

ANTICUERPOS MEJORADOS CONTRA IL-6

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente Solicitud reclama el beneficio de prioridad de la
5 Solicitud Provisional E.U.A. Núm. 62/087,448, archivada el
4 de diciembre del 2014; y la Solicitud Provisional E.U.A.
Núm. 62/247,705, archivada el 28 de octubre del 2015. Los
contenidos completos de cada una de estas solicitudes se
incorporan en la presente a modo de referencia.

10

CAMPO DE LA INVENCION

El campo de la invención se relaciona a IL-6. De modo más
particular, el campo se relaciona a los moduladores de IL-6 y
sus usos en el tratamiento de enfermedades, tales como
15 enfermedades oculares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

IL-6 es una citoquina pleiotrópica con papeles reportados en
inflamación, hematopoyesis, angiogénesis, diferenciación
20 celular y supervivencia neuronal. La presente invención se
relaciona a anticuerpos mejorados de IL-6 y los usos de los
mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se relaciona a anticuerpos de IL-6 y fragmentos (por ejemplo, fragmentos de unión al antígeno) o derivados de los mismos, así como a ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de IL-6 o los fragmentos. La invención también se relaciona a los usos de dichos anticuerpos, fragmentos o derivados. Los anticuerpos y fragmentos o derivados de los mismos pueden utilizarse, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad asociada a IL-6. En modalidades, el anticuerpo, fragmento o derivado del mismo puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a una IL-6, por ejemplo, a una IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo, fragmento o derivado del mismo puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente) al sitio II de una IL-6 (por ejemplo, al sitio II de IL-6 humana).

En un aspecto aquí proporcionado es un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende

(i) una VH CDR1 que comprende la secuencia de GYX₁LX₂NYLIE (SEQ ID NO:45),

(ii) una VH CDR2 que comprende la secuencia de VX₃TPGX₄GTIN (SEQ ID NO:46), y

(ii) una VH CDR3,

donde uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o más) de los

siguientes es cierto: X_1 no es A, X_2 no es S, X_3 no es I y X_4 no es S. En modalidades, X_1 no es A, X_2 no es S, X_3 no es I y X_4 no es S.

En modalidades, X_1 es V o una sustitución conservadora de V. En modalidades, X_2 es P o una sustitución conservadora de P. En modalidades, X_3 es T o una sustitución conservadora de T. En modalidades, X_4 es G o una sustitución conservadora de G. En modalidades, uno, dos, tres o todos de entre los que se mencionan a continuación, son ciertos: X_1 es V o una sustitución conservadora de V, X_2 es P o una sustitución conservadora de P, X_3 es T o una sustitución conservadora de T, y X_4 es G o una sustitución conservadora de G. En modalidades, X_1 es V o una sustitución conservadora de V, X_2 es P o una sustitución conservadora de P, X_3 es T o una sustitución conservadora de T, y X_4 es G o una sustitución conservadora de G.

En modalidades, X_1 se selecciona de entre V, I, L y M. En modalidades, X_1 se selecciona de entre V, I y L. En modalidades, X_2 se selecciona de entre P, G, y A. En modalidades, X_2 se selecciona de entre P y G. En modalidades, X_3 se selecciona de entre T y S. En modalidades, X_4 se selecciona de entre G y P.

En modalidades, uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o todos) de entre los siguientes es cierto: X_1 es V, X_2 es P, X_3

es T, y X_4 es G. En modalidades, X_1 es V, X_2 es P, X_3 i es s T, y X_4 es G.

En modalidades, VH CDR3 comprende la secuencia de SEQ ID NO:33.

5 En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al compararse con un anticuerpo o
10 fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, otro anticuerpo idéntico o fragmento de unión a antígeno) que comprende una secuencia donde uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, o todos) de los que se mencionan a continuación son ciertos: X_1 es A, X_2 es S, X_3 es I y X_4 es S.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo comprende una VH CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:31, una VH CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:32, y, opcionalmente, una VH CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:33.

20 En modalidades, la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:17 o se diferencia en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:17. En modalidades, la región variable de cadena pesada difiere en

no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:17. En modalidades, la región variable de cadena pesada difiere en entre 1-5 aminoácidos de SEQ ID NO:17.

En modalidades, la región variable de cadena pesada
5 comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:37. En modalidades, la región variable de cadena pesada consiste en una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:37. En modalidades, la región
10 variable de cadena pesada difiere en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:37. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:37. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
15 comprende una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO:37.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:39. En
20 modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia que difiere en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:39. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende SEQ ID NO:39. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al

antígeno es un Fab.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:54. En
 5 modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia que difiere en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:54. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende SEQ ID NO:54. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
 10 antígeno es un Fab.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un scFv. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende o consiste en la secuencia scFv.

15 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGG
 TINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGT
 VTVSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWFYQ
 QKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTF
 GQGTKLEIKRTV (SEQ ID NO:52) o

20 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWFYQKPGQPPKLLIYAAS
 NRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVGGG
 GSGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMG
 VTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSRWDPLYYYALE
 YWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO:53).

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:52 o SEQ ID NO:53. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende SEQ ID NO:52 o SEQ ID NO:53. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un scFv.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:41. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que difiere en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:41. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:41. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO:41.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al compararse con EBI-029 o un fragmento del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al compararse con un anticuerpo o fragmento de

unión al antígeno que comprende una VH CDR1 que comprende la
secuencia de SEQ ID NO:4, una VH CDR2 que comprende la
secuencia de SEQ ID NO:5, y, opcionalmente, una VH CDR3 que
comprende la secuencia de SEQ ID NO:6. En modalidades, el
5 anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una
afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al
compararse con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
que comprende una secuencia de región variable de cadena
pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:17. En
10 modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6
humana al compararse con un anticuerpo o fragmento de unión
al antígeno que comprende SEQ ID NO:24. En modalidades, el
anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una
15 afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al
compararse con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
que comprende o consiste en SEQ ID NO: 11.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
antígeno comprende una o más secuencias de EBI-030 o EBI-031,
20 tal como se tiene en la Tabla 4. En modalidades, el
anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende uno o
más dominios de EBI-030 o EBI-031, tal como se muestra en la
FIGURA 15 (por ejemplo, uno o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2,
FR3, CDR3, FR4, CH1, bisagra, CH2, y CH3 de la secuencia de

cadena pesada y/o FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, y CK de la secuencia de cadena ligera). En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena pesada y una cadena ligera. En modalidades, las cadenas pesada y ligera se unen mediante uno o más enlaces disulfuro. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Fab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un scFv. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, scFv o Fv.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al compararse con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que comprende una o más secuencias correspondientes de EBI-029, o secuencias de un anticuerpo descrito en WO2014/074905, aquí incorporado a modo de referencia en su totalidad. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una afinidad elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al compararse con tocilizumab.

Tabla 4: Resumen de las secuencias de EBI-029, EBI-030, y EBI-030

	Descripción	SEQ NO:	ID	Secuencia
5	EBI-029 HC (IgG2) secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 11	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTSTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDPHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVSLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKI KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
10				
15	EBI-029 HC -H311A	SEQ NO: 10	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTSTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDPHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVSLTVV A QDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKI KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
20				

	Descripción	SEQ NO:	ID	Secuencia
5	EBI-029 LC secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 12	ID	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT <u>INCRASESVD</u> <u>NYGIPFMN</u> WY QQKPGQPPKL <u>LIYAASN</u> RGSGVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY <u>YCQQSEEVPL</u> <u>TFGQGTKLEI</u> KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S <u>TLT</u> LSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
10	EBI-029 (IgG1) Fab HC secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 24	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV <u>SCKASGYALS</u> <u>NYLIEWVRQA</u> PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR <u>SR</u> <u>WDPLYYYALE</u> <u>YWGQGT</u> TVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT
15	EBI-029 VH secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 17	ID	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV <u>SCKASGYAL</u> <u>SNYLIE</u> WVRQAPGQGLEWMGV <u>VITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR <u>SRWDPLYYYALEY</u> WGQGT TVTVSS
20	EBI-029 VL secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 18	ID	DIVMTQSPDSLAVSLGERAT <u>INCRASESVD</u> <u>NYGIPFMN</u> WYQQ KPGQPPKLLIYAASN <u>RGSGVPDRFSGSG</u> SGTDFTLTISLQAE DVAVYYC <u>QQSEEVPL</u> <u>TFGQGTKLEI</u> KRTV
	EBI-029 HC CDR1	SEQ NO: 4	ID	GYALSNYLIE
	EBI-029 HC CDR2	SEQ NO: 5	ID	VITPGSGTIN
	EBI-029 HC CDR3	SEQ NO: 6	ID	SRWDPLYYYALEY
	EBI-029 LC CDR1	SEQ NO: 7	ID	RASESVDNYGIPFMN
	EBI-029 LC CDR2	SEQ NO: 8	ID	AASNRGSG
	EBI-029 LC CDR3	SEQ NO: 9	ID	QQSEEVPLT

	Descripción	SEQ NO:	ID	Secuencia
5	EBI-030 HC (IgG2) secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 41	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGY VLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGG TINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARS RWDPLY YALE YWGQGT TVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKY KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTT PPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSV MH EALHNHYTQK SLSLSPGK
10	EBI-030 LC secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 42	ID	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCR ASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPKL LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQ SEEVPLT FGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFY PREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S STLTL SKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
15	EBI-030 (IgG1) Fab HC secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 39	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGY VLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGG TINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARS R WDPLY YALE YWGQGT TVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVN HK PSNTKVDK KV EPKSCDKTHT
20	EBI-030 (IgG2) Fab HC secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 54	ID	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV S CKASGYVLPNYLIEWVRQA PGQ GLEWMGV TTPGG TINY A QKFQGRVTITADESTSTAY MELSSL RSEDTAVYYCARS RWDPLY YALEYWGQGT TVTV SSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT V SWNSGALTS GV HTFPAVLQSSGLYSLSSV V TPSSNFGTQTYTCNV DHK PSNTK VDK T VERK

	Descripción	SEQ NO:	ID	Secuencia
5	EBI-030 VH secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 37	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGY VLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAR SR <u>WDPLYYYALE</u> <u>YWGQGT</u> TVTV SS
	EBI-030 VL secuencia de aminoácidos	SEQ NO: 38	ID	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN WYQQK PGQPPKLLIY <u>AASNRGSGVPDR</u> FSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQSE <u>EVPLTFG</u> QGTKLEIKRTV
10	EBI-030 HC CDR1	SEQ NO: 31	ID	GYVLPNYLIE
	EBI-030 HC CDR2	SEQ NO: 32	ID	V TPGGGTIN
	EBI-030- HC CDR3	SEQ NO: 33	ID	SRWDPLYYYALEY
	EBI-030 LC CDR1	SEQ NO: 34	ID	RASESVDNYGIPFMN
15	EBI-030 LC CDR2	SEQ NO: 35	ID	AASNRGS
	EBI-030 LC CDR3	SEQ NO: 36	ID	QQSEEVPLT

	Descripción	SEQ NO:	ID	Secuencia
5	EBI-031 IgG2 HC secuencia de aminoácidos	SEQ NO:47	ID	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPYLYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSNFGT QTYTCNVDPHK PSNTKVDKTV ERKCCVECP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
10	scFv VH-VL secuencia de aminoácidos	SEQ NO:52	ID	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQ GLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARSRWDPYLYYALEYWGQGTITVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIP FMNWIYQQKPGQPPKLLIYAASNRRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSIQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV
15	scFv VL-VH secuencia de aminoácidos	SEQ NO:53	ID	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWIYQQK PGQPPKLLIYAASNRRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSIQAED VAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVGGGGSGGGGSGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQ GLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSL RSED TAVYYCARSRWDPYLYYALEYWGQGTITVTVSS

aa=aminoácido; na=ácido nucleico; HC=cadena pesada; LC=cadena
ligera; VH=región variable de cadena pesada; VL=región
variable de cadena ligera

La afinidad elevada y/o potencia elevada puede evaluarse
utilizando métodos aquí descritos y/o métodos conocidos en la
técnica.

En modalidades, la afinidad se evalúa utilizando resonancia de superficie de plasmones (SPR).

En modalidades, la afinidad se eleva en al menos 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 3, o 4 veces.

5 En modalidades, la potencia se eleva. En modalidades, la potencia se eleva tal como se indica por la disminución en el IC50 y/o disminución en el IC90. En modalidades, el IC50 disminuye en al menos 5, 10, 20, 30, 40, o 50 veces. En modalidades, el IC50 disminuye en al menos alrededor de 50
10 veces. En modalidades, el IC90 disminuye en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, o 500 veces. En modalidades, el IC90 disminuye al menos alrededor de 100 veces.

En modalidades, la potencia se evalúa, por ejemplo,
15 utilizando ensayo HEK-Blue™ o un ensayo de proliferación T1165.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la señalización en cis de IL-6, por ejemplo, tal como se evalúa basándose en el valor IC50 o IC90 obtenido
20 utilizando un ensayo HEK-Blue™ aquí descrito, por ejemplo, con 20 pM de IL-6 libre.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee un IC50 menor de 47 pM y/o un IC90 de menos de 4350 pM. En modalidades, el IC50 es menor que 47 pM, por

ejemplo, menor que 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 pM. En modalidades, el IC90 es menor que 4350 pM, por ejemplo, menor que 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5 pM. En modalidades, el IC50 y/o IC90 se evalúa en un ensayo HEK-Blue™ con 20 pM de IL-6.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno bloquea a IL-6 libre con mayor potencia al compararse con tocilizumab, por ejemplo, tal como se evalúa basándose en los valores de IC50 obtenidos utilizando un ensayo HEK-Blue™ con 20 pM de IL-6. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe IL-6 con más de 900 veces de potencia al compararse con tocilizumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es EBI-031 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee un IC50 de menor a 15 pM, por ejemplo, un IC50 de 14.2 pM, para inhibir IL-6.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno bloquea la señalización en trans de IL-6, por ejemplo, tal como se evalúa utilizando un ensayo HEK-Blue™ aquí descrito, por ejemplo, con 200 pM hiper IL-6. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la señalización mediante hiper IL-6. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la

señalización mediante hiper IL-6 con una potencia más elevada que tocilizumab, por ejemplo, con más de 900 veces de mayor potencia al compararse con tocilizumab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la
5 señalización mediante hiper IL-6 con un IC50 menor a 1 μ M. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la señalización mediante hiper IL-6 con un IC50 menor a 1 nM. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno inhibe la señalización mediante hiper IL-6 con un
10 IC50 menor a 100 pM o menor a 50 pM, por ejemplo, con un IC50 de alrededor de 14-15 pM. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es EBI-031 o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
15 antígeno inhibe la señalización en cis de IL-6 y la señalización en trans de IL-6.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es efectivo en el bloqueo de la señalización de IL-6 en el ojo durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses,
20 5 meses, o 6 meses, por ejemplo, después de una administración intravítrea. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno bloquea 95% de señalización de IL-6 en el ojo durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, o 6 meses, por ejemplo, después de una

administración intravítrea. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno bloquea 95% de la señalización de IL-6 en el ojo durante alrededor de 150 días.

En otro aspecto aquí proporcionado se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que comprende una secuencia de región variable de cadena pesada que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:37, donde dicha secuencia de región variable de cadena pesada comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) aminoácidos seleccionados de entre V28, P30, T51, y G55 (el número de aminoácidos es de acuerdo a SEQ ID NO:41).

En otro aspecto aquí proporcionado se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:39, donde dicha secuencia de región variable de cadena pesada comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) aminoácidos seleccionados de entre V28, P30, T51, y G55 (el número de aminoácidos es de acuerdo a SEQ ID NO:41).

En otro aspecto aquí proporcionado se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que comprende una secuencia que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:54, donde dicha

secuencia de región variable de cadena pesada comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) aminoácidos seleccionados de entre V28, P30, T51, y G55 (el número de aminoácidos es de acuerdo a SEQ ID NO:41).

5 En otro aspecto aquí proporcionado se proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:41, donde dicha secuencia de región variable de cadena
10 pesada comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) aminoácidos seleccionados de entre V28, P30, T51, y G55 (el número de aminoácidos es de acuerdo a SEQ ID NO:41).

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una afinidad elevada por IL-6 humana relativa
15 a un anticuerpo control, por ejemplo, relativa a EBI-029 o un fragmento del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una afinidad elevada por IL-6 humana relativa a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que es idéntica excepto que no comprende dicho o
20 dichos aminoácidos seleccionados de entre V28, P30, T51, y G55 y en su lugar comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) aminoácidos seleccionados de entre A28, S30, I51, y S55. En modalidades, la afinidad aumenta en al menos 1.5, 1.6, 1.7, 1.8. 1.9, 2, 3, o 4 veces. En modalidades, la afinidad

se evalúa utilizando resonancia de superficie de plasmones (SPR).

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una potencia elevada relativa a un anticuerpo control, por ejemplo, relativa a EBI-029 o un fragmento del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una potencia elevada relativa a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que es idéntico excepto que no comprende dicho o dichos aminoácidos seleccionados de entre V28, P30, T51, y G55 y en su lugar comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) aminoácidos seleccionados de entre A28, S30, I51, y S55.

En modalidades, la potencia es elevada tal como se indica por una disminución en el IC₉₀. En modalidades, el IC₅₀ disminuye mediante al menos 5, 10, 20, 30, 40, o 50 veces. En modalidades, el IC₅₀ disminuye por al menos alrededor de 50 veces. En modalidades, el IC₉₀ disminuye en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, o 500 veces. En modalidades, el IC₉₀ disminuye mediante al menos alrededor de 100 veces.

En modalidades, la potencia se evalúa utilizando ensayo HEK-Blue™ o un ensayo de proliferación T1165.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee un IC₅₀ menor a 47 pM y/o un IC₉₀ menor a

4350 pM. En modalidades, el IC50 es menor a 47 pM, por ejemplo, menor a 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, o 1 pM. En modalidades, el IC90 es menor a 4350 pM, por ejemplo, menor a 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5 pM. En 5 modalidades, el IC50 e/o IC90 se evalúa en un ensayo HEK-Blue™ con 20 pM de IL-6.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende V28, P30, T51, y G55 y el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno muestra afinidad 10 elevada y/o potencia elevada por IL-6 humana al compararse con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que es idéntico excepto que comprende A28, S30, I51, y S55.

En modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aquí descrito además comprende una región variable 15 de cadena ligera o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende una VL CDR1, una VL CDR2, y una VL CDR3.

En modalidades, la VL CDR1 comprende la secuencia de SEQ ID NO:34, la VL CDR2 comprende la secuencia de SEQ ID NO:35, y la VL CDR3 comprende la secuencia de SEQ ID NO:36.

20 En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno además comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:38.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al

antígeno además comprende una secuencia de región de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:38 o se diferencia de SEQ ID NO:38 por no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
5 antígeno además comprende una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:38. En modalidades, la secuencia de región variable de cadena ligera consiste en SEQ ID NO:38.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
10 antígeno además comprende una secuencia de cadena ligera que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% idéntica a SEQ ID NO:42.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
antígeno además comprende una secuencia de cadena ligera que
15 difiere en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácido de SEQ ID NO:42.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
antígeno además comprende una secuencia de cadena ligera que
comprende SEQ ID NO:42.

20 En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno además comprende una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42 o una secuencia que difiere en no más de 5, 4, 3, 2, o 1 aminoácidos de SEQ ID NO:42. En modalidades, la secuencia de cadena ligera consiste en SEQ ID

NO:42.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende

(i) una VH CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:31, una VH CDR2 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:32, y una VH CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:33 y (ii) una VL CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:34, una VL CDR1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:35, y una VL CDR3 que comprende la secuencia de SEQ ID NO:36. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende las CDR anteriores excepto que posee una mutación, por ejemplo, un total de 1, 2 o 3 mutaciones en las seis CDR. En modalidades, la o las mutaciones no disminuyen la afinidad y/o potencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, o un IgG4 o fragmento del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo IgG1 o IgG2 o fragmento del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es IgG1 Fab o un IgG2 Fab. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo IgG2 o fragmento de unión al antígeno.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al

antígeno se modifica para reducir o eliminar la actividad ADCC.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:37 y una región variable de cadena ligera que comprende o consiste en SEQ ID NO:38. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende las regiones variables de cadena pesada y ligera anteriores excepto que posee una mutación, por ejemplo, un total de máximo 1, 2, o 3 mutaciones. En modalidades, la o las mutaciones no disminuyen la afinidad y/o potencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:41 y, opcionalmente, una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que

consiste en SEQ ID NO:41 y, opcionalmente, una secuencia de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO:42.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que
5 comprende SEQ ID NO:47 y, opcionalmente, una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que es idéntica a SEQ ID NO:41 y una secuencia de cadena ligera que
10 es idéntica a SEQ ID NO:42, excepto que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una mutación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 mutaciones en total en relación a SEQ ID NO:41 y/o SEQ ID NO:42). En modalidades, la o las mutaciones se encuentran en la o las regiones de armazón. En
15 modalidades, la mutación no disminuye la afinidad y/o potencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en relación a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que no comprende dicha mutación.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al
20 antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que es idéntica a SEQ ID NO:47 y una secuencia de cadena ligera que es idéntica a SEQ ID NO:42, excepto que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una mutación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 mutaciones en total en relación a

SEQ ID NO:47 y/o SEQ ID NO:42). En modalidades, la o las mutaciones se encuentran en la o las regiones de armazón. En modalidades, la mutación no disminuye la afinidad y/o potencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en
5 relación a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que no comprende dicha mutación.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Fab.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al
10 antígeno es un IgG1 Fab.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Fab que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:39 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42. En una modalidad, el
15 anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Fab aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO:39 y una secuencia de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO:42.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al
20 antígeno es un IgG2 Fab.

En una modalidad, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Fab aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:54 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42. En una modalidad,

el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un Fab aislado que comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO:54 y una secuencia de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO:42.

5 En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que es idéntica a SEQ ID NO:39 y una secuencia de cadena ligera que es idéntica a SEQ ID NO:42, excepto que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una mutación (por
10 ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 mutaciones en total en relación a SEQ ID NO:39 y/o SEQ ID NO:42). En modalidades, la o las mutaciones se encuentran en la o las regiones de armazón. En modalidades, la mutación no disminuye la afinidad y/o potencia del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en
15 relación a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que no comprende dicha mutación.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que es idéntica a SEQ ID NO:54 y una secuencia de cadena ligera que
20 es idéntica a SEQ ID NO:42, excepto que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una mutación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 mutaciones en total en relación a SEQ ID NO:54 y/o SEQ ID NO:42). En modalidades, la mutación no disminuye la afinidad y/o potencia del anticuerpo o

fragmento de unión al antígeno en relación a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que no comprende dicha mutación.

En algunas modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede unirse a al menos uno de entre R24, K27, Y31, D34, S118, o V121 de IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede unirse a R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede unirse a al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 de entre R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de IL-6 humana.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede unirse (por ejemplo, puede unirse específicamente) al sitio II de una IL-6 humana.

En modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse a IL-6 con una T_m de 70°C o mayor.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede unirse a IL-6 con una T_m de 80°C o mayor.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno del mismo) se une a al menos uno de entre R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de

una IL-6 humana.

En modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a al menos dos de entre R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de una IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo se une a al menos tres de entre R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de una IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a al menos cuatro de entre R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de una IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a al menos cinco de entre R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de una IL-6 humana. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a R24, K27, Y31, D34, S118, y V121 de una IL-6 humana.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal humanizado. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo monoclonal humano.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno muestra <10% de agregación a una concentración de 100-150 mg/mL, por ejemplo, a una concentración de alrededor de 142 mg/mL en PBS, pH 7.4. En modalidades, el anticuerpo o

fragmento de unión al antígeno posee propiedades farmacocinéticas mejoradas al compararse con otro agente terapéutico, por ejemplo, al compararse con tocilizumab, bevacizumab, ranibizumab, y/o Eylea®. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee retención mejorada en el ojo cuando se administra al ojo, por ejemplo, intravítrea, por ejemplo, mediante inyección intravítrea. En modalidades, la retención mejorada en el ojo se indica mediante una vida media elevada en el ojo, por ejemplo, en el cuerpo vítreo, retina, humor acuoso, coroides y/o esclerótica.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno posee una vida media en el cuerpo vítreo de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 días. En modalidades, la vida media en el cuerpo vítreo es al menos de 10 días. En modalidades, la vida media en el cuerpo vítreo se evalúa en un animal, por ejemplo, en un conejo o un mono. En modalidades, la vida media en el cuerpo vítreo se evalúa en un humano.

En modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aquí descrito posee una vida media sistémica reducida (por ejemplo, un $T_{1/2\beta}$ menor) y/o un aclaramiento sistémico mejorado, por ejemplo, una vida media sistémica reducida o un aclaramiento sistémico mejorado al compararse

con el de otro agente terapéutico, por ejemplo, tocilizumab, bevacizumab, ranibizumab, y/o aflibercept (Eylea®). En modalidades, la vida media sistémica (por ejemplo, $T_{1/2\beta}$) es menor que la de tocilizumab y/o aflibercept (Eylea®). En

5 modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio Fc que comprende una mutación (por ejemplo, en 1, 2, 3, o 4 mutaciones) a una o más posiciones que corresponden a H311, D313, I254, o H436 (la numeración es de acuerdo a SEQ ID NO:41). En modalidades, la mutación se

10 selecciona de entre una o más de H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R, y H436A. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende un dominio Fc que comprende una mutación que corresponde a H311A (enumerado tal como aparece en SEQ ID NO:41). En modalidades, el dominio Fc

15 es un dominio IgG1 Fc. En modalidades, el dominio Fc es un dominio IgG2 Fc.

En modalidades, el dominio Fc es un dominio IgG1 Fc que posee la secuencia de SEQ ID NO:50 y, opcionalmente, comprende una mutación en una o más de las posiciones

20 subrayadas: (H90, D92, I33, y H215):

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:50).

En modalidades, el dominio IgG1 Fc comprende una mutación correspondiente a una o más de entre H90A, H90E, H90N, D92T, I33A, I33R, y H215A (enumerado tal como aparece en SEQ ID NO:50).

5 En modalidades, el dominio Fc es un dominio IgG2 Fc que posee la secuencia de SEQ ID NO:51 y, opcionalmente, comprende una mutación en una o más de las posiciones subrayadas: (H86, D88, I29, y H211):

VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
 10 NAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 (SEQ ID NO:51)

En modalidades, el dominio IgG2 Fc comprende una
 15 mutación correspondiente a una o más de entre H86A, H86E, H86N, D88T, I29A, I29R, y H211A (enumerado tal como aparece en SEQ ID NO:51)

En modalidades, la mutación Fc reduce la acumulación sistémica del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno
 20 (por ejemplo, aumenta el aclaramiento o disminuye la vida media, por ejemplo, $T_{1/2\beta}$) del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. En modalidades, la acumulación sistémica se reduce al compararse con la de otro agente terapéutico (por ejemplo, tocilizumab, bevacizumab, ranibizumab, y/o

aflibercept). En modalidades, la acumulación sistémica se reduce al compararse con la de tocilizumab y/o aflibercept. En modalidades, la acumulación sistémica se reduce al compararse con la acumulación sistémica de un anticuerpo correspondiente o un fragmento de unión al antígeno que no comprende la mutación. En modalidades, la acumulación sistémica se evalúa después de la administración intravítrea del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método para reducir los efectos sistémicos de inhibir IL-6 en un sujeto, el método que comprende la administración al sujeto un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un dominio Fc mutado tal como aquí se describe. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede inhibir una actividad de IL-6 y posee actividad reducida de Fc (por ejemplo, unión reducida a FcRn) al compararse con un anticuerpo o fragmento del mismo correspondiente que posee un dominio de Fc de tipo natural. En algunos casos, el método de reducir los efectos sistémicos de la inhibición de IL-6 en un sujeto incluyen la administración al sujeto de un antagonista de IL-6, que comprende un dominio Fc mutado tal como aquí se describe.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un

anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aquí descrito. En modalidades, el ácido nucleico codifica una secuencia de aminoácidos aquí descrita. En modalidades, el ácido nucleico comprende SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43, o SEQ ID NO:48. En 5 modalidades, el ácido nucleico codifica una secuencia descrita en la Tabla 4.

También se proporciona en la presente un vector que comprende el ácido nucleico. También se proporciona en la presente una célula que comprende el ácido nucleico o el 10 vector.

En modalidades, un anticuerpo IL-6 o fragmento de unión al mismo aquí descrito es para su utilización en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, un humano) que padece una enfermedad asociada a IL-6. En modalidades, la enfermedad 15 es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6, por ejemplo, en el cuerpo vítreo.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es para su utilización en el tratamiento de un 20 sujeto (por ejemplo, un humano) con edema macular diabético (DME, *por sus siglas en inglés*), retinopatía diabética, uveítis, glaucoma, sequedad ocular (por ejemplo, queratoconjuntivitis), conjuntivitis alérgica, dolor ocular, desprendimiento de retina regmatógeno (RRD, *por sus siglas en*

inglés), degeneración macular relacionada a la edad (AMD, *por sus siglas en inglés*), retinopatía diabética proliferativa (PDR, *por sus siglas en inglés*), oclusión de la vena central de la retina (RVO, *por sus siglas en inglés*), neuromielitis óptica (NMO, *por sus siglas en inglés*), trasplante de córnea, abrasión de la córnea, o daño ocular físico. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es para su utilización en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, un humano) con DME.

En modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno contra IL-6 aquí descrito es para su utilización en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada a IL-6. En modalidades, la enfermedad es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el cuerpo vítreo. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético (DME), retinopatía diabética, uveítis, glaucoma, sequedad ocular (por ejemplo, queratoconjuntivitis), conjuntivitis alérgica, dolor ocular, desprendimiento de retina regmatógeno (RRD), degeneración macular relacionada a la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), oclusión de la vena central de la retina (RVO), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión de la córnea, o daño ocular físico. En modalidades,

la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético. En modalidades, el medicamento se formula para su administración al cuerpo vítreo del ojo del sujeto (por ejemplo, inyección intravítrea).

5 También en la presente se proporciona una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno aquí descrito. En modalidades, la composición además comprende un acarreador farmacéuticamente aceptable y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 En modalidades, la composición es para su utilización en el tratamiento de una enfermedad asociada a IL-6. En modalidades, la enfermedad es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular que se caracteriza por un nivel elevado de IL-6 en el cuerpo vítreo. En modalidades, la
15 composición es para su utilización en el tratamiento de edema macular diabético (DME), retinopatía diabética, uveítis, glaucoma, sequedad ocular (por ejemplo, queratoconjuntivitis), conjuntivitis alérgica, dolor ocular, desprendimiento de retina regmatógeno (RRD), degeneración
20 macular relacionada a la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), oclusión de la vena central de la retina (RVO), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión de la córnea, o daño ocular físico.

Además en la presente se proporciona un método para

tratar una enfermedad asociada a IL-6, el método comprende la administración a un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de u anticuerpo o fragmento contra IL-6 aquí descrito. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es

5 una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el cuerpo vítreo. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético (DME), retinopatía diabética, uveítis, glaucoma, sequedad ocular (por ejemplo,

10 queratoconjuntivitis), conjuntivitis alérgica, dolor ocular, desprendimiento de retina regmatógeno (RRD), degeneración macular relacionada a la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), oclusión de la vena central de la retina (RVO), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea,

15 abrasión de la córnea, o daño ocular físico. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético.

En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, o la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, se administra al cuerpo

20 vítreo del ojo del sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravítrea). En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, o la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno es para inyección intravítrea.

En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético y el anticuerpo o fragmento o la composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se administra al cuerpo vítreo del ojo del sujeto.

Además, en la presente se proporciona un anticuerpo o fragmento (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno) del mismo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo contra IL-6 tal como aquí se describe=, o una composición que comprende dicho anticuerpo o fragmento del mismo, para su utilización en el tratamiento de una enfermedad asociada a IL-6 (por ejemplo, para su utilización en el tratamiento de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, con una enfermedad asociada a IL-6).

En modalidades, dicha enfermedad es una enfermedad ocular que se caracteriza por un nivel elevado de IL-6, por ejemplo, en el cuerpo vítreo. En modalidades, dicha enfermedad es edema macular diabético (DME), retinopatía diabética, uveítis, sequedad ocular (por ejemplo, queratoconjuntivitis), conjuntivitis alérgica, degeneración macular relacionada a la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), desprendimiento de retina regmatógeno (RRD), oclusión de la vena central de la retina (RVO), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión de

la córnea, o daño ocular físico. En modalidades, dicha enfermedad es DME. En modalidades, dicha enfermedad es sequedad ocular. En modalidades, dicha enfermedad es queratoconjuntivitis. En modalidades, dicha enfermedad es uveítis. En modalidades, dicha enfermedad es AMD. En modalidades, dicha enfermedad es PDR. En modalidades, dicha enfermedad es trasplante de córnea, abrasión de córnea o daño ocular físico. En modalidades, el anticuerpo o fragmento (por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno) es adecuado para su administración al cuerpo vítreo del ojo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento (por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno) se administra al cuerpo vítreo del ojo.

Además, en la presente se proporciona un método de tratamiento de una enfermedad asociada a IL-6, el método comprende la administración a un sujeto con un anticuerpo IL-6 o fragmento del mismo tal como aquí se describe. En modalidades, el anticuerpo IL-6 o fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión al antígeno del mismo), se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el cuerpo vítreo. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético (DME), retinopatía diabética, uveítis, sequedad ocular, queratoconjuntivitis, degeneración

macular relacionada a la edad (AMD), retinopatía diabética proliferativa (PDR), oclusión de la vena central de la retina (RVO), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión de la córnea, o daño ocular físico.

5 En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno del mismo), es adecuado para su administración al cuerpo vítreo del ojo. En modalidades, el anticuerpo o fragmento del mismo (por ejemplo, el fragmento de unión al antígeno del mismo),
10 se administra al cuerpo vítreo del ojo del sujeto. En modalidades, la enfermedad asociada a IL-6 es edema macular diabético y el anticuerpo o fragmento del mismo se administra al cuerpo vítreo del ojo del sujeto.

Además, en la presente se proporciona un kit que
15 comprende un anticuerpo de IL-6 o composición aquí descrita y, opcionalmente, instrucciones para su utilización.

Además, en la presente se proporciona un contenedor o dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de administración de fármaco, que comprende un anticuerpo de IL-6 o composición
20 aquí descrita. En modalidades, dicho dispositivo se configura para la administración del anticuerpo o composición al ojo, por ejemplo, al cuerpo vítreo. Además, en la presente se proporciona un kit que comprende dicho contenedor o dispositivo.

Tal como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo" es sinónimo de inmunoglobulina y debe considerarse como comúnmente se conoce en la técnica. El término anticuerpo no se limita por cualquier método de producción de anticuerpos. Por ejemplo, el término anticuerpo incluye, entre otros, anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Tal como aquí se utiliza, un anticuerpo es un tetrámero, y a menos que se describa lo contrario, cada uno se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, cada par posee una cadena ligera y una cadena pesada. El extremo amino terminal de cada cadena comprende una región variable de alrededor de entre 100 y 120 aminoácidos o más que poseen un papel primordial en el reconocimiento del antígeno. El extremo carboxilo terminal de cada cadena comprende una región constante con un papel primordial en la función efectora del anticuerpo. Las clases de cadenas ligeras humanas se denominan cadenas ligeras kappa y lambda. Las clases de cadenas pesadas son mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo de un anticuerpo. Los isotipos de anticuerpos son IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Entre las cadenas ligera y pesada, las regiones variables y constantes se unen mediante una región "J" de alrededor de 12 o más aminoácidos, y la cadena pesada además incluye una

región "D" de alrededor de tres o más aminoácidos.

Las regiones variables de cada par de cadena pesada/ligera (VH y VL), respectivamente, forman el sitio de unión al antígeno. De este modo, un anticuerpo IgG intacto, por ejemplo, posee dos sitios de unión. A excepción de anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son los mismos.

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo muestran la misma estructura general o regiones de armazón relativamente conservadas (FR) unidas mediante tres regiones hipervariables, además denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. El término "variable" se refiere al hecho que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en cuanto a secuencia entre anticuerpos y se involucran en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. La variabilidad reside primordialmente en las CDR, que se separan mediante las regiones de armazón (FR) más altamente conservadas. La asignación de aminoácidos a cada dominio se lleva a cabo de acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), o Chothia and Lesk, J Mol Biol 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989), donde se describen

métodos conocidos en la técnica.

“Tipo natural” puede referirse al alelo o especie más prevalente que se encuentra en una población o al anticuerpo obtenido de un animal no manipulado, al compararse con un
5 alelo o polimorfismo, o una variante o derivado obtenido mediante alguna forma de manipulación, tal como mutagénesis, utilización de métodos recombinantes y medios similares para cambiar un aminoácido de la molécula de unión al antígeno.

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una
10 porción de una cadena intacta o completa o a un anticuerpo, generalmente a la de unión al blanco o región variable. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. Un “fragmento funcional” o “análogo de un anticuerpo anti IL-6 de sitio II”
15 es un fragmento que puede prevenir o reducir sustancialmente la habilidad de IL-6 de unirse a un receptor, reducir la habilidad del complejo IL-6/IL-6R para unirse a gp130, o reducir la habilidad del ligando para unirse a gp130 o para iniciar la señalización. Tal como aquí se utiliza, “un
20 fragmento de unión al antígeno” o “fragmento funcional” generalmente es sinónimo de “fragmento de anticuerpo” y puede referirse a fragmentos, tales como Fv, Fab, F(ab')₂ y similares que pueden prevenir o reducir sustancialmente la habilidad de IL-6 de unirse a un receptor, reducir la

habilidad del complejo IL-6/IL-6R para unirse a gp130, o para iniciar la señalización.

Un "derivado" de un anticuerpo es un polipéptido que incluye al menos una CDR de un anticuerpo aquí descrito.

5 Normalmente, el derivado puede unirse al sitio II de IL-6.

"Competir" se refiere que a un primer anticuerpo o fragmento del mismo, puede competir por la unión con un segundo anticuerpo o fragmento del mismo, de tal modo que la unión del primer anticuerpo con su epítipo disminuye a
10 niveles detectables en la presencia del segundo anticuerpo, al compararse con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. En algunos casos, el término también puede referirse a la unión del segundo anticuerpo a su epítipo, la cual es menor a niveles detectables en la
15 presencia del primer anticuerpo. El mecanismo de dicha competición puede ser mediante, en ejemplos no limitantes, impedimento estérico, cambio de conformación, unión a un epítipo común.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el
20 contexto de las secuencias de ácido nucleico se refiere a los residuos en dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para su máxima correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser hasta al menos de nueve nucleótidos, por ejemplo, al menos alrededor

de 18 nucleótidos, al menos alrededor de 24 nucleótidos, al menos alrededor de 28 nucleótidos, al menos alrededor de 32 nucleótidos, al menos alrededor de 36 nucleótidos, o al menos alrededor de 48 o más nucleótidos. Los algoritmos conocidos en la técnica pueden utilizarse para medir identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos pueden compararse utilizando FASTA, Gap o Bestfit (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). FASTA, incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencias de las regiones de la mejor coincidencia entre la secuencia de consulta y la secuencia de búsqueda (Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol 266:227-258 (1996); Pearson, J Mol Biol 276:71-84 (1998); incorporados en la presente a modo de referencias). Se utilizan normalmente los parámetros por defecto para un programa o algoritmo en particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico pueden determinarse utilizando FASTA con sus parámetros por defecto (longitud de palabra de 6 y factor NOPAM para la matriz de puntaje) o utilizando Gap con sus parámetros por defecto, tal como se proporcionan en GCG Versión 6.1, incorporado en la presente a modo de

referencia.

El término "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de aminoácidos se refiere a los residuos en dos secuencias que son los mismos cuando se
5 alinean para su máxima correspondencia. La longitud de comparación de identidad de secuencia puede ser hasta al menos de cinco residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos alrededor de 20 residuos de aminoácidos, al menos alrededor de 30 residuos de aminoácidos, al menos alrededor de 50
10 residuos de aminoácidos, al menos alrededor de 100 residuos de aminoácidos, al menos alrededor de 150 residuos de aminoácidos, o al menos alrededor de 200 o más residuos de aminoácidos. La identidad de secuencia en los polipéptidos se mide normalmente utilizando software de análisis de
15 secuencia. Los algoritmos para la determinación del porcentaje de identidad de secuencia se conocen en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos pueden compararse utilizando FASTA, Gap o Bestfit (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). El
20 software de análisis de proteínas encuentra coincidencias en las secuencias utilizando mediciones de similitud asignadas a distintas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit",

los cuales pueden utilizarse con parámetros por defecto tal como lo especifican los programas para determinar la homología de la secuencia o la identidad de la secuencia entre polipéptidos altamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de distintas especies de organismos, o entre una proteína de tipo natural y un análogo de la misma. Véase, por ejemplo, GCG Versión 6.1 (University of Wisconsin, Madison, WI). Las secuencias de polipéptido también pueden compararse utilizando FASTA y sus parámetros por defecto o recomendados, véase GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) que proporciona alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor coincidencia entre la secuencia de consulta y la secuencia de búsqueda (Pearson, Methods Enzymol 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol Biol 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo que puede utilizarse cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de distintos organismos es el programa computacional BLAST, por ejemplo, blastp o tblastn, utilizando parámetros por defecto tal como los proporcionan los programas. Véanse, por ejemplo, Altschul et al., J Mol Biol 215:403-410 (1990); Altschul et al., Nucleic Acids Res 25:3389-402 (1997).

Una proteína o polipéptido es "sustancialmente pura", "sustancialmente homogénea" o "sustancialmente purificada"

cuando al menos alrededor de entre 60 y 75% de una muestra, posee una sola especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérica o multimérica. Un polipéptido o proteína sustancialmente puro puede comprender alrededor de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% pureza; por ejemplo, un polipéptido o proteína sustancialmente pura es 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, o 99% pura. La pureza u homogeneidad de la proteína puede evaluarse mediante cualquier medio adecuado, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína seguida por la visualización de una o más bandas asociadas con la proteína o polipéptido (por ejemplo, tras la tinción del gel), HPLC por exclusión de tamaños, HPLC por intercambio de cationes, electroforesis de capilaridad reducida en SDS, mapeo de péptidos o mapeo de glicanos. Se puede lograr una mayor resolución utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, otros medios de purificación.

El término "similitud sustancial", cuando denomina a un ácido nucleico o fragmento del mismo, se refiere a que, cuando se alinea de manera óptima con las inserciones o delecciones apropiadas del nucleótido con otro ácido nucleico (o su hebra complementaria), hay identidad de secuencia de nucleótidos en al menos alrededor de 85%, al menos alrededor de 90%, y al menos alrededor de 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de

bases de nucleótidos, por ejemplo, 85%, 90%, 95%, 96%, 98%, o 99% de identidad de secuencia, medida por cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap.

5 Aplicándose a polipéptidos, el término "identidad sustancial" o "similitud sustancial" se refiere a dos secuencias de aminoácidos, que cuando se alinean de manera óptima, mediante programas tales como GAP o BESTFIT utilizando marcas por espacios tal como lo proporcionan los
10 programas, intercambian al menos alrededor de 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia; por ejemplo, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia. En ciertas modalidades, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren en
15 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

 "Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de un agente terapéutico que se administra y que mejora al menos un signo o síntoma de una enfermedad tratada o aumenta o mejora el o los efectos profilácticos o
20 terapéuticos de otro tratamiento (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad asociada a IL-6. Se entiende que la cantidad terapéuticamente efectiva puede administrarse en dosis múltiples a lo largo de una cantidad limitada de tiempo o a modo de tratamiento crónico.

"Tratar" y "tratamiento" se refieren a un método para mejorar uno o más signos o síntomas de una enfermedad.

Tal como aquí se utiliza, el término "enfermedad" incluye enfermedades y desórdenes.

5 Toda la descripción de cada documento de patente y artículo científico aquí referico, y aquellos documentos de patentes y artículos científicos por ellos citados, se incorporan expresamente a modo de referencia en la presente para cualquier propósito.

10 Las características y ventajas adicionales de la invención se describen con más particularidad a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es una gráfica que ilustra los resultados de un experimento en el cual un anticuerpo anti IL-6 se administró vía intravítrea en un modelo de rata CNV. Se administró anticuerpo anti VEGF como control positivo y el control negativo fue el vehículo solamente. $p = 0.0054$ al Día 15 y $p = 0.0005$ al Día 22 para anti IL-6 vs. vehículo control.

20 La FIGURA 2 es una gráfica que ilustra los resultados de un experimento de unión para probar la habilidad del anticuerpo murino 64 para inhibir la unión de IL-6/IL-6R a gp130.

La FIGURA 3A es una gráfica que ilustra un experimento

en el cual se probó la habilidad de 020 para bloquear la señalización de IL-6 en la ausencia de un exceso de IL-6R α soluble. Los experimentos se llevaron a cabo en células HEK-Blue-IL-6 con 0.2 ng/mL IL-6 y 2 μ g/mL IL6R α .

5 La FIGURA 3B es una gráfica que ilustra un experimento en el cual se probó la habilidad de 020 para bloquear la señalización de IL-6 en la presencia de un exceso de IL-6R α soluble. Los experimentos se llevaron a cabo en células HEK-Blue-IL-6 con 0.2 ng/mL IL-6 y 2 μ g/mL IL6R α .

10 La FIGURA 4 es una gráfica que ilustra los resultados de un experimento en el cual un anticuerpo monoclonal anti IL-6 ("Bloqueador de IL-6") se administró vía intravítrea en un ratón modelo CNV. Los controles fueron no tratamiento (ojo contralateral), inyección intravítrea de un anticuerpo anti
15 VEGF ("Bloqueador de VEGF") o inyección intravítrea de un anticuerpo de isotipo control anti HRP ("Anticuerpo control").

La FIGURA 5 muestra la unión de IL-6 en relación al anticuerpo de tipo natural (EBI-029), en anticuerpos con las
20 siguientes mutaciones (1) I51T/S55G, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T,/S55G, y (4) A28V/S30P/I51T/S55G (también denominado como EBI-030).

La FIGURA 6 muestra la señalización en fracciones de las células reporteras de IL6 HEK-Blue™ tratadas con IL-6 y uno

de los siguientes Fab: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

La FIGURA 7 muestra la luminiscencia (una medida de proliferación inducida por IL-6) en células T1165.85.2.1
5 tratadas con IL-6 y uno de los siguientes Fab a la concentración mostrada: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

La FIGURA 8 muestra la señalización en fracciones de las células reporteras de IL6 HEK-Blue™ tratadas con 20 pM IL-6
10 y distintas concentraciones de (1) EBI-029 IgG2 (EBI029) producido en células HEK-6E, (2) EBI-030 IgG2 (EBI030) producido en células HEK-6E, y (3) EBI-030 IgG2-H311A (EBI030 H311A) producido en células HEK-6E; (4) tocilizumab (TOCI), y (5) EBI-030 IgG2 producido en un conjunto estable CHO (EBI-
15 030 CHO).

La FIGURA 9 muestra el modelo farmacocinético descrito en el Ejemplo 20.

La FIGURA 10 muestra el efecto de aumentar la potencia del anticuerpo en la duración de inhibición de IL-6 en el
20 ojo, tal como se simula utilizando el modelo farmacocinético descrito en el Ejemplo 20.

La FIGURA 11 muestra la concentración de fármaco EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, y tocilizumab (TCZ) en el cuerpo vítreo a lo largo del tiempo

después de la administración intravítrea.

La FIGURA 12 muestra la concentración de fármaco EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, y tocilizumab (TCZ) en la retina a lo largo del tiempo después de la administración intravítrea.

La FIGURA 13 muestra la concentración de fármaco EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, y tocilizumab (TCZ) en el humor acuoso a lo largo del tiempo después de la administración intravítrea.

La FIGURA 14 muestra la concentración de fármaco EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, EBI-030-H311A, Eylea®, y tocilizumab (TCZ) en la coroides a lo largo del tiempo después de la administración intravítrea.

La FIGURA 15A muestra las localizaciones de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, bisagra, CH2, y CH3 en las secuencias de cadena pesada de EBI-029 (SEQ ID NO: 11), EBI-030 (SEQ ID NO: 41), y EBI-031 (EBI-031 también se denomina en la presente como EBI-030-H311A) (SEQ ID NO: 47).

La FIGURA 15B muestra las localizaciones de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, y CK en la secuencia de cadena ligera (EBI-029, EBI-030 y EBI-031 poseen la misma secuencia de cadena ligera) (SEQ ID NO: 12).

La FIGURA 16A muestra la señalización en fracciones de células reporteras de IL-6 HEK-Blue™ tratadas con 20 pM IL-6

a distintas concentraciones de EBI-031 o tocilizumab.

La FIGURA 16B muestra la señalización en fracciones de células reporteras de IL-6 HEK-Blue™ tratadas con 200 pM hiper IL-6 a distintas concentraciones de EBI-031 o
5 tocilizumab.

La FIGURA 17 muestra resultados de simulaciones por computadora descritas en el Ejemplo 24.

La FIGURA 18 muestra un diagrama esquemático de las tres isoformas estructuralmente distintas de anticuerpos IgG2
10 debido al cambio en el enlace disulfuro.

La FIGURA 19 muestra cromatogramas de RP-HPLC de muestras de EBI-031: sin tratar (panel superior), 5 mM DTT (panel medio), 10 mM cisteína (panel inferior).

La FIGURA 20 muestra cromatogramas de RP-HPLC de
15 muestras de EBI-031 recolectadas de diferentes líneas celulares EBI-031: un cultivo escalado a 200 L de una línea celular clonal (panel superior), un cultivo escalado a 10 L de una línea celular precursor (panel medio), y un conjunto de células transfectadas estables (panel inferior).

20 La FIGURA 21 muestra cromatogramas RP-HPLC de muestras de EBI-031 recolectadas de un cultivo escalado a 200 L de una línea celular clonal, y designa y cuantifica qué isoformas se representan por cual pico en el cromatograma.

La FIGURA 22A es una gráfica que muestra los datos

farmacocinéticos del mono verde (K797), tal como se describe en el Ejemplo 26.

La FIGURA 22B es una gráfica que muestra los datos farmacocinéticos del mono verde (K679), tal como se describe
5 en el Ejemplo 26.

La FIGURA 23 es una gráfica que muestra los datos farmacocinéticos de ambos monos verdes (K797 o K679) y curvas de ajuste.

La FIGURA 24A muestra la concentración del fármaco de
10 EBI-031 en el humor vítreo a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

La FIGURA 24B muestra la concentración del fármaco de EBI-031 en el humor acuoso a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

15 La FIGURA 24C muestra la concentración del fármaco de EBI-031 en la coroides a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

La FIGURA 24D muestra la concentración del fármaco de EBI-031 en la conjuntiva a lo largo del tiempo, después de la
20 administración intravítrea.

La FIGURA 24E muestra la concentración del fármaco de EBI-031 en la córnea a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

La FIGURA 24F muestra la concentración del fármaco de

EBI-031 en el cuerpo ciliar del iris a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

La FIGURA 24G muestra la concentración del fármaco de EBI-031 en el cristalino a lo largo del tiempo, después de la
5 administración intravítrea.

La FIGURA 24H muestra la concentración del fármaco de EBI-031 en la retina a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

La FIGURA 24I muestra la concentración del fármaco de
10 EBI-031 en la esclerótica a lo largo del tiempo, después de la administración intravítrea.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha implicado que IL-6 posee un papel en distintas
15 enfermedades, tales como artritis reumatoide, y se ha reportado que aumenta significativamente en muchas enfermedades, incluyendo enfermedades oculares. IL-6 pueden actuar mediante mecanismos en cis y en trans. En el mecanismo en cis, se considera que IL-6 libre se une al receptor de IL-
20 6 anclado a la membrana (IL-6R también se denomina como IL-6R α y CD126), y el complejo IL-6/IL-6R interactúa con gp130 (también denominado CD130, receptor M de oncostatina, IL-6Rbeta y transductor de señal de IL-6) para activar la señalización en la célula que contiene el complejo. En el

mecanismo en trans, IL-6 libre se une al receptor soluble de IL-6 (sIL-6R). EL complejo IL-6/sIL-6R puede unirse entonces a gp130 presente en una membrana celular. Una diferencia clave entre estos mecanismos es que más tipos celulares expresan gp130 que IL-6R, cuya expresión es más limitada. Por lo tanto, en enfermedades para las cuales es deseable inhibir la señalización de IL-6, por ejemplo, en aquellas en las cuales es deseable inhibir ampliamente la señalización de IL-6, es útil inhibir tanto la señalización de IL-6 en cis como en trans. Los solicitantes han modificado antagonistas de IL-6, por ejemplo, anticuerpos anti IL-6, fragmentos y derivados que pueden inhibir la señalización en cis y en trans de IL-6. Además, los solicitantes han modificado dichos antagonistas de IL-6 para lograr un aclaramiento sistémico más rápido. Los antagonistas de IL-6, por ejemplo, anticuerpos de IL-6 y fragmentos o derivados de los mismos, se describen en WO2014/074905, cuyo contenido completo se incorpora en la presente a modo de referencia. LA presente invención se relaciona a anticuerpos de IL-6 mejorados y usos de los mismos.

Tal como se utiliza en la presente, los términos en singular, incluyendo, pero no limitándose a, "un", "uno", "una" o "el", "la", incluyen el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Características de antagonistas de IL-6 (IL-6a)

En general, un antagonista de IL6 (IL-6a) aquí descrito, se une específicamente al sitio II (sitio 2) de IL-6 y es útil para el tratamiento de enfermedades oculares relacionadas a IL-6 y otras ciertas enfermedades. Una enfermedad ocular relacionada a IL-6 es una en la cual un síntoma o actividad biológica indeseable de la enfermedad se asocia con la expresión o presencia de IL-6. En algunas modalidades, IL-6a posee una gran afinidad para IL-6 libre y unida, es relativamente estable en un organismo, puede inhibir la unión de IL-6 unida a IL-6R (aquí denominado complejo IL-6/IL-6R o IL-6/IL-6R) a gp130, y puede poseer un efecto terapéutico. En general, IL-6a es un anticuerpo o se deriva de un anticuerpo. Por ejemplo, un IL-6a es un Fab de alta afinidad, humanizado, que se puede unir específicamente al sitio II de IL-6 y potencialmente bloquear la señalización en cis y en trans de IL-6. En otro ejemplo, IL-6a es un anticuerpo completo, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG2.

En algunas modalidades, el Fab se configura además como una secuencia de FC modificado o es un anticuerpo completo. En algunas modalidades, el IL-6a con Fc modificado (por ejemplo, Fab con Fc modificado) posee un aclaramiento sistémico más rápido al compararse con un control apropiado, por ejemplo, al compararse con el anticuerpo, fragmento o

derivado del mismo correspondiente que no posee el Fc modificado. Estas y otras características de IL-6a se describen en la presente.

Los solicitantes han diseñado antagonistas de IL-6 que
5 se unen selectivamente al sitio II de IL-6 para proporcionar una inhibición amplia de la señalización de IL-6 debido a que dichas moléculas pueden inhibir la unión de gp130 a IL-6, sin importar si IL-6 se encuentra libre o unida a IL-6r o sIL-6R de membrana. Además, dirigirse al ligando (IL-6) en lugar de
10 al receptor de IL-6, puede evitar el aclaramiento mediado por receptor y la toxicidad debida a ADCC (citotoxicidad mediada por célula y dependiente de anticuerpo). Dado que IL-6 tiene papeles tanto patológicos como protectores en la enfermedad, la utilización de un antagonista de IL-6 (IL-6a) para tratar
15 una enfermedad asociada con un aumento de IL-6 puede mejorar ciertos aspectos de una condición, pero además puede causar efectos adversos significativos, por ejemplo, efectos sistémicos. Esta dualidad de las vías de señalización de IL-6 (es decir, la habilidad para tener efectos deseables y/o
20 indeseables) pueden hacer que sea indeseable tratar una enfermedad asociada a IL-6 con un inhibidor sistémico. De este modo, las composiciones y métodos aquí proporcionados pueden ser útiles para los tratamientos que inhiban al menos una actividad d eIL-6, pero que no tengan un efecto en las

actividades positivas de IL-6, en parte debido a que las composiciones pueden formularse para la administración local, por ejemplo, para la administración local en el ojo. Por ejemplo, en ciertos aspectos, IL-6a se diseña para ser de un tamaño adecuado para su administración a un sitio particular. En algunas modalidades, IL-6a es un anticuerpo completo. En algunas modalidades, IL-6a se deriva de un anticuerpo y es de un formato tal que puede permanecer más tiempo en el cuerpo vítreo del ojo y que tenga un filtrado sistémico limitado. En algunas modalidades, IL-6a es un anticuerpo modificado (por ejemplo, un anticuerpo como dominio Fc modificado) que posee una residencia más larga en el cuerpo vítreo del ojo y/o un filtrado sistémico más limitado, al compararse con un anticuerpo correspondiente sin modificar. En algunas modalidades, IL-6a es un anticuerpo IgG2.

En algunos aspectos, IL-6a es un IL-6a relativamente pequeño, tal como un fragmento de un anticuerpo u otro derivado de un anticuerpo que es de menor tamaño que un anticuerpo completo, por ejemplo, un Fab que se deriva de un anticuerpo IL-6. En algunos casos, IL-6a se encuentra de una forma tal que puede pasar de una parte de un tejido a otra con una cinética mayor al compararse con un anticuerpo correspondiente completo de IL-6. En algunas modalidades, IL-6a es un Fab que se ha modificado para ser una molécula más

grande, la cual es más probable que tenga una mayor residencia en el lugar al cual se administró al compararse con el Fab solo, por ejemplo, IL-6a es dimerizado mediante el dominio Fc. En ciertas modalidades, el dominio Fc se ha
5 modificado de tal modo que la porción Fc posee una unión a FcRn eliminada o reducida que puede reducir la acumulación sistémica al compararse con la misma entidad de unión a IL-6 que incluye un Fc de tipo natural. El dominio Fc modificado puede ser, por ejemplo, un dominio IgG1 o un dominio IgG2.

10 Normalmente, los antagonistas de IL-6 aquí descritos poseen una afinidad suficientemente grande por su blanco, IL-6, para ser efectivos en el mejoramiento de al menos un efecto indeseable de IL-6 y son suficientemente estables para utilizarse como tratamiento.

15 En general, la PK de un IL-6a, por ejemplo, un IL-6a adecuado para su utilización en el ojo, posee una vida media suficientemente larga en el sitio de administración, por ejemplo, en el cuerpo vítreo, para proporcionar un efecto terapéutico. En ejemplos no limitantes, la PK puede ser una
20 vida media de al menos 8 días, 10 días, 14 días, 21 días, 28 días o 30 días.

Identificación de unión de antagonistas de IL-6 al sitio II

En general, puede utilizarse cualquier método conocido en la técnica para generar una molécula que pueda unirse a IL-6,

por ejemplo, pueden evaluarse bibliotecas de polipéptidos o bibliotecas moleculares para encontrar compuestos candidatos en un ensayo de habilidad de un polipéptido o compuesto para unirse a IL-6. Una vez que un compuesto candidato se
5 identifica, el sitio de unión del compuesto puede determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede evaluarse la habilidad de una molécula para unirse a IL-6 de tipo natural y la unión comparada a la habilidad del compuesto para unirse a IL-6 mutada en el sitio
10 I, sitio II o sitio III. En modalidades, IL-6a, tal como aquí se describe, mantiene la habilidad de unirse a un complejo IL-6/IL-6R α y a IL-6, y evita la unión de IL-6/IL-6R α a gp130. En modalidades, un IL-6a tal como aquí se describe, puede competir con gp130 por la unión del complejo IL-6/IL-
15 6R α , por ejemplo, mediante la unión al sitio II de IL-6. Dichas actividades de unión pueden ensayarse utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los candidatos IL-6a pueden probarse, por ejemplo, utilizando un sistema de ensayo HEK-Blue™ IL-6 (InvivoGen,
20 San Diego). Las células HEK-Blue™ IL-6 son células HEK293 que se transfectan de manera estable con IL-6R humano y un gen reportero SEAP inducible por STAT3. En la presencia de IL-6, STAT3 se active y se secreta SEAP. SEAP se evalúa utilizando, por ejemplo, QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego). LA adición

de un antagonista de IL-6 a las células previene la secreción o disminuye el nivel de SEAP, como resultado de inhibir el receptor unido de IL-6 libre y soluble.

K_D se refiere a la constante de equilibrio de afinidad de unión de una interacción particular anticuerpo-antígeno o de una interacción fragmento de anticuerpo-anticuerpo. En modalidades, un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno aquí descrito se une a un antígeno (por ejemplo, IL-6) con una K_D menor o igual a 250 pM, por ejemplo, menor o igual a 225 pM, 220 pM, 210 pM, 205 pM, 150 pM, 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM, o 1 pM. K_D puede determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando resonancia de superficie de plasmones, por ejemplo, utilizando el sistema BiaCore™.

K_{off} se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno o complejo fragmento de anticuerpo-antígeno. La constante de velocidad de disociación puede determinarse utilizando resonancia de superficie de plasmones, por ejemplo, utilizando el sistema BiaCore™. Una K_{off} relativamente lenta puede contribuir a características deseables de un tratamiento, por ejemplo, permitiendo administración menos frecuente del inhibidor a un sujeto que necesite dicho tratamiento.

Especificidad

En algunas modalidades, un IL-6a aquí descrito se une específicamente a un blanco, por ejemplo, IL-6. En general, "unión específica", tal como aquí se utiliza, indica que una molécula se une preferencialmente a una molécula seleccionada y muestra mucha menos afinidad de unión por una o más moléculas adicionales. En modalidades, la afinidad de unión por otra molécula es 1, 2, 3 o más órdenes de magnitud menores que la afinidad de unión por el blanco.

10 Tal como se describe anteriormente, IL-6 puede encontrarse presente como IL-6 libre y como IL-6 unida a IL-6R α soluble. Los solicitantes han identificado el sitio II de IL-6 como un blanco óptimo para un antagonista de IL-6 al compararse con un inhibidor que se une al sitio I de IL-6. Un

15 inhibidor de sitio I puede inhibir la unión de IL-6 libre a IL-6R α . Sin embargo, dicho inhibidor no puede prevenir la actividad iniciada por complejos IL-6/IL-6R α preexistentes, excepto mediante el reemplazo limitado por la K_{off} del complejo. Otra alternativa, un inhibidor que se une a IL-6R α ,

20 es menos adecuada dado que puede haber una habilidad limitada para prevenir la actividad de IL-6 a menos que esté presente en concentraciones saturantes. Dado que la cantidad de receptor IL-6 es generalmente muy alta al compararse con la cantidad de IL-6, este enfoque puede requerir la

administración de una cantidad indeseablemente grande de una composición que inhiba la actividad de IL-6 mediante la unión al receptor. En modalidades, los antagonistas de IL-6 aquí descritos (por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos y derivados de los mismos aquí descritos) pueden bloquear la actividad de IL-6 aun cuando IL-6 se une a IL-6T. De este modo, una ventaja de IL-6a tal como aquí se describe es que relativamente menos cantidad de la composición puede ser necesaria para su administración para lograr un efecto terapéutico comparándose con un inhibidor dirigido contra el receptor de IL-6. Se ha reportado que los anticuerpos anti receptores son eliminados rápidamente mediante aclaramiento mediado por receptos, limitando significativamente su PK, requiriendo así dosis mayores, dosis más frecuentes, o ambas. De manera adicional, los anticuerpos anti receptor y anti sitio I de IL-6 poseen un problema, dado que aumentan significativamente la concentración en tejido de IL-6 al eliminar la vía normal de aclaramiento de ligando mediada por receptor, exponiendo así al sujeto a niveles potencialmente indeseables de IL-6 en un tejido. Además, la utilización de un inhibidor dirigido contra IL-6R α puede necesitar la presencia del inhibidor cerca de los sitios en el cual la inhibición es deseada y en el sitio en el cual no es deseable, por ejemplo, tratamiento sistémico. La utilización

de un IL-6a que se une al sitio II, el sitio en el cual se une gp130, permite la inhibición mediante IL-6 libre así como IL-6 que se une a IL-6R, pero que no ha activado aún la vía de señalización de IL-6 mediante gp130. De este modo, sin
5 querer adherirse a la teoría, los antagonistas de IL-6 aquí descritos se diseñan para unirse a ambas formas de IL-6 (soluble y unidos al receptor), específicamente los antagonistas de IL-6 unidos al sitio II de IL-6, el cual es accesible en ambas formas. Las composiciones que contienen un
10 IL-6a tal y como se describen en la presente pueden inhibir la señalización en cis y en trans de IL-6.

En algunos casos, los compuestos y métodos aquí proporcionados se diseñan para proporcionar un bloqueo efectivo de IL-6 suficiente para tratar al menos un signo o
15 síntoma de un desorden asociado a IL-6, por ejemplo, inhibiendo la angiogénesis e/o inflamación.

Los compuestos aquí descritos son útiles para tratar enfermedades oculares caracterizadas por un nivel indeseablemente alto de IL-6, por ejemplo, en el cuerpo
20 vítreo (véase Yuuki et al., J Diabetes Compl 15:257 (2001); Funatsu et al., Ophthalmology 110: 1690, (2003); Oh et al., Curr Eye Res 35:1116 (2010); Noma et al., Eye 22:42 (2008); Kawashima et al., Jpn J Ophthalmol 51:100 (2007); Kauffman et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 35:900 (1994); Miao et al.,

Molec Vis 18:574(2012)).

En general, un IL-6a tal como se describe en la presente es un antagonista potente de la señalización de IL-6. En algunas modalidades, un IL-6a aquí descrito posee una alta
5 afinidad por IL-6, por ejemplo, un IC₅₀ menor o igual a 100 pM en un ensayo de HEK-Blue IL-6 utilizando 10 pM IL-6. La alta afinidad de IL-6a puede determinarse basándose en la K_D de IL-6a, por ejemplo, una K_D menor o igual a 1 nM, menor o igual a 500 pM, menor o igual a 400 pM, menor o igual a
10 300 pM, menor o igual a 240 pM, o menor o igual a 200 pM.

Para producir un IL-6a biológico (por ejemplo, una proteína o polipéptido tal como un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo) útil para tratar un desorden asociado con una mayor expresión o actividad de IL-6, normalmente es
15 deseable que el IL-6a biológico posea una alta productividad. Por ejemplo, una productividad adecuada es mayor o igual a 1 g/L (por ejemplo, mayor o igual a 2 g/L, mayor o igual a 5 g/L, o mayor o igual a 10 g/L).

Para administrar de manera efectiva un antagonista de
20 IL-6, es necesario que el inhibidor posea una solubilidad compatible con la concentración a la cual se administrará. Por ejemplo, en el caso de un IL-6a de anticuerpo completo, la solubilidad es mayor o igual a 20 mg/mL, mayor o igual a 10 mg/mL, mayor o igual a 5 mg/mL, o mayor o igual a 1 mg/mL.

Además, para ser un tratamiento viable, el inhibidor debe tener una alta estabilidad a la temperatura corporal de administración y en los sitios de actividad, así como estabilidad durante el almacenamiento. En modalidades, el

5 inhibidor posee una T_m mayor o igual a 60°C (por ejemplo, mayor o igual a 60°C, mayor o igual a 62.5°C, mayor o igual a 65°C, mayor o igual a 70°C, mayor o igual a 73°C, o mayor o igual a 75°C). En modalidades, el inhibidor posee una T_{onset}

10 mayor o igual a 45°C, por ejemplo, mayor o igual a 50°C, mayor o igual a 51°C, mayor o igual a 55°C, o mayor o igual a 60°C. Los métodos para determinar T_m y T_{onset} pueden determinarse utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los antagonistas que poseen las características deseadas pueden seleccionarse de entre tipos adecuados de moléculas

15 conocidas en la técnica, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo fragmentos y derivados de un anticuerpo dirigido contra el sitio II de IL-6 que normalmente mantiene características suficientes del anticuerpo IL-6 precursor (por ejemplo, propiedades deseadas de unión). Dichos antagonistas incluyen

20 fragmentos Fab, fragmentos scFV, fragmentos Fab modificados para incluir una porción Fc y anticuerpos completos modificados para tener un armazón diferente del anticuerpo precursor dirigido contra el sitio II de IL-6.

En algunos aspectos, el IL-6a que aquí se describe

comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo humano que puede competir o tener competencia cruzada con un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse al sitio II de IL-6. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo
5 puede componerse de un dominio VH y un dominio VL aquí descritos, y los dominios VH y VL pueden comprender un grupo de CDR de un anticuerpo de unión a IL-6/sitio II aquí descrito.

Cualquier método adecuado puede utilizarse para
10 determinar el dominio y/o epítipo unido por un IL-6a, por ejemplo, al mutar distintos sitios de IL-6. Dichos sitios en los cuales las mutaciones previenen o disminuyen la unión de IL-6a y el ligando IL-6 están involucrados ya sea directamente en la unión a IL-6a o indirectamente afectando
15 el sitio de unión, por ejemplo, afectando la conformación de IL-6. Otros métodos pueden utilizarse para determinar los aminoácidos únicos por IL-6a. Por ejemplo, un escaneo de unión a péptido puede utilizarse, tal como un inmunoensayo unido a enzima basado (ELISA, *por sus siglas en inglés*) en
20 PEPSCAN. En un escaneo de unión a péptido de este tipo, péptidos cortos que se superponen derivados del antígeno se evalúan sistemáticamente por su capacidad de unión a un miembro de unión. Los péptidos pueden acoplarse de modo covalente a una superficie de soporte para formar un arreglo

de péptidos. Los péptidos pueden encontrarse en conformación lineal o restringida. Una conformación restringida puede producirse utilizando péptidos con un residuo terminal de cisteína (cys) a cada extremo de la secuencia del péptido.

5 Los residuos de cys pueden acoplarse de manera covalente directa o indirectamente a una superficie de soporte de tal modo que el péptido se mantenga en una conformación de asa. De este modo, un péptido utilizado en el método puede tener un residuo de cys añadido a cada extremo de una secuencia de

10 péptido correspondiente a un fragmento del antígeno. Pueden utilizarse péptidos con doble asa, en los cuales un residuo cys se localiza en o cerca de la mitad de la secuencia del péptido. Los residuos cys pueden acoplarse de manera covalente directa o indirectamente a una superficie de

15 soporte de tal modo que los péptidos formen una conformación de doble asa, con un asa en cada lado del residuo central de cys. Los péptidos pueden generarse sintéticamente, y los residuos de cys pueden por lo tanto modificarse en los sitios deseados, a pesar de no ser naturales en la secuencia del

20 sitio II de IL-6. De manera opcional, los péptidos lineales o restringidos pueden evaluarse en un ensayo de unión de péptido. Un escaneo de unión de péptido puede involucrar la identificación (por ejemplo, utilizando un ELISA) un grupo de péptidos a los cuales se une el miembro de unión, donde los

péptidos poseen secuencias de aminoácidos correspondientes a fragmentos de un IL-6a (por ejemplo, péptidos que incluyen alrededor de 5, 10 o 15 residuos contiguos de IL-6a), y el alineamiento de péptidos para determinar una marca de
5 residuos unidos por el miembro de unión, donde la marca comprende residuos comunes para péptidos superpuestos. De manera alternativa o adicional, el método de escaneo de unión a péptido puede utilizarse para identificar los péptidos a los cuales se une IL-6a con al menos una proporción
10 seleccionada de señal:ruido.

Otros métodos conocidos en la técnica pueden utilizarse para determinar los residuos unidos por un anticuerpo, y/o para confirmar los resultados del escaneo de unión a péptido, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida (por ejemplo,
15 tal como aquí se describe), intercambio de hidrógeno y deuterio, espectrometría de masas, NMR, y cristalografía de rayos X.

Normalmente, un IL-6a útil tal como se describe en la presente es una molécula de anticuerpo humano, una molécula
20 de anticuerpo humanizado o un fragmento de unión de los mismos. En general, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El origen de dicho anticuerpo puede ser humano, murino, de rata, de camélico, de conejo, ovino, porcino o bovino, y puede generarse de acuerdo a métodos conocidos en

la técnica.

En general, un IL-6a comprende al menos las CDR de un anticuerpo que puede unirse específicamente a IL-6 (por ejemplo, IL-6 humana), por ejemplo, al sitio II de IL-6. La estructura de una CDR o un grupo de CDR de la invención puede ser una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o porción sustancial de la misma en la cual la CDR o grupo de CDR se localiza en un lugar correspondiente al de la CDR o grupo de CDR de dominios variables naturales de anticuerpo VH y VL codificados por genes de inmunoglobulina reacomodados. Las estructuras y localizaciones de los dominios variables de inmunoglobulina puede determinarse en referencia a Kabat, et al., 1983 (National Institutes of Health), y actualizaciones del mismo que se pueden encontrar bajo la búsqueda de "Kabat" utilizando cualquier motor de búsqueda en internet.

Un IL-6a, tal como aquí se describe, es normalmente un anticuerpo que generalmente comprende un dominio de anticuerpo VH y/o un dominio VL de anticuerpo. Un dominio VH comprende un grupo de CDR de cadena pesada (VHCDR) y un dominio VL comprende un grupo de CDR de cadena ligera (VLCDR). Ejemplos de dichas CDR se proporcionan en la presente en los Ejemplos. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende un VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3 y un armazón. Puede comprender de

manera alternativa o además puede comprender un dominio VL de anticuerpo VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 y un armazón.

En la presente se describen antagonistas de IL-6 que comprenden VHCDR1 y/o VHCDR2 y/o VHCDR3 tales como los que
5 aquí se describen y/o un VLCDR1 y/o VLCDR2 y/o VLCDR3 tales como los que aquí se describen. El IL-6a puede comprender una o más CDR de cualquier anticuerpo, fragmento o derivado de los aquí descritos. El IL-6a puede comprender un grupo de VHCDR (por ejemplo, VHCDR1, VHCDR2, y VHCDR3), y,
10 opcionalmente, puede además comprender un grupo de VLCDR (por ejemplo, VLCDR1, VLCDR2, y VLCDR3). Las CDR pueden derivarse de uno o más anticuerpos, fragmentos o derivados de los aquí descritos. Por ejemplo, las VLCDR pueden derivarse del mismo anticuerpo o de uno diferente de VHCDR.

15 En general, un dominio VH puede aparearse con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo. Por ejemplo, el dominio HC de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 se aparea con el dominio LC de SEQ ID NO:2. En algunos casos, un dominio VH o VL por sí solo puede
20 utilizarse como un IL-6a.

En algunos aspectos, IL-6a es una molécula de anticuerpo, fragmento o derivado del mismo que comprende (i) una secuencia de dominio VH que posee al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos

con un dominio VH aquí descrito (por ejemplo, SEQ ID NO:37),
o (ii) un grupo de VHCDR (por ejemplo, VHCDR1, VHCDR2, y/o
VHCDR3) de la secuencia de dominio VH. En modalidades, la
molécula de anticuerpo, fragmento o derivado del mismo
5 comprende un VHCDR1, VHCDR2, y VHCDR3 de SEQ ID NO:37. En
modalidades, la molécula de anticuerpo, fragmento o derivado
del mismo comprende una VHCDR1, VHCDR2, y VHCDR3 que se
diferencian colectivamente de VHCDR1, VHCDR2, y VHCDR3 de SEQ
ID NO:37 en no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de
10 4, o no más de 5 aminoácidos.

La molécula de anticuerpo, fragmento o derivado del
mismo puede además comprender, opcionalmente (i) una
secuencia de dominio VL que posee al menos 60, 70, 80, 85,
90, 95, 98 o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con
15 un dominio VL aquí descrito, por ejemplo, un dominio VL de
SEQ ID NO: 38, o (ii) un grupo de VLCDR (por ejemplo, VLCDR1,
VLCDR2, y/o VLCDR3) de dominio VL. En modalidades, la
molécula de anticuerpo, fragmento o derivado del mismo
comprende VLCDR1, VLCDR2, y VLCDR3 de SEQ ID NO: 38. En
20 modalidades, la molécula de anticuerpo, fragmento o derivado
del mismo comprende una VLCDR1, VLCDR2, y VLCDR3 que difiere
colectivamente de VLCDR1, VLCDR2, y VLCDR3 de SEQ ID NO:38 en
no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4, o no más
de 5 aminoácidos. Los algoritmos que pueden utilizarse para

calcular el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluyen, por ejemplo, BLAST, FASTA, o el algoritmo de Smith-Waterman, por ejemplo, utilizando parámetros por defecto.

5 Un IL-6a tal como aquí se describe, puede comprender regiones constantes de anticuerpo o partes del mismo, por ejemplo, regiones constantes o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede encontrarse unido en su extremo carboxilo terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo, incluyendo cadenas CK o CL humanas. De modo
10 similar, un IL-6a basado en un dominio VH puede encontrarse unido en su extremo carboxilo terminal completamente o en parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las
15 subclases de isotipos, particularmente IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En modalidades, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se modifica para reducir o eliminar actividad ADCC.

En una modalidad, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG2. En una modalidad el anticuerpo de la
20 invención comprende un armazón de IgG2, región constante de IgG2, o región Fc de IgG2 tal como aquí se describe.

Los anticuerpos IgG2 pueden existir como tres isoformas estructurales principales IgG2-A, IgG2-B, e IgG2-A/B (Wypych

J. et al. *Journal of Biological Chemistry*. 2008, 283:16194-16205). Esta heterogeneidad estructural se debe a distintas configuraciones de los puentes disulfuro que unen los brazos Fab a la región de bisagra de cadena pesada. En la isoforma

5 IgG2-A, no hay puentes disulfuro uniendo los brazos Fab a la región de bisagra. En la isoforma IgG2-B, ambos brazos poseen enlaces disulfuro uniendo la cadena pesada y ligera a la región de bisagra. La isoforma IgG2-A/B es un híbrido entre las isoformas IgG2-A e IgG2-B, con sólo un brazo Fab con

10 enlaces disulfuro uniendo la cadena pesada y ligera de un brazo Fab a la región de bisagra. La conversión de un anticuerpo IgG2 entre dos o todas las isoformas estructurales diferentes, también denominada como aleatorización de disulfuros, ocurre naturalmente in vivo e in vitro para

15 anticuerpos naturales y recombinantes. Como resultado, las formulaciones de anticuerpos IgG2 en la técnica comprende una mezcla heterogénea de isoformas IgG2-A, IgG2-B, e IgG2-A/B. Las distintas isoformas de IgG2 pueden tener propiedades funcionales únicas y diferentes, tales como diferencias en

20 estabilidad, agregación, viscosidad, unión al receptor Fc o potencia. LA presencia de múltiples isoformas o niveles mayores de una isoforma particular en un anticuerpo IgG2 pueden afectar negativamente la estabilidad, agregación o potencia.

La presente invención proporciona un anticuerpo con la ventaja de existir primordialmente en la isoforma IgG2-A o IgG2-A/B. El anticuerpo de la presente invención no existe en la isoforma IgG2-B, o no existe en la isoforma IgG2-B durante una cantidad de tiempo sustancial. Por lo tanto, las composiciones y formulaciones que comprenden al anticuerpo de la invención son menos heterogéneas que otros anticuerpos IgG2 conocidos en la técnica, y, por lo tanto, pueden preferirse más para su utilización en una aplicación terapéutica.

Las composiciones que comprenden el anticuerpo de la invención comprenden primordialmente las isoformas IgG2-A y/o IgG2-A/B del anticuerpo. En una modalidad, una composición que comprende un anticuerpo aquí descrito comprende al menos 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de las isoformas IgG2-A o IgG2-A/B del anticuerpo. En una modalidad, una composición que comprende un anticuerpo aquí descrito comprende al menos 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de las isoformas IgG2-A e IgG2-A/B conjuntamente. En dichas modalidades, una composición que comprende un anticuerpo aquí descrito no comprende una cantidad sustancial de las isoformas IgG2-B del anticuerpo. Por ejemplo, la composición comprende menos de 10%, 5%, 2%, 1%, 0.5%, o 0.1% de las isoformas IgG2-B del anticuerpo.

En algunos casos, un anticuerpo de la invención es modificado adicionalmente utilizando métodos conocidos en la técnica, creando una secuencia con un alotipo específico, por ejemplo, un alotipo que predomine en una población con un
5 origen geográfico particular. En algunos casos, la región constante de la cadena pesada humana se modifica para este propósito.

Un IL-6a puede ser una molécula de anticuerpo, fragmento de unión de la misma o variante, con una o más CDR, por
10 ejemplo, un grupo de CDR, en un armazón de anticuerpo. Por ejemplo, una o más CDR de un grupo de CDR de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tal como aquí se describe) puede insertarse en un armazón (por ejemplo, un armazón humano) para proporcionar una
15 molécula de anticuerpo. Las regiones de armazón pueden derivarse de secuencias de genes de línea germinal humana o pueden ser de origen no germinal.

Los residuos de armazón de VH y/o VL pueden modificarse tal como se describe y ejemplifica en la presente, por
20 ejemplo, utilizando mutagénesis dirigida.

Los cambios de aminoácidos pueden hacerse en una o más regiones de armazón y/o en una o más CDR derivadas de un anticuerpo contra IL-6 dirigido al sitio II de IL-6 (aquí denominado un "anticuerpo de IL-6 de referencia") utilizando

métodos y parámetros conocidos en la técnica. También se incluyen en la presente un antagonista resultante de IL-6 que mantiene la unión al sitio II de IL-6 (por ejemplo, sitio II de IL-6 humana) y normalmente posee al menos la misma unión o

5 afinidad mayor al compararse al anticuerpo de IL-6 de referencia. En algunos casos, para mejorar un parámetro tal como la estabilidad, un cambio que resulte en una disminución de la afinidad de unión del IL-6a derivado al compararse con el IL-6a de referencia (por ejemplo, el anticuerpo de

10 referencia) puede introducirse para crear un IL-6a útil. En algunas modalidades, por ejemplo, en algunos casos en los cuales la referencia se relaciona a la unión de FcRn o a un parámetro farmacocinético (PK) tal como la vida media en el cuerpo vítreo o vida media sistémica (por ejemplo, en sangre,

15 plasma, suero, linfa, hígado, riñón, otro tejido o fluido corporal), un anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo que puede no unirse específicamente a IL-6.

Un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-6a puede incluir la sustitución de uno o

20 más residuos de aminoácidos con un aminoácido no natural o no estándar, modificando uno o más residuos de aminoácidos en una forma no natural o no estándar, o insertando uno o más aminoácido no natural o no estándar en la secuencia. Ejemplos de números y localizaciones de alteraciones en las secuencias

de la invención se describen en la presente. Los aminoácidos naturales incluyen los L-aminoácidos "estándar" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos estándar de una sola letra. Los aminoácidos no estándar incluyen cualquier otro residuo que puede estar incorporado en una cadena principal de polipéptido o resultar de una modificación de un residuo de aminoácido existente. Los aminoácidos no estándar pueden ser naturales o no naturales. Muchos aminoácidos no estándares naturales se conocen en la técnica, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina y N-acetilserina. Dichos residuos de aminoácidos que son derivados en su posición N-alfa se localizarán solamente en el extremo amino terminal de una secuencia de aminoácidos. El aminoácido se encuentra normalmente como L-aminoácido. En algunos casos, el aminoácido es un D-aminoácido. Las formas metiladas, acetiladas y/o fosforiladas de aminoácidos se conocen y los aminoácidos de la presente invención pueden estar sujetos a dicha modificación.

Las secuencias de aminoácidos en los dominios de anticuerpo y miembros de unión de la invención pueden comprender aminoácidos no naturales o no estándar, tal como aquí se describe. Los aminoácidos no estándares (por ejemplo, D-aminoácidos) pueden incorporarse en una secuencia de

aminoácido utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, en síntesis de la molécula o mediante modificación posterior a la síntesis o reemplazo de un aminoácido. En algunos casos, un D-aminoácido se utiliza para aumentar la PK
5 de IL-6a.

Las regiones nuevas VH o VL con secuencias derivadas de CDR de la invención pueden generarse utilizando mutagénesis aleatoria de una o más secuencias de ácido nucleico derivadas de VH y/o VL para generar mutaciones en todo el dominio
10 variable. Por ejemplo, puede utilizarse PCR proclive a errores (Chao et al., Nature Protocols, 1:755-768 (2006)). En algunas modalidades, una o dos sustituciones de aminoácidos se llevan a cabo dentro de un dominio o grupo variable completo de CDR. Otros métodos conocidos en la técnica pueden
15 utilizarse para generar mutaciones, por ejemplo, mutagénesis dirigida, normalmente en una o más CDR.

Un método para producir un anticuerpo IL-6a, es alterar un dominio VH tal como aquellos aquí descritos mediante la adición, delección, sustitución o inserción de uno o más
20 aminoácidos. El dominio VH alterado puede combinarse con un dominio VL (por ejemplo, un dominio VL aquí descrito), que además puede alterarse tal como aquí se describe y utilizarse los métodos conocidos en la técnica. Se prueba la habilidad de dichas moléculas para unirse al sitio II de IL-6 y,

opcionalmente, para otras propiedades deseadas tales como el aumento de afinidad al compararse con una molécula de referencia. En algunos casos, un dominio VH o VL variante puede poseer 1, 2, 3, 4 o 5 de dichas alteraciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos).

En modalidades, un IL-6a de la invención es un fragmento de un anticuerpo que se une al sitio II de IL-6 y comprende un sitio de unión al antígeno, por ejemplo, puede unirse al sitio II de IL-6. Los fragmentos de anticuerpo de la invención de la invención se obtienen generalmente iniciando con una molécula de anticuerpo de referencia (precursor), tal como una molécula de anticuerpo que comprende SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. Los fragmentos de anticuerpo pueden generarse utilizando métodos conocidos en la técnica tales como ADN recombinante, escisión enzimática (por ejemplo, utilizando pepsina o papaína), escisión química de un anticuerpo (por ejemplo, reducción química de puentes disulfuro). Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno del anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como as Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd, y región variable estabilizada con enlaces disulfuro (dsFv). Otras moléculas de anticuerpo incluyendo uno o más sitios de unión al antígeno del anticuerpo pueden modificarse, incluyendo, por ejemplo, F(ab')₂, F(ab)₃,

diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, y minicuerpos. Ejemplos de moléculas de anticuerpo y métodos para su construcción y utilización se describen en Holliger and Hudson, 2005, Nat Biotechnol 23:1126-1136. Ejemplos no

5 limitantes de fragmentos de unión son un fragmento Fab compuesto de VL, VH, dominio de cadena ligera constante (CL) y dominio 1 de cadena pesada constante (CH1); y fragmento Fd compuesto de dominios VH y CH1; un fragmento Fv compuesto de dominios VL y VH de un solo anticuerpo; un fragmento dAb

10 compuesto de un dominio VH o VL; regiones CDR aisladas; un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; una molécula Fv de cadena única (scFv), en la cual del dominio VH y el dominio VL se unen mediante un péptido de unión, lo que permite que los dos

15 dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno; un dímero Fv biespecífico de una sola cadena (por ejemplo, tal como se describe en WO 1993/011161) y un diacuerpo, el cual es un fragmento multivalente o multiespecífico construido utilizando fusión de genes (por

20 ejemplo, tal como se describe en WO94/13804). Moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro, uniendo los dominios VH y VL. Los minicuerpos que comprenden un scFv unidos a un dominio CH3 pueden también utilizarse como IL-6a. Otros

fragmentos y derivados de un anticuerpo que pueden utilizarse como IL-6a incluyen un Fab', el cual difiere de un fragmento Fab por la adición de unos cuantos residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal del dominio de cadena pesada

5 CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, el cual es un fragmento Fab' en el cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre.

En algunos casos, un IL-6a que es un fragmento de

10 anticuerpo se ha modificado químicamente para mejorar o introducir una propiedad deseable, por ejemplo, PEGilación para aumentar la vida media o la incorporación.

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un fragmento pequeño monomérico de unión a antígeno de un anticuerpo (la región

15 variable de una cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo). VH dAb ocurren naturalmente en camélidos (por ejemplo, camellos y llamas) y pueden producirse mediante la inmunización de un camélido con un antígeno blanco, aislando los linfocitos B específicos para el antígeno y clonando

20 directamente los genes dAb de linfocitos B individuales. Un IL-6a de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente tal como aquí se asienta, o un dominio VH o VL que comprende un grupo de CDR sustancialmente tal como aquí se describe.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos biespecíficos en los cuales dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula. Un IL-6a puede incorporarse como parte de un anticuerpo biespecífico preparado utilizando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos. Tal molécula puede ser un fragmento de un anticuerpo biespecífico de un tipo descrito anteriormente. Un ejemplo no limitante de un método para generar un anticuerpo biespecífico es la tecnología BiTE™ en la cual los dominios de unión de dos anticuerpos con distintas especificidades pueden utilizarse y unirse directamente mediante péptidos cortos y flexible. Esto combina dos anticuerpos en una sola cadena corta de polipéptido. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, utilizando solamente dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de una reacción anti idiotípica. Los anticuerpos biespecíficos pueden construirse como IgG completos, como Fab'2 biespecíficos, como Fab'PEG, como diacuerpos o como scFv biespecíficos. Además, dos anticuerpos biespecíficos pueden unirse utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia con anticuerpos completos biespecíficos, son útiles, en parte

debido a que pueden construirse y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse al momento utilizando 5 exposición por fago (WO 1994/13804) de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo se mantendrá constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el sitio II de IL-6, entonces puede hacerse una biblioteca donde el otro brazo varíe y se seleccione un anticuerpo de especificidad 10 apropiada.

Los anticuerpos biespecíficos completos pueden hacerse mediante métodos de modificación alternativos tales como los que se describen en WO 1996/27011, WO 1998/50431 y WO 2006/028936.

15 En algunos casos, un IL-6a de la invención comprende un sitio de unión al antígeno dentro de una molécula distinta a un anticuerpo, por ejemplo, mediante la incorporación de una o más CDR, por ejemplo, un grupo de CDR en un andamiaje de proteína distinto al de anticuerpo, tal como se describe a 20 continuación. En algunos casos, las CDR se incorporan en un andamiaje distinto al de anticuerpo. Un sitio de unión al sitio II de IL-6 puede proporcionarse mediante un arreglo de CDR en andamiajes de proteína distintos de anticuerpo, tales como fibronectina o citocromo B, o mediante aleatorización o

mutar residuos de aminoácidos de un asa en un andamiaje de proteína para proporcionar especificidad de unión por un sitio II de IL-6. Los andamiajes para modificar nuevos sitios de unión en proteínas se conocen en la técnica. Por ejemplo,

5 los andamiajes de proteína para simular anticuerpos se describen en WO200034784, donde se describen proteínas (simulaciones de anticuerpos) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III con al menos un asa aleatorizada. Un andamiaje adecuado en el cual se inserta una o más CDR, por

10 ejemplo, un grupo de HCDR, puede proporcionarse mediante cualquier miembro de dominio de la super familia de genes de inmunoglobulina. El andamiaje puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un andamiaje de proteína distinta a anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión al

15 antígeno en una molécula de andamiaje que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos alguna de las moléculas de anticuerpo. El tamaño pequeño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una habilidad para entrar a las células, penetrar profundo en

20 tejidos o alcanzar blancos dentro de otras estructuras, o para unirse en las cavidades de la proteína del antígeno blanco. Las proteínas normales con una cadena principal estable y una o más asas variables, en las cuales al secuencia de aminoácido del asa o asas se muta

específicamente o aleatoriamente para crear un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno blanco. Dichas proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, utilizando el décimo dominio de fibronectina tipo II), lipocalinas, así como andamiajes de gamma-cristalina y otras Afillin™ (Scil Proteins, Halle, Alemania). Ejemplos de otros enfoques incluyen microcuerpos sintéticos basados en ciclotidas - pequeñas proteínas con enlaces disulfuro, microproteínas (por ejemplo, Versabodies™, Amunix Inc., Mountain View, CA) y proteínas de repeticiones de anquirina (DARPin, por ejemplo, de Molecular Partners AG, Zurich-Schlieren, Suiza). Dichas proteínas además incluyen dominios pequeños y modificados tales como, por ejemplo, inmunodominios (véanse, por ejemplo, Publicación de Patente E.U.A. Nos. 2003/082630 y 2003/157561). Los inmunodominios contienen al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo.

Un IL-6a puede comprender aminoácidos adicionales, por ejemplo, para conferirle a la molécula otras características funcionales además de su habilidad para unirse al antígeno.

En algunos casos, un IL-6a contiene una marca detectable, o se conjuga con una toxina o una porción o enzima dirigida (por ejemplo, mediante enlace o molécula de

unión peptidil). Por ejemplo, un IL-6a puede comprender un sitio catalítico de IL-6 o complejo IL-6/IL-6R. El sitio catalítico puede, en algunos casos, inhibir también una función biológica de IL-6, por ejemplo, mediante la escisión
5 de IL-6, IL-6R u otra molécula que se asocia con el complejo IL-6a/IL-6.

En algunos aspectos, la invención incluye un anticuerpo IL-6a que se ha modificado al compararse con un anticuerpo de referencia para alterar, por ejemplo, incrementar, disminuir,
10 o eliminar la función o efecto biológico de IL-6a. En un ejemplo, la región Fc se modifica o el dominio Fc precursor se reemplaza con un dominio Fc modificado para alterar la farmacocinética del IL-6a modificado al compararse con el precursor sin modificar. En algunas modalidades, IL-6a se
15 modifica para poseer un armazón de IgG2. En otras modalidades, IL-6a es un armazón IgG1 o IgG2 y posee un Fc modificado que incrementa la afinidad de unión a IL-6a a pH 6.0 y no altera sustancialmente la afinidad de unión a pH 7.0 al compararse con un IL-6a precursor y otro IL-6a de
20 referencia.

En algunas modalidades, un anticuerpo IL-6a se modifica para aumentar la fijación de complemento y la citotoxicidad dependiente de complemento. En otros aspectos, el anticuerpo IL-6a se modifica para aumentar la habilidad del anticuerpo

al compararse con un anticuerpo de referencia para activar células efectoras y participar en citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). En algunos casos, los anticuerpos, tal como aquí se describen, pueden modificarse para aumentar su capacidad de activar células efectoras y para participar en citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) y para aumentar la capacidad de fijar complemento y participar en citotoxicidad dependiente de complemento (CDC, *por sus siglas en inglés*).

En algunas modalidades, los anticuerpos aquí descritos se modifican para reducir su capacidad de fijar complemento y de participar en citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En otras modalidades, los anticuerpos se modifican para reducir su habilidad de activar células efectoras y de participar en citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). En otras modalidades, un anticuerpo tal como aquí se describe, puede modificarse para reducir su habilidad para activar células efectoras y participar en citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) y para reducir su habilidad para fijar complemento y participar en citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

Generalmente, es una ventaja evitar administraciones frecuentes de una dosis de un IL-6a, por ejemplo, cuando se administra mediante inyección en el ojo. Para facilitar esta

característica, en ciertas modalidades, la vida media en el sitio de la administración, por ejemplo, el cuerpo vítreo, de un IL-6a tal como aquí se describe es al menos de 4 días, por ejemplo, al menos 7 días, al menos 9 días, al menos 11 días, 5 o al menos 14 días. En ciertas modalidades, la vida media promedio de IL-6a es de al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 25 días, 30 días, 40 días, 50 días, o 60 10 días. Los métodos para aumentar la vida media de un anticuerpo se conocen en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Pat. E.U.A. No. 6,277,375 y en Publicación Internacional Nos. WO 1998/23289 y WO 1997/3461. En algunas modalidades, la vida media de IL-6a es mayor en el sitio de 15 administración blanco, por ejemplo, en el cuerpo vítreo, que la vida media sistémica, por ejemplo, la vida media en sangre, suero, plasma, linfa, hígado, riñón y otro tejido o fluido corporal).

En otra modalidad, la invención proporciona un artículo 20 de manufactura que incluye un contenedor. El contenedor incluye una composición que contiene un IL-6a tal como aquí se describe, y un prospecto o etiqueta que indica que la composición puede utilizarse para tratar un desorden relacionado con IL-6. Normalmente, la composición es un IL-6a

en una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, la invención es un kit que comprende una composición que contiene un IL-6a tal como aquí se describe, e instrucciones para administrar la composición a un sujeto que necesite el tratamiento.

En modalidades en las cuales se desea una gran cantidad de IL-6a, por ejemplo, para aumentar la retención de IL-6a en el sitio de administración o cerca de él, una porción que aumenta el tamaño pero que no afecta significativamente de manera adversa la función de IL-6a (por ejemplo, afinidad de unión de IL-6 por IL-6 o por el complejo IL-6/IL-6R) puede asociarse con el IL-6a. Por ejemplo, un Fab puede modificarse genéticamente para expresarse como un solo polipéptido que contiene un Fab y una porción Fc.

En modalidades en las cuales se desea un tamaño relativamente pequeño de IL-6a, pueden utilizarse fragmentos de un anticuerpo IL-6, por ejemplo, un fragmento scFv o un Fab. El tamaño de un anticuerpo IgG es alrededor de 150 kD, un Fab es alrededor de 50 kD y un scFv es alrededor de 25 kD. En algunas modalidades, un IL-6a tal como aquí se describe es menor a 50 kD. Dicho antagonista puede ser, por ejemplo, menor o igual a 50 kD y mayor a 10 kD, menor o igual a 50 kD y mayor a 20 kD, o menor o igual a 50 kD y mayor o igual a

25 kD.

En algunos casos, la estabilidad de un antahonista de IL-6, por ejemplo, un anticuerpo u otro inhibidor con puentes disulfuro, se mejora al crear una variante en cuyo uno o más
5 puentes disulfuro son estables que en la molécula precursor.

Otra ventaja de ciertas moléculas de IL-6a aquí descritas puede ser la disponibilidad de moléculas efectivas con un tamaño apropiado para su modo de administración, sitio de administración o modo de actividad. Por ejemplo, un IL-6a
10 en un formato de Fab puede utilizarse en una aplicación tópica. Los métodos de modificación de dichas moléculas se describen aquí y se conocen en la técnica.

Indicaciones/Enfermedad Asociada a IL-6

Las enfermedades que pueden tratarse con un IL-6a de la
15 invención, incluyen aquellas enfermedades en las cuales se asocia una elevación de IL-6 con el estado de la enfermedad o como prerrequisito para el estado de la enfermedad. Dichas enfermedades incluyen aquellas en las cuales la angiogénesis e inflamación producidas por IL-6 contribuyen a la patología
20 de la enfermedad. Esto incluye enfermedades en las cuales IL-6 se encuentra aumentada al compararse con niveles normales, por ejemplo, enfermedades en las cuales IL-6 se encuentra aumentada en el cuerpo vítreo (tales como, por ejemplo, edema macular diabético, retinopatía diabética y uvieitis) o en

tejidos del ojo. Ejemplos incluyen ciertas enfermedades del ojo que incluyen, sin limitación, sequedad ocular (por ejemplo, queratoconjuntivitis), conjuntivitis alérgica, uveítis, degeneración macular relacionada a la edad (AMD),
5 retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular diabético (DME), desprendimiento de retina regmatógeno (RRD), oclusión de la vena central de la retina (RVO), neuromielitis óptica (NMO). Otros desórdenes oculares que pueden tratarse incluyen aquellos causados por trauma tales como trasplante
10 de córnea, abrasión de córnea, u otros daños físicos al ojo. De acuerdo a esto, la invención incluye el tratamiento a un sujeto que padece una enfermedad relacionada a IL-6 con un IL-6a aquí descrito.

En algunas modalidades, la enfermedad asociada con IL-6
15 es una enfermedad inflamatoria. En algunas modalidades, la enfermedad es glaucoma.

En algunas modalidades, la enfermedad es dolor ocular.

En algunas modalidades, el tratamiento de un sujeto además incluye la determinación si el sujeto posee una
20 enfermedad asociada a IL-6, y, opcionalmente, si el sujeto es resistente a otros tratamientos inhibidores distintos a IL-6 tales como esteroides o tratamientos anti VEGF.

Un problema con ciertos tratamientos basados en anticuerpos que son efectivos en un sitio específico tal como

en el ojo, por ejemplo, en el cuerpo vítreo, son los efectos adversos que resultan de administración sistémica. Una solución es proporcionar tratamientos que pueden administrarse localmente, en lugar de sistémicamente, tal como lo ejemplifican las moléculas aquí descritas. Ya que algunos tratamientos que son administrados localmente, por ejemplo, al cuerpo vítreo, aparecerán, en alguna extensión, sistémicos, es una ventaja diseñar una molécula que poseerá una inactivación sistémica relativamente rápida. Los solicitantes han modificado ejemplos de anticuerpos de IL-6 diseñados para una inactivación sistémica rápida, por ejemplo, al compararse con la molécula precursor o un anticuerpo de referencia. Esto se logró al mutar el dominio Fc para modificar la unión de FcRn de la molécula, por ejemplo, para reducir el reciclaje mediado por FcRn de IL-6a.

Edema macular diabético (DME). El edema macular diabético (DME) involucra la oclusión y derrame de los vasos sanguíneos de la retina, causando menor agudeza visual y, potencialmente, ceguera.

Los tratamientos estándar para DME incluyen administración local de esteroides o anticuerpos anti VEGF. Sin embargo, muchos pacientes son resistentes a estos tratamientos. La patogénesis del edema macular diabético involucra los componentes de angiogénesis, inflamación y

estrés oxidativo. IL-6 se induce por hipoxia e hiperglicemia y puede aumentar la inflamación vascular, permeabilidad vascular, y angiogénesis patológica. IL-6 puede inducir directamente la expresión de VEGF y puede promover

5 neovascularización coroidal en modelos animales. En pacientes con DME, los niveles oculares de IL-6 correlacionan positivamente con el grosor macular y la severidad de la enfermedad. Se reporta que los niveles de IL-6 se encuentran elevados en pacientes que fallan con el tratamiento anti VEGF

10 mientras disminuye en pacientes que responden a anti VEGF. De este modo, la administración de un IL-6a tal como aquí se describe es útil para el tratamiento de diabetes en combinación con un tratamiento anti VEGF o como una alternativa al tratamiento anti VEGF, incluyendo a los

15 pacientes que no responden al tratamiento anti VEGF. El tratamiento de edema macular con un IL-6a puede además mejorar la seguridad mediante la eliminación de la necesidad de inhibir completamente cualquier mecanismo para inhibir la patología, preservando así algunos de los papeles

20 fisiológicos deseados de cada citoquina. De este modo, el tratamiento local con IL-6a en combinación con la inhibición de VEGF puede disminuir la frecuencia de dosis y reducir los efectos adversos del tratamiento.

En DME hay correlaciones positivas entre los niveles

vítreos de IL-6 y tanto la severidad de la enfermedad como los sujetos resistentes para VEGF. De este modo, un IL-6a tal como aquí se describe puede utilizarse para tratar sujetos con DME que son resistentes al tratamiento con esteroides, al
5 tratamiento anti VEGF o a ambos. En algunos casos, un IL-6a se utiliza en combinación con un tratamiento anti VEGF o tratamiento de esteroides, por ejemplo, para tratar DME.

Un IL-6a aquí descrito además puede utilizarse para tratar desórdenes tales como cáncer, por ejemplo, cáncer de
10 próstata, leucemia, mieloma múltiple, enfermedades inflamatorias (tales como enfermedades proliferantes inflamatorias crónicas) y enfermedades autoinmunes, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Castleman (hiperplasia de nódulos linfáticos angiofolicular o gigante,
15 hamartoma linfoide, hiperplasia de nódulo linfático angiofolicular), artritis idiopática juvenil (incluyendo artritis idiopática juvenil y enfermedad de inicio adulto de Still), enfermedad de inicio adulto de Still, amiloidosis de amiloide A, polimialgia reumática, sinovitis simétrica
20 seronegativa de remisión con edema con fóvea, espondiloartritis, enfermedad de Behcet (incluyendo tratamiento de manifestaciones oculares), arterioesclerosis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, polimiositis (una miopatía inflamatoria), policondritis de remisión, hemofilia

A adquirida, esclerosis múltiple, anemia de inflamación y enfermedad de Crohn.

Los antagonistas de IL-6 también son útiles para el tratamiento de ciertas enfermedades neurológicas, por ejemplo, depresión y enfermedad de Alzheimer.

Otras enfermedades que pueden tratarse con IL-6a aquí descrito incluyen, sin limitación, esclerosis sistémica, arteritis de Takayasu, arteritis de célula gigante, enfermedad de huésped contra trasplante y síndrome periódico asociado al receptor TNF (TRAPS, *por sus siglas en inglés*).

Dosificación

Un anticuerpo IL-6 o fragmento del mismo puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, un paciente) que expresa, por ejemplo, niveles altos anormales de IL-6. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse una vez, o puede administrarse múltiples veces. El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, entre tres veces diariamente a hasta una vez cada seis meses o más. La administración puede ser en un esquema de administración, tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse continuamente

mediante una minibomba u otra vía, tal como una cápsula implantable de liberación lenta o mediante una célula encapsulada que produce el anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse vía

5 mucosas, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intraocular o intratumoral. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse una vez, al menos dos veces o durante al menos el periodo de tiempo hasta que la condición sea tratada,

10 paliada o curada. El anticuerpo o fragmento del mismo generalmente se administrará durante el tiempo que la condición esté presente. El anticuerpo o fragmento del mismo se administrará generalmente como parte de una composición farmacéutica, tal como aquí se describe. LA dosis del

15 anticuerpo generalmente estará en el intervalo de entre 0.1 a 100 mg/kg, 0.5 a 50 mg/kg, 1 a 20 mg/kg, y 1 a 10 mg/kg. La concentración en suero del anticuerpo o fragmento del mismo puede medirse mediante cualquier método adecuado. Una

20 característica de ciertos compuestos aquí descritos es que requieren dosis relativamente no frecuentes, por ejemplo, una vez a la semana, dos veces a la semana, tres veces a la semana, una vez cada cuatro semanas, una vez cada dos semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 12 semanas, una vez cada 16 semanas, una vez cada 32 semanas, una vez al mes,

una vez cada dos meses, una vez cada tres meses o una vez cada seis meses. En algunos casos, el compuesto se administra según se utilice, lo cual se determina, por ejemplo, debido a la condición del sujeto. Es una característica de los antagonistas de IL-6 aquí descritos que permiten dosificaciones relativamente no frecuentes que la combinación de alta potencia que se logra, al menos en parte, por una velocidad de desacoplamiento una vez que se une a IL-6 y la habilidad para administrar una concentración relativamente alta del compuesto.

En algunos casos, IL-6a se administra como monoterapia. En otras modalidades, IL-6a se administra de manera concomitante con metotrexato u otro fármaco antiartrítico que modifique la enfermedad.

15 **Generación de anticuerpos**

Un anticuerpo IL-6a o derivado o fragmento del mismo puede producirse utilizando métodos conocidos en la técnica, tal como la metodología de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, véase Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495). Otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales pueden emplearse también, tal como la transformación viral u oncogénica de linfocitos B. Los anticuerpos quiméricos o humanizados pueden prepararse basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado utilizando métodos

conocidos en la técnica. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera pueden obtenerse de un hibridoma murino de interés y pueden modificarse para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas), utilizando técnicas de biología molecular estándar. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden enlazarse a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Pat. E.U.A. No. 4,816,567). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas pueden insertarse en un armazón humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, por ejemplo, Pat. E.U.A. No. 5,225,539, y Pat. E.U.A. Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762; y 6,180,370).

En modalidades, un IL-6a aquí descrito (por ejemplo, un anticuerpo anti IL-6a o derivado o fragmento del mismo) puede unirse específicamente a IL-6 humana. En modalidades, IL-6a puede unirse específicamente al sitio II de IL-6 (por ejemplo, sitio II de IL-6 humana).

En algunas modalidades, un anticuerpo IL-6a es un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que comprenden porciones de un sistema humano inmune en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos o

transcromosómicos incluyen "ratones con Ig humana" tales como HuMAb Mouse® y KM Mouse® (Véase, por ejemplo, Pat. E.U.A. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; Pat. E.U.A. No. 5,545,807; Publicación PCT Nos.: WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962; y Publicación PCT No. WO 01/14424).

En otro aspecto, los anticuerpos humanos anti IL-6 pueden obtenerse utilizando un ratón que acarrea secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que posee un transgen de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones se describen en detalle en Publicación PCT No. WO 02/43478.

Otros sistemas animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana se encuentran disponibles en la técnica y pueden utilizarse para obtener un anticuerpo IL-6a. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse™ (Abgenix, Inc.) puede utilizarse; dichos ratones se describen en, por ejemplo, Pat. E.U.A. Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584; y 6,162,963. Además, los sistemas de animales transcromosómicos que expresan genes de inmunoglobulinas se encuentran disponibles en la técnica y pueden utilizarse para obtener un anticuerpo IL-6a. Por

ejemplo, los ratos con un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana se describen en Tomizuka et al. (2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:722-727). Los anticuerpos monoclonales humanos también
5 pueden prepararse utilizando ratones SCID en los cuales las células inmunitarias humanas se han reconstituido, de tal manera que puede generarse una respuesta de anticuerpo humano tras una inmunización. Dichos ratones se describen en, por ejemplo, Pat. E.U.A. Nos. 5,476,996 y 5,698,767.

10 **Bibliotecas de Exposición por Fago**

En algunos casos, un anticuerpo IL-6a o derivado o fragmento del mismo se produce en un método que involucra la síntesis de una biblioteca de anticuerpos humanos utilizando fagos, evaluando la biblioteca con IL-6, por ejemplo, IL-6 humana, o
15 un fragmento del mismo, aislando el fago que se une a IL-6 y obteniendo el anticuerpo del fago.

Un anticuerpo IL-6a humano recombinante puede aislarse también mediante la evaluación de una biblioteca de anticuerpos recombinantes combinatorios. En general, la
20 biblioteca es una biblioteca de exposición por fago de scFv, generada utilizando ADNc de VL y VH de humano, preparado a partir de ARNm aislado de linfocitos B, Los métodos para preparar y evaluar dichas librerías se conocen en la técnica. Kits para generar la biblioteca de exposición por fago se

encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, núm. de catálogo 27-9400-01; y el kit de exposición por fago de Stratagene SurfZAP™, núm. de catálogo 240612). Otros métodos y reactivos que pueden utilizarse en la generación y evaluación de bibliotecas de exposición por fago se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, Pat. E.U.A. No. 5,223,409; Publicación PCT Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay et al., Hum Antibod Hybridomas 3:81-85 (1992); Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Griffiths et al., EMBO J 12:725-734 (1993); Hawkins et al., J Mol Biol 226:889-896 (1992); Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991); Gram et al., Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., Bio/Technology 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982 (1991), las cuales se incorporan en la presente a modo de referencia.

En un ejemplo de aislamiento y producción de anticuerpos humanos de IL-6 con las características deseadas, un anticuerpo humano de IL-6 se utiliza primero para seleccionar las secuencias de cadena pesada y ligera humanas con

actividad similar de unión a IL-6, utilizando los métodos de
impronta de epítipo descritos en Publicación PCT No. WO
93/06213, incorporada aquí a modo de referencia. Las
bibliotecas de anticuerpo utilizadas en este método son
5 generalmente bibliotecas de scFv preparadas y evaluadas tal
como se describe en Publicación PCT No. WO 92/01047;
McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); y Griffiths et
al., EMBO J 12:725-734 (1993), las cuales se incorporan en la
presente a modo de referencia.

10 Una vez que los dominios VL y VH humanos iniciales se
seleccionan, se llevan a cabo experimentos de "mezcla y
coincidencia", en los cuales los pares distintos de segmentos
VL y VH inicialmente seleccionados se evalúan por sus
capacidades de unión a IL-6 para seleccionar combinaciones de
15 pares VL/VH preferentes. Para seleccionar características
deseables de un IL-6a, los segmentos VL y/o VH de un par
seleccionado pueden mutarse aleatoriamente. Esta maduración
de afinidad in vitro puede lograrse, por ejemplo,
amplificando los dominios VH y VL utilizando cebadores de PCR
20 complementarios a una CDR de uno o ambos dominios VH y VL
seleccionados, dichos cebadores contienen una mezcla
aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en ciertas
posiciones de tal modo que los productos de PCR resultantes
codifican segmentos VH y VL en los cuales se han introducido

mutaciones aleatorias en VH y/o VL. Dichos segmentos VH y VL pueden reevaluarse por su unión a IL-6, por ejemplo, al sitio II de IL-6.

Después de la evaluación y aislamiento de un anticuerpo
5 IL-6a de una biblioteca de exposición de inmunoglobulina recombinante, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado puede recuperarse del paquete de exposición (por ejemplo, del genoma del fago) y se subclonó en otros vectores de expresión utilizando técnicas de ADN
10 recombinante conocidas en la técnica. Dichos anticuerpos pueden manipularse para producir un fragmento de anticuerpo tal como los que aquí se describen.

Farmacocinética (PK)

Las pruebas de PK pueden llevarse a cabo utilizando métodos
15 aquí descritos y/o métodos conocidos en la técnica. Una barrera para determinaciones que requieren la utilización de un animal, por ejemplo, la determinación de PK, es que IL-6 humana posee menos del 50% de homología con la de animales comúnmente utilizados para dicha prueba. Un método para
20 probar la PK es, por lo tanto, la utilización de un ratón transgénico que expresa IL-6 humana. En algunas modalidades, se utiliza un primate no humano para determinar la PK.

En algunas modalidades, un anticuerpo anti IL-6 se muta para alterar su PK, por ejemplo, mediante la alteración de la

sensibilidad a pH de la unión de FcRn. Un método para obtener dichas mutaciones se describe en los Ejemplos. De acuerdo a esto, en algunas modalidades, el IL-6a posee una PK sistémica alterada al compararse con un IL-6a precursor o una molécula de referencia. En algunos casos, la PK no se altera o mejora en el cuerpo vítreo. En algunas modalidades, el IL-6a posee una PK sistémica reducida (por ejemplo, menor vida media y/o aclaramiento mayor, por ejemplo, tal como se prueba en un fluido circulatorio tal como sangre, plasma, linfa, o suero) al compararse con un IL-6a precursor o una molécula de referencia.

Modelos para probar un antagonista de IL-6

Los antagonistas de IL-6 pueden probarse en modelos de enfermedad para la administración asociada de IL-6, particularmente para la eficacia del tratamiento y los efectos deletéreos limitados en las propiedades de ventaja de IL-6. Por ejemplo, uveítis puede probarse en un modelo experimental autoinmune en ratas o ratones (Caspi, Invest Ophthalmol Vis Sci 52:1873; Agarwal et al., 900:443-69, 2012) utilizando proteína de unión a interfotoreceptor retinoide (IRBP) en inmunización de adyuvante completo de Freund (CFA). Otros modelos incluyen aquellos conocidos en la técnica para uveítis inducida por células dendríticas, transferencia adoptiva de linfocitos T efectores cultivados, ratones Tg TCR

con EAU espontánea en IRBP, uveítis inducida por endotoxina, uveoretinitis autoinmunitaria (Haruta et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 53:3264 (2011); Yoshimura et al., Rheumatology 48:347-354 (2009)).

5 Otros sistemas modelo que pueden utilizarse para examinar los efectos de un IL-6a en el tratamiento de una enfermedad asociada a IL-6 son, por ejemplo, un modelo de neovascularización coroidal (CNV) (Izumi-Nagai et al., Am J Pathol 170:6 (2007); Krzystolik et al., Arch Ophthalmol
10 120:338 (2002)) y modelos diabéticos tales como aquellos descritos en Kern et al. (Animal Models Of Diabetic Complications Consortium (P01 DK57733), Update Report (September 2001 - January 2004)). Los modelos de animal útiles para la prueba de IL-6a en artritis reumatoide se
15 conocen en la técnica, por ejemplo, ver Asquith et al. (Eur J Immunol 39:2040-4 (2009)) y Kollias et al. (Ann Rheum Dis 70:1357-62 (2011)).

Los modelos de CNV representan, por ejemplo, las condiciones humanas de AMD y DME. Los modelos de
20 neovascularización retiniana son útiles, por ejemplo, para estudiar retinopatías isquémicas, por ejemplo, retinopatía diabética o retinopatía de premadurez. Se conocen en la técnica distintos modelos de neovascularización retiniana (véase, por ejemplo, Grossniklaus, H.E. et al. Prog Retin Eye

Res. 2010 Nov;29(6):500-19. doi:
 10.1016/j.preteyeres.2010.05.003. Epub 2010 May 19; Saisin, Y
 et al. (2003) Journal of Cellular Physiology, 195:241-248;
 Takahashi, K. et al. (2003) Investigative Ophthalmology &
 5 Visual Science, 44(1):409-415; Lima e Silva, R. et al. (2007)
 FASEB Journal, 21:3219-3230; Tobe et al. (1998) American
 Journal of Pathology, 153(5):1641-1646; Dong, A et al. (2011)
 PNAS, 108(35): 14614-14619; Dong et al. (2009) J Cell Physiol
 219:544-552; Smith, LE et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis Sci
 10 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) Investigative
 Ophthalmology & Visual Science, 48(9):4335-4341) y pueden
 utilizarse para investigar la eficacia de un IL-6a. La
 neovascularización coroidal (CNV) puede inducirse, por
 ejemplo, mediante láseres, luz, cirugía o modificaciones
 15 genéticas. Los modelos de neovascularización retiniana
 inducida por oxígeno se conocen en la técnica y se describen,
 por ejemplo, en Smith, LE et al. 1994 Invest Ophthalmol Vis
 Sci 1994; 35:101-111; Shen, J. et al. (2007) Investigative
 Ophthalmology & Visual Science, 48(9):4335-4341.

20 También puede utilizarse un modelo de
 isquemia/reperfusion. Véase, por ejemplo, Zheng, L et al.
 Investigative Ophthalmology & Visual Science, vol. 48 no. 1
 pp. 361-367, 2007. Por ejemplo, al Día 1, se inserta una
 aguja de caliber 30 unida a una bolsa de fluido en la córnea

de ratones anestesiados y la presión intraocular (IOP) se eleva hasta aproximadamente 120 mmHg para generar isquemia. Después de 30-90 minutos, se retira la aguja, se normaliza la IOP, y ocurre un reflujo en la circulación retiniana. La expresión de marcadores inflamatorios incluyendo TNF- α y ICAM-1 puede evaluarse mediante western blot y qPCR al Día 2-6. Además, puede evaluarse la pérdida de células ganglionares mediante histología al Día 3-14 y la degeneración capilar se mide mediante técnica de digestión con tripsina al Día 10-14. Para estudios de tratamiento, el artículo de prueba (por ejemplo, 1 μ L de una concentración apropiada, por ejemplo, 20 mg/mL, de IL6a) se inyecta vía intravítrea ya sea poco antes o después de la inducción de la isquemia.

Terapias de combinación

En algunas modalidades, se administra un IL-6a en combinación con una segunda entidad terapéutica. Por ejemplo, un IL-6a se administra en un esquema de tratamiento que incluye un inhibidor de VEGF tal como, por ejemplo, ranibizumab. En algunas modalidades, se administra un IL-6a en un esquema de tratamiento que incluye un inhibidor tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti PDGF o anticuerpo anti receptor de PDGF (por ejemplo, imatinib). En algunas modalidades, se administra un IL-6a en combinación con un inhibidor de la vía de complemento, por ejemplo, lampalizumab (inhibidor de

Factor D) o un inhibidor de C5.

Administración de antagonista de IL-6

Un antagonista de IL-6 o composición aquí descrita puede administrarse localmente, ya sea en contacto directo con o
5 cerca de una célula o tejido blanco para la inhibición de IL-6. Ejemplos no limitantes de dichos métodos de administración incluyen inyección, infusión o implante de una sustancia que contiene un antagonista de IL-6.

En modalidades, el IL-6a o composición se administra vía
10 intraocular, por ejemplo, vía intravítrea, por ejemplo, mediante inyección intravítrea, inserción oftálmica o administración genética.

En algunas modalidades, la composición de IL-6a se administra como una formulación oftálmica. Los métodos pueden
15 comprender la administración de la composición de IL-6a y un acarreador oftalmológicamente aceptable. En algunas modalidades, la formulación oftálmica es un líquido, semisólido, inserto, película, micropartícula o nanopartícula. La composición de IL-6a puede administrarse,
20 por ejemplo, vía tópica o mediante inyección (por ejemplo, inyección intravítrea).

En algunas modalidades, la composición de IL-6a se formuló para administración intravítrea.

En algunas modalidades, la composición de IL-6a se

formuló para administración tópica, por ejemplo, en el ojo. La formulación tópica puede ser una formulación líquida o semisólida, por ejemplo, una formulación tópica puede incluir una solución acuosa, una suspensión acuosa, un ungüento o un
5 gel. Una formulación oftálmica de IL-6a puede aplicarse tópicamente en el frente del ojo, bajo el párpado superior, en el párpado inferior y en el fondo de saco. Normalmente, la formulación oftálmica es estéril. Una formulación oftálmica de IL-6a puede contener uno o más excipientes farmacéuticos
10 adecuados para la preparación de formulaciones oftálmicas. Ejemplos de dichos excipientes son agentes preservantes, agentes amortiguadores, agentes quelantes, agentes antioxidante y sales para regular la presión osmótica. Las formulaciones oftálmicas, incluyendo ungüentos y
15 suspensiones, poseen una viscosidad que es adecuada para la vía de administración seleccionada. En algunas modalidades, la formulación oftálmica posee una viscosidad de entre alrededor de 1000 y alrededor de 3000 centipoise.

En algunas modalidades, la formulación es una
20 formulación líquida que comprende un polímero. Dicho polímero puede utilizarse para mejora la biodisponibilidad, aumentar la viscosidad, o reducir el drenaje del ojo de una formulación líquida. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Wagh et al. (Asian J

Pharm, 2:12-17, 2008). En ejemplos no limitantes, el polímero es hialuronasa de sodio, quitosano, una clicodextrina (por ejemplo, hidroxipropil- β -ciclodextrina), ácido polgalactorónico, xiloglicano, goma xantano, goma gellan, un tiómero, un poli(orto éster) (por ejemplo, Einmahl, Adv Drug Deliv Rev 53:45-73, 2001), o un polisacárido de semilla de tamarindo (por ejemplo, Ghelardi et al., Antimicrob Agents Chemother 48:3396-3401, 2004).

En algunas modalidades, una formulación que comprende una composición de IL-6a para administración oftálmica puede comprender uno o más surfactantes, adyuvantes, amortiguadores, antioxidantes, ajustadores de tonicidad, preservantes (por ejemplo, EDTA, BAK (cloruro de benzalconio), clorito de sodio, perborato de sodio, poliquaterium-1, espesantes o modificadores de viscosidad (por ejemplo, carboximetil celulosa, hidroximetil celulosa, polivinil alcohol, polietilenglicol, glicol 400, propilenglicol, hidroximetil celulosa, hidroxipropil guar, ácido hialurónico e hidroxipropil celulosa) y similares. Los aditivos en la formulación pueden incluir, pero no se limitan a, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido sórbico, metil parabeno, propil parabeno, clorhexidina, aceite de castor y perborato de sodio.

En algunas modalidades, se utiliza agua purificada o

desionizada. El pH puede ajustarse añadiendo cualquier ácido, base o amortiguador de ajuste de pH fisiológica y oftalmológicamente aceptable, cuyo rango se encuentre entre alrededor de 5.0 a 8.5, por ejemplo, pH 7.0, pH 7.3, pH, 7.4, 5 o pH 7.5. Ejemplos oftalmológicos aceptables de ácidos incluyen acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico, clorhídrico y similares, y ejemplos de bases incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, 10 trometamina, trishidroximetilaminometano y similares. Ejemplos de sales y amortiguadores que pueden utilizarse en una formulación incluyen citrato/dextrosa bicarbonato de sodio, cloruro de amonio y mezclas de los ácidos y bases ya mencionados.

15 En algunas modalidades, la presión osmótica de la composición oftálmica puede ser de entre 10 miliosmolar (mOsM) y alrededor de 400 mOsM, por ejemplo, entre 200 y 400 mOsM, o entre 220 y 370 mOsM. Generalmente, la presión osmótica puede ajustarse utilizando sales o excipientes 20 fisiológica u oftalmológicamente aceptables. En algunas modalidades, el cloruro de sodio se incluye en una formulación, por ejemplo, el cloruro de sodio se encuentra en una formulación en una concentración de entre 0.01% y 1% en peso, o entre 0.05% y 0.45% en peso, basándose en el peso

total de la composición. Las cantidades equivalentes de una o más sales hechas de cationes tales como potasio, amonio y similares y de aniones tales como cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato, bisulfato, bisulfato de sodio, sulfato de amonio y similares pueden utilizarse también además o en lugar de cloruro de sodio para lograr osmolalidades dentro del rango deseado. En algunas modalidades, un azúcar tal como manitol, dextrosa, sorbitol, glucosa y similares se utilizan también para ajustar la osmolalidad.

En algunas modalidades, los métodos involucran formar o proporcionar un depósito del agente en contacto con la superficie externa del ojo. Un depósito se refiere a una fuente de agente que no se elimina rápidamente por las lágrimas u otro mecanismo de aclaramiento del ojo. Esto permite que haya concentraciones continuas y sosteniblemente altas del agente en el fluido de la superficie externa del ojo mediante una aplicación única. En algunas modalidades, el depósito puede permanecer por hasta ocho horas o más. En algunas modalidades, la formulación del depósito oftálmico incluye, pero no se limita a, suspensiones, ungüentos e insertos sólidos poliméricos acuosos.

En algunas modalidades, una composición semisólida es una formulación líquida que aumenta en viscosidad tras la

aplicación al ojo, normalmente debido a la presencia de un polímero en la formulación líquida el cual aumenta su viscosidad con un cambio en la temperatura, el pH o la concentración de electrolitos. El polímero puede ser, por ejemplo, celulosacetofalato, ácido poliacrílico, goma gellan, hialuronasa, quitosano, sales de ácido algínico (por ejemplo, alginato de sodio), o un bloque de copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, Pluronic®, BASF; poloxamer). En alguna modalidad, el ácido poliacrílico es ácido acrílico entrecruzado (por ejemplo, CARBopol®). En algunas modalidades, la composición semisólida comprende una mezcla de carbopol y un bloque de copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno; una mezcla de metilcelulosa e hidroxietil celulosa; o una mezcla de polietilenglicol y un bloque de copolímero de óxido de etileno y óxido de propileno.

En algunas modalidades, la formulación oftálmica que contiene IL-6a es un ungüento o gel. En alguna modalidad, la formulación oftálmica es un vehículo de administración de base aceite. Por ejemplo, la formulación puede comprender una base de petróleo o lanolina a la cual se agrega la composición de IL-6a (por ejemplo, a entre 0.1% y 2%) y excipientes. Las bases comunes pueden incluir, pero no se limitan a, aceite mineral, petrolato y combinaciones de los

mismos. En algunas modalidades, el ungüento se aplica como una línea en el párpado inferior.

En algunos casos, la composición oftálmica es un inserto oftálmico. En modalidades, la composición se administra vía
5 intravítrea mediante un inserto oftálmico.

Por ejemplo, el inserto oftálmico es biológicamente inerte, suave, biodegradable, viscoelástico, estable para la esterilización después de exponerse a agentes terapéuticos, resistente a infecciones de bacterias aéreas, biodegradable,
10 biocompatible y/o viscoelástico. En algunas modalidades, el inserto comprende una matriz oftálmicamente aceptable, por ejemplo, una matriz de polímero. La matriz es normalmente un polímero y la composición de IL-6a se dispersa en la matriz o se une a la matriz de polímero. En algunas modalidades, el
15 agente es lentamente liberado de la matriz mediante la disolución o hidrólisis de un enlace covalente. En algunas modalidades, el polímero es biodegradable (soluble) y la velocidad de disolución del mismo puede controlar la velocidad de liberación del agente dispersado en él. De otra
20 forma, la matriz de polímero es un polímero biodegradable que se descompone mediante, por ejemplo, hidrólisis, para liberar así el agente unido a él o dispersado en él. En otras modalidades, la matriz y el agente pueden estar acompañados de un recubrimiento polimérico adicional para controlar más

la liberación. En algunas modalidades, el inserto comprende un polímero biodegradable tal como policaprolactona (PCL), un copolímero de etilen/vinil acetato (EVA), polialquil cianoacrilato, poliuretano, nylon, o poli(dl-láctido-co-glicólido) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunos casos, el agente se dispersa en el material de la matriz o se dispersa entre la composición de monómeros utilizados para hacer el material de la matriz antes de la polimerización. En algunas modalidades, la cantidad de agente es entre alrededor de 0.1 y alrededor de 50%, o entre alrededor de 2 y alrededor de 20%. La matriz de polímero biodegradable puede utilizarse de tal modo que el inserto no tenga que ser removido del ojo. En tanto el polímero biodegradable se degrade o disuelva, el agente es liberado.

En otras modalidades, el inserto oftálmico comprende un polímero, incluyendo, pero no limitado a, aquellos descritos en Wagh, et al., "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian J. Pharm., páginas 12-17 (Enero 2008), el cual se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. En algunas modalidades, el inserto comprende un polímero seleccionado de entre polivinilpirrolidona (PVP), un polímero o copolímero de acrilato o metacrilato (por ejemplo, la familia Eudragit® de polímeros de Rohm o Degussa), hidroximetil celulosa, ácido

poliacrílico, poli(amidoamina) dendrímeros, poli(dimetilsiloxano), óxido de polietileno, poli(láctido-coglicólido), poli(2-hidroxietilmetacrilato), polivinil alcohol), o poli(propilen fumarato). En algunas modalidades, el inserto comprende Gelfoam®. En algunas modalidades, el inserto es un conjugado de ácido poliacrílico de 450 kDa y cisteína.

El inserto puede comprender un centro que contiene la composición de IL-6a y un tubo exterior (por ejemplo, tal como se describe en Pub. de Patente E.U.A. No. 20040009222). En algunos casos, el tubo exterior puede ser permeable, semipermeable, o impermeable al fármaco. En algunas modalidades, el centro incluye una matriz de polímero que no posee un efecto significativo en la velocidad de liberación de la composición IL-6a. En algunos casos, el tubo exterior, la matriz de polímero del centro o ambos son biodegradables. El producto coextruido puede segmentarse en dispositivos de administración de fármaco. En algunas modalidades, el dispositivo no posee recubierta, de tal modo que los extremos respectivos se encuentran abiertos, o el dispositivo se encuentra recubierto con, por ejemplo, una capa que es permeable a la composición de IL-6a, semipermeable a la composición de IL-6a, o biodegradable. En ciertas modalidades, la composición de IL-6a y al menos un polímero

se encuentran mezclados en forma de polvo.

En algunas modalidades, la composición oftálmica es una película oftálmica. Los polímeros adecuados para dichas películas incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos
5 en Wagh, et al. (*supra*). En algunas modalidades, la película es un lente de contacto suave, por ejemplo, un lente compuesto de copolímeros de N,N-dietilacrilamida y ácido metacrílico entrecruzado con etilenglicol dimetacrilato.

En ciertas modalidades, el IL-6a es un inserto que se
10 encuentra en forma tubular y puede segmentarse.

En algunas modalidades la composición de IL-6a se formula en una cantidad terapéuticamente efectiva, recubierta o dispersa en una matriz de polímero, de tal modo que la composición de IL-6a se encuentra en forma granular o de
15 partículas. En algunas modalidades, la composición de IL-6a se libera de la formulación como fármaco de los gránulos disueltos en la matriz, se difunde a lo largo de la matriz y se libera en el fluido fisiológico circundante. En algunas modalidades, la velocidad de liberación se encuentra limitada
20 primordialmente por la velocidad de disolución de la composición de IL-6a de los gránulos/partículas en la matriz; los pasos de difusión a lo largo de la matriz y de dispersión en el fluido circundante no son primordialmente limitantes de la velocidad. En ciertas modalidades, la matriz de polímero

es no biodegradable, mientras que, en otras modalidades, es biodegradable. Matrices de polímero biodegradables a modo de ejemplo pueden formarse de poliuretano, polisilicona, poli(etilen-co-vinil acetato) (EVA), polivinil alcohol y
5 derivados y copolímeros de los mismos. Matrices de polímero biodegradables a modo de ejemplo pueden formarse a partir de polianhídrido, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poliortoéster, polialquilcianoacrilato, y derivados y copolímeros de los mismos.

10 En algunos casos, la composición de Il-6a se formula en un material colagenoso. Por ejemplo, el inserto puede ser un inserto de fármaco oftálmico soluble (por ejemplo, una película ovalada que puede introducirse en el saco conjuntivo superior para la administración del fármaco; un inserto
15 elíptico tal como OCUSERT® (sistema terapéutico ocular de pilocarpina, desarrollado por Alza Corporation) el cual está hecho de etilen vinil acetato; Lacrisert®, un inserto en forma de bastón hecho de celulosa; sistemas de administración de fármacos oftálmicos nuevos (New Ophthalmic Drug Delivery
20 Systems (NODS)) hechos de poli(vinil alcohol); o insertos tales como aquellos descritos en Fabrizio (Adv Drug Deliv Rev 16: 95-106, 1998). En algunos casos, el inserto comprende colágeno, gelatina o un polímero, donde el polímero se selecciona de entre policaprolactona (PCL), un copolímero de

etilen/vinil acetato (EVA), polialquil cianoacrilato, poliuretano, nylon, poli(dl-láctido-co-glicólido) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunos casos, el inserto se implanta bajo el párpado superior. En algunos
5 casos, el inserto se implanta en el segmento posterior del ojo, en el espacio coroidal o en la esclerótica. En algunas modalidades, el inserto se implanta vía intravítrea o subretiniana. En algunas modalidades, el inserto se inyecta vía subretiniana. Los métodos de administración y las
10 técnicas para su preparación se mencionan en Remington's: The Practice of Science of Pharmacy, 20th edition (Lippincott Williams & Wilkins, 2006), el cual se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad.

En otras modalidades, un inserto que contiene la
15 composición de IL-6a proporciona una liberación sostenida del agente en el cuerpo vítreo del cuerpo. Tal como aquí se utiliza, "liberación sostenida" se refiere a que la composición libera el agente a lo largo de un periodo de tiempo extendido de modo controlado. En algunas modalidades,
20 el inserto libera el agente a una velocidad tal que la concentración acuosa del agente permanece menor a la concentración del agente en el cuerpo vítreo durante la liberación. En algunas modalidades, la concentración del agente acuoso es de entre alrededor de 0.002 µg/mL y

alrededor de 0.01 µg/mL o de entre alrededor de 0.01 µg/mL, y alrededor de 0.05 µg/mL, o menor a alrededor de 0.05 µg/mL. En algunas modalidades, el agente se libera a una velocidad de entre alrededor de 1 µg/día y alrededor de 50 µg/día, o de entre alrededor de 1 µg/día y alrededor de 10 µg/día. En algunas modalidades, el inserto además comprende un agente terapéutico adicional, tal como se detalló anteriormente, por ejemplo, fluocinolona acetónido (tal como el que se encuentra en el inserto oftálmico Retisert®).

En algunas modalidades, la composición oftálmica comprende microesferas o nanopartículas. En alguna modalidad, las microesfereas comprenden gelatina. En algunas modalidades, las microesferas se inyectan al segmento posterior del ojo, en el espacio coroidal, en la esclerótica, vía intravítrea o subretiniana. En algunas modalidades, las microesferas o nanopartículas comprenden un polímero, incluyendo, pero no limitándose a, aquellos descritos en Wagh, et al. (Asian J Pharm 2:12-17, 2008). En algunas modalidades, el polímero es quitosano, un ácido policarboxílico tal como ácido poliacrílico, partículas de albúmina, ésteres de ácido hialurónico, ácido poliitacónico, poli(butil)cianoacrilato, policaprolactona, poli(isobutil)caprolactona, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), o poli(ácido láctico). En algunas modalidades,

las microesferas o nanopartículas comprenden partículas sólidas de lípidos.

En algunas modalidades, una composición de IL-6a comprende una resina de intercambio de iones. En algunas modalidades, la resina de intercambio de iones es una zeolita inorgánica o resina orgánica sintética. En algunas modalidades, la resina de intercambio de iones incluye, pero no se limita a, aquellas descritas en Wagh, et al., *supra*, la cual se incorpora en la presente a modo de referencia en su totalidad. En algunas modalidades, la resina de intercambio de iones es un ácido poliacrílico parcialmente neutralizado.

Una composición de IL-6a puede proporcionarse en una suspensión acuosa polimérica. En algunas modalidades, la composición de IL-6a o un agente de suspensión polimérico se suspende en un medio acuoso (por ejemplo, con las propiedades descritas anteriormente). Ejemplos de agentes de suspensiones poliméricos incluyen, pero no se limitan a, dextranos, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, geles de polisacárido, Gelrite®, polímeros celulósicos como hidroxipropil metilcelulosa, y polímeros que contienen carboxi, tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico, así como otros demulcentes poliméricos. En algunas modalidades, el agente de suspensión polimérico es un polímero hinchable en agua, insoluble en agua, especialmente

un polímero entrecruzado que contiene carboxi. En algunas modalidades, el agente de suspensión polimérico comprende entre al menos alrededor 90% y alrededor de 99.9%, o entre alrededor de 95% y alrededor de 99.9% en peso basándose en el peso total de los monómeros presentes, de uno o más monómeros insaturados con monoetileno que contienen carboxi. En algunas modalidades, el monómero insaturado con monoetileno que contiene carboxi incluye ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico, ácido metilacrílico (ácido crotónico), ácido cis-.alfa.-metilcrotónico (ácido angélico), ácido trans- α -metilcrotónico (ácido tíglico), ácido α -butilcrotónico, ácido .alfa.-fenilacrílico, ácido α -bencilacrílico, ácido α -ciclohexilacrílico, ácido fenilacrílico (ácido cinámico), ácido coumárico (ácido o-hidroxicinámico), y ácido umbelico (ácido p-hidroxicoumárico). En algunas modalidades, el polímero se entrecruza mediante un agente de reticulación polifuncional (por ejemplo, un agente de reticulación bifuncional). En algunas modalidades, el agente de reticulación se encuentra en una cantidad de entre alrededor de 0.01% y alrededor de 5%, o entre alrededor de 0.1% y alrededor de 5.0%, o entre alrededor de 0.2% y alrededor de 1%, basándose en el peso total de los monómeros presentes. En algunas modalidades, los agentes de reticulación son monómeros de reticulación

bifuncional de poliéter no polialquénil, tales como divinil glicol, 2,3-dihidroxihexa-1,5-dieno, 2,5-dimetil-1,5-hexadieno, divinilbenceno, N,N-dialilacrilamida, N,N-dialimetacrilamida; agentes de reticulación de polialquénil poliéter que contienen dos o más grupos de alquénil éter que contienen grupos terminales $H_2C=C$, preparados mediante esterificación de un alcohol polihídrico que contiene al menos cuatro átomos de carbono y al menos tres grupos hidroxilo con un alquénil halido tal como alil bromuro o similares, por ejemplo, polialil sacarosa, polialil pentaeritritol, o similares; agentes de reticulación macroméricos no hidrofílicos diolefínicos con pesos moleculares de entre alrededor de 400 y alrededor de 8000, tal como diacrilatos insolubles y poliácrilatos y metacrilatos de dioles y polioles, diisocianato hidroxialquil acrilato o metacrilato, productos de reacción de prepolímeros terminados de isocianato derivados de dioles de poliéster dioles de poliéter o dioles de polisiloxano con hidroxialquilmecrilatos, y similares.

En algunas modalidades, los polímeros entrecruzados están hechos de un monómero o monómeros insaturados de monoetileno que contienen carboxi como el mismo monómero insaturado de monoetileno presente, junto con un agente o agentes de reticulación. En algunas modalidades, los polímeros son aquellos en los cuales hasta alrededor del 49%

y preferentemente entre alrededor de 0% y alrededor de 20% en peso del monómero o monómeros insaturados de monoetileno que contienen carboxi se han reemplazado por uno o más monómero o monómeros insaturados de monoetileno que no contienen carboxi que contienen sólo sustituyentes fisiológica y oftálmicamente inocuos, incluyendo ésteres de ácido acrílico y metacrílico tales como metil metacrilato, etil acrilato, butil acrilato, 2-etilhexilacrilato, octil metacrilato, 2-hidroxietilmetacrilato, 3-hidroxipropilacrilato, y similares, 5
vinil acetato, N-vinilpirrolidona, y similares (por ejemplo, 10
Mueller et al. Pat. E.U.A. No. 4,548,990). En algunas modalidades, los polímeros incluyen policarbofil (Noveon AA-1), Carbopol®, y DuraSite®. En algunas modalidades, los polímeros de reticulación se preparan mediante suspensión o 15
emulsión polimerizando los monómeros, utilizando catalizadores de polimerización convencionales de radicales libres, hasta una partícula seca de no más de alrededor de 50 µm de tamaño en diámetro esférico equivalente. En algunas modalidades, el tamaño de partícula seca promedio es de entre 20
alrededor de 1 y alrededor de 30 µm, o de entre alrededor de 3 y alrededor de 20 µm en diámetro esférico equivalente. En algunas modalidades, las partículas de polímero se obtienen mediante molienda mecánica de partículas de polímero más grandes. En otras modalidades, dichos polímeros tienen un

peso molecular de entre alrededor de 250,000 y alrededor de 4,000,000, y entre alrededor de 3,000,000,000 y 4,000,000,000. En otras modalidades, las partículas del polímero entrecruzado son monodispersas, lo cual quiere decir

5 que poseen una distribución de tamaño de partícula de tal modo que al menos alrededor de 80%, alrededor de 90% o alrededor de 95% de las partículas se encuentran en una banda μm de distribución de tamaño de partícula principal. En otras modalidades, el tamaño de partícula monodispersa se refiere a

10 que no hay más de alrededor de 20%, alrededor de 10% o alrededor de 5% de partículas de un tamaño menor a 1 μm . En algunas modalidades, la suspensión polimérica acuosa comprende entre alrededor de 0.05 y alrededor de 1%, entre alrededor de 0.1 y alrededor de 0.5%, o entre alrededor de

15 0.1 y alrededor de 0.5%, del agente y entre alrededor de 0.1 y alrededor de 10%, entre alrededor de 0.5 y alrededor de 6.5%, entre alrededor de 0.5 y alrededor de 2.0%, entre alrededor de 0.5% y alrededor de 1.2%, entre alrededor de 0.6 y alrededor de 0.9%, o entre alrededor de 0.6 y alrededor de

20 0.8% de un agente de suspensión polimérico. Aunque la referencia se realizó en singular, debe entenderse que una o más especies de agente de suspensión polimérico puede utilizarse con la cantidad total dentro de los intervalos declarados. En una modalidad, la cantidad de partículas de

polímero entrecruzadas ligeras insolubles, el pH, y la presión osmótica pueden correlacionarse entre sí y con el grado de reticulación para resultar en una composición con una viscosidad en el intervalo de entre alrededor de 500 y
5 alrededor de 100000 centipoise y preferentemente entre alrededor de 1,000 y alrededor de 30,000 o entre alrededor de 1,000 y alrededor de 10,000 centipoise, medido en temperatura ambiente (alrededor de 25°C) utilizando un viscosímetro Brookfield Digital LVT equipado con un huso de número 25 y un
10 adaptador de muestra pequeño 13R a 12 rpm. En algunas modalidades, la viscosidad está entre alrededor de 10 y alrededor de 400 centipoise, entre alrededor de 10 y alrededor de 200 centipoises o entre alrededor de 10 y alrededor de 25 centipoise.

15 En algunas modalidades, las suspensiones poliméricas acuosas pueden formularse de tal modo que mantengan la misma o sustancialmente la misma viscosidad en el ojo que tenían antes de administrarse en el ojo. En algunas modalidades, pueden formularse de tal modo que haya mayor gelificación al
20 contacto con el fluido lagrimal. Por ejemplo, cuando una formulación que contiene DuraSite® u otro polímero similar de tipo de ácido poliacrílico se administra al ojo a un pH menor de alrededor de 6.7, el polímero puede hincharse al contacto con el fluido lagrimal ya que posee un pH mayor (alrededor de

7). Esta gelificación o aumento en la gelificación puede conducir al atrapamiento de partículas suspendidas, extendiendo el tiempo de residencia de la composición en el ojo. En algunas modalidades, el agente es liberado lentamente, según se disuelvan las partículas suspendidas a lo largo del tiempo. En algunas modalidades, esta administración aumenta el confort del paciente y aumenta el tiempo de contacto del agente con los tejidos el ojo, incrementando así la extensión de absorción de fármaco y la duración de acción de la formulación en el ojo. Los agentes contenidos en esos sistemas de administración de fármaco se liberarán de los geles a velocidades que dependen de factores como el fármaco mismo y su forma física, la extensión de la carga del fármaco y el pH del sistema, así como de cualquier adyuvante de administración de fármaco, tal como resinas de intercambio de iones compatibles con la superficie ocular, las cuales pueden estar también presentes.

En algunas modalidades, el antagonista de IL-6 se proporciona a un sujeto utilizando la administración genética, por ejemplo, administración genética local. Dicha administración puede ser mediante un sistema de expresión transitoria, un sistema de expresión estable (por ejemplo, integrado) tal como un sistema de administración basado en lentivirus fabricado por Bluebird Bio (Cambridge, MA), o una

administración en una fábrica celular tal como aquellas fabricadas por Neurotech (Cumberland, Rhode Island).

Todas las características técnicas pueden combinarse individualmente en todas las combinaciones posibles de dichas
5 características.

Equivalentes

La invención puede comprenderse e otras formas específicas sin alejarse del espíritu ni las características esenciales de la misma. Las modalidades presentadas a continuación se
10 consideran por lo tanto en todos los aspectos como ilustrativas y no como limitantes de la invención aquí descrita.

EJEMPLOS

15 Los ejemplos no limitantes que se presentan a continuación, ilustran modalidades de las invenciones aquí descritas.

Ejemplo 1: Validación del bloqueo de IL-6 local en el modelo de neovascularización coroidea (CNV)

Para determinar si el bloqueo de IL-6 local puede ser
20 efectivo para tratar un padecimiento de los ojos, por ejemplo, edema macula diabético (DME) o AMD húmeda, un anticuerpo anti IL-6 se administró localmente utilizando un sistema modelo para neovascularización coroidea. Un modelo CNV inducido con láser (eyecro.com/in-vivo/laser-induced-

choroidal-neovascularization-cnv/) reproduce la mayoría de los procesos patológicos subyacentes a DME incluyendo inflamación y angiogénesis. Se llevaron a cabo estudios en ratas en EyeCRO (Ciudad de Oklahoma, OK). Seis animales en

5 cada grupo sufrieron tratamiento láser bilateral en el Día 0 para producir tres lesiones por ojo. En los días 3 y 10, 3 µg de un anticuerpo policlonal anti IL-6 de rata (R&D Systems AF506; Minneapolis, MN) se administra al grupo de prueba mediante inyección intravítrea (IVT), mientras se administra

10 PBS o anticuerpo policlonal anti VEGF (R&D Systems AF564) a los grupos del vehículo y de control positivo, respectivamente. Se lleva a cabo una angiografía *in vivo* en los días 15 y 22 para medir el área de lesión. En ambos días, el grupo tratado con anti IL-6 tuvo una neovascularización

15 reducida significativamente al compararse con el vehículo control. No hubo diferencia significativa en la respuesta entre el grupo tratado con anti IL-6 y el control positivo anti VEGF. La FIGURA 1 muestra los resultados de cada experimento. Estos datos demuestran que un IL-6a, por

20 ejemplo, un anticuerpo anti IL-6, administrado IVT puede reducir la neovascularización en un modelo CNV de rata a niveles similares a un control positivo anti VEGF ($p = 0.0054$ en el Día 15 y $p = 0.0005$ en el Día 22 para anti IL-6 vs. vehículo control).

Estos datos indican que el bloqueo local de IL-6 puede ser útil para el tratamiento de padecimientos del ojo tales como enfermedades que involucren derrame vascular, por ejemplo, edema macular.

5 **Ejemplo 2: Antagonistas candidatos de anticuerpos contra IL-6**

Se desarrollaron antagonistas candidatos de anticuerpos contra IL-6 utilizando un proceso que involucra, primeramente, inmunizaciones. Las inmunizaciones se llevaron a cabo bajo la dirección de los inventores mediante una
10 organización de investigación contractual (CRO, *por sus siglas en inglés*). Cinco ratones BALB/C se inyectaron subcutáneamente con 80 µg de IL-6 humana (R&D Systems, cat# 206-IL/CF, Minneapolis, MN) en PBS con 1 M de NaCl con adyuvante de Freud. Dos aumentos se llevaron a cabo con 80 µg
15 y 50 µg de IL-6. Las células del bazo se recolectaron del ratón con la titulación más alta se fusionaron con células de mieloma P3x763Ag8.653 para formar hibridomas.

Se probaron los sobrenadantes del hibridoma para unión y antagonismo a IL-6. Para la unión, placas ELISA, Costar 9018
20 se recubrieron con 1 µg/mL de IL-6 humana en PBS durante la noche a 4°C. Los pozos se bloquean con PBS conteniendo 2% de BSA, se lavan y posteriormente se incuban con 50 µL de cada sobrenadante de hibridoma diluido 1:2 con PBS conteniendo 2% de BSA. Después de 60 min., los pozos se lavan tres veces con

300 μ L de PBS conteniendo 0.1% de Tween 20. HRP anti ratón diluido 1:3000 en PBA-BSA se añade posteriormente a cada pozo y se incuba durante 30 minutos. Los pozos se lavan como se menciona arriba, después se añade sustrato de 3,3', 5-5'-
5 tetrametilbenzidina (TMB) y la medición de la señal a 450 nm y 550 nm. Para estudios de antagonismo, las células reporteras HEK-BlueTM-IL-6 (InvivoGen, San Diego, CA) se incuban con concentraciones incrementadas de IL-6 en la presencia de sobrenadante de hibridoma diluido 1:10. Después
10 de 20-24 horas se mezclan 20 μ L de sobrenadante con 180 μ L de QuantiBlueTM (InvivoGen) y la absorbancia se mide a 655 nm.

Basado en los estudios de unión y antagonismo, el hibridoma 64 se selecciona por los solicitantes como principal y se subclona en el CRO. El hibridoma 64 (un
15 monoclonal murino) se prueba para la habilidad de inhibir la unión de un complejo IL-6/IL-6R α a gp130 utilizando una enzima ligada a una prueba inmunoabsorbente (ELISA). El hibridoma 64 a una concentración de 1-5 μ g/mL reduce significativamente la unión de un complejo IL-6/IL-6R α para
20 inmovilizar gp130 mediante ELISA (FIGURA 2).

Las subclonas se prueban nuevamente y los dominios variables de la subclona 64.58 se amplifican mediante 5'RACE PCR y se secuencian. Las secuencias dominio variable de ratón (referidas como m64) se presentan a continuación:

m64 VH (cadena pesada variable)

QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGYAFSNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVITPGSGTINYN
EKFKGKAVLTADKSSSTVYMQLSLTSDDSAVYFCAKSRWDPLYYYALEYWGQGTSTVTVSS
(SEQ ID NO:13)

5 m64 VL (cadena ligera variable)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGG
VPAFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPLTFGAGTKLELK (SEQ ID
NO:14)

Para crear secuencias humanizadas, las regiones
10 determinantes de la complementariedad (CDR) de m64 se
injertan en un armazón de línea germinal humana seleccionado
por la similitud a la secuencia de ratón mediante un
algoritmo computacional. Las secuencias humanizadas
(referidas como h64) son las siguientes (los residuos
15 alterados comparados a las secuencias m64 se encuentran
subrayados) y tienen alrededor del 79.5% de identidad (VH) y
84.4% de identidad (VL) con las secuencias murinas:

h64 VH

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYA
20 QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGT^{TV}TVSS
(SEQ ID NO:15)

h64 VL

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQQSKEVPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID

NO:16)

Las secuencias humanizadas se sintetizan mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA), posteriormente se clonan dentro de vectores de expresión derivados de pcDNA3.1 como fusiones en línea con los dominios constantes de IgG1 humana. Las IgG se expresan mediante transfección transitoria en células Freestyle™-293 (Invitrogen, Grand Island, NY) y se purifican mediante cromatografía de proteína A. En ambos estudios, unión y antagonismo, h6a-IgG demuestra una reducción de potencia considerable comparada a su predecesor m64. Además, la exposición por levadura se utiliza para reestablecer la afinidad perdida.

Para llevar a cabo el diseño de maduración de la afinidad para reestablecer o mejorar la afinidad de h64IgG humanizada, las secuencias del anticuerpo h64 se reclonaron para generar una molécula Fab en vectores de levadura derivados de pYC2/CT en el cual la cadena FabH se fusiona a 4m5.3 scFv anti FITC a través de una molécula de unión (G4S)₃ (SQE ID NO: 29). Se genera, entonces, una biblioteca de variantes de h64 mediante PCR proclive a errores siguiendo el protocolo de Chao et al. (2006, Nature Protocols, 1:755-768). Las variantes de h64 se expresan y se capturan por la superficie mediante levaduras marcadas con FITC-PEG-NHS y posteriormente se incuban con IL-6 humana biotinilada. La

unión a IL-6 se detecta con estreptavidina-APC, y las células
 con la mayor cantidad de unión a IL-6 relativa a la cantidad
 de Fab mostrados se seleccionan en un clasificador de celdas
 BD FACSARIA™. Después de cuatro rondas de selección, se
 5 selecciona y secuencia una población de las variantes de más
 alta afinidad. La secuencia de la clona seleccionada por
 maduración de la afinidad (referida como h6a-1.4) es como
 sigue con las mutaciones seleccionadas (por ejemplo, mutadas
 al compararse con las secuencias de h6a VH y VL) en negritas
 10 y las CDR están subrayadas. Estos son los dominios variables
 de 018 (así como las moléculas IL-6a 020 y 029 descritas
 abajo). Nótese que los Fab completos incluyen los dominios CK
 e IgG1 CH1. En el contexto de esta solicitud, se refiere a
 las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y
 15 ligeras "Fab" significa que la secuencia puede ser parte de
 un Fab funcional que consiste de una secuencia derivada de la
 cadena ligera y la secuencia derivada de la cadena pesada.

h64-1.4 VH (018VH) (dominio variable)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYA**L**SNYLI**E**WVRQAPGQGLEWMG**V**ITPGSGT**I**NYA
 20 QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS**R**WDPLY**Y**ALEYWGQGT**T**VT**V**SS
 (SEQ ID NO:17)

h64-1.4 VL (018VL) (dominio variable)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESV**D**NYGI**P**FMN**W**YQ**K**PGQPPK**L**LIYAAS**N**R**G**SG
 VPDRFSGSGSGTDFTLT**I**SS**L**QAEDVAVYYC**Q**Q**S****E**EV**P**LT**F**GQGT**K**LEIK**R**TV (SEQ ID

NO:18)

Los dominios variables de h64-1.4 se reclonan dentro de un vector IgG1 humano pcDNA3.1 y se expresa como una IgG1 de longitud total en células Freestyle™-HEK293 (Life
 5 Technologies). La IgG purificada resultante fue significativamente más potente que el anticuerpo h64 original en los estudios de unión y de antagonismo celular. Las pruebas de afinidad utilizando el sistema de levadura, el incremento de afinidad para la molécula original humanizada
 10 de 343 pM a 43 pM. La potencia del antagonista se incrementó alrededor de 10 veces como se ensayó utilizando el sistema celular HEK-Blue.

La IgG hg4-1.4 se reformatea como un Fab para uso ocular y otras indicaciones. Adicionalmente, otras rondas de
 15 selección basadas en la generación de la biblioteca y levaduras se llevan a cabo para mejorar la afinidad. Después de cuatro rondas de selección, hubo enriquecimiento significativo para una variante VH con la mutación A79V. Los anticuerpos, variantes y fragmentos de los mismos que
 20 comprenden la variante A79V se referencian como anticuerpos, variantes y fragmentos de los mismos IL-6a 019.

Ejemplo 3: Selección de formato.

Para investigar adecuadamente los formatos para un antagonista IL-6 basado en anticuerpo, los anticuerpos IL-6

seleccionados como se describen arriba se prueban para expresión transitoria, estabilidad, propiedades de agregación, afinidad de unión e IC50 utilizando Fab, formas scFv(VH-VL) y scFv(VL-VH) de las secuencias 018.

5 Los resultados de estos estudios para una de las moléculas candidatas IL-6a (secuencias que contienen la región variable 018) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

	Parámetro	Fab	scFv(V_H-V_L)	scFv(V_L-V_H)
10	Expresión transitoria	45 mg/ml	2 mg/L	4 mg/L
	Estabilidad (T _M)	73°C	43°C	46°C
	Agregación (SEC, MALS)	No	Sí	N/A
15	Afinidad de Unión (K _D)	240 pM	1 nM	720 pM
	IC50 con 10 pM IL-6	255 pM	160 pM	125 pM

Estos datos demuestran un método de identificación de características clave de varios formatos de un antagonista de IL-6 basado en anticuerpo e ilustra que para antagonistas IL-6 que contienen las regiones variables 018, el formato 018 Fab tiene las características más favorables en la mayoría de las categorías clave, por ejemplo, expresión, estabilidad, agregación, y afinidad de unión al compararse con una

configuración scFv. El IC50 del Fab 018 cae dentro de un rango razonable para el uso terapéutico.

Ejemplo 4: Ejemplos de anticuerpos IL-6a, fragmentos y derivados

5 Los solicitantes tienen identificadas las siguientes secuencias utilizando métodos descritos en el presente documento. Subrayado se representan las secuencias CDR de las cadenas pesadas y ligeras. Otras secuencias pueden encontrarse a lo largo de la especificación.

10 Secuencia polipeptídica de la cadena pesada 018 (longitud total; f1018HC) en un armazón IgG1

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYA
QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
15 LYSLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19)

20 Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada 018 (longitud total; f1018HC) en un armazón IgG1

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
CTTGTAAGCGTCTGGTTACGCCCTTTCAAAC TACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCC
CGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTATCACCCCTGGGAGCGGCACCATTAATTACGCC

CAGAAATTTTCAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGG
 AGCTGTCCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGA
 CCCTCTTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCATCT
 GCTAGCACAAAAGGACCATCAGTCTTCCCACTTGCTCCTTCATCTAAGAGCACAAAGTGGTG
 5 GCACTGCAGCCCTTGGCTGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTG
 GAACTCCGGTGCACTGACATCCGGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGA
 CTGTATAGCCTGTCTTCGGTGGTCACTGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATA
 TTTGCAACGTCAATCACAAGCCCTCCAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATC
 TTGTGACAAGACCCATACGTGTCCTCCCTGTCCCGCCCCTGAACTGCTGGGAGGCCCTTCT
 10 GTGTTCTGTTCACCTAAGCCAAAGGACACTCTGATGATCAGCCGGACTCCCGAGGTTA
 CCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAAGACCCTGAGGTTAAGTTCAATTGGTACGTGGA
 TGGCGTCGAGGTGCATAACGC AAAAACCAAGCCGAGAGAGGAGCAGTACaatAGCACCTAT
 AGAGTAGTGAGCGTCCTGACTGTCTTACATCAGGATTGGCTCAATGGTAAAGAATATAAGT
 GCAAGGTAAGCAACAAGGCCCTACCCGCACCAATAGAGAAGACCATCTCCAAGGCGAAAGG
 15 TCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTTTATACACTGCCTCCCTCACGCGACGAATTAACAAAGAAT
 CAGGTGTCTCTCACCTGTCTCGTCAAGGGCTTTTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGG
 AATCCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTATAAGACA ACTCCCCAGTCCTGGATT CAGATGG
 GTCGTTCTTTCTATATAGTAAGTTGACCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAACAGGGGAACGTG
 TTCTCTTGCTCTGTTATGCATGAAGCGCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGTCCC
 20 TGAGCCCCGGGAAG (SEQ ID NO:20)

Secuencia polipeptídica de la cadena pesada Fab 018
 (018FabHC) en un armazón IgG1. Las CDR están subrayadas

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAS GYALSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYA
 QKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRWDPLYYYALEYWGQGTTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSSTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO:1)

Secuencia polipeptídica de longitud completa de la
 cadena ligera 018 (f1018LC). Las CDR están subrayadas

5 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLsKADY EKHKVYACEV
 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:2)

10 Ésta es también la secuencia de la cadena ligera para
 los antagonistas IL-6 020 y 029.

Secuencia de ácido nucleico de longitud completa de la
 cadena ligera 018 (018LC) en un armazón IgG1

GACATAGTGA TGACTCAAAG TCCGGACAGC CTGGCGGTGT CACTCGGCGA
 15 ACGGGCAACT ATCAACTGCC GAGCCAGCGA GAGCGTCGAT AATTACGGCA
 TCCCCTTCAT GAACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGACAGCC GCCCAAGCTG
 CTTATCTACG CCGCTTCCAA CCGGGGATCA GGGGTGCCCCG ATCGATTTAG
 TGGAAGCGGT AGTGGGACCG ATTTCACACT GACCATCAGC TCCCTTCAGG
 CCGAGGATGT GGCTGTCTAT TATTGTCAGC AATCCGAGGA AGTGCCGCTC
 20 ACGTTTGGTC AGGGAACCAA ACTGGAGATC AAGCGGACCG TAGCGGCGCC
 TAGTGTCTTC ATCTTCCCAC CCTCCGACGA ACAGCTGAAG TCTGGCACTG
 CTTCCGTCGT GTGCCTGCTC AACAACTTTT ACCCTAGAGA GGCAAAAGTT
 CAATGGAAAG TAGACAATGC CTTGCAGTCC GGGAAGTCCC AGGAGTCTGT
 CACAGAGCAG GATAGTAAGG ACTCAACCTA CAGCCTGTCC AGCACACTGA

CCCTCTCCAA AGCCGACTAC GAGAAGCACA AAGTGTACGC TTGCGAAGTT
ACGCATCAGG GGCTGTCCTC ACCCGTTACA AAAAGTTTTA ACAGAGGGGA GTGC

(SEQ ID NO:26)

Cadena Pesada Fab 019 (019FabHC, misma secuencia que

5 018FabHC excepto por A79V (negrita/cursiva)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTST**VY** MELSSLRSED TAVYYCARSR
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT

10 QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC (SEQ ID NO:3)

VH 019 (región variable/019HC)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTST**VY** MELSSLRSED TAVYYCARSR
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO:27)

15 La secuencia de la cadena ligera del anticuerpo 019
(019LC) (polipeptídica y ácido nucleico) es la misma que el
018LC

CDR1 de 018HC (VH CDR1 018): GYALSNYLIE (SEQ ID NO:4)

CDR2 de 018HC (VH CDR2 018): VITPGSGTIN (SEQ ID NO:5)

20 CDR3 de 018HC (VH CDR3 018): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:6)

CDR1 de 018LC (VL CDR1): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO:7)

CDR2 de 018LC (VL CDR2): AASNRGS (SEQ ID NO:8)

CDR3 de 018LC (VL CDR3): QQSEEVPLT (SEQ ID NO:9)

CDR1 de 019HC (VH CDR1 019): GYALSNYLIE (SEQ ID NO:4)

CDR2 de 019HC (VH CDR2 019): VITPGSGTIN (SEQ ID NO:5)

CDR3 de 019HC (VH CDR3 019): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:6)

Ejemplo 5: Mapeo de epítomos y estructura

Mapeo de epítomos

5 El mapeo de epítomos funcionales se lleva a cabo en
candidatos antagonistas de IL-6. Se encuentra que un
anticuerpo candidato (anticuerpo 64 murino) no reduce la
unión de IL-6R α a IL-6 en un ELISA indicando que el
anticuerpo candidato no se une al sitio I. Experimentos
10 adicionales se conducen demostrando que el anticuerpo 64
murino quimérico reduce la unión del complejo IL-6/IL-6R α a
gp130 en un ELISA indicando que el Sitio II o el Sitio III de
la IL-6 albergan el sitio de unión para un anticuerpo.
También se encuentra que el anticuerpo 64 murino no bloquea
15 significativamente la unión de un anticuerpo conocido AH-65
al sitio de unión III (Immunotech, Marseille, France) de IL-6
indicando que el sitio de unión del anticuerpo candidato es
el sitio II de la IL-6. Estos datos demuestran que pueden
generarse anticuerpos contra el sitio II y demuestra un
20 método de identificación de dichos anticuerpos.

Para definir adicionalmente el epítopo, se generan
mutaciones en IL-6 en levadura como fusiones a 4m5.3 (Boder
et al., 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 10701-10705; Chao et
al., 2006, Nat Protoc 1, 755-768). Las mutaciones expresadas

fueron en IL-6 humana con las siguientes mutaciones únicas o dobles: R24E/D27E, R30E, Y31E, D34R, S118R/V121E, W157E, Q159E/T162P, K171E, y R179E. Las moléculas IL-6 mutadas expresadas se utilizan en estudios de unión con 018 (Fab). La

5 afinidad reducida para 018 (Fab) se observa para R24E/K27E, Y31E, D34R, y S118R/V121R, las cuales se localizan en el sitio II de IL-6. En consecuencia, la invención aquí descrita incluye un anticuerpo que se une al menos a uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los aminoácidos en la posición 24,

10 27, 31, 31, 118, y 121 de la IL-6 humana o del sitio equivalente en una IL-6.

Definición estructural de un epítipo en el sitio II

Las siguientes distancias fueron calculadas en un sitio II definido estructuralmente. Los cálculos se basan en la

15 estructura cristalina hexamérica de IL-6/IL-6 α , PDB 1P9M (Boulanger et al., 2003, Science 300: 2101-2104). La hélice I de IL-6 se encuentra entre el sitio I y el sitio II resultando en ciertos residuos que caen cerca del sitio II pero tienen cadenas laterales que apuntan hacia el sitio I,

20 por ejemplo, R30. D2 y D3 referido a los dominios extracelulares de IL-6R α .

Se determinó que los aminoácidos mencionados a continuación de IL-6 caen dentro de 5 Å de gp130-D2-D3: L19, R24, K27, Q28, R30, Y31, D34, E110, Q111, R113, A114, M117,

S118, V121, Q124, F125, y K128.

Se determinó que los aminoácidos mencionados a continuación caen dentro de 7 Å de gp130-D2-D3: L19, E23, R24, I25, K27, Q28, I29, R30, Y31, D34, K41, Q102, E109, E110, Q111, A112, R113, A114, V115, Q116, M117, S118, K120, V121, L122, Q124, F125, y K128.

En consecuencia, una molécula, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a uno o más aminoácidos de IL-6 que caen dentro de 5 Å o 7 Å del sitio II puede ser un IL-6a.

La secuencia de la IL-6 humana se proporciona debajo como referencia (la secuencia subrayada es la secuencia líder). Los aminoácidos dentro de 7 Å de gp130-D2-D3 están en cursivas. La numeración de los aminoácidos por ejemplo, mutaciones utilizadas para definir epítomos, está sin la secuencia líder.

IL-6 Humana

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYIL
 DGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEF
 EVYLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQN
 QWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO:21)

Los experimentos se llevan a cabo probando el fragmento Fab del anticuerpo humanizado h64-1.4 y demuestra que es capaz de bloquear la señalización en cis y trans de IL-6, la

cual se debe a la orientación del sitio II. La potencia del fragmento Fab no cambia en la presencia del receptor IL-6 soluble (sIL-6R). Esto está en contraste con un IgG anti IL6R que tiene disminuida la potencia en la presencia de sIL-6R, y
5 que bloquea la señalización en cis solamente.

Estos experimentos demuestran que un anticuerpo o fragmento del anticuerpo tal como el fragmento Fab que está orientado al sitio II puede utilizarse para inhibir la señalización en cis y trans de IL-6.

10 **Ejemplo 6: Estudios en primates**

Debido a que las actividades en no primates pueden diferir mucho de aquellos que son primates, los candidatos antagonistas de IL-6 son típicamente evaluados por PK y otros parámetros utilizando primates no humanos. La IL-6 no humana
15 difiere de la IL-6 del mono cynomolgus y del mono rhesus en siete sitios, uno de los cuales es en el sitio II (aminoácido 28) y es el mismo en el sitio II de la IL-6 en el mono verde Africano. Esto parece disminuir la unión de un anticuerpo que comprende las secuencias 018 por únicamente alrededor de 3-4
20 veces. La habilidad de unión para unirse a la IL-6 de un primate no humano es una característica útil de un antagonista de IL-6, facilitando el desarrollo de un candidato como un fármaco, por ejemplo, permitiendo pruebas tales como la prueba de toxicología en primates no humanos.

Como en la mayoría de los anticuerpos de IL-6, los anticuerpos anti IL-6 descritos en el presente documento no reaccionan de forma cruzada con IL-6 de roedor, conejo o perro debido a la baja homología de la secuencia. Sin embargo, en estudios de afinidad, se encuentra que el Fab 018 se une a las IL-6 del mono cynomolgus y el mono verde africano con afinidad aproximadamente humana (Tabla 2).

Tabla 2. Afinidad monovalente (018 Fab) para varias IL-6 de varias especies.

10	Especies	K _D
	Humano	200 pM
	Mono verde Africano	280 pM
	Mono cynomolgus	840 pM
	Perro	> 1 μM
	Ratón	> 1 μM
15	Conejo	> 1 μM
	Rata	> 1 μM

Estos datos demuestran la habilidad de un IL-6a, como aquí se describe, para unirse específicamente y la habilidad para desarrollar una molécula que tenga características que le permitan realizar pruebas por ejemplo, toxicología y estudios reproductivos, en un animal adecuado.

Ejemplo 7: Expresión elevada de un IL-6a

Para elevar la expresión de polipéptidos Fab 018 y Fab 019,

se hacen constructos introduciendo cinco aminoácidos adicionales (DKTHT (SEQ ID NO: 30)) a la cadena pesada en la región bisagra/CH1 utilizando métodos conocidos en la técnica. La secuencia de la cadena pesada de Fab 018 alterado se muestra debajo como SEQ ID NO:24. La secuencia alterada 018 se denomina en el presente documento como 020 y la secuencia 019 alterada se denomina en el presente documento como 021. La molécula 020 (la cadena pesada de Fab 20 y la cadena ligera Fab 018) tiene expresión mejorada comparada al Fab precursor que tiene cadenas ligera y pesada de Fab 018. La molécula 019 exhibe una diferencia de afinidad no significativa comparada con la molécula 020. La expresión de 020 y 019 se incrementa por alrededor de dos veces, respectivamente, y las afinidades no son afectadas por la alteración.

Cadena pesada 020 (Fab con DKTHT (SEQ ID NO: 30 en el carboxilo terminal)

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKAS <u>GYALS</u>	<u>NYLIEWVRQA</u>	PGQGLEWMGV
<u>ITPGSGTINY</u>	AQKFQGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARS <u>R</u>
20 <u>WDPLYYYALE</u>	<u>YWGQGT</u> TVTV	SSASTKGPSV	FPLAPSSKST	SGGTAALGCL
VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SSGLYSLSSV	VTVPSSSLGT

QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:24)

El antagonismo de IL-6 utilizando Fab 020 se mide en células reporteras IL-6 HEK-Blue™ (InvivoGen, San Diego, CA).

Las células se incuban en una mezcla de IL-6 10 pM y se varía la concentración de 020 o anticuerpo IL-6R α (Cell Sciences, Canton, MA), con o sin 50 nM de IL-6R α . Después de 20-24 horas de incubación, 20 μ L del sobrenadante del cultivo celular se mezcla con 180 μ L de sustrato de QuantiBlue™ (InvivoGen) y se incuba durante una hora; entonces se mide la absorbancia a 655 nm. Las FIGURA 3A y FIGURA 3B muestran los datos de esos experimentos, demostrando la habilidad de 020 para inhibir la actividad de IL-6 en la presencia o ausencia de IL-6R.

Ejemplo 8: Anticuerpos IgG2 IL-6

Se reformatea 018 en un armazón de isotipo IgG2 humana para reducir la unión a Fc γ R y reducir ADCC al compararse con el anticuerpo con formato IgG1 utilizando métodos conocidos en la técnica. En adición, reformateando 018 a un formato de longitud total, por ejemplo, un IgG2, se espera que disminuya la razón de aclaramiento del cuerpo vítreo debido al mayor tamaño de la molécula.

Construcción/purificación de anticuerpos IgG2 anti IL-6

Para construir anticuerpos iGg2 humanos utilizando secuencias anti IL-6 descritas arriba, un dominio constante de IgG2 se amplifica por PCR de ADNc con los sitios de restricción NheI y MluI en los extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. El producto de PCR se purifica, se digiere

con las enzimas de restricción NheI y MluI, y después se liga en un vector pTT5 que contiene el dominio variable anti IL-6, por ejemplo, SEQ ID NO:1 (ver arriba). Esto produce una secuencia de cadena pesada IgG2 de longitud completa. Los
5 plásmidos que contienen la cadena ligera de longitud completa que contiene la secuencia 018 se usan para proporcionar la cadena ligera.

Para reducir la unión de FcRn y de este modo reducir el reciclaje de la IL-6a, se hacen mutaciones puntuales en la
10 cadena pesada. Las mutaciones se hacen mediante mutagénesis QuikChange® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los plásmidos de las cadenas pesada y ligera se cotransfectan utilizando polietilenimina (PEI) en 100 mL de cultivos transitorios de células HEK293-6E y se cultivan para permitir
15 la expresión durante alrededor de cinco días. Los anticuerpos generados contienen la mitad del sitio de unión II del anti IL-6 y la estructura de IgG3. Dichas estructuras que contienen CDRs 018 se denominan en el presente documento 018IgG2 o 029. Las mutaciones puntuales se hacen en los
20 residuos I253.

La molécula IgG2 se expresa y bloquea IL-6 en ensayos celulares con poca potencia mejorada comparada con Fab 020.

Secuencias maduras 029 (CDR subrayadas)

Cadena pesada 029

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR
WDPLYYYALE YWGQGT^{TV}TV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT
 5 QTYTCNV^{DH}K PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST
 FRVVS^{VL}TVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK^T KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQ^{PE}N NYKTT^{PP}MLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID
 10 NO:11)

Cadena ligera 029

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPKL
 LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
 15 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL^S STLTL^{SK}ADY EKHKVYACEV
 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:12)

Unión alterada a FcRn

IL-6 puede tener ciertos efectos sistémicos positivos. Es
 además una ventaja modificar un IL-6a que tenga buena
 20 retención en el cuerpo vítreo pero que tenga una vida media
 sistémica corta. La reducción o eliminación de la unión a
 FcRn debe reducir la acumulación sistémica de algunos
 fármacos que escapen a la circulación, de este modo mejora la
 seguridad de un IL-6a.

En consecuencia, debido al tráfico mediado por FcRn puede incrementar el flujo de anticuerpos del ojo, el IgG2 020 se modifica para eliminar la unión a FcRn mediante la introducción de mutaciones en Fc en los residuos I254, H311, 5 o H436 (Véase SEQ ID NO:23) numerados de acuerdo a Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)). Los sitios mutados se muestran en negritas en SEQ ID NO:23; I254 se muta a A o R, H311 se muta a A o E, H311 se muta N con D 313 mutado a T, y H436 se muta a A (la numeración empieza después de la 10 secuencia líder, la cual se subraya en SEQ ID NO:23, los antagonistas de IL-6 que contienen dichas secuencias se denominan 0181gG2m.

Cadena pasada anti IL-6 (IgG2) (letras normales: VH; 15 letras cursivas: CH)(sin secuencia líder) mostrando los sitios de mutación (negritas)

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYALS	NYLIEWVRQA	PGQGLEWMGV
ITPGSGTINY	AQKFQGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARSR
WDPLYYYALE	YWGQGTITVTV	SSASTKGPSV	FPLAPCSRST	SESTAALGCL
VKDYPPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SGLYSLSSV	VTVPSSNFGT
20 QTYTCNVDPHK	PSNTKVDKTV	ERKCCVECPP	CPAPPVAGPS	VFLFPPKPKD
TLMI SRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST
FRVVSVLTVV	HQDWLNGKEY	KCKVSNKGLP	APIEKTISK	KGQPREPQVY
TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPMLD
SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH	EALHN HYTQK	SLSLSPGK (SEQ ID

NO:23)

Cadena pesada anti IL-6 (IgG2) (letras normales: VH; letras cursivas: CH) con secuencia líder (subrayada) mostrando los sitios de mutación (negritas)

5 MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS
 NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY
 MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTITVTV **SSASTKGPSV**
FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ
SSGLYSLSV VTPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP
 10 **CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV**
DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP
APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTTPLMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:28)

15 En consecuencia, algunas modalidades incluyen un anticuerpo que tiene la secuencia de la cadena pesada representada en SEQ ID NO: 23 con mutaciones en I254 (por ejemplo, A o R), H311 (mutado a A o E), H436 (mutado a A), o D313 (mutado a T) con H311 mutado a N.

20 SEQ ID NO: 25 además proporciona una secuencia que, cuando se muta a I133 (por ejemplo, I133A o I133R),), H190 (por ejemplo, H190A o H190E), H315 (por ejemplo, H315A), o D192 con H190 (por ejemplo, D192T con H190N) puede utilizarse en un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo para

producir un polipéptido que tiene una unión a Fc reducida a bajos pH, por ejemplo pH 5.5 o pH lisosomal y/o un polipéptido que tiene vida media sistémica reducida al compararse con un precursor u otra molécula de referencia que no incluye la secuencia.

SASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDPHK PSNTKVDKTV
 ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY
 10 KCKVSNKGLP APIEKTISKI KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO:25)

Cadena ligera anti IL-6 (IgG2) (letras normales: VK; letras cursivas: CK)

15 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNRSG
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ
 DSKDSTYSLI STLTLISKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID
 NO:22)

20 **Ejemplo 9: Estabilidad de la formulación**

La estabilidad del fragmento Fab anti IL-6/IgG1 (que contiene el dominio IgG1CH1) se prueba mediante la determinación de T_m en PBS después en un rango de amortiguadores y excipientes utilizados en fluorometría diferencial de barrido. Se

encontró que el amortiguador de citrato, pH 5.5, incrementó la T_m a más de 80°C. En consecuencia, en algunas modalidades, se proporciona un IL-6a en amortiguador de citrato y en algunos casos tiene una T_m de al menos de 80°C.

5 La agregación se prueba utilizando SEC-MALS y no se observa agregación a 20 mg/mL en amortiguador fosfato salino (PBS, *por sus siglas en inglés*).

Ejemplo 10: Anticuerpos sensibles al pH para mejorar la PK

IL-6 puede tener ciertos efectos sistémicos positivos. Es
10 además una ventaja modificar un IL-6a que tiene buena retención en el cuerpo vítreo pero tiene una vida media sistémica limitada. La reducción o eliminación de la unión a FcRn puede reducir la acumulación sistémica de algunos fármacos que escapan en la circulación, de este modo mejora
15 la seguridad de un IL-6a. En consecuencia, debido al tráfico mediado por FcRn, puede incrementar el flujo de anticuerpos del ojo, el IgG2 020 se modifica para eliminar la unión a FcRn mediante la introducción de mutaciones en Fc en los residuos I254, H311, o H436 (numerados de acuerdo a Martin
20 et al., (Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001))). Dichos anticuerpos se denominan en el presente documento como anticuerpos IL-6pH o anti IL-6pH y se describen a continuación.

Generación de anticuerpos con unión sensible al pH

El pKa de la histidina es alrededor de 6.0 y las histidinas insertadas en las interfaces de unión pueden interrumpir la unión con la protonación de la cadena lateral a bajos pH.

5 Utilizando un anticuerpo anti IL-6 dirigido al sitio II como aquí se describe, se genera una biblioteca que contiene variantes ricas en histidina de CDR de 018 y la biblioteca se examina para uniones sensibles a pH utilizando exposición por levadura. La biblioteca generada es una biblioteca combinada
10 con CDR codificadas mediante degeneración de codones tal que cada residuo es un residuo tipo natural (es decir, el mismo que en el anticuerpo padre) o un residuo de histidina. La evaluación se lleva a cabo alternando la clasificación de una mayor unión a pH fisiológico (7.4) y baja unión a pH
15 endosomal (5.5).

Se identificó que un mutante seleccionado de levadura tiene una alta unión a pH 7.4 (Kd monovalente de 407 pM para el mutante al compararse con 192 pM para la molécula precursor) y relativamente baja unión a pH 5.5 (Kd
20 monovalente de 2.362 nM para el mutante al compararse con 195 nM para el precursor). Esto constituye un cambio de aproximadamente 5.8 veces en la afinidad a pH 5.5. Este mutante contiene múltiples mutaciones de histidina en CDR1 de la cadena ligera. Así, el mutante demuestra unión similar a

la molécula precursor a pH 7.4, y una pérdida significativa de afinidad a pH 5.5. Estas observaciones se verifican utilizando ELISA, FACS, y análisis SPR por métodos conocidos en la técnica.

5 Estos datos demuestran que un IL-6a basado en un anticuerpo puede crearse teniendo las características de un anticuerpo anti IL-6 dirigido al sitio II de IL-6 que puede utilizarse para inhibir la actividad en cis y trans de IL-6, y tener un incremento en PK, al compararse con un anticuerpo
10 precursor u otros anticuerpos que tienen un dominio Fc tipo natural efectuado al menos en parte por la alteración de la unión a PH 5.5.

Ejemplo 11: Eficacia del bloqueo local de IL-6 en el modelo de neovascularización coroidea (CNV) por láser en ratón

15 Para determinar si el bloqueo local de IL-6 puede ser efectivo para el tratamiento de padecimientos del ojo, por ejemplo, edema macular diabético (DME, por sus siglas en inglés) o AMD húmedo, un anticuerpo monoclonal anti IL-6 se administra localmente en un sistema modelo para
20 neovascularización coroidea. Se emplea el modelo CNV inducido con láser como se describe en Saishin et al. Journal of Cellular Physiology, 195:241-248 (2003), en este Ejemplo. Un modelo CNV inducido con láser reproduce la mayoría de los procesos patológicos subyacentes al edema macula diabético

(DME, por sus siglas en inglés), incluyendo inflamación y angiogénesis.

Un anticuerpo monoclonal de IL-6 anti ratón (MP5-20F3, el cual es un anticuerpo isotipo IgG1 de rata se adquiere de Bio X Cell, número de catálogo BE0046) se administra al grupo de prueba mediante inyección intravítrea (IVT). Los controles reciben la inyección intravítrea de trampa de VEGF o inyección intravítrea de un anticuerpo anti HRP de isotipo control (un IgG1 de rata contra peroxidasa de rábano, clona de HRPN, adquirido de BioXCell; número de catálogo BE0088). Para todos los grupos de anticuerpos, se inyectaron 20 µg de proteína en un volumen de 1 µL en el ojo de prueba, mientras el ojo contralateral se deja sin tratamiento como control.

Los ratones son sacrificados en el día 7 después del láser y los montajes planos coroidales se tiñeron con lectina de Griffonia Simplicifolia (GSA) para medir el área de lesión. La FIGURA 4 muestra los resultados. El grupo tratado con anticuerpo anti IL-6 muestra una reducción estadísticamente significativa en neurovascularización comparada con el grupo tratado con el anticuerpo control ($p < 0.05$). En promedio el grupo tratado con el anticuerpo anti IL-6 también muestra la reducción de la neurovascularización comparada con el control positivo anti VEGF.

Estos datos demuestran que un IL-6a, por ejemplo, un

anticuerpo monoclonal anti IL-6, administrado IVT puede reducir significativamente la neovascularización en un modelo de CNV de ratón. Los resultados sugieren que un anticuerpo anti IL-6 puede producir una reducción en la neovascularización al menos tan grande, y posiblemente más grande, que un anticuerpo anti VEGF. Estos datos indican que la inhibición local de IL-6 es útil para el tratamiento de los padecimientos de los ojos tales como enfermedades que involucran derrame vascular, por ejemplo, AMD húmedo o edema macular, por ejemplo, edema macular diabético.

Ejemplo 12. Desarrollo de un anticuerpo IL-6 mejorado.

Se generaron variantes del anticuerpo EBI-029. Para caracterizar mejor la contribución de la mutación A28V, S30P, I51T, y S55G, se introducen combinaciones específicas en el vector de visualización Fab EBI-029 tipo natural y se mide la unión. Los resultados se muestran en la FIGURA 5. Después de una competencia con IL-6 2 μ M durante la noche, todos los mutantes tuvieron niveles significativamente mayores de IL-6 biotinilada remanente en su superficie celular relativa a la visualización al compararse con el Fab EBI.029 tipo natural. El orden de rango de unión del de mayor al de menor afinidad fue A28V/S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > I51T/S55G > wt ("wilt type", tipo natural). La mutación cuádruple A28V/S30P/I51T/S55G también se refiere en el

presente documento como EBI-030.

Secuencias de EBI-030 se muestran a continuación.

Secuencias CDR 030:

CDR1 de 030HC (VH CDR1 030): GYVLPNYLIE (SEQ ID NO:31)

5 CDR2 de 030HC (VH CDR2 030): VTTPGGTIN (SEQ ID NO:32)

CDR3 de 030HC (VH CDR3 030): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO:33)

CDR1 de 030LC (VL CDR1 030): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO:34)

CDR2 de 030LC (VL CDR2 030): AASNRRGS (SEQ ID NO:35)

CDR3 de 030LC (VL CDR3 030): QQSEEVPLT (SEQ ID NO:36)

10 Secuencia de la región variable de la cadena pesada 030
(mutaciones relativas a 029 se muestran en negritas):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV
TTPGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR
WDPLYYYALE YWGQGT^{TV}TV SS (SEQ ID NO:37)

15 Secuencia de la región variable de la cadena ligera 030
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNRGSG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV (SEQ ID
NO:38)

20 Secuencia polipeptídica de la cadena pesada Fab (IgG1)
030 (CDR subrayadas, mutaciones relativas a 029 se muestran
en negritas):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV
TTPGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR
WDPLYYYALE YWGQGT^{TV}TV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL

VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT
QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)

En modalidades, la secuencia DKTHT (SEQ ID NO:30) en el
término carboxílico de SEQ ID NO:39 no está incluida en la
5 secuencia Fab.

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada Fab 030:
CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
CTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCC
CGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCACCATTAATTACGCC
10 CAGAAATTTAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGG
AGCTGTCCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGA
CCCTCTTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCATCT
GCTAGCACAAAAGGACCATCAGTCTTCCCCTTGCTCCTTCATCTAAGAGCACAAAGTGGTG
GCACTGCAGCCCTTGGCTGCCTGGTGAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTG
15 GAACTCCGGTGCACTGACATCCGGAGTACACACTTTCCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGA
CTGTATAGCCTGTCTTCGGTGGTCACTGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATA
TTTGCAACGTCAATCACAAGCCCTCCAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATC
TTGTGACAAAACACACACA (SEQ ID NO:40)

030 puede producirse también como una secuencia
20 polipeptídica de cadena pesada de IgG2 Fab:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVTPGGG
TINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRDPLYYALEYWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERK

(SEQ ID NO:54)

Ejemplo 13. Expresión y purificación de variantes de fragmentos Fab

Los insertos del dominio VH que contiene las siguientes
5 combinaciones de mutantes A28V/I51T/S55G, S30P/I51T/S55G, y
A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030), se generan de vectores de
exposición por levadura mediante doble digestión con BamHI-
HF/NheI-HF. Los insertos se purifican por electroforesis en
gel de agarosa 1% y se ligan en un vector de expresión de
10 mamíferos derivado de pTT5 que contiene una secuencia líder,
un dominio IgG1 CH1 humano, una marca de His en el extremo
carboxilo terminal. Los transformantes se seleccionan en LB-
Amp, se extrae el ADN del vector, y los insertos se confirman
mediante secuenciación. Las transfecciones transitorias se
15 llevan a cabo en células HEK-6E (Canadian Research Council)
para cada cadena pesada Fab mutante apareada con la cadena
ligera del Fab EBI-029 tipo natural (descrita en el presente
documento como SEQ ID NO:12) utilizando PEI como reactivo de
transfección. El Fab EBI-029 tipo natural también se expresa
20 como un control (la cadena pesada del Fab tipo natural se
describe en el presente documento como SEQ ID NO:24). Los
sobrenadantes se aíslan después de 5 días y los Fab
expresados se purifican por cromatografía de afinidad
utilizando agarosa Ni-NTA (Life Technologies). La proteína

purificada se intercambia con el amortiguador en PBS, pH7.4 por diferentes rondas de concentración/dilución y la concentración de la proteína y pureza se determinan mediante absorbancia 280 y SDS-PAGE.

5 **Ejemplo 14: Anticuerpos variantes muestran una unión mejorada según lo evaluado utilizando resonancia de plasmones de superficie**

Las afinidades de las moléculas Fab 029 variantes para IL-6 se miden por Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR, *por*
 10 *sus siglas en inglés*) en un Espectrómetro Reichert SR7000Dc. Se inmoviliza IL-6 humana a 20 µg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 4.5 en un chip de carboximetildextrano 500 kDa por acoplamiento de amina estándar. Se inyectan diluciones
 15 seriales de cada molécula de Fab en 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.3 a 25°C con una velocidad de flujo de 25 µL/min. Después de 4 minutos, la carga se detiene y se mide la
 disociación por amortiguador de flujo corriente (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.3) durante 5 min. Las trazas del sensograma
 se ajustan mal a un modelo de unión 1:1, potencialmente
 20 debido a la mezcla de orientaciones de IL-6 en el chip o a una unión no específica del anticuerpo. En cambio, las curvas se ajustan a 2 especies (especies de baja y alta afinidad, marcadas "baja afinidad" y "alta afinidad" en la tabla 3) utilizando el software TraceDrawer en donde k_{a1} , k_{d1} , y $KD1$

son la velocidad de asociación, velocidad de disociación, y constante de unión en equilibrio para especies de baja afinidad, y ka_2 , kd_2 , y KD_2 son las constantes de velocidad de asociación, velocidad de disociación, y constante de unión en equilibrio para especies de alta afinidad. Todos los Fab mutantes tuvieron una menor disociación al compararse con el Fab EBI-029 de tipo natural, con el orden presentado a continuación, que muestra de la más alta a la más baja afinidad - A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > Tipo natural (EBI-029).

Tabla 3. Resultados del SPR para anticuerpos mutantes

Fab	ka_1 (*e ⁴)	ka_1 (*e ⁻⁴)	ka_1 (nM)	ka_1 (*e ⁵)	ka_1 (*e ⁻⁴)	ka_1 (nM)
Tipo natural	5.48	6.08	11.1	2.94	4.27	1.45
A28V/I51T/S55G	8.06	2.91	3.6	3.65	1.45	0.40
S30P/I51T/S55G	7.18	2.18	3.04	3.29	0.95	0.29
A28V/S30P/I51T/S55G	7.95	2.70	3.39	3.25	0.66	0.20

Baja afinidad
Alta afinidad

Ejemplo 15: Anticuerpos variantes muestran mejoría en la potencia de antagonismo en células reporteras IL-6 HEK-Blue™

La línea celular reportera IL-6 HEK-Blue™ (Invivogen) se utiliza para comparar la potencia de la inhibición de la señalización entre los diferentes fragmentos Fab EBI-029 mutantes. Las células IL-6 HEK-Blue™ son una línea HEK293

modificada que expresa de manera estable el gen IL-6R y contiene un gen reportero secretor de la fosfatasa alcalina bajo el control del promotor mínimo de IFN β fusionado a cuatro sitios de unión STAT3. Para medir el antagonismo de IL-6, 10 μ L de IL-6 humana 400 pM (R&D Systems 206-IL-010/CF) se mezclan con 10 μ L de cada variante de Fab a un rango de concentración en una placa de 96 pocillos y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células IL-6 HEK-Blue™ en fase logarítmica se tripsinizan y se resuspenden en medio de ensayo (DMEM, glucosa 4.5g/L, 10% de FBS inactivado por calor, L-glutamina 2mM, Pen-Step) a 280,000 células/mL, 180 μ L de la suspensión celular se añade a cada pocillo de las mezclas de IL-6/Fab para llevar a la concentración final de IL-6 a 20 pM. Las células se incuban a 37°C/5% CO₂ durante 20 horas. Después, se mezclan 20 μ L del sobrenadante de cada pocillo con 180 μ L de reactivo Quanti-Blue™ (Invivogen) y se incuban a 37°C durante 40 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nm en un lector de placas SpectraMax M5. La señal de los pocillos sin IL-6 se sustrajo y luego se divide por las células tratadas sin inhibidor para derivar el valor de señalización fraccional. Todos los mutantes muestran potencia significativamente mayor comparada con Fab EBI-029 de tipo natural con el orden de rango de potencia antagónica como sigue: A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030)

> A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > Tipo natural (EBI-029).

Estos resultados se muestran en la FIGURA 6.

Ejemplo 16: Anticuerpos variantes muestran potencia antagónica mejorada en un ensayo de proliferación T1165

5 Las células T1165.85.2.1 (R&D Systems) son una línea celular de plasmocitoma murino que prolifera en respuesta a IL-6 de ratón, rata o humano. Para medir el antagonismo de los mutantes Fab EBI-029, se mezclan 25 µL de 2 ng/mL de IL-6 humana (R&D Systems 206-IL-010/CF) con 25 µL de cada variante
10 de Fab a un rango de concentraciones en una placa de 96 pocillos y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células T1165 en fase logarítmica se concentran en el fondo y se resuspenden en medio de ensayo (90% RPMI 1640, FBS 10%, L-glutamina 2 mM, Pen-Strep) a 2x10⁵
15 células/mL. Se añaden 50 µL de la suspensión celular a cada pocillo de las mezclas IL-6/Fab para llevar a la concentración final de IL-6 de 0.5 ng/mL. Las células se incuban a 37°C/5% CO₂ durante 72 horas. 100 µL del reactivo Cell-Titer Glo® (Promega) se añade a cada pocillo y se incuba a temperatura
20 ambiente durante 10 minutos. La luminiscencia se mida en un lector de placas SpectraMax M5. Todos los mutantes muestran potencia significativamente mayor comparada con Fab EPI-029 wt con la señalización no medible de IL-6 en el rango de las concentraciones de Fab probadas (ver FIGURA 7).

Ejemplo 17: Comparación de las propiedades similares a fármacos de anticuerpos variantes

La estabilidad térmica de cada variante de Fab se determinó mediante fluorometría diferencial de barrido (DSF, por sus siglas en inglés). Se mezclan 2 μ L de proteína a 2.5 o 5 mg/mL con 18 μ L PBS y 2 μ L de 50x Sypro Orange en una placa de PCR BioRad de 96 pocillos. La placa se corre en un Sistema BioRad CFX96 RT-PCR con una temperatura lineal que incrementa de 25°C a 95°C y se mide la fluorescencia a través del tiempo. La T_m se calcula como el punto más bajo de la primer derivada de la curva de fusión. Todas las variantes han medido los valores de T_m entre 76 y 78°C, consistente con la medida de T_m del Fab EBI-029 a 76°C.

Para medir la agregación, las muestras se evalúan por SEC-MALS utilizando un HPLC Agilent 1260 combinado con un instrumento de dispersión de luz Wyatt miniDawn TREOS y un instrumento de índice de refracción Wyatt Optilab rEX. Se inyectan de 20-100 μ g de proteína y se corre a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Todas las variantes tienen pesos moleculares entre 45000 y 52000 Da según lo medido por dispersión de luz, consistente con el Fab EBI-029 de tipo natural.

Estos resultados indican que EBI-030 se comporta de manera similar al compararse con EBI-029 en términos de sus

propiedades similares a fármaco.

Ejemplo 18: Producción de EBI-029 completo y anticuerpos IgG2

EBI-030 y anticuerpos IgG2 con dominios Fc mutantes.

Reformateo de EBI-029 y EBI-030 a IgG2 y al mutante FcIgG2

5 Los dominios variables de la cadena pesada de EBI-029 y EBI-030 que incluyen la secuencia líder (MDWTWRILFLVAAATGAHS; SEQ ID NO:49) se amplifican por PCR de los vectores Fab utilizando cebadores que introducen un sitio EcoR1 en el extremo amino terminal y un sitio NheI en el extremo

10 carboxilo terminal. Los productos de PCR se purifican en gel de agarosa al 1% y se digieren por duplicado con EcoRI-HF y NheI-HF. Los vectores de la cadena principal basados en pTT5 que contienen la secuencia de la cadena pesada IgG2 tipo natural o un dominio IgG2 variante con una mutación H311A

15 (H311 corresponde a la numeración en SEQ ID NO:41; esto corresponde a H310 en la numeración proporcionada en Martin et al., Molecular Cell, 7:4, 867-877 (2001)) se digieren de manera similar EcoRI-FH/NheI-HF y se purifican en un gel de agarosa al 1%. Los insertos se ligan en una cadena principal

20 digerida utilizando la enzima Quikligase (New England Biolabs), se transforman en células TOP 10 (Life Technologies), y se seleccionan en LB-Amp. Se extrae el ADN de los vectores de las clonas y se secuencian para confirmar el inserto. La mutación H311A se selecciona para reducir la

afinidad de unión a Fc por FcRn al fin de que se reduzca la acumulación sistémica de moléculas que escapan del tejido ocular.

Expresión y purificación de variantes IgG2 por transfección

transitoria

EBI-029 IgG2, EBI-029 IgG2-H311A, EBI-030 IgG2, y EBI-030 IgG2-H311A se expresan por transfección transitoria en células HEK. Los vectores pTT5 que contienen cada cadena pesada se cotransfectan con el plásmido EBI-029 LC utilizando
10 PEI como un reactivo de transfección.

Los sobrenadantes se aíslan después de 5 días y las moléculas IgG2 se purifican por cromatografía de afinidad utilizando agarosa Proteína A. La proteína purificada se cambia de amortiguador en PBS, pH 7.4 por diferentes rondas
15 de concentración/dilución y la concentración de proteína y la pureza se determina por Absorbancia 280 y SDS-PAGE.

Producción de un acumulado estable de CHO

Los acumulados de CHO estable que producen EBI-029 IgG2, EBI-030 IgG2, o EBI-030 IgG2-H311A se generan utilizando el kit
20 Freedom CHO-S (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En breve, cada cadena pesada se clona por digestión/ligadura estándar en el vector pCHO1.0 en combinación con el EBI-029 LC. Las construcciones se transfectan en células CHO-S utilizando el reactivo Freestyle

MAZ y se seleccionan los acumulados estables con un incremento de concentración de Puromicina y MTX. Después de dos rondas de selección, los acumulados se examinan para la producción de anticuerpos por cromatografía analítica de Proteína A y los mayores productores se seleccionan para escalar y subclonar.

Las secuencias de presentan a continuación.

Secuencia polipeptídica de cadena pesada 030 (en el armazón IgG2, CDR subrayadas):

```

10  QVQLVQSGAE   VKKPGSSVKV   SCKASGYVLP   NYLIEWVRQA   PGQGLEWMGV
    TTPGGGTINY   AQKFQGRVTI   TADESTSTAY   MELSSLRSED   TAVYYCARSR
    WDPLYYYALE   YWGQGTITVTV   SSASTKGPSV   FPLAPCSRST   SESTAALGCL
    VKDYFPEPVT   VSWNSGALTS   GVHTFPAVLQ   SSGLYSLSSV   VTPVSSNFGT
    QTYTCNVDHK   PSNTKVDKTV   ERKCCVECPP   CPAPPVAGPS   VFLFPPKPKD
15  TLMISRTPEV   TCVVVDVSHE   DPEVQFNWYV   DGVEVHNAKT   KPREEQFNST
    FRVVSVLTVV   HQDWLNGKEY   KCKVSNKGLP   APIEKTISKT   KGQPREPQVY
    TLPPSREEMT   KNQVSLTCLV   KGFYPSDIAV   EWESNGQPEN   NYKTTTPMLD
    SDGSFFLYSK   LTVDKSRWQQ   GNVFSCSVMH   EALHNHYTQK   SLSLSPGK (SEQ ID
    NO:41)

```

20 Secuencia polipeptídica de cadena ligera 030 (en el armazón IgG2, CDR subrayadas):

```

    DIVMTQSPDS   LAVSLGERAT   INCRASESVD   NYGIPFMNWY   QQKPGQPPKL
    LIYAASNRGS   GVPDRFSGSG   SGTDFTLTIS   SLQAEDVAVY   YCQQSEEVPL
    TFGQGTKLEI   KRTVAAPSVF   IFPPSDEQLK   SGTASVVCLL   NNFYPREAKV

```

QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLs STLTLsKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:42)

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
5 CTTGTAAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCC
CGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCACCATTAATTACGCC
CAGAAATTTcAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGG
AGCTGTCCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGA
CCCTCTTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCATCT
10 GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGA
GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG
GAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACA
CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATG
15 TTGTGTCGAGTGCCCAACCGTGCCCAAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGG
TGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
20 ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTcAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC

GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
AA SEQ ID NO:43

Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera 030:

GACATAGTGATGACTCAAAGTCCGGACAGCCTGGCGGTGTCACTCGGCGAACGGGCAACTA
5 TCAACTGCCGAGCCAGCGAGAGCGTCGATAATTACGGCATCCCCTTCATGAACTGGTATCA
GCAGAAGCCAGGACAGCCGCCAAGCTGCTTATCTACGCCGCTTCCAACCGGGGATCAGGG
GTGCCCCGATCGATTTAGTGGAAGCGGTAGTGGGACCGATTTACACTGACCATCAGCTCCC
TTCAGGCCGAGGATGTGGCTGTCTATTATTGTCAGCAATCCGAGGAAGTGCCGCTCACGTT
TGGTCAGGGAACCAAACCTGGAGATCAAGCGGACCGTAGCGGCGCCTAGTGTCTTCATCTTC
10 CCACCCTCCGACGAACAGCTGAAGTCTGGCACTGCTTCCGTCGTGTGCCTGCTCAACAACT
TTTACCCTAGAGAGGCAAAAGTTCAATGGAAAGTAGACAATGCCTTGCAGTCCGGGAACTC
CCAGGAGTCTGTACAGAGCAGGATAGTAAGGACTCAACCTACAGCCTGTCCAGCACACTG
ACCCTCTCCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCTTGCGAAGTTACGCATCAGG
GGCTGTCCTCACCCGTTACAAAAAGTTTTAACAGAGGGGAGTGC SEQ ID NO:44

15 Secuencia polipeptídica de la cadena pesada con la
mutación H311A (311A está en negritas y las CDR están
subrayadas), también se refiere en el presente documento como
la secuencia polipeptídica de la cadena pesada **031**:

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKAS <u>GYVLP</u>	<u>NYLIEWVRQA</u>	PGQGLEWMGV
20 <u>TPGGGTINY</u>	AQKFQGRVTI	TADESTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARS <u>R</u>
<u>WDPLYYYALE</u>	YWGQGTITVTV	SSASTKGPSV	FPLAPCSRST	SESTAALGCL
VKDYFPEPVT	VSWNSGALTS	GVHTFPAVLQ	SSGLYSLSV	VTVPSSNFGT
QTYTCNVDPHK	PSNTKVDKTV	ERKCCVECPP	CPAPPVAGPS	VFLFPPKPKD
TLNISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVQFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQFNST

FRVVSVLTVV **A**QDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID
 NO:47)

5 Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada 031:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAAGGTAT
 CTTGTAAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAAACTACCTGATCGAATGGGTGAGGCAGGCTCC
 CGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCACCATTAATTACGCC
 CAGAAATTTTCAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCCACCAGTACTGCCTACATGG
 10 AGCTGTCCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTACTACTGCGCCCGGAGTCGATGGGA
 CCCTCTTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGCCAGGGAACGACCGTTACAGTGTCATCT
 GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGA
 GCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG
 GAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA
 15 CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACA
 CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATG
 TTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGG
 TGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT
 20 GCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGC
 GTCCTCACCGTCGTGGCCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA
 ACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGA
 ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC

AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
 CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
 GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA
 AA (SEQ ID NO:48)

5 **Ejemplo 19: Comparación de la potencia de IgG2 EBI-030 vs**
EBI-029 en el ensayo IL6 HEK-Blue

La célula reportera de IL6 HEK-Blue™ (Invivogen) se utiliza para comparar la potencia de la inhibición de la señalización de IL6 entre los anticuerpos IgG2 EBI-029 y EBI-030. Tres
 10 proteínas preparadas purificadas de las células HEK-6E se comparan con IgG2 EBI-029, IgG2 EBI-030, e IgG2 EBI-030 H311A (también denominada 031 o EBI-031), junto con una preparación de IgG2 EBI-030 producida en un acumulado CHO estable. Adicionalmente, Tocilizumab, un anticuerpo anti IL6R
 15 aprobado, se incluye como control. Para medir el antagonismo de IL6, se mezcla IL-6 humana (R&D Systems 206-IL-010/CF) 400 pM con concentraciones variadas de cada anticuerpo en una placa de 96 pocillos y se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células IL6 HEK-Blue™ en fase
 20 logarítmica se tripsinizan y se resuspenden en medio de ensayo (DMEM, glucosa 4.5 g/L, FBS inactivado por calor 10%, L-glutamina 2 mM, Pen-Step) a 280000 células/mL. Se añaden 180 µL de la suspensión celular a cada pocillo de las mezclas de IL-6/Fab para llevar a una concentración final de IL-6 de

20 pM. Las células se incuban a 37°C/5% CO₂ durante 20 horas. Se mezclan 20 µL del sobrenadante de cada pocillo con 180 µL del reactivo Quanti-Blue™(Invivogen) y se incuba a 37°C durante 40 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nm en un lector de placa SpectraMax M5.

Los resultados se muestran en la FIGURA 8 y en la Tabla 5. EBI-030 (incluyendo EBI-030 producida en células HEK con o sin la mutación H311A y EBI-030 producida en células CHO) muestra una potencia mejorada considerablemente (alrededor de una disminución de 50 veces en IC₅₀ y disminución de >100 veces en IC₉₀) al compararse con EBI-029. El incremento en potencia es mayor que el incremento en la medida de afinidad por SPR.

Tabla 5: Valores de IC₅₀ e IC₉₀

	IC ₅₀ (pM)	IC ₉₀ (pM)
EBI-029	47	4350
EBI-030	0.9	1.1
EBI-030 CHO	1.4	11
EBI-030-H311A	0.6	12.4
Tocilizumab	1490	23700

EBI-030 (también aquí denominado como IgG2 EBI-030-H311A) tiene un IC₅₀ de más de 75 veces menor que el de EBI-029 y un IC₉₀ alrededor de 350 veces menor que el de EBI-029. EBI-030 producido en células HEK tiene un IC₅₀ mayor a 50 veces menos que el de EBI-029 y un IC₉₀ aproximadamente 4000

veces menor que el de EBI-029.

Ejemplo 20: Análisis de modelos de mayor potencia en la duración del bloqueo de IL-6 vitreal

El efecto de una mayor potencia en la extensión y duración
 5 del bloqueo de IL-6 seguido de la administración intravítrea
 se simula utilizando un modelo farmacocinético (FIGURA 9).
 Las ecuaciones diferenciales que describen cambios en
 anticuerpos libres (A), IL-6 libre (IL), y el complejo
 anticuerpo/IL-6 se definen como sigue:

$$10 \quad d/dt(A) = -A \cdot k_{ae} - A \cdot IL \cdot k_1 + AIL \cdot k_2$$

$$d/dt(IL) = k_{pi} - IL \cdot k_{ie} - A \cdot IL \cdot k_1 + AIL \cdot k_2$$

$$d/dt(AIL) = -AIL \cdot k_{aie} + A \cdot IL \cdot k_1 - AIL \cdot k_2$$

donde K_{ae} es la velocidad de aclaramiento del anticuerpo
 del cuerpo vítreo, k_1 es la velocidad de asociación para la
 15 unión anticuerpo/IL-6, k_2 es la velocidad de disociación para
 el complejo anticuerpo/IL6, k_{pi} es la velocidad de producción
 de IL-6, k_{ie} es la velocidad del aclaramiento de IL-6 libre
 del cuerpo vítreo, y k_{aie} es la velocidad de aclaramiento del
 complejo anticuerpo/IL-6 del vítreo. Los valores de los
 20 parámetros y las velocidades iniciales se definen como se
 muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de los parámetros y velocidades iniciales

Parámetros	Valor
Concentración inicial del anticuerpo - A_0	3000 nM

Concentración inicial de IL-6 - IL_0	0.01 nM
Concentración inicial del complejo - AIL_0	0
Velocidad de asociación - k_1	$8.64 \text{ nM}^{-1}\text{d}^{-1}$
Velocidad de disociación- k_2	Variando entre 0.0086 d^{-1} y 0.86 d^{-1}
Velocidad de aclaramiento del anticuerpo - k_{ae}	0.037 d^{-1}
Velocidad de aclaramiento de IL6 - k_{ie}	0.69 d^{-1}
Velocidad de producción de IL6 - k_{pi}	0.0069 nM d^{-1}
Velocidad de aclaramiento del complejo - k_{aie}	0.037 d^{-1}

A_0 se calcula basándose en el supuesto de una dosis de 50 μL de 50 mg/mL de un anticuerpo en un ojo humano con un volumen vítreo de 5 mL. IL_0 se estima basándose en los valores medidos clínicamente para IL-6 vítrea en pacientes DME de $\sim 200 \text{ pg/mL}$. k_1 se estima basándose en velocidades de asociación de anticuerpos típicos de $1\text{E}5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, mientras que k_2 se varía para estimular los valores de potencia variando desde 100 pM a 1 pM. k_{ae} se deriva de la medida de los tiempos de vida media del aclaramiento vítreo en conejo de ~ 11 días escalado por 1.8 como se midió previamente para la PK humana. k_{ie} se estima como la vida media de aclaramiento de 24 horas, y k_{pi} se calcula como $IL_0 \cdot k_{ie}$.

Se llevan a cabo simulaciones de anticuerpo libre e IL-6 libre utilizando el software Berkeley Madonna durante un

curso temporal de 300 días (FIGURA 10). Un corte del bloqueo del IL-6 al 95% se selecciona para medir la duración de la inhibición. El modelo predice que el incremento de la potencia del anticuerpo extiende significativamente la duración de la inhibición en el ojo de 130 días para $k_2/k_1 = 100$ pM a 200 días para $k_2/k_1 = 10$ pM a 225 días para $k_2/k_1 = 1$ pM.

Ejemplo 21: Farmacocinética de IL-6a

Los experimentos de farmacocinética (PK) se llevan a cabo en conejos blancos de Nueva Zelanda machos por PharmOptima (Portage, MI). Todos los animales tienen entre 12-13 meses de edad y pesan 2.61-3.42 kg. Se comparan las proteínas mencionadas a continuación - EBI-029-IgG2 (SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12), EBI-029-IgG2-H311A (SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:12), EBI-030 (SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42), EBI-030-IgG2-H311A (SEQ ID NO:47 y SEQ ID NO:42), EBI-029 Fab (SEQ ID NO:24 y SEQ ID NO:12), Eylea® (trampa VEGF), y Tocilizumab (TCZ; anticuerpo anti IL6R). Todas las proteínas se formulan a 13.8 mg/mL en PBS, pH 7.4. EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, EBI-029 Fab, y Tocilizumab no se unen a sus antígenos blancos en el conejo, mientras que Eylea® no se une a VEGF de conejo.

Para la investigación de PK intravítrea, se inyectan 9 animales con 50 μ L del artículo de prueba en cada ojo. Antes

de la inyección, se aplica clorhidrato de Lidocaína (inyectable al 2%), Proparacaína al 0.5%, o Tetracaína al 0.5% en la superficie ocular. Las inyecciones se llevaron a cabo en la mitad del cuerpo vítreo con una jeringa de 5 insulina BD de 300 μ L (aguja de 31G x 0.793 cm (5/16 pulgadas)) insertada a través del cuadrante dorsotemporal del ojo. Para la investigación de la PK sistémica, se inyectan 3 animales con 100 μ L del artículo de prueba a través de la vena del oído.

10 Se recolectan muestras de sangre seriadas de 3 animales en los grupos de IVT e iv a 0.083, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240, y 336 horas y se diluye 1:1 con una solución de Citrato-Fosfato-Dextrosa y se coloca en hielo. El plasma se aísla mediante centrifugación de las muestras de sangre frías a 15 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se almacenan en un congelador a -80°C.

El tejido ocular se aísla de ambos ojos de todos los animales en el grupo IVT a 0.25, 24, 168, y 336 horas posterior a la dosis. Los animales son sacrificados mediante 20 sobredosis de barbiturato intravenoso. Para aislar el humor acuoso, inmediatamente después de la eutanasia, se inserta una jeringa con aguja bajo la córnea y el humor acuoso se drena lentamente. El humor acuoso se transfiere a un tubo previamente etiquetado, y se coloca en hielo seco o

congelador a -80°C .

Para aislar la retina y corioidea, se introduce un pequeño seccionador con un escalpelo en la esclerótica de ojo enucleado, paralelo y caudal con el limbo. Se utiliza tijera
5 para continuar con la apertura alrededor del globo ocular, separándolo en dos mitades. El globo ocular posterior se posiciona de modo que el interior mire hacia arriba. Utilizando un cuchillo, la retina se recolecta cuidadosamente del globo ocular. Una vez que la retina se recolecta del
10 globo ocular, la corioidea se colecta en una manera similar del globo ocular remanente. Ambas muestras, separadamente, se transfieren a tubos Precellys® previamente pesados y previamente etiquetados, y se colocan en hielo seco o congelador a -80°C . El tejido de la retina y corioidea se
15 diluyen 10 veces en amortiguador de fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) se homogeniza y se almacena a -80°C .

Las concentraciones de proteína en cada tejido se evalúan por ELISA. Para EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A, y EBI-029 Fab, se recubren
20 placas Costar a mitad de volumen con $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ de IL-6 humana en PBS por 1 hora a RT. Los pocillos se bloquean con PBS que contienen BSA al 2%, se lavan, y posteriormente se incuban con un rango de diluciones para cada muestra utilizando PBS + plasma de conejo al 5% + Tween 20 al 0.05% como diluyente. Se

incluyó una curva estándar utilizando proteína purificada en cada placa. Las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 60 minutos, después se lavan tres veces con 300 µL de PBS que contiene Tween 20 al 0.05%. Posteriormente, se añade
5 HRP anti kappa (Genway Inc.) diluido 1:10,000 en PBS, BSA al 1%, Tween 20 al 0.05% a cada pocillo y se incuba durante 30 minutos. Los pocillos se lavan como se indicó anteriormente, después se añade 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se mide la señal a 450 y 550 nm en un lector de placa
10 Spectramax. Las concentraciones de proteínas se calculan basándose en la curva estándar utilizando el software Softmax Pro 6. Cada ELISA se repite al menos en 3 placas independientes y se reporta el promedio de vida media.

Para tocilizumab, las concentraciones de proteína se
15 determinan por ELISA como anteriormente excepto que el Fab anti Tocilizumab (BioRad HCA252) se usa como el reactivo de captura y un HRP-Fc-IgG anti humano (Sigma A0170) se usa como el anticuerpo de detección. Dos ensayos de ELISA diferentes se usan para medir Eylea® libre y total. Para Eylea® libre,
20 los pocillos se recubren con VEGF recombinante (R&D Systems) y la proteína unida se detecta con un HRP-Fc-IgG anti humano (Sigma A0170). Para medir Eylea® total, un anticuerpo Fc anti humano (Sigma I2136) se utiliza para captura y un HRP-CH2-IgG anti humano (BioRad MCA647P) se utiliza para detección. Cada

ELISA se repite en al menos tres placas independientes y se reporta el promedio de la vida.

Resumen de resultados

En la mayoría de los animales, la formación robusta de anticuerpos contra la proteína inyectada se observa a los 5 tiempos 240 y 360 horas. Debido a que esta formación de anticuerpos puede afectar el aclaramiento de la proteína o interferir con el ELISA, los datos del análisis se limitan a los tiempos mencionados e incluye las 168 horas. Para PK 10 intravítrea, todas las proteínas IgG2 EBI-029 y EBI-030 se aclaran significativamente más lento ($T_{1/2}$ = 9.3, 9.0, 15.7, y 9.8 días para EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030, y EBI-030-H311A, respectivamente) al compararse con Eylea® ($T_{1/2}$ = 6.3 días), Tocilizumab ($T_{1/2}$ = 4.8 días), o con el fragmento EBI- 15 029 Fab ($T_{1/2}$ = 3.9 días) (FIGURA 11, Tabla 7). Se observan tendencias similares en la retina, coroides, y en el humor acuoso donde EBI-030 y EBI-030-H311A se acumulan a niveles más altos al compararse con Eylea® y Tocilizumab (ver FIGURA 12 y FIGURA 13). Todas las proteínas son detectables en el 20 plasma después de la administración IVT con EBI-029, EBI-030, y Tocilizumab acumulando niveles mayores significativamente que Eylea® o EBI-030-H311A (ver FIGURA 14). De manera similar, Eylea® y EBI-030-H311A se aclararon más rápidamente del plasma después de la administración IV, con la vida media

de EBI-030-H311A es aproximadamente la mitad de IgG2 tipo natural debido a la reducción de la unión de FcRn (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados Farmacocinéticos

PK Vítreo	
Molécula	T _{1/2} (días)
EBI-029	9.3
EBI-029-H311A	9.0
EBI-030	15.7
EBI-030-H311A	9.8
EBI-029 Fab	3.9
Eylea®	6.1 (libre), 6.3 (total)
Tocilizumab	4.8
PK sistémica después de la administración IV	
Molécula	T _{1/2β} (horas)
EBI-029	77
EBI-030	69
EBI-030-H311A	33
Eylea®	37 (libre), 42 (total)
TCZ	50

Ejemplo 22: Solubilidad de EBI-031 a altas concentraciones

Se concentró EBI-031 purificado de 3 mg/mL a 142 mg/mL en PBS, pH 7.4 utilizando un concentrador de giro Amicon Ultra-15. Las preparaciones anterior y posterior a la concentración se evalúan para agregación mediante el corrimiento en una columna Tosoh G3000SWXL 7.8x30 SEC combinada con un instrumento de dispersión de luz Wyatt miniDawn TREOS y un

instrumento de índice de refracción. Se inyectan 20 µg de proteína y corren a una velocidad de flujo de 1mL/min en PBS. La fracción de masa para el pico al peso molecular esperado de ~150 kDa es aproximadamente igual para las dos concentraciones ((90.9% para la preparación de 3 mg/mL y 91.3% para la preparación de 142 mg/mL) indicando que no hay aumento significativo en la agregación de las proteínas durante la concentración. Estos resultados demuestran que EBI-031 puede concentrarse a más de 142 mg/mL con una agregación medible pequeña (<10% de agregación).

Ejemplo 23: EBI- 031 bloquea la señalización en cis y trans de IL6

La línea celular reportera IL6 HEK-Blue™ (Invivogen) se utiliza para comparar la potencia de EBI-031 y tocilizumab para bloquear la señalización IL6 en cis y trans. Para la señalización cis, la IL-6 libre (concentración final= 20 pM) se mezcla con EBI-031 o tocilizumab a un rango de concentraciones en una placa de 96 pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células IL6 HEK-Blue™ en fase logarítmica se tripsinizan y resuspenden en medio de ensayo (DMEM, glucosa 4.5g/L, 10% de FBS inactivado por calor, L-glutamina 2mM, Pen-Step), y 50,000 células se añaden a cada pocillo en un volumen final de 200 µL. Los pocillos se incuban a 37°C/5% CO₂ durante 20 horas. Se

mezclan 50 μ L del sobrenadante de cada pocillo con 150 μ L de reactivo Quanti-Blue™ (Invivogen) y se incuba a 37°C durante 40 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nm en un lector de placas SpectraMax M5. La señal de fondo de los pocillos sin IL-6 se sustrae y después se divide entre las células tratadas con IL-6 sin inhibidor para derivar un valor de señalización fraccional. EBI-031 (IC₅₀ = 14.2 pM) bloquea la IL-6 libre con potencia >900 veces mayor comparada con tocilizumab (IC₅₀ = 12.9 nM) (FIGURA 16A).

Para medir el bloqueo de señalización en trans, los experimentos se llevan a cabo como anteriormente excepto que utilizan hiper IL-6 a una concentración final de 200 pM en lugar de IL-6 libre. La hiper IL-6 es una fusión genética entre IL-6 y el receptor IL-6 soluble (Fischer et al., Nature Biotechnology 15:142-145 (1997)). EBI-031 bloquea la hiper IL-6 de manera potente (IC₅₀ = 32 pM), mientras tocilizumab es incapaz de inhibir significativamente la señalización fuera de una concentración de 1 μ M. (FIGURA 16B).

Estos resultados muestran que EBI-031 se une a IL-6 humana en el sitio II, o el sitio que contacta gp130, con afinidad a nivel pM y bloquea la señalización de IL-6 y el complejo IL-6/sIL-6R α en ensayos celulares potencialmente >900 veces más que tocilizumab.

Ejemplo 24: Simulación computacional para la supresión EBI-031 intravítrea de la señalización de IL-6

Las simulaciones computacionales se llevan a cabo como se describen en el Ejemplo 20 para predecir el largo de tiempo de que la administración intravítrea de EBI-031 en humanos debe suprimir el 95% de la señalización de IL-6. k_2 se configura a 0.12 d^{-1} de manera que $k_2/k_1 = 14 \text{ pM}$, tal como se mide en el ensayo de potencia. La $T_{1/2}$ del aclaramiento se configura a 18 días basándose en las mediciones del tiempo de vida media de aclaramiento intravítrea en Conejos escalado por 1.8 en humanos. Todos los otros parámetros se describen en la Tabla 6. El modelo predice que EBI-031 debe bloquear el 95% de la señalización de IL-6 durante ~150 días después de la administración (FIGURA 17). Estos resultados del modelo indican que EBI-031 puede bloquear sustancialmente la señalización de IL-6 en el ojo por un largo periodo de tiempo, por ejemplo, arriba de 6 meses.

Ejemplo 25: Caracterización de Isoformas de EBI-031

EBI-031 es un anticuerpo IgG2. Como se discute previamente, los anticuerpos IgG2 existen en tres diferentes isoformas estructurales, IgG2-A, IgG2-B, e IgG2-A/B (FIGURA 18). En este ejemplo, los experimentos se llevaron a cabo para identificar las isoformas estructurales en muestras de EBI-031.

Análisis RP-HPLC.

La cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC, *por sus siglas en inglés*) se usa para resolver las isoformas estructurales de EBI-031. Un método analítico mejorado de RP-HPLC que ha sido utilizado previamente para resolver isoformas estructurales de IgG2 mediadas por disulfuro (véase, Dillon et al., *Journal of Chromatography A*, 2006, 1120:112-120) se optimiza para resolver EBI-031.

Las muestras de EBI-031 que contienen aproximadamente 30 µg se cargan en una columna Zorbax 300SB-C8 (150 mm x 2.1 mm, 5.0 µm, 300 Å). La temperatura de la columna se configura a 75°C. La fase móvil A es agua que contiene TFA al 0.1%, y la fase móvil B es IPA 55%, CAN, agua al 4.9% y TFA al 0.1%. La velocidad de flujo es 0.5 mL/min. La columna se equilibra inicialmente con 90% de fase móvil A y 10% de fase móvil B por 2 minutos seguido de 2 min de gradiente de paso de 10 a 25% B. La elución se alcanza con un gradiente lineal de 25-32% B durante 21 min. La absorbancia UV se monitorea a 214 nm y/o 280 nm.

A fin de determinar si la resolución se relaciona con disulfuro, las muestras se tratan con DTT 5 mM y cisteína 10 mM a temperatura ambiente durante 2 min y después se analizan con el método de RP-HPLC (FIGURA 19). El tratamiento

con DTT, el cual es un potente agente reductor, causa la reducción del anticuerpo IgG2, resultando en la elución en pico tempranos (Pico 0 y Pico 1) (FIGURA 19, panel de en medio). El tratamiento con cisteína, el cual es un agente reductor medio al compararse con DTT, cambia la distribución de la isoforma a través de los picos tempranos (Pico 0 y Pico 1), aunque no hasta el punto visto con la muestra tratado con DTT (FIGURA 19, panel del fondo).

Los datos demuestran que el método de RP-HPLC resuelve las isoformas estructurales con diferente conectividad de disulfuro. Las diferentes estructuras unidas al disulfuro se confirman con un mapeo de péptidos no reducidos y análisis de espectrometría de masas: el pico de elución temprano (Pico 1) contiene la isoforma IgG2-A/B y el pico de elución tardío (Pico 2) contiene la isoforma IgG2-A. De manera importante, no hay isoforma IgG2-B (Pico 0) detectada en la muestra EBI-031 (FIGURA 19, panel superior).

Comparación de diferentes muestras de EBI-031

Utilizando el análisis RP-HPLC descrito arriba, las muestras EBI-031 recolectadas de diferentes líneas celulares que expresan EBI-031 se analizan para comparar la distribución de la isoforma de los anticuerpos producidos. Las muestras EBI-031 se recolectan de un cultivo de escala de 200 L de una línea celular clonal, un cultivo de escala de 10 L de una

línea celular precursor, y un acumulado de células tranfectadas estable. EBI-031 se purifica utilizando un método cromatográfico de tres pasos de la línea celular que expresan EBI-031 clonal y precursor. EBI-031 se purifica de un acumulado de células transfectadas estables utilizando purificación con Proteína A. Las muestras se analizan por métodos descritos arriba.

Los resultados mostrados en la FIGURA 20 muestran que las tres muestras de EBI-031 contienen las isoformas IgG2-A e IgG2-A/B, pero no una cantidad sustancial de IgG2-B. Estos datos demuestran que el anticuerpo IgG2 EBI-031 se produce en una mezcla menos heterogénea que otros anticuerpos IgG2, si la producción es de una línea celular clonal que expresa EBI-031, una línea celular precursor que expresa EBI-031, o de una población celular heterogénea que expresa de manera estable EBI-031. La FIGURA 21 muestra la distribución de las isoformas de la muestra de EBI-031 del cultivo de escala 200 L de una línea celular clona que expresa EBI-031, por ejemplo, el panel superior de la FIGURA 20. Las áreas bajo las curvas se miden también, y la distribución entre las isoformas se muestran en la tabla bajo la FIGURA.

Ejemplo 26. Farmacocinética en estudios de primates

La farmacocinética de EBI-031 se investigó en estudios en primates. Se probaron dos monos verdes machos. Se inyectaron

50 µL de EBI-031 50 mg/mL vía intravítrea en el ojo. Se utilizó el software Madonna para el ajuste de curvas.

Los datos del estudio en primates se modelaron utilizando un ajuste a la curva. Las ecuaciones diferenciales que describen los cambios del anticuerpo en el cuerpo vítreo (A) y del anticuerpo fuera del cuerpo vítreo, por ejemplo, a nivel sistémico, (Ap) se definieron como se presenta a continuación:

$$d/dt(A) = -A \cdot k_{ae}$$

$$d/dt(A_p) = A \cdot k_{ae}(Dil) - A_p \cdot k_{ape}$$

Los valores en el parámetro de inicio y las velocidades se definen tal como se muestra en la tabla a continuación:

Tabla 8: Valores y velocidades en el parámetro de inicio

Parámetro	Valor
Dil - Dilución	100
k _{ae} - Velocidad de eliminación vítreo	0.2
k _{ape} - Velocidad de eliminación sistémica	1.4
Init A - Anticuerpo inicial en el cuerpo vítreo	1000000
Init A _p - Anticuerpo inicial fuera del cuerpo vítreo	0

Otras consideraciones incluidas en el ajuste incluyen: dilución y ambas constantes de velocidad se propusieron para el ajuste. Inicial A se mantuvo constante (2x50mL de 50 mg/mL en 5 mL de ojo). Los resultados del modelaje tal como se

muestran en las FIGURAS 22A, 22B, y 23 mostraron que las constantes de velocidad de eliminación vítrea resultaron en vidas medias de 4.6 y 5.7 días, respectivamente para los dos monos. Se calculó que la constante de velocidad de eliminación vítrea fue de 5.2 días. La eliminación sistémica se modeló de 1.1 días, y 0.63 días (promedio 0.85 días). Estos resultados demostraron que la vida media de EBI-031 en el cuerpo vítreo fue significativamente más larga que la vida media sistémica en primates.

10 **Ejemplo 27: Farmacocinética de EBI-031**

Se llevó a cabo otro experimento de farmacocinética (PK), donde 50 µl de una solución de 20 mg/mL de EBI-031 se inyectó vía intravítrea en los ojos de conejos. Los puntos temporales examinados fueron 1, 3, 7 y 14 días (por ejemplo, 24, 72, 15 168, y 336 horas). Se analizaron dos animales (cuatro ojos) para cada punto temporal. Los métodos para la administración de la formulación de EBI-031, el aislamiento del tejido ocular y la determinación de la concentración de proteína fue tal como se describió en el Ejemplo 21.

20 Los resultados se muestran en las FIGURAS 24A-24I. Cuando se analizó la concentración de proteína para los días 1-14 en el humor vítreo, se determinó que la vida media de EBI-031 es de 8.95 días (FIGURA 24A). Sin embargo, se detectó una fuerte respuesta de anticuerpos el Día 14, lo cual puede

afectar estos resultados. Cuando se analizó la concentración de proteína para los días 1-7 en el humor vítreo, se determinó que la vida media de EBI-031 es de 18.88 días.

EBI-031 también se detectó en otros compartimentos del
5 ojo después de la inyección intravítrea. EBI-031 también
permeó al humor acuoso humor (FIGURA 24B), la coroides
(FIGURA 24C), la conjuntiva (FIGURA 24D), la córnea (FIGURA
24E), el cuerpo ciliar (FIGURA 24F), el cristalino (FIGURA
24G), la retina (FIGURA 24H), y la esclerótica (FIGURA 24I).
10 La concentración del fármaco en estos tejidos fue de uno o
dos órdenes de magnitud más bajos que las concentraciones
detectadas en el cuerpo vítreo.

Otras modalidades se encuentran dentro del alcance de
las reivindicaciones que se presentan a continuación.

15

20