. It binds to soluble and cell membrane bound IL-6R (α chain) forming a binary complex and this complex is able to interact with cell membrane bound gp130 (β chain), induces formation of signaling complex comprising two each of IL-6, IL-6R, and gp130.

[0002] Antibodies to hIL-6R are described in US 5,670,373, 5,795,965, 5,817,790, 6,410,691, and EP 409 607B1. Therapeutic methods are described in US 5,888,510 and 6,723,319.

BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

[0003] In a first aspect, the invention provides human antibodies, preferably recombinant human antibodies, that specifically bind human interleukin-6 receptor (hIL-6R). These antibodies are characterized by binding to hIL-6R with high affinity and slow dissociation kinetics and by the ability to neutralize IL-6 activity. The antibodies can be full-length (for example, an IgG1 or IgG4 antibody) or may comprise only an antigen-binding portion (for example, a Fab, F(ab')₂ or scFv fragment), and may be modified to effect functionality, e.g., to eliminate residual effector functions (Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925-1933). In a preferred embodiment, the invention provides an antibody or antigen-binding fragment thereof, which binds human IL-6 receptor (SEQ ID NO:1) with a K_D of about 500 pM or less, as measured by surface plasmon resonance. In a more specific embodiment, the antibody or antigen-binding fragment has a K_D of less than 300 pM, or less than 200 pM, or even less than 100 pM. In various embodiments, the antibody or antigen-binding fragment thereof blocks hIL-6 activity with an IC₅₀ of 250 pM or less, as measured by luciferase bioassay. In more specific embodiments, the antibody or antigen-binding fragment thereof exhibits an IC₅₀ of 150 pM or less.

[0004] In related aspects, the antibody or antigen-binding fragment of the invention binds hIL-6R with an affinity at least 2-fold higher than it binds monkey IL-6R. In more preferred embodiments, the antibody or antigen-binding fragment binds hIL-6R protein (SEQ ID NO:1) with an affinity that is up to about 3-fold higher relative to its binding to monkey IL-6R (*Macaca fascicularis* extracellular domain shown in SEQ ID NO:251).

[0005] In one embodiment, the antibody or antigen-binding portion of the antibody of the invention comprises a heavy chain variable region (HCVR) selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, 227, 19, 231, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 239, 241, 163, 179, 235, 195 and 211, or substantially similar sequence thereof. In a more specific embodiment, the antibody or antigen-binding fragment thereof further comprises a light chain variable region (LCVR) selected from the group consisting of SEQ ID NO: 11, 229, 27, 233, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 237, 203 and 219, or a substantially similar sequence thereof. In specific

7

embodiments, the antibody or antigen-binding fragment thereof comprise HCVR/LCVR pairs selected from the group consisting of SEQ ID NO:3/11; 227/229; 19/27; 231/233; 35/43; 51/59; 67/75; 83/91; 99/107; 115/123; 131/139; 147/155; 239/155; 241/155; 163/171; 179/187; 235/237; 195/203; and 211/219, or substantially similar sequences thereof.

[0006] In a second aspect, the invention provides isolated nucleic acid molecules that encode an antibody or antigen-binding fragment of an antibody of the invention. In one embodiment, the nucleic acid molecule of the invention encodes an antibody or fragment thereof comprising an HCVR as described above. In specific embodiments, the nucleic acid molecule encoding the HCVR is selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 226, 18, 230, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 238, 240, 162, 178, 234, 194 and 210, or a substantially identical sequence thereof. In a related aspect, the invention provides an isolated nucleic acid molecule encoding an LCVR as described above. In specific embodiments, the nucleic acid molecule encoding the LCVR is a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 10, 228, 26, 232, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 236, 202 and 218, or a substantially identical sequence thereof.

[0007] In a third aspect, the invention features an antibody or antigen-binding fragment, comprising a heavy chain complementary determining region 3 (CDR3) domain and a light chain CDR3 domain, wherein

the heavy chain CDR3 domain comprises an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19}$ (SEQ ID NO:247) wherein $X^1 = \text{Ala}$, $X^2 = \text{Lys}$, $X^3 = \text{Gly}$, $X^4 = \text{Arg}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Ser or Ala}$, $X^7 = \text{Phe}$, $X^8 = \text{Asp}$, $X^9 = \text{Ile}$, $X^{10} = \text{Pro or absent}$, $X^{11} = \text{Phe or absent}$, $X^{12} = \text{Val or absent}$, $X^{13} = \text{Tyr or absent}$, $X^{14} = \text{Tyr or absent}$, $X^{15} = \text{Tyr or absent}$, $X^{16} = \text{Gly or absent}$, $X^{17} = \text{Met or absent}$, $X^{18} = \text{Asp or absent}$, and $X^{19} = \text{Val or absent}$; and

the light chain CDR3 domain comprises an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO:250) wherein $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln or His}$, $X^3 = \text{Ala}$, $X^4 = \text{Asn or Tyr}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$, $X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Pro}$, and $X^9 = \text{Thr}$.

[0008] In a more specific embodiment, the antibody or antigen-binding fragment further comprises

a heavy chain CDR1 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:245) wherein $X^1 = \text{Gly or Arg}$, $X^2 = \text{Phe}$, $X^3 = \text{Thr}$, $X^4 = \text{Phe}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Asp}$, $X^7 = \text{Tyr}$, and $X^8 = \text{Ala}$;

a heavy chain CDR2 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:246) wherein $X^1 = \text{Ile or Val}$, $X^2 = \text{Ser}$, $X^3 = \text{Trp}$, $X^4 = \text{Asn}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Gly}$, $X^7 = \text{Ser}$, and $X^8 = \text{Ile}$;

a light chain CDR1 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:248), wherein $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gly}$, $X^3 = \text{Ile}$, $X^4 = \text{Ser}$, $X^5 = \text{Ser}$, and $X^6 = \text{Trp}$; and

8

a light chain CDR2 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO:249), wherein X^1 = Gly or Ala, X^2 = Ala, and X^3 = Ser.

[0009] In a fourth aspect, the invention features an antibody or antigen-binding fragment, comprising:

a heavy chain CDR3 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 25, 153, 9, 185, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 169, 201 and 217; and

a light chain CDR3 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO:33, 161, 17, 193, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 177, 209 and 225.

[0010] In a more specific embodiment, the antibody or antigen-binding fragment further comprises:

a heavy chain CDR1 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 21, 149, 5, 181, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 165, 197, and 213;

a heavy chain CDR2 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, 151, 7, 183, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 167, 199 and 215;

a light chain CDR1 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 29, 157, 13, 189, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 173, 205 and 221; and

a light chain CDR2 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 31, 159, 15, 191, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 175, 207 and 223.**

[0011] In specific embodiments, the antigen or antigen-binding fragment comprises heavy chain CDR sequences SEQ ID NO:21, 23, 25 and light chain CDR sequences SEQ ID NO:29, 31, 33; heavy chain CDR sequences SEQ ID NO:149, 151, 153 and light chain CDR sequences SEQ ID NO:157, 159, 161; heavy chain CDR sequences SEQ ID NO:5, 7, 9 and light chain SEQ ID NO: 13, 15, 17; and heavy chain CDR sequences SEQ ID NO: 181, 183, 185 and light chain CDR sequences SEQ ID NO:189, 191, 193.

[0012] In a fifth aspect, the invention features isolated nucleic acid molecules encoding an antibody or antigen-binding fragments of the invention, wherein the antibody or fragment thereof comprises

a heavy chain CDR3 domain encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:24, 152, 8, 184, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 168, 200 and 216; and

a light chain CDR3 domain encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:32, 160, 16, 192, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 176, 208 and 224; as well as substantially identical nucleic acid sequences thereof.

[0013] In a more specific embodiment, isolated nucleic acid molecules are provided encoding an antibody or antigen-binding fragment of the invention, wherein the antibody or fragment thereof comprises

a heavy chain CDR1 encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 20, 148, 4, 180, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 164, 196 and 212;

a heavy chain CDR2 domain encoded by a nucleotide sequence selected from the group

9

consisting of SEQ ID NO: 22, 150, 6, 182, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 166, 198 and 214;

a light chain CDR1 domain encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 28, 156, 12, 188, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 172, 204 and 220; and

a light chain CDR2 domain encoded by a nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO: 30, 158, 14, 190, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 174, 206 and 222; as well as substantially identical nucleic acid sequences thereof.

[0014] The invention encompasses anti-hIL-6R antibodies or antigen-binding fragments thereof having a modified glycosylation pattern. In some applications, modification to remove undesirable glycosylation sites may be useful, or an antibody lacking a fucose moiety on an oligosaccharide chain, for example, to increase antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (see Shield et al. (2002) JBC 277:26733). In other applications, modification of a galactosylation can be made in order to modify complement-dependent cytotoxicity (CDC).

[0015] In further aspects, the invention provides recombinant expression vectors carrying the nucleic acid molecules of the invention, and host cells into which such vectors have been introduced, as are methods of making the antibodies or antigen-binding fragments of the invention obtained by culturing the host cells of the invention. The host cell may be a prokaryotic or eukaryotic cell, preferably the host cell is an *E. coli* cell or a mammalian cell, such as a CHO cell.

[0016] In a further aspect, the invention features a pharmaceutical composition comprising a human antibody or antigen-binding fragment of an antibody which specifically binds hIL-6R and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0017] In further aspects, the invention features methods for inhibiting human IL-6 activity using an antibody, or antigen-binding portion thereof, of the invention. In one embodiment, the invention encompasses a therapeutic method comprising administering an antibody of the invention, or a fragment thereof, to a human subject suffering from a disorder which is treated or ameliorated by inhibition of IL-6 activity. The disorder can be, for example, arthritis, including chronic rheumatoid arthritis; inflammatory bowel diseases, including Crohn's disease and ulcerative colitis; systemic lupus erythematosus; and inflammatory diseases.

[0018] In further aspects, the invention provides the use of an antibody or antigen-binding fragment of an antibody as defined above in the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an IL-6-mediated disease or disorder in a human. In a related aspect, the invention provides an antibody or antigen-binding fragment of an antibody as defined above for use in the attenuation or inhibition of an IL-6-mediated disease or disorder in a human.

[0019] Other objects and advantages will become apparent from a review of the ensuing detailed description.

DETAILED DESCRIPTION

[0020] Before the present methods are described, it is to be understood that this invention is not limited to particular methods and experimental conditions described, as such methods and

10

conditions may vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments only, and is not intended to be limiting, since the scope of the present invention will be limited only by the appended claims.

[0021] Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Although any methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention, the preferred methods and materials are now described.

[0022] The term "human IL6R" (hIL-6R), as used herein, is intended to refer to a human cytokine receptor that specifically binds interleukin-6 (IL-6). The extracellular domain of hIL-6R is shown in SEQ ID NO:1.

[0023] The term "antibody", as used herein, is intended to refer to immunoglobulin molecules comprising four polypeptide chains, two heavy (H) chains and two light (L) chains interconnected by disulfide bonds. Each heavy chain comprises a heavy chain variable region (abbreviated herein as HCVR or VH) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region comprises three domains, CH1, CH2 and CH3. Each light chain comprises a light chain variable region (abbreviated herein as LCVR or VL) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain (CL1). The VH and VL regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementary determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each VH and VL is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

[0024] The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion" or "antibody fragment"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (e.g., hIL-6R). 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 VL, VH, CL1 and CH1 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 VH and CH1 domains; (iv) a Fv fragment consisting of the VL and VH domains of a single arm of an antibody; (v) a dAb fragment (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), which consists of a VH domain; and (vi) an isolated complementary determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, VL and VH, 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 contiguous chain in which the VL and VH regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); see e.g., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). 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 (see e.g., Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448).

[0025] A "neutralizing" or "blocking" antibody, as used herein, is intended to refer to an antibody whose binding to hIL-6R results in inhibition of the biological activity of hIL-6. This inhibition of the biological activity of hIL-6 can be assessed by measuring one or more indicators of hIL-6 biological activity known to the art, such as hIL-6-induced cellular activation and hIL-6 binding to hIL-6R (see examples below).

[0026] A "CDR" or complementary determining region is a region of hypervariability interspersed within regions that are more conserved, termed "framework regions" (FR). In different embodiments of the anti-hIL-6R antibody or fragment of the invention, the FRs may be identical to the human germline sequences, or may be naturally or artificially modified. A group of CDRs may be defined as an amino acid consensus sequence; for example, in one embodiment, the anti-hIL-6R antibody or antigen-binding fragment of the invention may be described as comprising a heavy chain CDR3 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19}$ (SEQ ID NO:247) wherein $X^1 = \text{Ala}$, $X^2 = \text{Lys}$, $X^3 = \text{Gly}$, $X^4 = \text{Arg}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Ser or Ala}$, $X^7 = \text{Phe}$, $X^8 = \text{Asp}$, $X^9 = \text{Ile}$, $X^{10} = \text{Pro or absent}$, $X^{11} = \text{Phe or absent}$, $X^{12} = \text{Val or absent}$, $X^{13} = \text{Tyr or absent}$, $X^{14} = \text{Tyr or absent}$, $X^{15} = \text{Tyr or absent}$, $X^{16} = \text{Gly or absent}$, $X^{17} = \text{Met or absent}$, $X^{18} = \text{Asp or absent}$, and $X^{19} = \text{Val or absent}$; and a light chain CDR3 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO:250) wherein $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln or His}$, $X^3 = \text{Ala}$, $X^4 = \text{Asn or Tyr}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$, $X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Pro}$, and $X^9 = \text{Thr}$.

[0027] The term "surface plasmon resonance", as used herein, refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIAcore™ system (Pharmacia Biosensor AB).

[0028] The term "epitope" is an antigenic determinant that interacts with a specific antigen binding site in the variable region of an antibody molecule known as a paratope. A single antigen may have more than one epitope. Epitopes may be either conformational or linear. A conformational epitope is produced by spatially juxtaposed amino acids from different segments of the linear polypeptide chain. A linear epitope is one produced by adjacent amino acid residues in a polypeptide chain. In certain circumstances, an epitope may include moieties of saccharides, phosphoryl groups, or sulfonyl groups on the antigen.

[0029] The term "substantial identity" or "substantially identical," when referring to a nucleic acid or fragment thereof, indicates 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 95%, and more preferably at least about 96%.

12

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 below.

[0030] As applied to polypeptides, the term "substantial similarity" or "substantially similar" means that two peptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 95% sequence identity, even more preferably at least 98% or 99% sequence identity. Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions. A "conservative amino acid substitution" is one in which 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 or degree of similarity 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. See, e.g., Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. 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: aspartate and glutamate, and 7) sulfur-containing side chains are cysteine and methionine. Preferred conservative amino acids substitution groups are: valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamate-aspartate, and asparagine-glutamine. Alternatively, a conservative replacement is any change having a positive value in the PAM250 log-likelihood matrix disclosed in Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45. A "moderately conservative" replacement is any change having a nonnegative value in the PAM250 log-likelihood matrix.

[0031] Sequence similarity for polypeptides, which is also referred to as sequence identity, is typically measured using sequence analysis software. Protein analysis software matches similar sequences using measures of similarity assigned to various substitutions, deletions and other modifications, including conservative amino acid substitutions. For instance, GCG software contains programs such as Gap and Bestfit which can be used with default parameters 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 a mutant thereof. See, e.g., GCG Version 6.1. Polypeptide sequences also can be compared using FASTA using default or recommended parameters, a program in 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 (2000) *supra*). Another preferred algorithm when comparing a sequence of the invention to a database

12

containing a large number of sequences from different organisms is the computer program BLAST, especially blastp or tblastn, using default parameters. See, e.g., Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 and Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402.

Preparation of Human Antibodies

[0032] Methods for generating human antibodies include, for example, VelocImmune™ (Regeneron Pharmaceuticals), XenoMouse™ technology (Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21; Abgenix), the "minilocus" approach, and phage display (and see, for example, US 5,545,807, US 6,787,637). The VelocImmune™ technology (US 6, 596,541) encompasses a method of generating a high specificity fully human antibody to a select antigen. This technology involves generation of a transgenic mouse having a genome comprising human heavy and light chain variable regions operably linked to endogenous mouse constant region loci such that the mouse produces an antibody comprising a human variable region and a mouse constant region in response to antigenic stimulation. The DNA encoding the variable regions of the heavy and light chains of the antibody are isolated and operably linked to DNA encoding the human heavy and light chain constant regions. The DNA is then expressed in a cell capable of expressing the fully human antibody. In specific embodiment, the cell is a CHO cell.

[0033] Antibodies may be therapeutically useful in blocking a ligand-receptor interaction or inhibiting receptor component interaction, rather than by killing cells through fixation of complement (complement-dependent cytotoxicity)(CDC) and participation antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The constant region of an antibody is important in the ability of an antibody to fix complement and mediate cell-dependent cytotoxicity. Thus, the isotype of an antibody may be selected on the basis of whether it is desirable for the antibody to mediate cytotoxicity.

[0034] Human immunoglobulins can exist in two forms that are associated with hinge heterogeneity. In one form, an immunoglobulin molecule comprises a stable four chain construct of approximately 150-160 kDa in which the dimers are held together by an interchain heavy chain disulfide bond. In a second form, the dimers are not linked via interchain disulfide bonds and a molecule of about 75-80 kDa is formed composed of a covalently coupled light and heavy chain (half-antibody). These forms have been extremely difficult to separate, even after affinity purification. The frequency of appearance of the second form in various intact IgG isotypes is due to, but not limited to, structural differences associated with the hinge region isotype of the antibody. In fact, a single amino acid substitution in the hinge region of the human IgG4 hinge can significantly reduce the appearance of the second form (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) to levels typically observed using a human IgG1 hinge. The instant invention encompasses antibodies having one or more mutations in the hinge, CH2 or CH3 region which may be desirable, for example, in production, to improve the yield of the

14

desired antibody form.

[0035] Antibodies of the invention are preferably prepared with the use of VelocImmune™ technology. A transgenic mouse in which the endogenous immunoglobulin heavy and light chain variable regions are replaced with the corresponding human variable regions is challenged with the antigen of interest, and lymphatic cells (such as B-cells) are recovered from the mice that express antibodies. The lymphatic cells may be fused with a myeloma cell line to prepare immortal hybridoma cell lines, and such hybridoma cell lines are screened and selected to identify hybridoma cell lines that produce antibodies specific to the antigen of interest. DNA encoding the variable regions of the heavy chain and light chain may be isolated and linked to desirable isotypic constant regions of the heavy chain and light chain. Such an antibody protein may be produced in a cell, such as a CHO cell. Alternatively, DNA encoding the antigen-specific chimeric antibodies or the variable domains of the light and heavy chains may be isolated directly from antigen-specific lymphocytes.

[0036] In one embodiment, the transgenic mouse comprises up to 18 functional human variable heavy chain genes and 12 functional human variable kappa light chain genes. In another embodiment, the transgenic mouse comprises up to 39 human variable heavy chain genes and 30 human variable kappa light chain genes. In yet another embodiment, the transgenic mouse comprises up to 80 human variable heavy chain genes and 40 human variable kappa light chain genes.

[0037] In general, the antibodies of the instant invention possess very high affinities, typically possessing K_D s of from about 10^{-9} through about 10^{-12} M, when measured by binding to antigen either immobilized on solid phase or in solution phase.

[0038] Initially, high affinity chimeric antibodies are isolated having a human variable region and a mouse constant region. As described below, the antibodies are characterized and selected for desirable characteristics, including binding affinity to hIL-6R, ability to block hIL-6, and/or selectivity for the human protein. The mouse constant regions are replaced with a desired human constant region to generate the fully human antibody of the invention, for example wild-type or modified IgG4 or IgG1 (for example, SEQ ID NO:242, 243, 244). While the constant region selected may vary according to specific use, high affinity antigen-binding and target specificity characteristics reside in the variable region.

Epitope Mapping and Related Technologies

[0039] To screen for antibodies which bind to a particular epitope, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988 Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane, eds., can be performed. Other methods include alanine scanning mutants, peptide blots (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), or peptide cleavage analysis as described in the examples below. In addition, methods such as epitope excision, epitope extraction and chemical modification of antigens can be employed (Tomer (2000)

15

Protein Science: 9: 487-496).

[0040] Modification-Assisted Profiling (MAP), also known as Antigen Structure-based Antibody Profiling (ASAP) is a method that categorizes large numbers of monoclonal antibodies (mAbs) directed against the same antigen according to the similarities of the binding profile of each antibody to chemically or enzymatically modified antigen surfaces (US Patent Application Publication No. 2004/0101920). Each category may reflect a unique epitope either distinctly different from or partially overlapping with an epitope represented by another category. This technology allows rapid filtering of genetically identical antibodies, such that characterization can be focused on genetically distinct antibodies. When applied to hybridoma screening, MAP may facilitate identification of rare hybridoma clones with desired characteristics. MAP may be used to sort the hIL-6R antibodies of the invention into groups of antibodies binding different epitopes.

[0041] Agents useful for altering the structure of the immobilized antigen are enzymes, such as, for example proteolytic enzymes and chemical agents. The antigen protein may be immobilized on either biosensor chip surfaces or polystyrene beads. The latter can be processed with, for example, an assay such as a multiplex Luminex™ detection assay (Luminex Corp., TX). Because of the capacity of Luminex™ to handle multiplex analysis with up to 100 different types of beads, Luminex™ provides almost unlimited antigen surfaces with various modifications, resulting in improved resolution in antibody epitope profiling over a biosensor assay.

Therapeutic Administration and Formulations

[0042] The administration of therapeutic entities in accordance with the invention will be administered with suitable carriers, excipients, and other agents that are incorporated into formulations to provide improved transfer, delivery, tolerance, and the like. A multitude of appropriate formulations can be found in the formulary known to all pharmaceutical chemists: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1975), particularly Chapter 87 by Blaug, Seymour, therein. These formulations include, for example, powders, pastes, ointments, jellies, waxes, oils, lipids, lipid (cationic or anionic) containing vesicles (such as Lipofectin™), DNA conjugates, anhydrous absorption pastes, oil-in-water and water-in-oil emulsions, emulsions carbowax (polyethylene glycols of various molecular weights), semi-solid gels, and semi-solid mixtures containing carbowax. Any of the foregoing mixtures may be appropriate in treatments and therapies in accordance with the present invention, provided that the active ingredient in the formulation is not inactivated by the formulation and the formulation is physiologically compatible and tolerable with the route of administration. See also Powell et al. PDA (1998) J Pharm Sci Technol. 52:238-311 and the citations therein for additional information related to excipients and carriers well known to pharmaceutical chemists.

16

EXAMPLES

[0043] The following examples are put forth so as to provide those of ordinary skill in the art with a complete disclosure and description of how to make and use the methods and compositions of the invention, and are not intended to limit the scope of what the inventors regard as their invention. Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (e.g., amounts, temperature, etc.) but some experimental errors and deviations should be accounted for. Unless indicated otherwise, parts are parts by weight, molecular weight is average molecular weight, temperature is in degrees Centigrade, and pressure is at or near atmospheric.

Example 1. Generation of Human Antibodies to Human IL-6 Receptor.

[0044] Immunization of rodents can be done by any methods known in the art (see, for example, Harlow and Lane (1988) *supra*; Malik and Lillehoj, Antibody techniques: Academic Press, 1994, CA). In a preferred embodiment, hIL-6R antigen is administered directly to mice which comprise DNA loci encoding both human Ig heavy chain variable region and Kappa light chain variable region (VelocImmune™, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; US 6,596,541), with an adjuvant to stimulate the immune response. Such an adjuvant includes complete and incomplete Freund's adjuvant, MPL+TDM adjuvant system (Sigma), or RIBI (muramyl dipeptides) (see O'Hagan, Vaccine Adjuvant, by Human Press, 2000, NJ). Such an adjuvant can prevent rapid dispersal of polypeptide by sequestering the antigen in a local depot, and may contain factors that can stimulate host immune response. In one embodiment, hIL-6R is administered indirectly as DNA plasmid that contains hIL-6R gene and expresses hIL-6R using the host cellular protein expression machinery to produce antigen polypeptide *in vivo*. In both approaches, the immunization schedule requires several administrations spaced by a few weeks. The antibody immune response is monitored by standard antigen-specific immunoassay. When animals reached their maximum immune response, the antibody expressing B cells were harvested and fused with mouse myeloma cells to preserve their viability, forming hybridoma cells. To select functionally desirable monoclonal antibodies, conditioned media of the hybridoma cells or transfected cells were screened for specificity, antigen-binding affinity, and potency in blocking hIL-6 binding to hIL-6R (described below).

Example 2. Anti-hIL6R antibodies generated via direct isolation of splenocytes

[0045] DNA encoding VH and VL domains may be isolated directly from a single antigen positive B cell. Briefly, the hIL-6R α immunized transgenic mouse was terminated and splenocytes were harvested. Red blood cells were removed by lysis followed by pelleting the harvested splenocytes. Resuspended splenocytes were first incubated with a cocktail of human IgG, FITC-anti-mFc, and biotin-IL6Ra for 1 hour. The stained cells were washed twice with PBS, then stained with a cocktail of human and rat IgG, APC-anti-mIgM, and SA-PE for one hour. The

17

stained cells were washed once with PBS and were analyzed by flow cytometry on a MoFlo (Cytomation). Each IgG positive, IgM negative, and antigen positive B cell was sorted and plated into a separate well on a 96-well plate. RT-PCR of antibody genes from these B cells was performed according to a method described by Wang et al. (2000) (J Immunol Methods 244:217-225). Briefly, cDNAs for each single B cell were synthesized via RT-PCR. Each resulting RT product was then split and transferred into two corresponding wells on two 96-well plates. One set of the resulting RT products was first amplified by PCR using a 5' degenerate primer specific for human IgG heavy chain variable region leader sequence and a 3' primer specific for mouse heavy chain constant region, to form an amplicon. The amplicon was then amplified again by PCR using a 5' degenerate primer set specific for framework 1 of human IgG heavy chain variable region sequence and a nested 3' primer specific for mouse heavy chain constant region. The other set of the resulting RT products was first amplified by PCR using a 5' degenerate primer specific for human kappa light chain variable region leader sequence and a 3' primer specific for mouse kappa light chain constant region to form an amplicon. The amplicon was then amplified again by PCR using a 5' degenerate primer set specific for framework 1 of human kappa light chain variable region sequence and a nested 3' primer specific for mouse kappa light chain constant region. The heavy chain and light chain PCR products were cloned into Sap I-linearized antibody vectors containing IgG1 heavy chain constant region and kappa light chain constant region, respectively. The heavy chain plasmid has a lox2272 site and a lox511 site flanking the heavy chain expression cassettes. In addition, immediately downstream of the lox2272 in the heavy chain plasmid there is a hygromycin-resistance gene that lacks a promoter and an initiating ATG. The hygromycin-resistance gene is also transcriptionally linked to a downstream eGFP gene via an IRES sequence. The light chain plasmid has a loxP site and lox2272 site flanking the light chain expression cassette. In addition, The light chain plasmid has a SV40 promoter immediately before an ATG at the lox2272 site, such that upon integration into an appropriate host cell the lox2272-proximal SV40 promoter and initiating ATG from the light chain plasmid is brought adjacent to the hygromycin-resistance gene in the heavy chain plasmid in the proper reading frame to allow transcription and translation of the hygromycin-resistance and eGFP genes. Purified recombinant plasmids having a heavy chain variable region sequence and plasmids having a light chain variable region sequence from the same B cell were then combined and transfected, together with a plasmid that expresses the Cre recombinase, into a modified CHO host cell line. The modified CHO host cell line contains, from 5' to 3', a loxP site, an eCFP, a lox2272 site, DsRed, and a lox511 site at a transcriptionally active locus. Consequently, the host CHO cell can be isolated by flow cytometry as a blue-positive, red-positive, and green-negative cell. When recombinant plasmids expressing heavy chain and light chain genes are transfected together with a plasmid expressing the Cre recombinase, site-specific recombination mediated by the Cre recombinase results in the integration of the antibody plasmids at the chromosomal locus containing the lox

sites and replacement of the eCFP and DsRed genes. Recombinants can then be isolated as blue-negative, red-negative, and green-positive cells by flow cytometry. Accordingly, CHO cells transfected with recombinant plasmids having a heavy chain variable region sequence and plasmids having a light chain variable region sequence from the same B cell were sorted by flow cytometry, and proper recombinants that show the blue-negative, red-negative, and green-positive phenotype were isolated, and stable recombinant antibody-expressing CHO cell lines were established from isolated clones.

Example 3. Antigen Binding Affinity Determination

[0046] The K_D of the antigen binding to the selected antibodies described above were determined by surface kinetics on a real-time biosensor surface plasmon resonance assay (BIAcore™). More specifically, the affinity of the antibodies for human IL-6R was measured using a BIAcore® 2000 or BIAcore® 3000. The antibody was captured on an anti-mouse IgG surface and exposed to various concentrations of recombinant hIL-6R protein either in monomeric or dimeric form. Kinetic analysis using BIAevaluation™ software was performed to obtain the association and dissociation rate constants.

[0047] Binding affinities of the antibodies to hIL-6R was also measured for either hybridoma-conditioned media or purified proteins by plate-based competition immunoassay. The antibody proteins were purified using Protein G affinity chromatography from hybridoma cell conditioning medium that was bovine IgG-depleted (Invitrogen). For the competition ELISA, briefly, constant amounts of antibody at different levels were premixed with serial dilutions of antigen protein, hIL-6R-hFc, ranging from 0 to 10 µg/ml, and incubated for two hours at room temperature to reach pseudo-binding equilibrium between the antibody and antigen. These solutions were then transferred to 96-well hIL-6R-hFc pre-coated plates to allow the free-antibody in the mixtures to bind to plate-coated hIL-6R-hFc. The plates were typically coated with 1 to 2 µg/ml hIL-6R-hFc protein in PBS solution overnight at 4°C followed by BSA nonspecific blocking. After washing off excess antibody in solution, plate-bound antibodies were detected with an HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA polyclonal antibody reagent and developed using either colorimetric or chemiluminescence substrates. The dependency of the signals on the concentrations of antigen in solution was analyzed with a 4-parameter fit analysis using Prism™ software (Graph Pad) and reported as IC_{50} . Competition immunoassay were also carried out using steady state solution phase Kinexa™ instrument (Sapidyne Inc.).

[0048] Results are shown in Table 1 (control: humanized monoclonal antibody to human IL-6R (U.S. Patent No. 5,817,790 SEQ ID NO:89 and 71). Antibody (HCVR and LCVR amino acid sequences): VQ8A9-6 (3, 11); VQ8F11-21 (19, 27); VV7G4-1 (35, 43); VV7G4-10 (51, 59) VV6C10-1 (67, 75); VV6C10-3 (83, 91); VV6C10-4 (99, 107); VV6F12-11 (115, 123); VV9A6-11 (131, 139); VV6A9-5 (147, 155); VV3D8-4 (163, 171); VV1G4-7 (179, 187); 248982-13-1-E5 (195, 203); 248982-13-2-A9 (211, 219). Monomer and dimer K_D determined by BIAcore™;

79

solution K_D by Kinexa™; IC_{50} by ELISA assays (n.d. = not determined).

Table 1. Antigen Binding Affinity

Antibody	K_D Monomer (nM)	K_D Dimer (nM)	Solution K_D Monomer (nM)	ELISA IC_{50} Dimer (nM)
VQ8A9-6	0.222	0.101	0.120	0.004
VQ8F11-21	0.067	0.023	0.009	0.008
VV3D8-4	2.410	0.172	1.910	0.013
VV6A9-5	0.097	0.146	0.032	0.005
VV1G4-7	0.225	0.070	0.197	0.041
VV6C10-1	0.267	0.032	2.050	0.010
VV6F12-11	n.d.	n.d.	n.d.	0.033
VV7G4-10	n.d.	n.d.	n.d.	1.980
VV9A6-11	n.d.	n.d.	n.d.	0.347
VV6C10-3	n.d.	n.d.	n.d.	0.009
248982-13-1-E5	0.987	0.785	n.d.	0.360
248982-13-2-A9	2.870	n.d.	n.d.	0.054
Control	1.790	n.d.	1.960	n.d.

Example 4. Neutralization of hIL-6 Activity

[0049] hIL-6 blocking activities of the anti-hIL-6R antibodies of the invention were screened by hIL-6 blocking immunoassays, *in vitro* hIL-6 dependent cell growth bioassays, and surface plasmon resonance (BIAcore™). The Immunoassay was used to screen ability of the tested antibody to block hIL-6 binding to hIL-6R, and the *in vitro* bioassay was used to determine the potency of the antibodies in neutralizing hIL-6R-mediated cellular signal transduction.

[0050] For the immunoassay, hIL-6 recombinant protein was coated on a 96-well plate in PBS buffer overnight at 4°C. This plate was used to capture free hIL-6R-hFc from antibody sample solutions, and the amount of captured hIL-6R-hFc was quantified according to the standard curve. The sample solutions were composed of a constant amount of hIL-6R-hFc recombinant protein (100 pM) and varying amounts of antibody, either in crude hybridoma condition medium or as purified antibody protein, ranging from 0 to about 50 nM in serial dilutions. The antibody-antigen mixtures were incubated at room temperature for ~2 hours to allow antibody-antigen binding to reach equilibrium. The equilibrated sample solutions were then transferred to the hIL-6 coated plates for measurement of free hIL-6R-hFc. After 1 hour binding, the plate was washed and bound hIL-6R-hFc was detected using HRP-conjugated goat anti-hFc polyclonal antibodies (Jackson Immuno Research), and developed using TMB substrate (BD Pharmingen). IC_{50} s were determined as the amount of antibody required to reduce 50% of IL-6R-hFc detectable to plate bound hIL-6 ligand. Results are shown in the first column of Table 2.

[0051] Additionally, the ability of the test antibody to block hIL-6 binding to the hIL-6R receptor was determined using surface plasmon resonance. Purified antigen hIL-6R-hFc molecules were captured by goat anti-human IgG polyclonal antibodies immobilized on CM-5 surface through amine coupling to a density of 250 RU. hIL-6 solution (0.25ml, 50 nM) was injected over the receptor surface and bound hIL-6 recorded (first injection of IL-6). Bound hIL-6 was then removed with a pulse of 3 M MgCl₂ following by conditioning buffer. Anti-hIL6R antibody in hybridoma conditioned medium was injected over the captured receptor surface followed by second injection of hIL-6. The percent reduction in hIL-6 binding resulting from preformed antibody and receptor complex was used as a score to define hIL-6 blockers from non-blockers (second column, Table 2).

Table 2. Neutralization of hIL-6 Binding

Antibody	hIL6R/hIL6 Binding Inhibition IC ₅₀ (nM)	hIL6/hIL6R Binding Inhibition (%)	XG-1 cell proliferation Inhibition IC ₅₀ (nM)	HepG2/Stat3 Luciferase activity IC ₅₀ (nM)
VQ8A9-6	0.39	68	0.40	0.097
VQ8F11-21	0.12	98	0.62	0.135
VV3D8-4	0.61	93	>100	n.d.
VV6A9-5	0.35	100	1.10	0.188
VV1G4-7	1.10	34	1.80	0.578
VV6C10-1	4.60	61	>6.90	n.d.
VV6F12-11	2.20	n.d.	n.d.	n.d.
VV7G4-10	13.00	n.d.	n.d.	n.d.
VV9A6-11	0.50	n.d.	n.d.	n.d.
VV6C10-3	0.06	n.d.	n.d.	n.d.
Control	2.20	91	1.50	0.854

[0052] The ability of hIL-6R antibodies to block hIL-6 activity *in vitro* was measured in the hIL-6-dependent myeloma line XG-1. XG-1 cells maintained in hIL-6-containing medium were washed twice with hIL-6-free media and cultured for ~24 hours in hIL-6-free medium to deplete residual hIL-6. The starved cells were then spun down and re-suspended in the medium at 4 x 10⁵ cells per ml and plated 20,000 cells per well in a 96-well tissue culture plate. The purified antibody proteins were serially diluted in medium and added to the plated cells at concentrations ranging from 0 to 50 nM. Subsequently, recombinant hIL-6 was added to the wells to a final concentration of 8 pM. Cells were allowed to grow for ~72 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. At the end of growth period, live cells were measured using CCK-8 kit (Dojindo, Japan). IC₅₀s were determined as described above, and reported in the third column of Table 2.

[0053] The ability of hIL-6R antibodies to block hIL-6 activity was also measured *in vitro* in the

21

hIL-6-responsive human hepatoma cell line, HepG2. HepG2 cells were transfected with a reporter plasmid containing a STAT3 (Signal Transducer and activator of Transcription 3) response element linked to a luciferase gene. The transfected cells were trypsinized, spun down and re-suspended in the medium at approximately 2.5×10^5 cells per ml and plated at 20,000 cells per well in a 96-well tissue culture plate. The purified antibody proteins were serially diluted in medium and added to the plated cells at concentrations ranging from 0 to 100 nM. Subsequently, recombinant hIL-6 was added to the wells to a final concentration of 50 pM. The response was measured after incubating the cells for 6 hours at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator. Luciferase activity was measured with the Steady-Glo™ luciferase assay system (Promega). IC₅₀s were determined as described above, and reported in the fourth column of Table 2.

Example 5. Binding Epitope Diversity

[0054] An antibody binding competition immunoassay was performed using as a control humanized antibody to human IL-6R. Briefly, a 96-well immunosorbent plate was coated with 20 ng per well hIL-6R recombinant protein overnight at 4°C. After blocking non-specific binding with BSA, the hIL-6R binding sites on one half of the plate were saturated with binding of the control antibody by addition of 500 ng of the control per well, and to the other half of the plate was added binding buffer only. After three hours binding at room temperature, the purified antibodies were spiked in at a final concentration of 50 ng/ml with and without the preexisting control antibody in the well. After one hour of additional binding, the free antibody was washed away and the plate-bound antibody was detected with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or IgA, polyclonal antibody and the plate was developed using chromatic HRP substrates and absorbance at 450 nm was recorded. Percentage deductions of the binding of the anti-hIL6R antibodies by the presence of the control antibody are listed in Table 3 below. A similar experiment was conducted using surface plasmon resonance technology (Table 3). Both methods generated consistent results. Antibodies VQ8F11, VV3D8, VV6A9, VV6C10-1 bound epitopes overlapping with the control antibody; while antibodies VQ8A9, VV1G4, VV6F12, VV7G4, VV9A6, and VV6C10-3 appeared to bind distinct epitopes as antigen binding was not blocked by the control antibody. Partial competition may result from steric hindrance from the first antibody bound, even though epitopes may not be overlapping.

Table 3. Competition of Antigen Binding with Control Antibody

Antibody	BlAcore™ (% reduction)	Immunoassay (% reduction)
VQ8A9-6	28	3
VQ8F11-21	96	79
VV3D8-4	97	84

VV6A9-5	96	84
VV1G4-7	12	3
VV6C10-1	90	80
VV6F12-11	n.d.	3
VV7G4-10	n.d.	26
VV9A6-11	n.d.	18
VV6C10-3	n.d.	1

Example 6. Cross-species Binding Property

[0055] Four antibodies were tested for cross-reactivity to monkey IL-6R recombinant protein using BIAcore™ technology. Briefly, a biosensor chip on which goat anti-mouse Fc polyclonal antibody was immobilized was used to present anti-hIL-6R monoclonal antibodies to a density of about 75 RU. Recombinant human or monkey monomeric IL-6R protein (*Macaca fascicularis*, extracellular domain; SEQ ID NO:251), at a concentration range between 1.25 – 40 nM, was injected over the antibody surface. The binding of the receptor to the antibody and the dissociation of the bound complex were monitored in real-time. Both association rate constant (ka) and dissociate rate constant (kd) were obtained, and K_D calculated (Table 4).

Table 4. Comparison of Binding Affinity to Human and Monkey IL-6R

Antibody	Antigen	ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	kd (S ⁻¹)	K _D (nM)
Control	Human IL6R	1.74E+05	1.67E-04	0.963
	Monkey IL6R	1.44E+05	1.68E-04	1.170
VQ8F11-21	Human IL6R	8.51E+05	4.38E-05	0.051
	monkey IL6R	3.39E+05	4.86E-05	0.143
VV1G4-7	Human IL6R	2.57E+05	6.18E-05	0.240
	monkey IL6R	no binding		
VV6A9-5	Human IL6R	5.18E+05	8.41E-05	0.162
	monkey IL6R	5.00E+05	7.70E-05	0.154
VQ8A9-6	Human IL6R	7.32E+05	2.76E-04	0.377
	monkey IL6R	7.31E+05	4.16E-04	0.569

[0056] Among the four tested antibodies, VQ8F11, VV6A9, and VQ8A9 strongly reacted to monkey receptor with K_D values that differed by up to about 1.5- to about 3-fold from human receptor binding, respectively. VV1G4, which was not blocked by the control antibody (Table 3), showed no binding to monkey receptor despite strong binding to the human receptor with K_D of 241 pM.

23

Example 7. Effect of Constant Region on Binding Affinity

[0057] The binding affinity to monomeric hIL-6R of four antibodies having mouse IgG, human IgG1 or human IgG4 (wild-type and modified) were determined using BIAcore™ as described above except a goat anti-human Fc polyclonal antibody surface was used to capture hIgG antibodies. Monomeric hIL-6R was injected at concentrations of 12.5, 6.25, 3.12, and 1.56 nM. The ability of the antibodies to neutralize hIL-6-dependent HepG2/STAT3 signal transduction was also determined in a luciferase assay (IC₅₀). IC₅₀s for different IgG isotypes were similar, suggesting no effect of isotype on antibody affinity for antigen.

Table 5. Comparison of IgG Isotypes

Antibody	IgG	ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	kd (S ⁻¹)	K _D (nM)	IC ₅₀ (nM)
VQ8F11-21	hIgG1	6.22E+05	4.54E-05	0.073	0.150
	hIgG4	7.17E+05	5.22E-05	0.073	0.228
	mIgG2a	7.86E+05	5.27E-05	0.067	0.135
	modhIgG4	8.81E+05	4.705E-05	0.053	0.249
VQ8A9-6	hIgG1	1.09E+06	2.60E-04	0.238	0.130
	hIgG4	1.17E+06	2.35E-04	0.201	0.185
	mIgG1	9.95E+05	2.21E-04	0.222	0.097
VV6A9-5	hIgG1	7.12E+05	8.87E-05	0.125	0.204
	hIgG4	5.67E+05	7.64E-05	0.135	0.343
	mIgG2a	7.72E+05	7.52E-05	0.097	0.188
VQ1G4-21	hIgG1	3.34E+05	7.92E-05	0.237	0.767
	hIgG4	2.73E+05	9.18E-05	0.336	0.528
	mIgG2a	3.41E+05	7.66E-05	0.225	0.578

24

Claims:

1. An antibody or antigen-binding fragment thereof, which specifically binds human interleukin-6 receptor (hIL-6R) with a K_D of about 500 pM or less, and 300 pM or less, as measured by surface plasmon resonance.

2. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 1 which binds hIL-6R with an affinity at least 2-fold higher relative to its binding to monkey IL-6R.

3. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 1 or 2, comprising a heavy chain complementary determining region 3 (CDR3) domain and a light chain CDR3 domain, wherein the heavy chain CDR3 domain comprises an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19}$ (SEQ ID NO:247) wherein $X^1 = \text{Ala}$, $X^2 = \text{Lys}$, $X^3 = \text{Gly}$, $X^4 = \text{Arg}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Ser or Ala}$, $X^7 = \text{Phe}$, $X^8 = \text{Asp}$, $X^9 = \text{Ile}$, $X^{10} = \text{Pro or absent}$, $X^{11} = \text{Phe or absent}$, $X^{12} = \text{Val or absent}$, $X^{13} = \text{Tyr or absent}$, $X^{14} = \text{Tyr or absent}$, $X^{15} = \text{Tyr or absent}$, $X^{16} = \text{Gly or absent}$, $X^{17} = \text{Met or absent}$, $X^{18} = \text{Asp or absent}$, and $X^{19} = \text{Val or absent}$; and

the light chain CDR3 domain comprises an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO:250) wherein $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln or His}$, $X^3 = \text{Ala}$, $X^4 = \text{Asn or Tyr}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$, $X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Pro}$, and $X^9 = \text{Thr}$.

4. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 3, further comprising

a heavy chain CDR1 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:245) wherein $X^1 = \text{Gly or Arg}$, $X^2 = \text{Phe}$, $X^3 = \text{Thr}$, $X^4 = \text{Phe}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Asp}$, $X^7 = \text{Tyr}$, and $X^8 = \text{Ala}$;

a heavy chain CDR2 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:246) wherein $X^1 = \text{Ile or Val}$, $X^2 = \text{Ser}$, $X^3 = \text{Trp}$, $X^4 = \text{Asn}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Gly}$, $X^7 = \text{Ser}$, and $X^8 = \text{Ile}$;

a light chain CDR1 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:248), wherein $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gly}$, $X^3 = \text{Ile}$, $X^4 = \text{Ser}$, $X^5 = \text{Ser}$, and $X^6 = \text{Trp}$; and

a light chain CDR2 domain comprising an amino acid sequence of the formula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO:249), wherein $X^1 = \text{Gly or Ala}$, $X^2 = \text{Ala}$, and $X^3 = \text{Ser}$.

5. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 1 or 2, comprising:

a heavy chain CDR3 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 25, 153, 9, 185, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 169, 201 and 217; and

a light chain CDR3 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO:33, 161, 17, 193, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 177, 209 and 225.

25

6. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 5, further comprises:
- a heavy chain CDR1 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 21, 149, 5, 181, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 165, 197, and 213;
 - a heavy chain CDR2 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 23, 151, 7, 183, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 167, 199 and 215;
 - a light chain CDR1 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 29, 157, 13, 189, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 173, 205 and 221; and
 - a light chain CDR2 domain selected from the group consisting of SEQ ID NO: 31, 159, 15, 191, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 175, 207 and 223.
7. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 5 or 6, wherein the heavy chain CDRs and the light chain CDRs comprise
- SEQ ID NO:21, 23, 25 and SEQ ID NO:29, 31, 33;
 - SEQ ID NO:149, 151, 153 and SEQ ID NO:157, 159, 161;
 - SEQ ID NO:5, 7, 9 and SEQ ID NO: 13, 15, 17; and
 - SEQ ID NO: 181, 183, 185 and SEQ ID NO:189, 191, 193, respectively.
8. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 1 or 2, comprising
- a heavy chain variable region (HCVR) selected from the group consisting of SEQ ID NO:19, 147, 3, 179, 227, 231, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 239, 241, 163, 235, 195 and 211; and
 - a light chain variable region (LCVR) selected from the group consisting of SEQ ID NO: 27, 155, 11, 187, 229, 233, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 171, 237, 203 and 219.
9. An antibody or antigen-binding fragment according to claim 8, comprising HCVR/LCVR pairs selected from the group consisting of SEQ ID NO: 19/27; 147/155; 3/11; 179/187; 227/229; 231/233; 35/43; 51/59; 67/75; 83/91; 99/107; 115/123; 131/139; 239/155; 241/155; 163/171; 235/237; 195/203 and 211/219.
10. An isolated nucleic acid molecule encoding an antibody or antigen-binding fragment according to any one of the preceding claims.
11. A vector comprising the nucleotide sequence according to claim 10.
12. A host-vector system for the production of an antibody or antigen-binding fragment of an antibody which specifically binds human IL-6 receptor, comprising a vector according to claim 11, in a suitable host cell.

26

13. A host-vector system according to claim 12, wherein the host cell is a prokaryotic or eukaryotic cell selected from one of an *E. coli* or a CHO cell.
14. A method for producing an anti-IL-6R antibody or antigen-binding fragment thereof, comprising growing cells of a host-vector system according to claim 12 or 13 under conditions permitting production of the antibody or fragment thereof and recovering the antibody or fragment so produced.
15. Use of an antibody or antigen-binding fragment of an antibody according to any one of claims 1 to 9 in the manufacture of a medicament for use to attenuate or inhibit an IL-6-mediated disease or disorder in a human.
16. An antibody or antigen-binding fragment of an antibody according to any one of claims 1 to 9 for use in the attenuation or inhibition of an IL-6-mediated disease or disorder in a human.
17. A pharmaceutical composition comprising an antibody or antigen-binding fragment of an antibody according to any one of claims 1 to 9 and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.
18. A method of attenuating or inhibiting an IL-6-mediated disease or disorder in a human patient, the method comprising administering an effective amount of an antibody or antigen-binding fragment of an antibody according to any one of claims 1 to 9 to a human patient.
19. A method according to claim 18, wherein the IL-6-mediated disease or disorder is arthritis, such as chronic rheumatoid arthritis; an inflammatory bowel disease, such as Crohn's disease or ulcerative colitis; or systemic erythematosis.

ANTICUERPOS DE ALTA AFINIDAD PARA EL RECEPTOR IL-6 HUMANO

Declaración de la Técnica Relacionada

5 **[0001]** La interleuquina-6 (IL-6) es una citoquina pleiotrópica producida por las células inmunes y no inmunes que juega un papel crucial en la regulación de la respuesta inmune, las reacciones de fase aguda, y la hematopoiesis. Ésta se une a la membrana soluble y de la célula unida al IL-6R (cadena α) formando un complejo binario y este complejo es capaz de interactuar con la membrana de la

10 célula unida al gp130 (cadena β), induce la formación de complejo de señalización que comprende dos cada uno de IL-6, IL-6, IL-6R, y gp130.

[0002] Los anticuerpos del hIL-6R se describen en la US 5,670,373, 5,795,965, 5,817,790, 6,410,691, y EP 409 607B1. Los métodos terapéuticos se describen en

15 la US 5,888,510 y 6,723,319.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0003] En un primer aspecto, la invención suministra anticuerpos humanos,

20 preferiblemente anticuerpos humanos recombinantes, que se unen específicamente al receptor de la interleuquina-6 humana (hIL-6R). Estos anticuerpos se caracterizan por unirse al hIL-6R con alta afinidad y lenta cinéticas de disociación y por la capacidad de neutralizar la actividad IL-6. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o

25 pueden comprender solamente una porción de la unión de antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv), y se puede modificar para efectuar la funcionalidad, por ejemplo, para eliminar las funciones efectoras residuales

(Reddy et al. (2000) J. Immunol. 164:1925-1933). En una modalidad preferida, la invención suministra un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de éste, que se une al receptor IL-6 humano (SEQ ID NO:1) con un K_D de aproximadamente 500 pM o menos, medido mediante resonancia de plasmón de superficie. En una
5 modalidad más específica, el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno tienen un K_D de menos de 300 pM, o menos de 200 pM, o aún menos de 100 pM. En varias modalidades el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno de éste bloquea la actividad hIL-6 con un IC_{50} de 250 pM o menos, medido mediante bioensayo de luciferasa. En modalidades más específicas, el anticuerpo o el
10 fragmento de unión de antígeno de éste exhibe un IC_{50} de 150 pM o menos.

[0004] En aspectos relacionados, el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno de la invención se une al IL-6 con una afinidad por lo menos 2 veces mayor de la que éste se une al IL-6R de mono. En modalidades más preferidas, el
15 anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno se une a la proteína hIL-6R (SEQ ID NO:1) con una afinidad que es de hasta aproximadamente 3 veces mayor con relación a su unión al IL-6R de mono (dominio extracelular de *Macaca fascicularis* mostrado en la SEQ ID NO:251).

[0005] En una modalidad, el anticuerpo o la porción de unión de antígeno del anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:3, 227, 19, 231, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 239, 241, 163, 179, 235, 195 y 211, o una secuencia sustancialmente similar de éstas. En una modalidad más específica, el anticuerpo
20 o el fragmento de unión de antígeno de éste comprende además una región variable de cadena ligera (LCVR) seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 11, 229, 27, 233, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 237, 203 y

219, o una secuencia sustancialmente similar de éstas. En modalidades específicas, el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno de éste comprenden los pares HCVR/LCVR seleccionados del grupo que consiste de la SEQ ID NO:3/11; 227/229; 19/27; 231/233; 35/43; 51/59; 67/75; 83/91; 99/107;
5 115/123; 131/139; 147/155; 239/155; 241/155; 163/171; 179/187; 235/237; 195/203; y 211/219, o secuencias sustancialmente similares de éstas.

[0006] En un segundo aspecto, la invención suministra moléculas de ácido nucleico aislado que codifican un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno
10 de un anticuerpo de la invención. En una modalidad, la molécula de ácido nucleico de la invención codifica un anticuerpo o fragmento de éste que comprende un HCVR como se describió anteriormente. En modalidades específicas, la molécula de ácido nucleico que codifica el HCVR se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO:2, 226, 18, 230, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 238, 240, 162, 178,
15 234, 194 y 210, o una secuencia sustancialmente idéntica de éstas. En un aspecto relacionado, la invención suministra una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el LCVR como se describió anteriormente. En modalidades específicas, la molécula de ácido nucleico que codifica el LCVR es una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 10, 228, 26, 232, 42, 58,
20 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 236, 202 y 218, o una secuencia sustancialmente idéntica de éstas.

[0007] En un tercer aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno, que comprende un dominio de la región 3
25 determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3) y un dominio CDR3 de cadena ligera, en donde

el dominio CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19}$ (SEQ ID NO:247) en donde $X^1 = \text{Ala}$, $X^2 = \text{Lys}$, $X^3 = \text{Gly}$, $X^4 = \text{Arg}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Ser o Ala}$, $X^7 = \text{Phe}$, $X^8 = \text{Asp}$, $X^9 = \text{Ile}$, $X^{10} = \text{Pro}$ o ausente, $X^{11} = \text{Phe}$ o ausente, $X^{12} = \text{Val}$ o ausente, $X^{13} = \text{Tyr}$ o ausente, $X^{14} = \text{Tyr}$ o ausente, $X^{15} = \text{Tyr}$ o ausente, $X^{16} = \text{Gly}$ o ausente, $X^{17} = \text{Met}$ o ausente, $X^{18} = \text{Asp}$ o ausente, y $X^{19} = \text{Val}$ o ausente; y

el dominio CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO:250) en donde $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln}$ o His , $X^3 = \text{Ala}$, $X^4 = \text{Asn}$ o Tyr , $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$, $X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Pro}$, y $X^9 = \text{Thr}$.

[0008] En una modalidad más específica, el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno comprende además

un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:245) en donde $X^1 = \text{Gly}$ o Arg , $X^2 = \text{Phe}$, $X^3 = \text{Thr}$, $X^4 = \text{Phe}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Asp}$, $X^7 = \text{Tyr}$, y $X^8 = \text{Ala}$;

un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:246) en donde $X^1 = \text{Ile}$ o Val , $X^2 = \text{Ser}$, $X^3 = \text{Trp}$, $X^4 = \text{Asn}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Gly}$, $X^7 = \text{Ser}$, y $X^8 = \text{Ile}$;

un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:248) en donde $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gly}$, $X^3 = \text{Ile}$, $X^4 = \text{Ser}$, $X^5 = \text{Ser}$, y $X^6 = \text{Trp}$; y

5 un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO:249) en donde $X^1 = \text{Gly}$ o Ala , $X^2 = \text{Ala}$, y $X^3 = \text{Ser}$.

[0009] En un cuarto aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo o un
10 fragmento de unión de antígeno, que comprende:

Un dominio CDR3 de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:25, 153, 9, 185, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 169, 201 y 217; y

15 Un dominio CDR3 de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:33, 161, 17, 193, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 177, 209 y 225.

[0010] En una modalidad más específica, el anticuerpo o el fragmento de unión de antígeno comprende además:

20

Un dominio CDR1 de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:21, 149, 5, 181, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 165, 197, y 213;

25 Un dominio CDR2 de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:23, 151, 7, 183, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 167, 199 y 215;

Un dominio CDR1 de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:29, 157, 13, 189, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 173, 205, y 221; y

Un dominio CDR2 de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de
5 la SEQ ID NO:31, 159, 15, 191, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 175, 207 y 223.**

[0011] En modalidades específicas, el antígeno o el fragmento de unión de antígeno comprende las secuencias CDR de cadena pesada SEQ ID NO:21, 23, 25 y las secuencias CDR de cadena ligera SEQ ID NO:29, 31, 33; las secuencias
10 CDR de cadena pesada SEQ ID NO:149, 151, 153 y las secuencias CDR de cadena ligera SEQ ID NO:157, 159, 161; las secuencias CDR de cadena pesada SEQ ID NO:5, 7, 9 y las secuencias CDR de cadena ligera SEQ ID NO:13, 15, 17; y las secuencias CDR de cadena pesada SEQ ID NO:181, 183, 185 y las secuencias CDR de cadena ligera SEQ ID NO:189, 191, 193.

15

[0012] En un quinto aspecto, la invención caracteriza moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo o fragmentos de unión de antígeno de la invención, en donde el anticuerpo o fragmento de éste comprende

20 Un dominio CDR3 de cadena pesada codificado por una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:24, 152, 8, 184, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 168, 200 y 216; y

Un dominio CDR3 de cadena ligera codificado por una secuencia de
25 nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:32, 160, 16, 192, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 176, 208 y 224; así como también las secuencias de ácido nucleico sustancialmente idénticas a ésta.

32

[0013] En una modalidad más específica, las moléculas de ácido nucleico aisladas se suministran las cuales codifican un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de la invención, en donde el anticuerpo o el fragmento de éste
5 comprende

Un dominio CDR1 de cadena pesada codificado por una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:20, 148, 4, 180, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 164, 196, y 212;
10

Un dominio CDR2 de cadena pesada codificado por una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:22, 150, 6, 182, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 166, 198 y 214;

15 Un dominio CDR1 de cadena ligera codificado por una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:28, 156, 12, 188, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 172, 204, y 220; y

Un dominio CDR2 de cadena ligera codificado por una secuencia de
20 nucleótido seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:30, 158, 14, 190, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 174, 206 y 222; así como también secuencias de ácido nucleico sustancialmente idénticas a éstas.

[0014] La invención comprende anticuerpos anti-hIL-6R o fragmentos de unión
25 de antígeno de éstos que tienen un patrón de glucosilación modificado. En algunas aplicaciones, la modificación para remover los sitios de glucosilación indeseables puede ser útil, o un anticuerpo al que le falta un grupo funcional

fucosa o una cadena de oligosacárido, por ejemplo, para incrementar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) (ver Shield et al. (2002) JBC 277:26733). En otras aplicaciones, la modificación de una galactosilación se puede hacer con el fin de modificar la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

[0015] En aspectos adicionales, la invención suministra vectores de expresión recombinante que llevan las moléculas de ácido nucleico de la invención, y células huéspedes en las cuales tales se han introducido tales vectores, como son los métodos para elaborar los anticuerpos o los fragmentos de unión de antígeno de la invención obtenidos al cultivar las células huéspedes de la invención. La célula huésped puede ser una célula procariótica o eucariótica, preferiblemente la célula huésped es una célula de *E. coli* o una célula de mamífero, tal como la célula CHO.

15

[0016] En un aspecto adicional, la invención caracteriza una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humano o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo que se une específicamente al hIL-6R y a un portador farmacéuticamente aceptable.

20

[0017] En aspectos adicionales, la invención caracteriza métodos para inhibir la actividad del IL-6 humano utilizando un anticuerpo, o una porción de unión de antígeno de éste, de la invención. en una modalidad, la invención comprende un método terapéutico que comprende administrar un anticuerpo de la invención, o un fragmento de éste, a un sujeto humano que sufre de un trastorno que se trata o se mejora mediante la inhibición de la actividad IL-6- El trastorno puede ser, por ejemplo, artritis, incluyendo artritis reumatoide crónica; enfermedades inflamatorias

25

del intestino, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa; el lupus sistémico eritematoso; y enfermedades inflamatorias.

[0018] En aspectos adicionales, la invención suministra el uso de un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo como se definió anteriormente en la elaboración de un medicamento con uso para atenuar o inhibir una enfermedad o un trastorno mediados por IL-6 en un humano. En un aspecto relacionado, la invención suministra un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo como se definió anteriormente para el uso en la atenuación o inhibición de una enfermedad o trastorno mediado por IL-6 en un humano.

[0019] Otros objetivos y ventajas serán evidentes de una revisión de la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0020] Antes de que se describan los presentes métodos, se debe entender que esta invención no se limita a métodos particulares y a las condiciones experimentales descritas, en razón a que tales métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada aquí es con el propósito de describir solamente modalidades particulares, y no pretende ser limitante, en razón a que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones finales.

[0021] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tiene los mismos significados que se entienden

comúnmente por un experto en la técnica al cual corresponde esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente de aquellos descritos aquí se puede utilizar en la práctica o para ensayar la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora.

5

[0022] El término "IL6R humano" (hIL-6R), como se utiliza aquí, se refiere a un receptor de citoquina humano que se une específicamente a la interleuquina-6 (IL-6). El dominio extracelular del hIL-6R se muestra en la SEQ ID NO:1.

10 **[0023]** El término "anticuerpo", como se utiliza aquí, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas a enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La
15 región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está comprendida de un dominio (CL1). Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad,
20 denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intermezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de estructura (FR). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el terminal amino al terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

25

[0024] El término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se utiliza

aquí, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hIL-6R). Se ha mostrado que la función de unión del antígeno de un anticuerpo se puede desarrollar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de los

5 fragmentos de unión comprendidos por el término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo incluye (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL1 y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados a un puente disulfuro en la región pivote; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH

10 y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento de dAb (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, ellos se pueden unir,

15 utilizando métodos recombinantes, por el ligador sintético que les posibilita ser hechos como una cadena contigua única en la cual los pares de las regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocidas como cadena única Fv (scFv; ver, por ejemplo, Brid et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena única también

20 pueden pretender estar comprendidos dentro del término "porción de unión de antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como los diacuerpos, también están comprendidos (ver, por ejemplo, Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448).

25 **[0025]** Un anticuerpo "neutralizante" o "bloqueante", como se utiliza aquí, pretende referirse a un anticuerpo cuya unión al hIL-6R da como resultado la inhibición de la actividad biológica del hIL-6. Esta inhibición de la actividad

biológica del hIL-6 se puede evaluar al medir uno o más indicadores de la actividad biológica hIL-6 conocida en la técnica, tal como la activación celular inducida por hIL-6 y el hIL-6 que se une al hIL-6R (ver ejemplos adelante).

- 5 [0026] Un "CDR" o una región determinante de complementariedad es una región de hipervariabilidad intermezclada con regiones que son más conservadas, denominadas "regiones de estructura" (FR). En diferentes modalidades del anticuerpo anti-IL-6R o fragmento de la invención, los FR pueden ser idénticos a las secuencias de línea germinal humana, o pueden ser naturalmente o
- 10 artificialmente modificados. Un grupo de CDR se puede definir como una secuencia de consenso del amino ácido; por ejemplo, en una modalidad, el anticuerpo anti-hIL-6R o fragmento de unión de antígeno de la invención se puede describir como el que comprende un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6$
- 15 $- X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19}$ (SEQ ID NO:247) en donde $X^1 = \text{Ala}$, $X^2 = \text{Lys}$, $X^3 = \text{Gly}$, $X^4 = \text{Arg}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Ser o Ala}$, $X^7 = \text{Phe}$, $X^8 = \text{Asp}$, $X^9 = \text{Ile}$, $X^{10} = \text{Pro o ausente}$, $X^{11} = \text{Phe o ausente}$, $X^{12} = \text{Val o ausente}$, $X^{13} = \text{Tyr o ausente}$, $X^{14} = \text{Tyr o ausente}$, $X^{15} = \text{Tyr o ausente}$, $X^{16} = \text{Gly o ausente}$, $X^{17} = \text{Met o ausente}$, $X^{18} = \text{Asp o ausente}$, y $X^{19} = \text{Val o ausente}$; y un
- 20 dominio CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID NO:250) en donde $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln o His}$, $X^3 = \text{Ala}$, $X^4 = \text{Asn o Tyr}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$, $X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Pro}$, y $X^9 = \text{Thr}$.

- 25 [0027] El término "resonancia de plasmón de superficie", como se utiliza aquí, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteína

dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, utilizando el sistema BIAcore™ (Pharmacia Biosensor AB).

[0028] El término "epítopo" es un determinante antigénico que interactúa con un sitio de unión de antígeno específico en la región variable de una molécula de anticuerpo conocido como paratopo. Un antígeno único puede tener más de un epítopo. Los epítopos pueden ser conformacionales o lineales. Un epítopo conformacional se produce al yuxtaponer espacialmente los amino ácidos de diferentes segmentos de la cadena de polipéptido lineal. Un epítopo lineal es aquel producido por residuos de amino ácido adyacentes en una cadena de polipéptido. En ciertas circunstancias, un epítopo puede incluir grupos funcionales de sacáridos, grupos fosforilo, o grupos sulfonilo sobre el antígeno.

[0029] El término "identidad sustancial" o "sustancialmente idénticos", cuando se refiere al ácido nucleico o al fragmento de éste, indica que, cuando se alinea óptimamente con las inserciones o supresiones de nucleótido apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de nucleótido de por lo menos aproximadamente el 95%, y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 96%, 97%, 98%, 99% de las bases del nucleótido, medidas mediante cualquier algoritmo bien conocido de identidad de secuencia, tal como el FASTA, BLAST o Gap, como se discute adelante.

[0030] Como se aplicó a los polipéptidos, el término "similitud sustancial" o "sustancialmente similar" significa que dos secuencias de péptido, cuando se alinean óptimamente, tal como mediante los programas Gap o BESTFIT utilizando pesos de espacios por defecto, comparten por lo menos 95% de la identidad de secuencia, aún más preferiblemente por lo menos 98% o 99% de identidad de

secuencia. Preferiblemente, las posiciones del residuo que no son idénticas difieren de la sustituciones de amino ácido conservadoras. Una "sustitución de amino ácido conservadora" es aquella en la cual un residuo de amino ácido se sustituye por otro residuo de amino ácido que tiene una cadena lateral (grupo R)

5 con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de amino ácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos donde dos o más secuencias de amino ácido difieren una de la otra por sustituciones conservadoras, la identidad de la secuencia porcentual o el grado de similitud se

10 puede ajustar hacia arriba para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para hacer los ajustes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331. Ejemplos de grupos de amino ácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina,

15 alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadenas laterales de hidroxilo alifáticas: serina y teonina; 3) cadenas laterales que contienen amida: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: aspartato y glutamato, y 7) cadenas laterales que contienen azufre son cisteína y

20 metionina. Los grupos de sustitución de amino ácidos conservadores preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina. Alternativamente, un reemplazo conservador es cualquier cambio que tenga un valor positivo en la matriz de probabilidad del log PAM250 descrita en Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443

25 45. Un reemplazo "moderadamente conservador" es cualquier cambio que tenga un valor no negativo en la matriz de probabilidad del log PAM250.

40

[0031] La similitud de secuencia para polipéptidos, que también se denomina como identidad de secuencia, se mide típicamente utilizando un software de análisis de secuencia. El software de análisis de proteína hace coincidir las secuencias similares utilizando medidas de similitud asignadas a varias sustituciones, supresiones y otras modificaciones, que incluyen sustituciones de amino ácido conservadoras. Por ejemplo, el software GCG contiene programas tales como el Gap y el Bestfit que se pueden utilizar con parámetros por defecto para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre los polipéptidos cercanamente relacionados, tales como los polipéptidos homólogos de especies diferentes de organismos o entre una proteína tipo silvestre y una luteína de ésta. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1. Las secuencias de polipéptido también se pueden comparar utilizando FASTA utilizando parámetros por defecto o recomendados, un programa en Versión GCG 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) suministra los alineamientos y la identidad de secuencia porcentual de las regiones del mejor traslazo entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson (2000) *supra*). Otro algoritmo preferido cuando se compara una secuencia de la invención con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa de computadora BLAST, especialmente blastp o tblastn, utilizando parámetros por defecto. Ver, por ejemplo, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403 410 y Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25:3389 402.

Preparación de los Anticuerpos Humanos

[0032] Los métodos para generar anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo VelocimmuneTM (Regeneron Pharmaceuticals), XenoMouseTM technology (Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21; Abgenix), la aproximación "minilocus" y el

41

despliegue de fago (y ver, por ejemplo, documentos US 5,545,807, US 6,787,637). La tecnología VelocimmuneTM (US 6,596,541) comprende un método para generar un anticuerpo completamente humano de alta especificidad a un antígeno seleccionado. Esta tecnología involucra la generación de un ratón transgénico que

5 tiene un genoma que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera humana ligados operablemente a los locus de la región constante de ratón endógenos de tal forma que el ratón produce un anticuerpo que comprende una región variable humana y una región constante de ratón en respuesta a la estimulación antigénica. El ADN que codifica las regiones variables de las cadenas

10 pesada y ligera del anticuerpo se aísla y está operablemente ligado a un ADN que codifica las regiones constantes de cadena pesada y ligera humanas. El ADN se expresa entonces en una célula capaz de expresar el anticuerpo completamente humano. En una modalidad específica, la célula es una célula CHO.

15 **[0033]** Los anticuerpos pueden ser terapéuticamente útiles para bloquear una interacción ligando-receptor, o inhibir la interacción del componente del receptor, en lugar de matar las células a través de la fijación del complemento (citotoxicidad dependiente de complemento) (CDC) y la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo de participación (ADCC). La región constante de un

20 anticuerpo es importante en la capacidad de un anticuerpo para fijar la citotoxicidad dependiente de célula de complemento y mediada. Así, el isotipo del anticuerpo se puede seleccionar sobre la base de si es deseable para el anticuerpo mediar la citotoxicidad.

25 **[0034]** Las inmunoglobulinas humanas pueden existir en dos formas que están asociadas con la heterogeneidad de pivote. En una forma, una molécula de inmunoglobulina comprende una construcción de cuatro cadenas estable de

u2

aproximadamente 150-160 kDa en la cual los dímeros se mantienen juntos mediante un enlace disulfuro de cadena pesada intercadena. En una segunda forma, los dímeros no están ligados por vía de los enlaces disulfuro intercadena y se forma una molécula de aproximadamente 75-80 kDa compuesta de una cadena ligera y pesada covalentemente acopladas (mitad de anticuerpo). Estas formas han sido extremadamente difíciles de separar, aún después de la purificación de afinidad. La frecuencia de aparición de la segunda forma en varios isotipos IgG intactos se debe a, pero no se limitan a, diferencias estructurales asociadas con el isotipo de la región pivote del anticuerpo. De hecho, una sustitución del amino ácido único en la región pivote del pivote IgG4 humano puede reducir significativamente la aparición de la segunda forma (Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30:105) a niveles típicamente observados utilizando un pivote IgG1 humano. La presente invención comprende anticuerpos que tienen una o más mutaciones en el pivote, región CH2 o CH3 las cuales pueden ser deseables, por ejemplo, en la producción, para mejorar el rendimiento de la forma de anticuerpo deseada.

[0035] Los anticuerpos de la invención se preparan preferiblemente con el uso de tecnología Velocimmune™. Un ratón transgénico en el cual las regiones variables de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena se reemplazan con las regiones variables humanas correspondientes se exponen con el antígeno de interés, y las células linfáticas (tales como las células B) están cubiertas de los ratones que expresan anticuerpos. Las células linfáticas se pueden fusionar con una línea celular de mieloma para preparar las líneas celulares de hibridoma inmortal, y tales líneas celulares de hibridoma se tamizan y seleccionan para identificar las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos específicos para el antígeno de interés. El ADN que codifica las regiones variables

de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden aislar y ligar a las regiones constantes isotípicas deseables de la cadena pesada y la cadena ligera. Tal proteína de anticuerpo se puede producir en una célula, tal como una célula CHO. Alternativamente, el ADN que codifica los anticuerpos quiméricos específicos de antígeno o los dominios variables de las cadenas ligera y pesada se puede aislar
5 directamente de los linfocitos específicos de antígeno.

[0036] En una modalidad, el ratón transgénico comprende hasta 18 genes humanos funcionales de cadena pesada variable y 12 genes humanos funcionales de cadena ligera kappa variable. En otra modalidad, el ratón transgénico
10 comprende hasta 39 genes humanos de cadena pesada variable y 30 genes humanos de cadena ligera kappa variable. En aún otra modalidad, el ratón transgénico comprende hasta 80 genes humanos de cadena pesada variable y 40 genes humanos de cadena ligera kappa variable.

15

[0037] En general, los anticuerpos de la presente invención poseen muy altas afinidades, típicamente poseen K_D s desde aproximadamente 10^{-9} hasta aproximadamente 10^{-12} M, cuando se miden al unir al antígeno inmovilizados sobre fase sólida o en fase de solución.

20

[0038] Inicialmente, los anticuerpos quiméricos de alta afinidad se aíslan teniendo una región variable humana y una región constante de ratón. Como se describe adelante, los anticuerpos se caracterizan y seleccionan por las características deseables, incluyendo la afinidad de unión al hIL-6R, la capacidad
25 de bloquear el hIL-6, y/o la selectividad por la proteína humana. Las regiones constantes de ratón se reemplazan con una región constante humana deseada para generar un anticuerpo completamente humano de la invención, por ejemplo

44

IgG4 o IgG1 modificado o de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO:242, 243, 244). Mientras que la región constante seleccionada puede variar de acuerdo con el uso específico, la unión de antígeno de alta afinidad y las características de especificidad objetivo residen en la región variable.

5

Mapeo del Epítipo y Tecnologías Relacionadas

[0039] Para seleccionar los anticuerpos que se unen a un epítipo particular, se pueden desarrollar un ensayo de bloque de cruce de rutina tal como aquel que se describe en *Antibodies: A Laboratory Manual* 1988 Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow y Lane, eds. Otros métodos incluyen mutantes de exploración de alanina, electrotransferencias de péptido (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63), o análisis de división de péptido como se describe en los ejemplos adelante. Además, se pueden emplear métodos tales como la escisión de epítipo, la extracción de epítipo y la modificación química de antígenos (Tomer (2000) *Protein Science*: 9: 487-496).

[0040] El Perfil Ayudado por Modificación (MAP), también conocido como Perfil de Anticuerpo con base en la Estructura de Antígeno (ASAP) es un método que categoriza grandes números de anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra el mismo antígeno de acuerdo con las similitudes del perfil de unión de cada anticuerpo a superficies de antígeno química o enzimáticamente modificadas (Publicación de la Solicitud de Patente US No. 2004/0101920). Cada categoría puede reflejar un epítipo único diferente de un traslapo parcial con un epítipo representado por otra categoría. Esta tecnología permite la rápida filtración de los anticuerpos genéticamente idénticos, de tal forma que la caracterización se puede enfocar en anticuerpos genéticamente distintos. Cuando se aplica a la selección

45

de hibridoma, el MAP puede facilitar la identificación de los clones de hibridoma raros con las características deseadas. El MAP se puede utilizar para seleccionar los anticuerpos hIL-6R de la invención en grupos de anticuerpos que se unen a diferentes epítopos.

5

[0041] Los agentes útiles para alterar la estructura del antígeno inmovilizado son enzimas, tales como, por ejemplo enzimas proteolíticas y agentes químicos. La proteína de antígeno se puede inmovilizar sobre superficies de chip biosensor o microesferas de poliestireno. El último se puede procesar con, por ejemplo, un
10 ensayo tal como un ensayo de detección Luminex™ multiplex (Luminex Corp., TX). En razón a la capacidad del Luminex™ para manejar los análisis múltiples con hasta 100 diferentes tipos de microesferas, el Luminex™ suministra casi superficies de antígeno ilimitadas con varias modificaciones, dando como resultado una resolución mejorada en el perfil del epítipo del anticuerpo sobre un
15 ensayo de biosensor.

Administración y Formulaciones Terapéuticas

[0042] La administración de entidades terapéuticas de acuerdo con la invención
20 se administrará con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en las formulaciones para suministrar transferencia, suministro, tolerancia mejoradas, y similares. Una multitud de formulaciones apropiadas se puede encontrar en la formulación conocida por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company,
25 Easton, Pa., 1975), particularmente el Capítulo 87 de Blaug, Seymour. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípido (catiónicas o aniónicas) (tal como

Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones de carbocera (polietilenglicoles de varios pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen carbocera. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada
5 en los tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre y cuando el ingrediente activo en la formulación no se active mediante la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la ruta de administración. Ver también Powell et al. PDA (1998) J Pharm Sci Technol. 52:238-311 y las citas de ésta para información adicional relacionada con los
10 excipientes y portadores bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

EJEMPLOS

[0043] Los siguientes ejemplos se establecen con el fin de suministrar a
15 aquellos expertos en la técnica una revelación y descripción completa de cómo hacer y utilizar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero algunos errores y desviaciones
20 experimentales se deben tener en cuenta. A menos que se indique otra cosa, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura es en grados Centígrados, y la presión está en o cerca de la atmosférica.

25 **Ejemplo 1. Generación de Anticuerpos Humanos al Receptor IL-6 Humano**

[0044] La inmunización de los roedores se puede hacer mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) *supra*; Malik y Lillehoj, *Antibody techniques*: Academic Press, 1994, CA). En una modalidad preferida, el antígeno hIL-6R se administra directamente a ratones que comprenden los locus de ADN que codifican tanto la región variable de cadena pesada Ig humana como la región variable de cadena ligera kappa (VelocimmuneTM, Regeneron Pharmaceuticals, Inc.; US 6,596,541), con un adyuvante para estimular la respuesta inmune. Tal adyuvante incluye el adyuvante de Freund completo e incompleto, el sistema adyuvante MPL+TDM (Sigma), o RIBI (muramil dipéptidos)(ver O'Hagan, *Vaccine Adjuvant*, by Human Press, 2000 NJ). Tal adyuvante puede evitar la dispersión rápida del polipéptido al secuestrar el antígeno en un depósito local, y puede contener factores que pueden estimular la respuesta inmune del huésped. En una modalidad, el hIL-6R se administra indirectamente como un plásmido de ADN que contiene el gen hIL-6R y expresa el hIL-6R utilizando la maquinaria de expresión de la proteína celular huésped para producir el polipéptido de antígeno *in vivo*. En ambas aproximaciones, la programación de inmunización requiere varias administraciones espaciadas por unas pocas semanas. La respuesta inmune del anticuerpo se monitorea por un inmunoensayo específico de antígeno estándar. Cuando los animales alcanzan su respuesta inmune máxima, el anticuerpo que expresa las células B se cosechó y fusionaron con células de mieloma de ratón para preservar su viabilidad, formando células de hibridoma. Para seleccionar los anticuerpos monoclonales funcionalmente deseables, el medio acondicionado de las células de hibridoma o las células transfectadas se seleccionó por especificidad, afinidad de unión de antígeno, y potencia para bloquear la unión hIL-6 a hIL-6R (descrita adelante).

Ejemplo 2. Anticuerpos anti-hIL-6R generados por vía del aislamiento directo de esplenocitos

[0045] Los dominios VH y VL que codifican el ADN se pueden aislar directamente de una célula B positiva de antígeno único. En resumen, el ratón transgénico inmunizado hIL-6R α se terminó y se cosecharon los esplenocitos. Las células sanguíneas rojas se removieron mediante lisis seguida por peletización de los esplenocitos cosechados. Los esplenocitos resuspendidos se incubaron primero con un coctel de IgG humano, FITC-anti-mFc, y biotin-IL6Ra durante 1 hora. Las células teñidas se cosecharon dos veces con PBS, luego se tiñeron con un coctel de IgG humano y de rata, APC-anti-mIgM, y SA-PE durante una hora. Las células teñidas se lavaron una vez con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo sobre un MoFlo (Citomación). Cada IgG positivo, IgM negativo, y célula B positiva de antígeno se seleccionó y se puso en placa en un pozo separado sobre una placa de 96 pozos. El RT-PCR de los genes de anticuerpo de estas células B se desarrolló de acuerdo con el método descrito en Wang et al. (2000)(J Immunol Methods 244:217-225). En resumen, los cADN para cada una de las células B se sintetizaron por vía de RT-PCR. Cada producto RT resultante se dividió y transfirió entonces en dos pozos correspondientes sobre las placas de 96 pozos. Un conjunto de los productos RT resultantes se amplificó primero mediante PCR utilizando un cebador degenerado 5' específico para la secuencia líder de la región variable de cadena pesada IgG humana y un cebador específico 3' para la región constante de cadena pesada de ratón, para formar un amplicón. El amplicón se amplificó entonces de nuevo mediante PCR utilizando un conjunto de cebador degenerado 5' específico para una estructura 1 de la secuencia de región variable de cadena pesada IgG humano y un cebador 3' en nicho para la región constante de cadena pesada de ratón. El otro conjunto de los productos RT

resultantes se amplificó primero mediante PCR utilizando un cebador degenerado 5' específico para la secuencia líder de la región variable de cadena ligera kappa humana y un cebador 3' específico para la región constante de cadena ligera kappa de ratón para formar un amplicón. El amplicón se amplificó entonces de nuevo mediante PCR utilizando un conjunto de cebador degenerado 5' específico para la estructura 1 de la secuencia de la región variable de cadena ligera kappa humana y un cebador 3' en nicho específico para la región constante de cadena ligera kappa de ratón. Los productos PCR de cadena pesada y de cadena ligera se clonaron en los vectores de anticuerpo linearizados Sap I que contienen la región constante de cadena pesada IgG1 y la región constante de cadena ligera kappa, respectivamente. El plásmido de cadena pesada tiene un sitio lox2272 y un sitio lox511 que flanquea los casetes de expresión de cadena pesada. Además, inmediatamente corriente abajo del lox2272 en el plásmido de cadena pesada existe un gen resistente a la higromicina al que le falta un promotor y un ATG de iniciación. El gen con resistencia a la higromicina también está transcripcionalmente ligado a un gen eGFP corriente abajo por vía de una secuencia IRES. El plásmido de cadena ligera tiene un sitio loxP y un sitio lox2272 que flanquea el casete de expresión de cadena ligera. Además, el plásmido de cadena ligera tiene un promotor SV40 inmediatamente antes del ATG en el sitio lox2272, de tal forma que luego de la integración en una célula huésped apropiada el promotor SV40 próximo al lox2272 y el ATG de iniciación del plásmido de cadena ligera son puestos en forma adyacente al gen con resistencia a higromicina en el plásmido de cadena pesada en la estructura de lectura adecuada para permitir la transcripción y traducción de los genes de resistencia a la higromicina y el eGFP. Los plásmidos recombinantes purificados que tienen una secuencia de región variable de cadena pesada y los plásmidos que tienen una secuencia de región variable de cadena ligera de la misma célula B se combinaron y transfectaron,

36

junto con un plásmido que expresa la recombinasa Cre, en la línea de célula huésped CHO modificada. La línea de célula huésped CHO modificada contiene, desde 5' a 3', un sitio loxP, un eCFP, un sitio lox2272, DsRed, y un sitio lox511 en un locus transcripcionalmente activo. Consecuentemente, la célula CHO huésped se puede aislar mediante citometría de flujo como una célula positiva azul, positiva roja, y negativa verde. Cuando los plásmidos recombinantes que expresan los genes de la cadena pesada y la cadena ligera se transfectan junto con un plásmido que expresa la recombinasa Cre, la recombinación específica de sitio mediada por la recombinasa Cre da como resultado la integración de los plásmidos de anticuerpo en el locus cromosomal que contiene los sitios lox y el reemplazo de los genes eCFP y DsRed. Los recombinantes se pueden aislar como células negativa azules, negativa rojas, y positivas verdes mediante citometría de flujo. De acuerdo con esto, las células CHO transfectadas con los plásmidos recombinantes que tienen una secuencia de la región variable de cadena pesada y los plásmidos que tienen una secuencia de la región variable de cadena ligera de la misma célula B se seleccionaron mediante citometría de flujo, y los recombinantes adecuados que muestran el fenotipo negativo azul, negativo rojo, y positivo verde se aislaron, y las líneas celulares CHO que expresa un anticuerpo recombinante estable se establecieron de los clones aislados.

20

Ejemplo 3. Determinación de Afinidad de la Unión de Antígeno

[0046] El K_D de la unión de antígeno a los anticuerpos seleccionados descritos anteriormente se determinó mediante cinéticas de superficie en un ensayo de resonancia de plasmón de superficie con biosensor en tiempo real (BIAcore™). Más específicamente, la afinidad de los anticuerpos para el IL-6R humano se midió utilizando un BIAcore® 2000 o un BIAcore® 3000. El anticuerpo se capturó

25

en una superficie IgG anti-ratón y expuesto a varias concentraciones de la proteína hIL-6R recombinante en forma monomérica o dimerica. Los análisis cinéticos que utilizan el software de BIAevaluationTM se desarrollaron para obtener las constantes de tasas de asociación y disociación.

5

[0047] Las afinidades de unión de los anticuerpos al hIL-6R también se midió para cualquier medio acondicionado con hibridoma o proteínas purificadas mediante inmunoensayo de competición basado en placa. Las proteínas de anticuerpo se purificaron utilizando la cromatografía de afinidad de Proteína G desde el medio de acondicionamiento de célula de hibridoma que fue despojado de IgG bovino (Invitrogen). Para la ELISA de competición, en resumen, cantidades constantes de anticuerpo a diferentes niveles se premezclaron con diluciones en serie de proteína de antígeno, hIL-6R-hFc, que varían de 0 a 10 µg/ml, y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente para alcanzar equilibrio de pseudo unión entre el anticuerpo y el antígeno. Estas soluciones se transfirieron luego a placas pre-recubiertas con hIL-6R-hFc de 96 pozos para permitirle al anticuerpo libre en las mezclas unirse a al hIL-6R-hFc recubierto en la placa. Las placas se recubrieron típicamente con 1 a 2 µg/ml de proteína hIL-6R-hFc en solución PBS durante toda la noche a 4°C seguido por un bloqueo no específico de BSA. Después de lavar el exceso de anticuerpo en solución, los anticuerpos unidos a placa se detectaron con un reactivo de anticuerpo policlonal IgG o IgA de anti-ratón de cabra conjugado a HRP y se desarrolló utilizando sustratos colorimétricos y o de quimioluminiscencia. La dependencia de las señales sobre las concentraciones del antígeno en solución se analizaron con un análisis de ajuste de 4 parámetros utilizando un software PrismTM (Graph Pad) y se reportaron como IC₅₀. El inmunoensayo de competición también se llevó a cabo utilizando un instrumento KinexaTM con fase de solución de estado constante (Sapidyne Inc.).

10

15

20

25

[0048] Los resultados se muestran en la Tabla 1 (control: anticuerpo monoclonal humanizado a IL-6R humano (Patente U.S. No. 5,817,790 SEQ ID NO:69 y 71). Anticuerpo (secuencias de amino ácido HCVR y LCVR): VQ8A9 (3-11); VQ8F11-21 (19, 27); VV7G4-1 (35, 43); VV7G4-10 (51, 59) VV6C10-1 (67, 75); VV6C10-3 (83, 91); VV6C10-14 (99, 107); VV6F12-11 (115, 123); VV9A6-11 (131, 139); VV6A9-5 (147, 155); VV3D8-4 (163, 171); VV1G4-7 (179, 187); 248982-13-1-E5 (195, 203); 248982-13-2-A9 (211, 219). El K_D del monómero y el dímero se determinaron mediante BIAcore™, el K_D de solución mediante Kinexa™, el IC_{50} mediante ensayos ELISA (n.d. = no determinado).

Tabla 1. Afinidad de Unión de Antígeno

Anticuerpo	K_D de Monómero (nM)	K_D de Dímero (nM)	Solución K_D de Monómero (nM)	ELISA IC_{50} Dímero (nM)
VQ8A9-6	0.222	0.101	0.120	0.004
VQ8F11-21	0.087	0.023	0.009	0.008
VV3D8-4	2.410	0.172	1.910	0.013
VV6A9-5	0.097	0.146	0.032	0.005
VV1G4-7	0.225	0.070	0.197	0.041
VV6C10-1	0.267	0.032	2.050	0.010
VV6F12-11	n.d.	n.d.	n.d.	0.033
VV7G4-10	n.d.	n.d.	n.d.	1.980
VV9A6-11	n.d.	n.d.	n.d.	0.347
VV6C10-3	n.d.	n.d.	n.d.	0.009
248982-13-1-E5	0.987	0.785	n.d.	0.360
248982-13-2-A9	2.870	n.d.	n.d.	0.054
Control	1.790	n.d.	1960	n.d.

Ejemplo 4. Neutralización de la Actividad hIL-6

[0049] Las actividades de bloqueo hIL-6 de los anticuerpos anti-hIL-6R de la invención se seleccionaron mediante inmunoensayos de bloqueo hIL-6.

bioensayos de crecimiento celular dependiente de hIL-6 *in vitro*, y resonancia de plasmón de superficie (BIAcore™). El inmunoensayo se utilizó para seleccionar la capacidad del anticuerpo probado a bloquear la unión del hIL-6 al hIL-6R, y el bioensayo *in vitro* se utilizó para determinar la potencia de los anticuerpos para neutralizar la transducción de señal celular mediada por hIL-6R neutralizante.

[0050] Para el inmunoensayo, la proteína recombinante hIL-6 se recubrió sobre una placa de 96 pozos en un amortiguador PBS durante toda la noche a 4°C. Esta placa se utilizó para capturar hIL-6R-hFc libre de las soluciones de muestra de anticuerpo, y la cantidad de hIL-6R-hFc capturado se cuantificó de acuerdo a la curva estándar. Las soluciones de muestra estuvieron compuestas de una cantidad constante de la proteína recombinante hIL-6R-hFc (100 pM) y cantidades variables de anticuerpo, en un medio de condición de hibridoma crudo o como una proteína de anticuerpo purificada, que varía desde 0 a aproximadamente 50 nM en diluciones en serie. Las mezclas de antígeno de anticuerpo se incubaron a temperatura ambiente durante ~2 horas para permitir la unión del anticuerpo-antígeno para alcanzar el equilibrio. Las soluciones de muestra equilibradas se transfirieron luego a las placas recubiertas con hIL-6 para la medición del hIL-6R-hFc libre. Después de 1 hora de unión, las placas se lavaron y el hIL-6R-hFc unido se detectó utilizando anticuerpos policlonales anti-hFc de cabra conjugados a HRP (Jackson Immuno Research), y desarrollados utilizando sustrato TMB (BD Pharmingen). Los IC₅₀ se determinaron como la cantidad de anticuerpo requerida para reducir el 50% del IL-6R-hFc detectable al ligando IL-6 unido a placa. Los resultados se muestran en la primera columna de la Tabla 2.

[0051] Adicionalmente, la capacidad del anticuerpo de prueba a bloquear la unión del IL-6 al receptor IL-6R se determinó utilizando resonancia de plasmón de

superficie. Las moléculas IL-6R-hFc de antígeno purificado se capturaron mediante los anticuerpos policlonales IgG anti-humanos de cabra inmovilizados sobre una superficie CM-5 a través de un acoplamiento amino a una densidad de 250 RU. La solución de IL-6 (0.25 ml, 50 nM) se inyectó sobre la superficie del receptor y se registró el IL-6 unido (primera inyección de IL-6). El hIL-6 unido se removió entonces con un pulso de $MgCl_2$ 3M seguido por el amortiguador de acondicionamiento. El anticuerpo anti-hIL-6R en el medio acondicionado con hibridoma se inyectó sobre la superficie del receptor capturado seguido por la segunda inyección de hIL-6. La reducción porcentual en la unión del hIL-6 dio como resultado el anticuerpo desarrollado y el complejo receptor se utilizó como una calificación para definir los bloqueadores hIL-6 de los no bloqueadores (segunda columna, Tabla 2).

Tabla 2. Neutralización de la Unión del hIL-6

Anticuerpo	Inhibición de unión hIL-6R/hIL6 IC ₅₀ (nM)	Inhibición de unión hIL6/hIL6R (%)	de la Inhibición de proliferación de célula XG-1 IC ₅₀ (nM)	Actividad de Luciferasa HepG2/Stat3 IC ₅₀ (nM)
VQ8A9-6	0.39	68	0.40	0.097
VQ8F11-21	0.12	98	0.62	0.135
VV3D8-4	0.61	93	>100	n.d.
VV6A9-5	0.35	100	1.10	0.1881.10
VV1G4-7	1.10	34	1.80	0.578
VV6C10-1	4.60	61	>6.90	n.d.
VV6F12-11	2.20	n.d.	n.d.	n.d.
VV7G4-10	13.00	n.d.	n.d.	n.d.
VV9A6-11	0.50	n.d.	n.d.	n.d.
VV6C10-3	0.06	n.d.	n.d.	n.d.
Control	2.20	91	1.50	0.854

[0052] La capacidad de los anticuerpos hIL-6R a bloquear la actividad del hIL-6 *in vitro* se midió en la línea de mieloma dependiente de hIL-6 XG-1. Las células

XG-1 mantenidas en el medio que contenían el hIL-6 se lavaron dos veces con un medio libre de hIL-6 y se cultivaron durante ~24 horas en un medio libre de hIL-6 para vaciar el hIL-6 residual. Las células hambrientas fueron entonces giradas y resuspendidas en el medio a 4×10^5 por ml y se pusieron en placa 20,000 células por pozo en una placa de cultivo de tejido de 96 pozos. Las proteínas del anticuerpo purificado se diluyeron en serie en el medio y se agregaron a las células puestas en placa a concentraciones que varían desde 0 a 50 nM. Posteriormente, el hIL-6 recombinante se agregó a los pozos a una concentración final de 8 pM. A las células se les permitió crecer durante ~72 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ modificada al 5%. Al final del período de crecimiento, las células vivas se midieron utilizando un kit CCK (Dojindo, Japón). Los IC₅₀ se determinaron como se describió anteriormente, y se reportaron en la tercera columna de la Tabla 2.

15 **[0053]** La capacidad de los anticuerpos hIL-6R a bloquear la actividad del hIL-6 también se midió *in vitro* en la línea celular de hematoma humano que responde a hIL-6, HepG2. Las células HepG2 se transfectaron con un plásmido reportero que contiene un elemento de respuesta STAT3 (Transductor de Señal y activador de Transcripción 3) ligado a un gen de luciferasa. Las células transfectadas se tripsinizaron, giradas y resuspendidas en el medio a aproximadamente 2.5×10^5 células por ml y puestas en placa a 20,000 células por pozo en una placa de cultivo de tejido de 96 pozos. Las proteínas de anticuerpo purificadas se diluyeron en serie en el medio y se agregaron a las células puestas en placa a concentraciones que varían desde 0 a 100 nM. Posteriormente, el hIL-6 recombinante se agregó a los pozos a una concentración final de 50 pM. La respuesta se midió después de incubar las células durante 6 horas a 37°C en una incubadora de CO₂ humidificada al 5%. La actividad de luciferasa se midió con un

55

sistema de ensayo de luciferasa Steady-Glo™ (Promega). Los IC₅₀ se determinaron como se describió anteriormente, y se reportaron en la cuarta columna de la Tabla 2.

5 Ejemplo 5. Diversidad del Epítopo de Unión

[0054] Un inmunoensayo de competición de unión de anticuerpo se desarrolló utilizando un anticuerpo humanizado de control a un IL-6R humano. En resumen, una placa inmunoabsorbente de 96 pozos se recubrió con 20 ng por pozo con proteína recombinante hIL-6R durante toda la noche a 4°C. Después de bloquear la unión no específica con BSA, los sitios de unión hIL-6R sobre la mitad de la placa se saturaron con la unión del anticuerpo de control mediante la adición de 500 ng del control por pozo, y a la otra mitad de la placa se agregó solamente el amortiguador de unión. Después de tres horas de unión a temperatura ambiente, los anticuerpos purificados se agregaron a una concentración final de 50 ng/ml con y sin el anticuerpo de control preexistente en el pozo. Después de una hora de unión adicional, se lavó el anticuerpo libre y se detectó el anticuerpo unido a placa detectado con IgG o IgA de anti-ratón de cabra conjugado a HRP, anticuerpo policlonal y la placa se desarrolló utilizando sustratos HRP cromáticos y se registró la absorbancia a 450 nm. Las deducciones porcentuales de la unión de los anticuerpos anti-hIL-6R mediante la presencia del anticuerpo de control se listan en la Tabla 3 de adelante. Un experimento similar se condujo utilizando tecnología de resonancia de plasmón de superficie (Tabla 3). Ambos métodos generaron resultados consistentes. Los epítopos unidos a los anticuerpos VQ8F11, VV3D8, VV6A9, VV6C10-1 se traslapan con el anticuerpo de control; mientras que los anticuerpos VQ8A9, VV1G4, VV6F12, VV7G4, VV9A6, y VV6C10-3 parecen unirse a diferentes epítopos en razón a que la unión del antígeno no se bloqueó

57

por el anticuerpo de control. La competición parcial puede resultar del impedimento estérico del primer anticuerpo unido, aunque los epítomos pueden ser no traslapantes.

Tabla 3. Competición de la Unión de Antígeno con el Anticuerpo de Control

Anticuerpo	BIAcore™ (% de reducción)	Inmunoensayo (% de reducción)
VQ8A9-6	26	3
VQ8F11-21	96	79
VV3D8-4	97	84
VV6A9-5	96	84
VV1G4-7	12	3
VV6C10-1	90	80
VV6F12-11	n.d.	3
VV7G4-10	n.d.	26
VV9A6-11	n.d.	18
VV6C10-3	n.d.	1

Ejemplo 6. Propiedad de Unión de especies cruzadas

[0055] Se probaron cuatro anticuerpos para reactividad cruzada a la proteína recombinante IL-6R de mono utilizando tecnología BIAcore™. En resumen, un chip biosensor sobre el cual se inmoviliza el anticuerpo policlonal Fc de anti-ratón de cabra se utilizó para los anticuerpos monoclonales anti-hIL-6R presentes a una densidad de aproximadamente 75 RU. La proteína IL-6R monomérica de recombinante de humano o de mono (*Macaca fascicularis*, dominio extracelular; SEQ ID NO:251), a un rango de concentración entre 1.25 – 40 nM, se inyectó sobre la superficie del anticuerpo. La unión del receptor al anticuerpo y la disociación del complejo de unión se monitorearon en tiempo real. Se obtuvieron tanto la constante de rata de asociación (ka) como la constante de rata de disociación (kd), y se calculó el KD (Tabla 4).

43

Tabla 4. Comparación de la Afinidad de Unión al IL-6R de Humano y de Mono

Anticuerpo	Antígeno	ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	kd (S ⁻¹)	K _D (nM)
Control	IL6R de Humano	1.74E+05	1.67E-04	0.963
	IL6R de Mono	1.44E+05	1.68E-04	1.170
VQ8F11-21	IL6R de Humano	8.51E+05	4.38E-05	0.051
	IL6R de Mono	3.39E+05	4.86E-05	0.143
VV1G4-7	IL6R de Humano	2.57E+05	6.18E-05	0.240
	IL6R de Mono	no unión		
VV6A9-5	IL6R de Humano	5.18E+05	8.41E-05	0.162
	IL6R de Mono	5.00E+05	7.70E-05	0.154
VQ8A9-6	IL6R de Humano	7.32E+05	2.76E-04	0.377
	IL6R de Mono	7.31E+05	4.16E-04	0.569

[0056] Entre los cuatro anticuerpos probados, el VQ8F11, VV6A9, y VQ8A9 reaccionaron fuertemente con el receptor de mono con valores K_D que difirieron hasta de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 veces de la unión del receptor humano, respectivamente. El VV1G4, no se bloqueó por el anticuerpo de control (Tabla 3), no mostró unión al receptor de mono a pesar de la fuerte unión al receptor humano con K_D de 241 pM.

Ejemplo 7. Efecto de la Región Constante sobre la Afinidad de Unión

10

[0057] La afinidad de unión al hIL-6R monomérico de cuatro anticuerpos que tiene el IgG de ratón, el IgG1 humano o el IgG4 humano (tipo silvestre y modificado) se determinó utilizando BIAcore™ como se describió anteriormente excepto que la superficie del anticuerpo policlonal Fc anti-humano de cabra se utilizó para capturar los anticuerpos hIgG. El hIL-6R monomérico se inyectó en concentraciones de 12.5, 6.25, 3.12, y 1.56 nM. La capacidad de los anticuerpos a neutralizar la transducción de señal del EGP/STAT3 dependiente de hIL-6 también se determinó en un ensayo de luciferasa (IC₅₀). Los IC₅₀ para diferentes isotipos

15

59

IgG fueron similares, lo que sugiere ningún efecto del isotipo sobre la afinidad del anticuerpo para el antígeno.

Tabla 5. Comparación de los Isotipos IgG

Anticuerpo	IgG	ka (M ⁻¹ S ⁻¹)	kd (S ⁻¹)	K _D (nM)	IC ₅₀ (nM)
VQ8F11-21	hIgG1	6.22E+05	4.54E-05	0.073	0.150
	hIgG4	7.17E+05	5.22E-05	0.073	0.228
	mIgG2a	7.86E+05	5.27E-05	0.067	0.135
	modhIgG4	8.81E+05	4.70E-05	0.053	0.249
VQ8A9-6	hIgG1	1.09E+06	2.60E-04	0.238	0.130
	hIgG4	1.17E+06	2.35E-04	0.201	0.185
	hIgG1	9.95E+05	2.21E-04	0.222	0.097
VW6A9-5	hIgG1	7.12E+05	8.87E-05	0.125	0.204
	hIgG4	5.67E+05	7.64E-05	0.135	0.343
	mIgG2a	7.72E+05	7.52E-05	0.097	0.188
VQ1G4-21	hIgG1	3.34E+05	7.92E-05	0.237	0.767
	hIgG4	2.73E+05	9.18E-05	0.336	0.528
	mIgG2a	3.41E+05	7.66E-05	0.225	0.578



REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno de éste, que se une específicamente al receptor de interleuquina-6 humano (hIL-6R) con un K_D de aproximadamente 500 pM o menos, y 300 pM o menos, medido mediante resonancia de plasmón de superficie.

2. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 el cual se une al hIL-6R con una afinidad por lo menos 2 veces mayor con relación a su unión al IL-6R de mono.

3. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende un dominio de la región 3 determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR3) y un dominio CDR3 de cadena ligera, en donde

el dominio CDR3 de cadena pesada que comprenden una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9 - X^{10} - X^{11} - X^{12} - X^{13} - X^{14} - X^{15} - X^{16} - X^{17} - X^{18} - X^{19}$ (SEQ ID NO:247) en donde $X^1 = \text{Ala}$, $X^2 = \text{Lys}$, $X^3 = \text{Gly}$, $X^4 = \text{Arg}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Ser o Ala}$, $X^7 = \text{Phe}$, $X^8 = \text{Asp}$, $X^9 = \text{Ile}$, $X^{10} = \text{Pro o ausente}$, $X^{11} = \text{Phe o ausente}$, $X^{12} = \text{Val o ausente}$, $X^{13} = \text{Tyr o ausente}$, $X^{14} = \text{Tyr o ausente}$, $X^{15} = \text{Tyr o ausente}$, $X^{16} = \text{Gly o ausente}$, $X^{17} = \text{Met o ausente}$, $X^{18} = \text{Asp o ausente}$, y $X^{19} = \text{Val o ausente}$; y

el dominio CDR3 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8 - X^9$ (SEQ ID

69

NO:250) en donde $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gln o His}$, $X^3 = \text{Ala}$, $X^4 = \text{Asn o Tyr}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Phe}$, $X^7 = \text{Pro}$, $X^8 = \text{Pro}$, y $X^9 = \text{Thr}$.

4. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende además

un dominio CDR1 de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:245) en donde $X^1 = \text{Gly o Arg}$, $X^2 = \text{Phe}$, $X^3 = \text{Thr}$, $X^4 = \text{Phe}$, $X^5 = \text{Asp}$, $X^6 = \text{Asp}$, $X^7 = \text{Tyr}$, y $X^8 = \text{Ala}$;

un dominio CDR2 de cadena pesada que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:246) en donde $X^1 = \text{Ile o Val}$, $X^2 = \text{Ser}$, $X^3 = \text{Trp}$, $X^4 = \text{Asn}$, $X^5 = \text{Ser}$, $X^6 = \text{Gly}$, $X^7 = \text{Ser}$, y $X^8 = \text{Ile}$;

un dominio CDR1 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3 - X^4 - X^5 - X^6 - X^7 - X^8$ (SEQ ID NO:248) en donde $X^1 = \text{Gln}$, $X^2 = \text{Gly}$, $X^3 = \text{Ile}$, $X^4 = \text{Ser}$, $X^5 = \text{Ser}$, y $X^6 = \text{Trp}$; y

un dominio CDR2 de cadena ligera que comprende una secuencia de amino ácido de la fórmula $X^1 - X^2 - X^3$ (SEQ ID NO:249) en donde $X^1 = \text{Gly o Ala}$, $X^2 = \text{Ala}$, y $X^3 = \text{Ser}$.

5. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende:

un dominio CDR3 de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:25, 153, 9, 185, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 169, 201 y 217; y

5 un dominio CDR3 de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:33, 161, 17, 193, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 177, 209 y 225.

6. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende además:

10

un dominio CDR1 de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:21, 149, 5, 181, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 165, 197, y 213;

15

un dominio CDR2 de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:23, 151, 7, 183, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 167, 199 y 215;

20

un dominio CDR1 de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:29, 157, 13, 189, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 173, 205, y 221; y

un dominio CDR2 de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste de la SEQ ID NO:31, 159, 15, 191, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 175, 207 y 223.

25

63

7. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde los CDR de cadena pesada y los CDR de cadena ligera comprenden:

5 SEQ ID NO:21, 23, 25 y SEQ ID NO:29, 31, 33;
 SEQ ID NO:149, 151, 153 y SEQ ID NO:157, 159, 161;
 SEQ ID NO:5, 7, 9 y SEQ ID NO: 13, 15, 17;
 SEQ ID NO: 181, 183, 185 y SEQ ID NO:189, 191, 193,
respectivamente.

10

8. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, que comprende

una región variable de cadena pesada (HCVR) seleccionada del grupo que

15 consiste de la SEQ ID NO:19, 147, 3, 179, 227, 231, 35, 51, 67, 83, 99, 115,
 131, 239, 241, 163, 235, 195 y 211; y

una región variable de cadena ligera (LCVR) seleccionada del grupo que

 consiste de la SEQ ID NO:27, 155, 11, 187, 229, 233, 43, 59, 75, 91, 107,
20 123, 139, 171, 237, 203 y 219.

9. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende los pares HCVR/LCVR seleccionados del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 19/27; 147/155; 3/11; 179/187;
25 227/229; 231/233; 35/43; 51/59; 67/75; 83/91; 99/107; 115/123; 131/139;
 239/155; 241/155; 163/171; 235/237; 195/203 y 211/219.

64

10. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 5 11. Un vector que comprende una secuencia de nucleótido de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Un sistema de huésped-vector para la producción de un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo que se une específicamente al receptor IL-6 humano, que comprende un vector de
10 acuerdo con la reivindicación 11, en una célula huésped adecuada.
13. Un sistema de huésped-vector de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la célula huésped es una célula procariótica o eucariótica
15 seleccionada de una célula de *E. coli* o una CHO.
14. Un método para producir un anticuerpo anti-IL-6R o un fragmento de unión de antígeno de éste, que comprende hacer crecer células de un sistema huésped-vector de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 bajo condiciones
20 que permitan la producción del anticuerpo o fragmento de éste y recuperar el anticuerpo o fragmento así producido.
15. Uso de un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en
25 la elaboración de un medicamento para uso para atenuar o inhibir una enfermedad o trastorno mediado por IL-6 en un humano.



16. Un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para uso en la atenuación o inhibición de una enfermedad o trastorno mediado por IL-6 en un humano.
- 5
17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10
18. Un método para atenuar o inhibir la enfermedad o trastorno mediado por IL-6 en un paciente humano, el método comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo o un fragmento de unión de antígeno de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 a
- 15
19. Un método de acuerdo a la reivindicación 18, en donde la enfermedad o trastorno mediado por IL-6 es artritis, tal como artritis reumatoide crónica; una enfermedad inflamatoria del intestino, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerativa; o eritematoso sistémico.
- 20

GG

RESUMEN

Un anticuerpo humano o un fragmento de unión de antígeno que se une al receptor IL-6 humano (hIL-6R) con un K_D de aproximadamente 500 pM o menos y
5 bloquea la actividad del IL-6 con un IC_{50} de 200 pM o menos. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo se unen al hIL-6R con una afinidad de por lo menos 2 veces mayor con relación a su unión al IL-6R de mono.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/013062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C12N15/13 A61K39/00

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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 2 694 767 A (INNOTHERAPIE LAB SA [FR]) 18 February 1994 (1994-02-18) table 6	1-19
Y	US 2005/142635 A1 (TSUCHIYA MASAYUKI [JP] ET AL) 30 June 2005 (2005-06-30) the whole document	1-19
Y	EP 0 409 607 B (KISHIMOTO TADAMITSU [JP]) 30 October 1996 (1996-10-30) the whole document	1-19
-/-		

☒ 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
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 December 2007

Date of mailing of the international search report

12/03/2008

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. Box 6518 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo id,
Fax (+31-70) 340-3015

Authorized officer

Weigl, Martina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/013062

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIHARA ET AL: "Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family" INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 12, November 2005 (2005-11), pages 1731-1740, XP005020014 ISSN: 1567-5769 the whole document	1-19
P, Y	PAUL-PLETZER KALANETHEE: "Tocilizumab: Blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders" DRUGS OF TODAY, vol. 42, no. 9, September 2006 (2006-09), pages 559-576, XP002462414 ISSN: 1699-3993 the whole document	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/013062

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search-report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 18 and 19 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1 and 2 (partially), 3 and 4 (completely), 5-19 (partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1 and 2 (partially), 3 and 4 (completely), 5-19 (partially)

Claims relating to an antibody or antigen-binding fragment comprising a heavy chain complementary determining region 3 (CDR3) domain which comprises the sequence AKGRDSFDI or AKGRDAFDI; nucleic acids encoding these antibodies or antigen-binding fragments; therapeutic applications of these antibodies or antigen-binding fragments

Invention 2-11: claim 1, 2 and 5-19 (all partially)

Claims relating to an antibody or antigen-binding fragment comprising a heavy chain complementary determining region 3 (CDR3) domain which comprises a sequence represented by SEQ ID NOs 9, 185, 41, 57, 89, 105, 121, 137, 201 or 217 respectively; nucleic acids encoding these antibodies or antigen-binding fragments; therapeutic applications of these antibodies or antigen-binding fragments

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/013062

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2694767	A	18-02-1994	NONE	
US 2005142635	A1	30-06-2005	NONE	
EP 0409607	B	30-10-1996	AT 144713 T	15-11-1996
			CA 2021594 A1	21-01-1991
			DE 69029015 D1	05-12-1996
			DE 69029015 T2	22-01-1998
			EP 0409607 A2	23-01-1991
			ES 2093017 T3	16-12-1996
			HK 49497 A	25-04-1997
			JP 3139293 A	13-06-1991
			SG 42954 A1	17-10-1997

73

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-138158-00000-0000

Fecha: 2008-12-30 17:05:14 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEYH Eje: 378 FASENACIONAL
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 73

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 95,319
 FECHA : DICIEMBRE 9 DE 2008

==== CONSIGNACION =====

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102218955	09/12/2008	45,848,000.00

==== CONCEPTO =====

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
	TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.
 COLO: 16813-841-001-9.



No. 08-138158-00000-0000

Fecha: 2008-12-30 17:05:14 Dep. 2020 NUECREACION
Ira. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 73



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Firma Responsable Mauricio

Fecha 30 DIC 2008

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	8 138158
	Solicitud internacional	PCT/US2007/013062
	Fecha inicio fase nacional	02/01/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1065

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

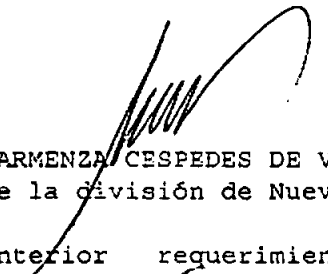
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 138158



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 30 ENE. 2009
jfernand