

ANTICUERPOS DE DOMINIO ANTI-IL-6

CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a compuestos capaces de unirse a la interleucina 6 (IL-6) y su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias tales como, por ejemplo, la enfermedad cardiovascular (CVD).

INCORPORACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS COMO REFERENCIA

La presente solicitud se presenta con un listado de secuencias en formato electrónico. El contenido completo del listado de secuencias se incorpora aquí como referencia.

ANTECEDENTES

Las CVD son una carga importante para la salud global y una de las principales causas de muerte en todo el mundo. A pesar de los avances en los tratamientos médicos y las medidas preventivas, la prevalencia de la CVD sigue aumentando a nivel mundial, lo que ejerce una presión significativa sobre los sistemas de salud y las economías. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar terapias nuevas e innovadoras que puedan prevenir y tratar la CVD de manera más efectiva. El desarrollo de nuevas terapias puede prolongar la vida de millones de personas y ayudar a aliviar el impacto social y económico de la enfermedad cardiovascular.

Durante los últimos 40 años, el enfoque farmacológico más exitoso para la prevención de la enfermedad cardiovascular ha sido la reducción agresiva de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). La reducción de LDL puede lograrse a través de modificaciones del estilo de vida, tales como el ejercicio regular y seguir una dieta rica en frutas, verduras, granos enteros, proteínas magras y baja en grasas saturadas y trans, colesterol y sodio, y/o medicamentos. Los medicamentos típicos para reducir LDL incluyen estatinas, inhibición de la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), secuestrantes de ácidos biliares, etc.

La IL-6 es una citocina multifuncional que desempeña un papel crucial en la mediación de diversas respuestas inmunitarias y procesos inflamatorios (por ejemplo, la regulación positiva de proteínas de fase aguda o la diferenciación de linfocitos T) a través de su regulación positiva transitoria en respuesta a la infección o daño tisular. La desregulación de la señalización de IL-6 se ha implicado en la patogenia de varias enfermedades, que incluyen trastornos autoinmunitarios, cáncer y afecciones inflamatorias crónicas. La IL-6 también se ha asociado con la CVD a través de su papel en la inflamación, un proceso que desempeña un papel clave en el desarrollo y la progresión de la CVD. La IL-6 puede promover la producción de otras citocinas proinflamatorias, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α e interleucina-1 β (IL-1 β), que pueden contribuir a la disfunción endotelial, la formación de placas y la aterosclerosis, lo cual es característico de la CVD.

El direccionamiento de IL-6 se ha explorado como una estrategia terapéutica potencial en diversas enfermedades, que incluyen la artritis reumatoide, el mieloma múltiple, la enfermedad de Castleman y la COVID-19. Un enfoque es bloquear el receptor de IL-6, que es responsable de los efectos aguas abajo de

la señalización de IL-6. Esto puede lograrse mediante el uso de anticuerpos monoclonales, tales como tocilizumab y sarilumab, que han sido aprobados para su uso en la artritis reumatoide. Otro enfoque es inhibir la producción o actividad de IL-6 a través de inhibidores de moléculas pequeñas. Aunque los anticuerpos han demostrado una eficacia terapéutica, también tienen limitaciones, que incluyen altos costos de producción, inmunogenicidad y el requisito de una administración parenteral. Los inhibidores de moléculas pequeñas que se dirigen a componentes de la señalización de IL-6 sufren de efectos fuera del objetivo y de una selectividad limitada.

Por lo tanto, persiste la necesidad de compuestos novedosos que se dirijan a la vía de IL-6 que puedan superar una o más limitaciones asociadas con los enfoques terapéuticos existentes y permitir un tratamiento eficiente de la enfermedad inflamatoria y/o cardiovascular.

COMPENDIO

La presente descripción se refiere a compuestos anti-IL-6 que son altamente potentes. Como se informa en la presente descripción, los inventores lograron generar varias moléculas de unión al antígeno de IL-6 que tienen cualidades adecuadas para su desarrollo como productos terapéuticos, en particular terapias orales.

Los inventores han diseñado compuestos anti-IL-6 con propiedades bioquímicas y biofísicas robustas adecuadas para la fabricación a escala clínica (que incluye la expresión, purificación y formulación). Además, los compuestos descritos en la presente descripción pueden humanizarse y se han humanizado, minimizando de esta manera el riesgo de inmunogenicidad en la terapia en humanos *in vivo*.

Los aspectos de la descripción se exponen a continuación y/o en las reivindicaciones adjuntas, y las modalidades y características preferidas adicionales de la descripción se describen a continuación.

La presente invención se propone proporcionar compuestos (tales como, por ejemplo, dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), polipéptidos, derivados polipeptídicos) contra enfermedades inflamatorias tales como, por ejemplo, CVD, con propiedades profilácticas, terapéuticas y/o farmacológicas mejoradas, preferentemente además de otras propiedades ventajosas (tales como, por ejemplo, facilidad de preparación mejorada, buena estabilidad, biodisponibilidad mejorada, potencia mejorada, especificidad mejorada, vida media mejorada y/o costos reducidos de bienes) en comparación con el estado de la técnica. En particular, la presente invención se propone proporcionar ISVD, polipéptidos que los comprenden y derivados de tales polipéptidos, capaces de unirse a IL-6.

A partir de diferentes campañas de selección de ISVD, tales como, por ejemplo, V_HH, se aislaron y se modificaron adicionalmente con características diversas y favorables, que incluyen mayor biodisponibilidad, estabilidad, afinidad y/o actividad inhibitoria.

En particular, los inventores fueron capaces de desarrollar compuestos anti-IL-6 que son adecuados para la administración oral. Desarrollar compuestos anti-IL-6 adecuados para la administración oral no es una tarea fácil, lo que requiere el desarrollo de compuestos que logran mejoras de biodisponibilidad, potencia, vida media y/o punto isoeléctrico (pI), entre otras características, o un equilibrio adecuado en la mejora de características convenientes. En particular, los inventores fueron capaces de desarrollar compuestos anti-

IL-6 que son adecuados para la administración oral debido a una mejor biodisponibilidad, potencia, vida media y/o punto isoeléctrico (pI). Los derivados polipeptídicos como se describe en la presente descripción son altamente potentes, proporcionan una vida media suficientemente larga y una biodisponibilidad suficiente para permitir una administración peroral efectiva.

En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un ISVD capaz de unirse a IL-6. Preferentemente, las ISVD de la descripción son ISVD aisladas. Por lo tanto, los ISVD de la presente descripción pueden comprender un sitio de unión para IL-6. Un ejemplo de un ISVD es un V_HH. El ISVD de la presente descripción puede comprender región(ones) marco, por ejemplo, FR1, FR2, FR3, FR4, y dicha(s) región(ones) marco puede(n) interrumpirse por una región determinante de complementariedad (CDR), por ejemplo, CDR1, CDR2, CDR3.

En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a polipéptido(s) que comprende(n) un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción y que comprende(n) además una extensión, tal como una extensión C-terminal. La extensión C-terminal puede ser de 1 a 20 aminoácidos de longitud, tal como 1 a 6 aminoácidos de longitud. La extensión C-terminal puede comprender una o más cisteínas y/o una o más lisinas. La extensión C-terminal puede ser adecuada para una derivatización adicional. Por lo tanto, un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción puede describirse como que comprende un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción que se fusiona en su C-terminal a una extensión.

En un tercer aspecto, la presente descripción se refiere a derivado(s) polipeptídico(s) que comprende(n) el ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción, y que comprende(n) además uno o más sustituyentes. El(Los) derivado(s) polipeptídico(s) puede(n) comprender dos sustituyentes. El(Los) sustituyente(s) puede(n) conjugarse con un resto de aminoácido adecuado, tal como con el grupo funcional de una lisina o una cisteína. El(Los) sustituyente(s) puede(n) unirse a la extensión C-terminal. El(Los) derivado(s) polipeptídico(s) puede(n) tener una vida media prolongada *in vivo* en comparación con el polipéptido o ISVD correspondiente.

En un cuarto aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un derivado polipeptídico, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo o el derivado polipeptídico es capaz de unirse a IL-6 en un epítipo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 26, 30, 33, 34, 73, 74, 75, 78, 171, 175, 178, 179, 182 y 183 de IL-6 humana madura, como se establece en la SEQ ID NO: 89.

En el quinto aspecto, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico, preferentemente en forma aislada, que codifica un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción.

En el sexto aspecto, la descripción se refiere a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el quinto aspecto de la descripción.

En el séptimo aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que porta un vector de expresión de acuerdo con el sexto aspecto de la descripción.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar un ISVD de acuerdo con el primer

aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción, que comprende las etapas de

- a. Cultivar una célula huésped de acuerdo con el séptimo aspecto de la descripción en condiciones que permitan la expresión de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción;
- b. Recuperar el ISVD o el polipéptido que se obtiene en la etapa a; y/o opcionalmente
- c. Unir uno o más sustituyentes capaces de extender la vida media del polipéptido, opcionalmente en donde cada sustituyente es el Quím. 24; y/u opcionalmente
- d. purificar el ISVD o polipéptido o derivado polipeptídico obtenido de esta manera.

En un noveno aspecto, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción.

En un décimo aspecto, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en medicina. En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria. En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al componente individual (intermediario) de ISVD que es parte de un derivado polipeptídico de ISVD o derivado polipeptídico de V_HH de acuerdo con el primer aspecto, tal como un fragmento V_HH anti-IL-6 particular o un fragmento V_HH anti-IL-6 particular de la misma.

Los derivados polipeptídicos como se describe en la presente descripción son altamente potentes, proporcionan una vida media suficientemente larga y/o una biodisponibilidad suficiente para permitir una administración subcutánea así como una administración peroral efectiva.

Otros aspectos, ventajas, aplicaciones y usos de los polipéptidos y composiciones se harán evidentes a partir de la descripción adicional en la presente descripción. Varios documentos se citan a lo largo del texto de esta descripción. Cada uno de los documentos citados en la presente descripción (incluyendo todas las patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, especificaciones e instrucciones del fabricante, etc.), ya sean supra o infra, se incorporan por la presente descripción como referencia en su totalidad. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar tal descripción en virtud de la invención anterior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-C muestran ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos anti-IL-6 que comprenden un sustituyente. En las modalidades que se muestran en las Figuras 1A y 1B, se proporciona además una extensión en el extremo C-terminal o N-terminal, respectivamente, del ISVD. La línea discontinua indica un puente disulfuro.

Las Figuras 1D-F muestran ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos anti-IL-6 en donde el sustituyente es un resto de prolongación. "E" – extensión; "PM"- resto de prolongación. La línea discontinua indica un puente disulfuro.

La Figura 2 muestra un ejemplo no limitante de un derivado polipeptídico anti-IL-6 que comprende un único sustituyente. La línea discontinua indica un enlace disulfuro. Los átomos de hidrógeno se han omitido para mayor claridad.

La Figura 3A muestra una descripción figurativa detallada del compuesto 9, que representa un ejemplo no limitante de derivados polipeptídicos anti-IL-6. La línea discontinua indica un enlace disulfuro. Los átomos de hidrógeno se han omitido para mayor claridad.

La Figura 3B muestra la misma descripción figurativa no limitante del compuesto 9 como se identifica en la Figura 3A, en donde se proporcionan detalles de la construcción. En esta modalidad, la extensión se proporciona en el extremo C-terminal del V_HH, comprende los residuos de aminoácidos de la SEQ ID No. 72 y se identifica por una caja con el patrón discontinuo. Cada uno de los dos sustituyentes (Quím. 24), el sustituyente etiquetado 1 y el sustituyente 2 respectivamente, se identifican mediante una caja con el patrón — . . — discontinuo. Los restos de prolongación se identifican mediante cuadros con el patrón — . — discontinuo. Los elementos enlazadores se identifican por cajas con el patrón — — discontinuo. La ——— línea discontinua indica un enlace disulfuro. Los átomos de hidrógeno se han omitido para mayor claridad.

La Figura 4A muestra la estructura molecular de parte de la interacción parátipo:epítipo entre la SEQ ID NO: 57 e IL-6 humana (hIL-6), como se obtiene de los experimentos cristalográficos de rayos X descritos en el Ejemplo 2.

La Figura 4B muestra la estructura molecular de parte de la interacción parátipo:epítipo entre las estructuras superpuestas de los polipéptidos V_HH 19, 33 y 35 y la IL-6 humana. Los residuos de aminoácidos que pertenecen a cualquiera de los polipéptidos V_HH se indican con un asterisco "*", por ejemplo, Trp 58/59. Los residuos de aminoácidos numerados restantes pertenecen a hIL-6.

La Figura 5 un polipéptido de ejemplo que comprende un V_HH anti-IL6 y una representación estructural de las estabilizaciones del puente de sal generadas a través de mutaciones en las posiciones 54, 56, 62 y 106. La descripción sobre cada una de las representaciones químicas identifica el residuo del V_HH anti-IL6 que se observa.

DESCRIPCIÓN

Persiste la necesidad de medicamentos seguros y eficaces para enfermedades inflamatorias, tales como,

por ejemplo, enfermedades cardiovasculares. Un objetivo de la presente descripción es proporcionar compuestos que combinan las propiedades ventajosas de los fármacos de anticuerpos y los fármacos de moléculas pequeñas. Por ejemplo, los fármacos de anticuerpos son típicamente capaces de dirigirse a un intervalo más amplio de antígenos y receptores que son inaccesibles o difíciles de alcanzar por péptidos o moléculas pequeñas, y a menudo dan como resultado una mayor eficacia y especificidad. Las moléculas pequeñas por otra parte pueden administrarse por vía oral, lo que es una vía de administración más conveniente para los pacientes.

Por lo tanto, es un objeto de la presente descripción proporcionar compuestos altamente potentes capaces de unirse a IL-6 que tienen una biodisponibilidad suficiente para permitir la administración peroral, y proporcionar una vida media suficientemente larga para permitir una dosificación una vez al día y, opcionalmente, una vez a la semana. Además, y alternativamente, los compuestos descritos en la presente descripción son adecuados para la inyección subcutánea.

En la presente descripción se describen compuestos capaces de unirse a IL-6. Los compuestos descritos en la presente descripción tienen una alta potencia *in vitro*. Por ejemplo, las potencias *in vitro* de los compuestos descritos en la presente descripción pueden estar entre 1-50 pM, tal como entre 5-35 pM, tal como entre 10-20 pM, medido opcionalmente como se describe en la sección de Ejemplos, tal como el **EJEMPLO 8: ENSAYO DEL GEN REPORTERO Y EXPERIMENTOS DE SPR**. Un ejemplo de un método para medir la potencia es un ensayo del gen reportero que utiliza una línea celular recombinante que expresa receptores de IL-6 y gp130, en la que la activación de dichos receptores por IL-6 da como resultado la fosforilación del transductor de señal y el activador de la transcripción-3 (STAT-3) y la transcripción posterior de un gen reportero de luciferasa introducido con un elemento de respuesta de STAT-3 que puede seguirse mediante el uso de un sustrato de luciferasa apropiado *por ejemplo* medición de la bioluminiscencia de la conversión de la oxiluciferina. La potencia *in vitro* se puede medir como se describe en el **EJEMPLO 8: ENSAYO DEL GEN REPORTERO Y EXPERIMENTOS DE SPR** y como se encuentra en la sección *Ensayo de Genes Reporteros (RGA)* de los *Materiales y Métodos* de los *Ejemplos*.

Además, o alternativamente, los compuestos descritos en la presente descripción muestran una vida media prolongada (lo que reduce la frecuencia de administración requerida). Convenientemente, los compuestos que tienen un resto de prolongación tienen una vida media considerablemente prolongada en comparación con el mismo compuesto sin un resto de prolongación. Por ejemplo, un derivado polipeptídico de V_HH tiene una vida media más larga que el V_HH correspondiente sobre sí mismo. La vida media prolongada se logra mediante la introducción de sustituyentes que tienen motivos prolongadores/restos de prolongación, *por ejemplo*, conjugaciones de ácidos grasos, dominio Fc, péptido de unión a FcRn, péptido de unión a Fc y péptido de unión a albúmina. La vida media *in vivo* prolongada de compuestos que tienen un sustituyente (por ejemplo, derivados polipeptídicos o compuestos prolongados) se demuestra en modelos animales tales como rata, perro y cerdo. Los compuestos no prolongados, tales como, por ejemplo, ISVD o polipéptidos muestran un aclaramiento muy rápido en perros y cerdos.

Además, o alternativamente, los compuestos descritos en la presente descripción se han diseñado para permitir la administración peroral además de también ser adecuados para, por ejemplo, la administración

parenteral.

Convenientemente, los compuestos descritos en la presente descripción pueden tener un punto isoeléctrico entre 3 y 7, tal como entre 3,5 y 6, tal como entre 4 y 5 (incluyendo los puntos finales del intervalo).

DEFINICIONES

A menos que se indique o defina de cualquier otra manera, todos los términos usados tienen el significado habitual en la técnica, que será claro para el experto.

A menos que se indique de cualquier otra manera, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera conocida *per se*, como será evidente para el experto.

Las letras del alfabeto griego pueden representarse por su símbolo o por el correspondiente nombre escrito, por ejemplo: α = alfa; β = beta; ε = épsilon; γ = gamma; ω = omega; etc. Además, la letra griega de μ puede representarse por "u", por ejemplo, en $\mu\text{I}=\text{uI}$, o en $\mu\text{M}=\text{uM}$.

Un asterisco (*) o un  en una fórmula/estructura química puede usarse para designar un punto de unión. Debe tenerse en cuenta que, como se usa en la presente descripción, las formas singulares "**a**", "**un**", y "**el/la**", incluya referencias plurales a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia al "método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica que podrían modificarse o sustituirse por los métodos descritos en la presente descripción. A menos que se indique de cualquier otra manera, el término "**al menos**" antes de una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento en la serie.

Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar, mediante el uso de no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente descripción. Tales equivalentes se pretenden abarcar por la presente invención.

El término "**y/o**" cada vez que se usa en la presente descripción incluye el significado de "y", "o" y "todo o cualquier otra combinación de los elementos conectados por dicho término.

El término "**comprender**", y variaciones de los mismos tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número o elemento o etapa o grupo de números o elemento o etapa declarados, pero no la exclusión de ningún otro número o elemento o etapa o grupo de números o elemento o etapa. Cuando se usa en la presente descripción, el término "comprender" puede sustituirse por los términos "contener" o "incluir" o a veces "tener".

El término "**aproximadamente**" se usa en la presente descripción para referirse aproximadamente, cerca de o alrededor de. Cuando el término "aproximadamente" se usa junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo al extender los límites por encima y más abajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" puede modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor indicado en un 20 por ciento, por encima o por debajo (más alto o más bajo), preferentemente un 15 por ciento, por encima y por debajo (más alto o más bajo), con mayor preferencia dentro del 10 por ciento, por encima y por debajo (más alto o más bajo), y con la máxima preferencia en un 5 por ciento, por encima

y por debajo (más alto o más bajo).

El término “**afinidad**” denota la resistencia o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se da comúnmente por la K_D o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como una constante de asociación, K_A , que es igual a $1/K_D$, y tiene unidades de (mol/litro)⁻¹ (o M⁻¹). En la presente descripción, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas se expresará principalmente en términos del valor de K_D de su interacción; quedando claro para el experto que en vista de que la relación $K_A = 1/K_D$ especifica la resistencia de la interacción molecular por su valor de K_D también puede usarse para calcular el valor de K_A correspondiente. El valor de K_D caracteriza la fuerza de una interacción molecular también en un sentido termodinámico ya que se relaciona con el cambio de energía libre (ΔG) de unión por la relación bien conocida $\Delta G = RT \ln(K_D)$ (equivalentemente $\Delta G = -RT \ln(K_A)$), donde R es igual a la constante de los gases, T es igual a la temperatura absoluta e $\ln$ indica el logaritmo natural. La K_D para interacciones biológicas que se consideran significativas (por ejemplo, específicas) están típicamente en el intervalo de 10^{-12} M (0,001 nM) a 10^{-5} (10 000 nM). Cuanto más fuerte sea una interacción, menor será su K_D . La K_D también puede expresarse como la relación de la constante de velocidad de disociación de un complejo, indicada k_{inv} , respecto a la velocidad de su asociación, indicada k_{dir} (de manera que $K_D = k_{inv}/k_{dir}$ y $K_A = k_{dir}/k_{inv}$). La k_{inv} de velocidad de disociación tiene unidades s⁻¹ (donde s es la notación de unidad SI de segundo). La k_{dir} de velocidad de asociación tiene unidades M⁻¹s⁻¹. La velocidad de asociación puede variar entre 10^2 M⁻¹s⁻¹ a aproximadamente 10^8 M⁻¹s⁻¹, acercándose a la constante de velocidad de asociación limitada por la difusión para interacciones bimoleculares.

La unión específica de un polipéptido de unión a antígeno, tal como un ISVD, a un antígeno o determinante antigénico puede determinarse de cualquier manera adecuada conocida *per se*, que incluyen, por ejemplo, ensayos de unión de saturación y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia de sándwich, y las diferentes variantes de los mismos conocidas *per se* en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en la presente descripción.

La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse a través de diferentes técnicas conocidas *per se*, tal como la bien conocida técnica del biosensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) (ver, por ejemplo, Ober y otros 2001, Intern. Immunology 13: 1551-1559) donde una molécula se inmoviliza en el chip del biosensor y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo, lo que produce mediciones de k_{dir} , k_{inv} y, por lo tanto, valores de K_D (o K_A). Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso del bien conocido BIACORE™ instrumentos (Cytiva). El ensayo de exclusión cinética (KINEXA®) (Drake y otros 2004, Analytical Biochemistry 328: 35-43) mide los eventos de unión en solución sin el marcaje de los socios de unión y se basa en la exclusión cinética de la disociación de un complejo. El análisis de afinidad en solución también puede realizarse mediante el uso del sistema de inmunoensayo GYROLAB®, que proporciona una plataforma para el bioanálisis automatizado y un rápido retorno de la muestra (Fraleigh y otros 2013, Bioanalysis 5: 1765-74). El experto también verá claramente que la K_D medida puede corresponder a la K_D aparente, el proceso de medición de alguna manera influye en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo,

mediante artefactos relacionados con el recubrimiento en el biosensor de una molécula. Además, una K_D aparente puede medirse si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En tal situación, la afinidad medida puede verse afectada por la avidéz de la interacción de las dos moléculas. En particular, la medición precisa de K_D puede ser bastante laboriosa y, como consecuencia, a menudo los valores de K_D aparente se determinan para evaluar la fuerza de unión de dos moléculas. Se debe señalar que siempre que todas las mediciones se realicen de manera consistente (por ejemplo, manteniendo inalteradas las condiciones del ensayo), las mediciones de K_D aparente pueden usarse como una aproximación de la verdadera K_D y, por lo tanto, en el presente documento K_D y K_D aparente, deben tratarse con la misma importancia o relevancia.

Los aminoácidos son moléculas que contienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico y, opcionalmente, uno o más grupos adicionales, que se refieren frecuentemente como una cadena lateral. El término "**aminoácido**" incluye aminoácidos canónicos (que se codifican genéticamente) y aminoácidos no naturales. Los ejemplos no limitantes de aminoácidos no naturales son Aib (ácido α -aminoisobutírico), deamino histidina (nombre alternativo ácido 3-(imidazol-4-il)propiónico, abreviado Imp (imidazopropionilo) y los d-isómeros de los aminoácidos canónicos. Todos los residuos de aminoácidos dentro del polipéptido para los cuales no se indica el isómero óptico deben entenderse en la presente descripción que significa el l-isómero a menos que se especifique de cualquier otra manera. Los residuos de aminoácidos se indicarán de acuerdo con el estándar de código de aminoácidos de tres letras o de una letra.

El término "**diferencia de aminoácidos**" como se usa en la presente descripción significa una sustitución o eliminación de un aminoácido.

El término "**anticuerpo**" en la presente descripción se refiere a una proteína, que comprende o se deriva de una secuencia de inmunoglobulina, que es capaz de unirse a un antígeno o una porción de este. Un "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos de longitud completa que comprenden al menos cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas ligeras (LC) que se conectan mediante enlaces disulfuro, así como anticuerpos que comprenden al menos tres cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (HC) y una cadena ligera (LC) que se conectan mediante enlaces disulfuro, así como anticuerpos recombinantes o modificados (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, etc.). Una clase de inmunoglobulinas son las IgG. En seres humanos, la clase IgG puede dividirse en cuatro subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en base a la secuencia de sus regiones constantes de cadena pesada. Las cadenas ligeras pueden dividirse en dos tipos, cadenas kappa y lambda, en base a diferencias en su composición de secuencias. Las moléculas de IgG están compuestas por dos cadenas pesadas, enlazadas entre sí por dos o más enlaces disulfuro, y dos cadenas ligeras, cada una unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro. Para evitar dudas, el término "anticuerpo" abarca también los anticuerpos de dominio único (sdAb).

El término "**sitio de unión al antígeno**" se usa indistintamente con "**dominio de unión al antígeno**" y se entenderá que se refiere a una región de un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a un antígeno. El dominio de unión al antígeno no necesita estar en el contexto de un anticuerpo completo, por ejemplo, puede estar en aislamiento (por ejemplo, un anticuerpo de dominio) o en otra forma, por ejemplo,

como se describe en la presente descripción, tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende un ISVD. Por ejemplo, las inmunoglobulinas “convencionales” (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) o fragmentos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, di-scFv) comprenden dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, que interactúan para formar un sitio de unión a antígeno. Típicamente, en las inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L) interactúan para formar un sitio de unión al antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de V_H y V_L contribuirán al sitio de unión al antígeno, *es decir* un total de 6 CDR estarán involucradas en la formación del sitio de unión al antígeno. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) son capaces de unirse específicamente a un epítipo del antígeno sin emparejarse con un dominio variable de inmunoglobulina adicional. El sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina se forma mediante un dominio V_H único, un V_HH único o V_L único. Como tal, el dominio variable único puede ser una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia V_L) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia del dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia V_H o secuencia V_HH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre y cuando sea capaz de formar una única unidad de unión al antígeno (es decir, una unidad de unión al antígeno funcional que consiste esencialmente de un único dominio variable, de manera que el único dominio de unión al antígeno no necesita interactuar con otro dominio variable para formar una unidad de unión al antígeno funcional).

Se dice que un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), un anticuerpo, un polipéptido, o generalmente una proteína de unión al antígeno o un polipéptido de unión al antígeno o un fragmento de este que puede **"unirse a"** o que puede **"unirse específicamente a"**, que **"tiene afinidad por"** y/o que **"tiene especificidad por"** un cierto epítipo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítipo de estos) está **"contra"** o **"dirigido contra"** dicho epítipo, antígeno o proteína o es una molécula de **"unión"** con respecto a tal epítipo, antígeno o proteína, o se dice que es "anti"-epítipo, "anti"-antígeno o "anti"- proteína. Por ejemplo, en el contexto de la interleucina 6 (IL-6), puede hacerse referencia a un constructo que se une a IL-6 como "anti"-IL-6.

El término **"sustitución conservadora"** como se usa en la presente descripción se refiere al caso en el que un aminoácido puede sustituirse por un aminoácido con propiedades bioquímicas similares, por ejemplo, un aminoácido básico puede sustituirse por otro aminoácido básico (por ejemplo, lisina por arginina), un aminoácido ácido puede sustituirse por otro aminoácido ácido (por ejemplo, glutamato por aspartato), un aminoácido neutro puede sustituirse por otro aminoácido neutro (por ejemplo, treonina por serina), un aminoácido cargado puede sustituirse por otro aminoácido cargado (por ejemplo, glutamato por aspartato), un aminoácido hidrófilo puede sustituirse por otro aminoácido hidrófilo (por ejemplo, asparagina por glutamina), un aminoácido hidrófobo puede sustituirse por otro aminoácido hidrófobo (por ejemplo, alanina por valina), un aminoácido polar puede sustituirse por otro aminoácido polar (por ejemplo, serina por treonina), un aminoácido aromático puede sustituirse por otro aminoácido aromático (por ejemplo, fenilalanina por triptófano) y un aminoácido alifático puede sustituirse por otro aminoácido alifático (por ejemplo, leucina por isoleucina).

Los términos "**bloque (cruzado)**", "**bloqueado (de forma cruzada)**", "**bloqueo (cruzado)**", "**unión competitiva**", "**competir (de forma cruzada)**", "**que compiten (de forma cruzada)**" y "**competencia (cruzada)**" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a la capacidad de una inmunoglobulina, anticuerpo, ISVD, polipéptido u otro agente de unión para interferir con la unión de otras inmunoglobulinas, anticuerpos, ISVD, polipéptidos o agentes de unión a un objetivo dado. El grado en el que una inmunoglobulina, anticuerpo, ISVD, polipéptido u otro agente de unión es capaz de interferir con la unión de otro al objetivo, y por lo tanto si puede decirse que bloquea de acuerdo con la invención, puede determinarse mediante el uso de ensayos de unión de competencia, que son comunes en la técnica, tal como por ejemplo mediante el cribado de ISVD purificados contra ISVD mostrados en fagos en un ELISA de competencia. Los métodos para determinar si una inmunoglobulina, anticuerpo, dominio variable único de inmunoglobulina, polipéptido u otro agente de unión dirigido contra unos bloques (cruzado), es capaz de bloquear (de forma cruzada), se unen competitivamente o es competitivo (de forma cruzada) como se define en la presente descripción se describen, por ejemplo, en Xiao-Chi Jia y otros (Journal of Immunological Methods 288; 91—98, 2004), Miller y otros (Journal of Immunological Methods 365; 118—125, 2011) y/o los métodos descritos en la presente descripción.

El término "**derivado**" como se usa en la presente descripción se refiere a un polipéptido modificado químicamente que tiene un sustituyente covalentemente unido a un aminoácido del polipéptido. Típicamente, un derivado polipeptídico se refiere a un polipéptido que comprende un ISVD en donde dicho polipéptido porta un sustituyente. Por ejemplo, el sustituyente puede unirse covalentemente al grupo tiol de una cisteína. El constructo resultante (es decir, el polipéptido que lleva un sustituyente) puede denominarse derivado polipeptídico.

El término "**EC₅₀**" como se usa en la presente descripción se refiere a la concentración requerida para inducir el 50 % del efecto máximo, es *decir* típicamente farmacológico o terapéutico. El término "**ED₅₀**" como se usa en la presente descripción se refiere a la dosis para el 50 % para inducir el efecto farmacológico o terapéutico. Típicamente, EC₅₀/ED₅₀ se realizan mediciones en farmacología *in vivo* modelos, mientras que IC₅₀ las mediciones pueden realizarse tanto *in vitro* e *in vivo*.

El término "**epítopo**" como se usa en la presente descripción se refiere a un sitio de unión específico en un antígeno o en una estructura antigénica para la cual, por ejemplo, un ISVD, o un polipéptido que comprende un ISVD, o un derivado polipeptídico que comprende un ISVD, tiene especificidad y afinidad. Los epítomos generalmente consisten en elementos superficiales de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último, se pierde en presencia de agentes desnaturizantes capaces de interrumpir la estructura de la proteína. Un epítopo puede ser un epítopo lineal, un epítopo conformacional, o un epítopo híbrido. El término "epítopo" puede usarse en referencia a un epítopo estructural. Un epítopo estructural, de acuerdo con algunas modalidades, puede usarse para describir la región de un antígeno que se cubre por un anticuerpo (por ejemplo, la huella de un anticuerpo cuando se une al antígeno). En algunas modalidades, un epítopo estructural puede describir los residuos

de aminoácidos del antígeno que están dentro de una proximidad especificada (por ejemplo, dentro de un número especificado de angstroms) de un residuo de aminoácido del anticuerpo. El término "epítopo" también puede usarse en referencia a un epítopo funcional. Un epítopo funcional, de acuerdo con algunas modalidades, puede usarse para describir los residuos de aminoácidos del antígeno que interactúan con los residuos de aminoácidos del anticuerpo de una manera que contribuye a la energía de unión entre el antígeno y el anticuerpo. Un epítopo puede determinarse de acuerdo con diferentes técnicas experimentales, también llamadas "técnicas de mapeo de epítopos". Se entiende que la determinación de un epítopo puede variar en base a las diferentes técnicas de mapeo de epítopos usados y también puede variar con las diferentes condiciones experimentales usadas, por ejemplo, debido a los cambios conformacionales o escisiones del antígeno inducidos por condiciones experimentales específicas.

El término "**excipiente**" como se usa en la presente descripción se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un ingrediente activo. Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, varios azúcares y tipos de almidón, L-arginina, nicotinamida, SNAC, estearato de magnesio, derivados de celulosa de estearilfumarato de sodio, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

El término "**extensión**" (E) como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido o polipéptido adecuado para unirse a un ISVD. La extensión puede ser de unos pocos aminoácidos, 1 a 10 aminoácidos, puede ser más larga, 10 a 30 aminoácidos, o puede ser muy larga, más de 30 aminoácidos. Una extensión está presente preferentemente en el extremo C-terminal (extensión C-terminal) de un ISVD, polipéptido de ISVD, derivado polipeptídico de ISVD, V_HH, polipéptido V_HH o derivado polipeptídico de V_HH. La extensión se fusiona preferentemente de manera recombinante con el ISVD. En otras modalidades, la extensión se expresa de manera recombinante con el ISVD. En otras modalidades, la extensión se conjuga con el ISVD por cualquier medio adecuado, tal como por conjugación química. En otras modalidades, la extensión puede vincularse al ISVD por otros medios, tales como la química de clic. En algunas modalidades, la extensión se vincula al ISVD como una extensión C-terminal de este o una extensión N-terminal de este. Se entiende que la construcción resultante de un ISVD que se proporciona con una extensión, tal como una extensión C-terminal, por ejemplo, puede denominarse en sentido amplio como un polipéptido o, más específicamente, un polipéptido que comprende un ISVD. En algunas modalidades, la extensión se proporciona como una estructura unida a cualquier residuo entre el C-terminal y el N-terminal del ISVD, tal como por ejemplo mediante acilación. En ciertas modalidades, un propósito de la extensión es ser un sitio de unión para uno o más sustituyentes (que además pueden comprender o ser resto(s) de prolongación), por ejemplo, a través de una o más cisteínas. Un ejemplo no limitante de una extensión es GQACPC (SEQ ID NO: 72). Por ejemplo, en una modalidad no limitante, un ISVD se proporciona con una extensión C-terminal de residuos de aminoácidos GQACPC (SEQ ID NO: 72), tal como para formar un polipéptido que comprende el ISVD, en donde las cisteínas en la posición 4 y 6 de acuerdo con el posicionamiento de la SEQ ID NO: 72 pueden ser cada una individualmente sitios de uniones para sustituyentes.

El término "**ácido graso**" se refiere a un ácido carboxílico opcionalmente sustituido con un alifático, en donde la cadena alifática es saturada o insaturada. Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos son ácido

carboxílico C12-C24.

“**Marco**” o “**FR**” son aquellas regiones de dominio variable distintas de los residuos de la región hipervariable. Por lo tanto, los compuestos descritos en la presente descripción comprenden de extremo N- a C-terminal los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

El término “**cisteína libre**” como se usa en la presente descripción se refiere a un residuo de cisteína en una cadena polipeptídica que está disponible para la reacción, por ejemplo, la conjugación química y, por lo tanto, no es parte de un puente disulfuro interno natural o modificado por ingeniería genética. En esencia, las cisteínas libres pueden usarse para la conjugación, aunque los residuos de cisteína libres, lo que incluye cisteínas libres introducidas recombinantemente, a menudo se bloquean con tioles pequeños, tales como cisteína, homocisteína o glutatión, durante la expresión recombinante de polipéptidos en células huésped. Esto también se observa en la producción recombinante de polipéptidos de ISVD en donde se ha/han introducido una o más cisteínas libres. Por lo tanto, puede usarse una reacción de reducción que usa un agente reductor adecuado, tal como un agente reductor disulfuro. Un ejemplo no limitante de un agente reductor es el bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidratada o el clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina, que pueden usarse para liberar y preparar la cisteína libre para la conjugación con un resto de interés, tal como, pero sin limitarse a, un sustituyente (que puede comprender o ser un resto de prolongación).

La **concentración inhibitoria semimáxima** (IC_{50}) puede ser una medida de la eficacia de un compuesto para inhibir una función biológica o bioquímica, por ejemplo, un efecto farmacológico. Esta medida cuantitativa indica cuánto del ISVD (por ejemplo, un polipéptido V_{HH}) se necesita para inhibir un proceso biológico dado (o componente de un proceso, por ejemplo, una enzima, receptor celular, quimiotaxis, anaplasia, metástasis, invasividad, etc.) a la mitad. En otras palabras, es la concentración inhibitoria (IC) semimáxima (50 %) de una sustancia (IC del 50 %, o IC_{50}). Los valores de IC_{50} pueden calcularse para un antagonista dado tal como el polipéptido o ISVD (por ejemplo, un Nanobody™) de la invención al determinar la concentración necesaria para inhibir la mitad de la respuesta biológica máxima del agonista. La IC_{50} de un fármaco puede determinarse al construir una curva de dosis-respuesta y examinar el efecto de diferentes concentraciones del antagonista, tal como el ISVD (por ejemplo, un polipéptido V_{HH}) de la invención sobre la inversión de la actividad del agonista.

La “**etiqueta HPC4**” se refiere a una secuencia de 12 aminoácidos derivada de la proteína C (SEQ ID NO: 87), que es un zimógeno plasmático dependiente de la vitamina K. La proteína C se activa por escisión proteolítica del complejo trombina-trombomodulina para formar una enzima anticoagulante. Este péptido puede expresarse y detectarse con la proteína de interés como una fusión amino-terminal o carboxi-terminal.

El término “**célula huésped**” como se usa en la presente descripción cubre cualquier tipo de sistema celular que puede manipularse para generar las ISVD descritas en la presente descripción. Las células huésped incluyen, pero no se limitan a, células cultivadas, por ejemplo, células de mamíferos cultivadas, tales como células CHO, células HEK293T, células HEK EXPI, células BHK, células NSO, células SP2/0, células de mieloma YO, células de mieloma de ratón P3X63, células PER, células PER.C6 o células de hibridoma, células de levadura, células de hongos y células de insectos.

El término **“hidrótropro”** como se usa en la presente descripción se refiere a un compuesto capaz de aumentar la solubilidad de los fármacos poco solubles en forma sólida. Los hidrótropos pueden añadirse durante el proceso de fabricación para mejorar la biodisponibilidad del fármaco una vez administrado. Estas sustancias actúan mejorando la solubilidad del fármaco en el fluido del estómago, lo que facilita su absorción a través de las paredes intestinales. Los ejemplos no limitantes de hidrótropos incluyen urea, nicotinamida y clorhidrato de piridoxina.

El término **“región hipervariable”** como se usa en la presente descripción se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende las “regiones determinantes de complementariedad” también conocidas como “CDR”.

El término **“identidad”** como se conoce en la técnica, se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más polipéptidos, según se determina al comparar las secuencias. En la técnica, “identidad” significa, además, el grado de relación de las secuencias entre los polipéptidos, según se determina por la cantidad de coincidencias entre las cadenas de dos o más residuos de aminoácidos. La “identidad” mide el porcentaje de coincidencias idénticas entre la más pequeña de dos o más secuencias con alineaciones de interrupciones (si corresponde) al que se llega mediante un modelo matemático o programa de computadora particular (es decir, “algoritmos”). La identidad de polipéptidos relacionados puede calcularse fácilmente mediante métodos conocidos.

“IL-6” es interleucina 6. IL-6 también puede denominarse en la presente descripción “el antígeno”. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de hIL-6 es la SEQ ID NO: 88. Esta secuencia se escinde *in vivo* para eliminar un péptido líder N-terminal, para producir IL-6 madura. La hIL-6 madura tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 89. La secuencia madura representa la IL-6 circulante *in vivo*, que es el antígeno objetivo para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo* como se describe en la presente descripción. En consecuencia, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera, IL-6 a la que se hace referencia en la presente descripción es hIL-6 madura. IL-6 puede fusionarse con un resto para la detección y/o la purificación y/o la inmovilización, tal como, por ejemplo, una etiqueta de His o etiqueta HPC4, por ejemplo, para su uso en ensayos como se describe en la presente descripción.

El término **“dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD)”**, que se usa indistintamente con **“dominio variable único”** o **“anticuerpo de dominio único”**, se refiere a una molécula de inmunoglobulina en donde el sitio de unión al antígeno está presente en, y formado por, un único dominio de inmunoglobulina. Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) puede comprender, por ejemplo, o consistir en un ISVD de cadena pesada, tal como un V_H, V_HH, que incluye un V_HH de camélido o V_HH humanizado. Preferentemente, es un V_HH, que incluye un V_HH de camélido o V_HH humanizado. Las ISVD de cadena pesada pueden derivarse de un anticuerpo convencional de cuatro cadenas o de un anticuerpo de cadena pesada. El término “ISVD”, incluye, pero no se limita a, dominios variables de anticuerpos de cadena pesada de camélidos (V_HH), anticuerpos de dominio (dAB) e ISVD derivados de tiburón (dominios de IgNAR). Como un anticuerpo convencional, un ISVD es capaz de unirse selectivamente a un antígeno específico. Típicamente, las ISVD tienen un peso molecular de solo 12-18 kDA, lo que las hace mucho más pequeñas que los anticuerpos convencionales. Para la comparación, los anticuerpos convencionales tienen

típicamente un peso molecular de aproximadamente 120-160 kDa. Generalmente, un ISVD tiene una secuencia de aminoácidos que comprende cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3, FR4) y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3), preferentemente de acuerdo con la siguiente fórmula (Fórmula I): FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (definición de Kabat).

El acrónimo “**V_HH**”, como se usa en la presente descripción, representa el dominio Variable de la cadena pesada.

Con respecto a las CDR, como se conoce bien en la técnica, existen múltiples convenciones para definir y describir las CDR de un V_H o fragmento V_HH, tal como la definición de Kabat (que se basa en la variabilidad de la secuencia y es la más comúnmente usada) y la definición de Chothia (que se basa en la ubicación de las regiones de lazo estructural). La referencia se hace, por ejemplo, al sitio web <http://www.bioinf.org.uk/abs/>.

En la presente descripción, las secuencias de CDR de ISVD tales como V_HH se determinan mediante el uso de la definición de Kabat (Kontermann y Dübel, 2010, Eds., Antibody Engineering, vol 2, Springer Verlag Heidelberg Berlín, Martin, Capítulo 3, págs. 33-51). De acuerdo con este método, las CDR del dominio variable se definen como la posición 31-35 (CDR1), la posición 50-65 (CDR2) y la posición 95-102 (CDR3). Sin embargo, se reconoce que los límites de las regiones CDR y FR pueden variar de los especificados. Sin embargo, cuando se hace referencia a posiciones de residuos de aminoácidos específicos en los compuestos descritos en la presente descripción que incluyen la numeración consecutiva de CDR y FR, a menos que se indique de cualquier otra manera.

El término “**punto isoeléctrico**” o “**pl**” como se usa en la presente descripción se refiere al valor de pH donde la carga neta total de una proteína, tal como un anticuerpo, es cero. En las proteínas puede haber muchos grupos cargados y en el punto isoeléctrico la suma de todas estas cargas es cero. A un pH por encima del punto isoeléctrico, la carga neta total de la proteína será negativa, mientras que, a valores de pH por debajo del punto isoeléctrico, la carga neta total de la proteína será positiva. El pl puede ser un punto isoeléctrico teórico o uno determinado experimentalmente. El experto en la técnica conoce los métodos para determinar el punto isoeléctrico de una proteína. Más comúnmente, el punto isoeléctrico de una proteína se calcula basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Están disponibles numerosas herramientas (en línea) que permiten la determinación del punto isoeléctrico de una proteína, tales como “ExPASy Compute pI/Mw”; ver Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005), págs. 571-607. Preferentemente, el algoritmo de Skoog & Wichman, 1986. La pKa de residuos de aminoácidos se usa para calcular el pl. El pl también puede determinarse experimentalmente y las variantes de carga pueden separarse, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de separación basadas en carga tales como electroforesis en gel de isoelectroenfoque (IEF) o electroforesis en gel de isoelectroenfoque capilar (cIEF).

El término “**aislado**”, como se usa en la presente descripción, se refiere al material que se elimina de su entorno original o nativo (por ejemplo, el entorno natural si se trata de un entorno natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no se aísla, sino que se aísla el

mismo polinucleótido o polipéptido, separado por intervención humana de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos pudieran ser parte de una composición, y aun así estar aislados en ese tal vector o composición no es parte del entorno en el cual se encuentra en la naturaleza. Se considera que una secuencia de ácido nucleico o aminoácido “**(en) (forma) (esencialmente) aislada**” – por ejemplo, en comparación con el medio de reacción o medio de cultivo del que se ha obtenido – cuando se ha separado de al menos otro componente con el que se asocia normalmente en dicha fuente o medio, tal como otro ácido nucleico, otra proteína/polipéptido, otro componente biológico o macromolécula o al menos un contaminante, impureza o componente menor. En particular, una secuencia de ácido nucleico o aminoácido se considera “(esencialmente) aislada” cuando se ha purificado al menos 2 veces, en particular al menos 10 veces, más en particular al menos 100 veces, y hasta 1000 veces o más. Un ácido nucleico o aminoácido que está “en (esencialmente) forma aislada” es preferentemente esencialmente homogéneo, como se determina mediante el uso de una técnica adecuada, tal como una técnica cromatográfica adecuada, tal como electroforesis de gel de poliacrilamida.

El término “**resto lipófilo**” como se usa en la presente descripción se refiere a un resto que comprende un resto de hidrocarburo alifático con un total de más de 6 y menos de 30 átomos de carbono, preferentemente más de 8 y menos de 20 átomos de carbono.

El término “**biodisponibilidad oral**” o “**biodisponibilidad peroral**” como se usa en la presente descripción se refiere a la cantidad de fármaco administrado en la circulación sistémica después de la administración peroral (estimada como el área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo) con relación a la cantidad de fármaco administrado en la circulación sistémica después de la administración intravenosa de dicho fármaco.

La parte de una molécula de unión a antígeno (tal como una inmunoglobulina, un anticuerpo convencional, un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), un polipéptido de la invención y/o un derivado polipeptídico de la invención) que reconoce el epítipo se denomina “**parátipo**”.

El término “**vida media en plasma**” como se usa en la presente descripción se refiere al tiempo requerido para que la mitad de la cantidad de una sustancia administrada a un paciente se metabolice o elimine del suero o plasma del paciente mediante procesos biológicos normales.

El término “**prolongación/resto de prolongación**”, “**resto que prolonga**” o “**resto de prolongación**” como se usa en la presente descripción se refiere a un resto que tiene propiedades de extensión de la vida media y puede usarse indistintamente con el término “prolongador” (P). El término “prolongación” por lo tanto se refiere a la extensión de la vida media y un prolongador o resto de prolongación por lo tanto sirve para el propósito de extender la vida media de los polipéptidos de ISVD y/o ISVD descritos en la presente descripción. El resto de prolongación o prolongador se une opcionalmente al ISVD o al polipéptido mediante un “enlazador” (L_p). Tal enlazador (L_p) pueden componerse de uno o varios “elementos enlazadores”. En una modalidad en la que el enlazador (L_p) consiste en un único elemento enlazador, el enlazador (L_p) y el elemento enlazador pueden referirse sinónimamente. En una modalidad donde el enlazador (L_p) se compone de varios elementos enlazadores en serie, o al menos parcialmente en serie, los “elementos

enlazadores" se comprenden por lo tanto dentro del enlazador (L_p). Cada prolongador o resto de prolongación se une preferentemente a una lisina expuesta en la superficie o a un residuo de cisteína en la cadena principal polipeptídica del compuesto. El punto de unión se denomina generalmente R1 (y en caso de unión de más de un resto de prolongación R2, R3, etcétera, en donde $R1 \neq R2 \neq R3$, etcétera). Con respecto a esto, el prolongador/resto de prolongación (P) y el enlazador (L_p) pueden proporcionarse en serie tal como para formar $P-L_p$ o L_p-P , o más explícitamente $P-L_p-R_n$ o R_n-L_p-P (donde n es un número entero de acuerdo con la referencia del punto de unión anteriormente indicada de R1, R2, R3, etc.) El experto será capaz de identificar otro(s) residuo(s) expuesto(s) en la superficie adecuado(s) para la unión. En algunas modalidades, donde se proporciona un prolongador/resto de prolongación (P) y un enlazador (L_p), que se une a un aminoácido de un polipéptido (tal como un ISVD, V_{HH} , polipéptido de ISVD, V_{HH} polipéptido, etc.), cada uno del prolongador/resto de prolongación (P) y un enlazador (L_p) individualmente pueden denominarse "elementos sustituyentes", mientras que el resultado del prolongador/resto de prolongación (P) y el enlazador (L_p) pueden denominarse como "sustituyentes". Escrito de cualquier otra manera y para evitar dudas, un sustituyente que tiene propiedades de extensión de la vida media puede denominarse que comprende un resto de prolongación. Se entiende que, en ciertas modalidades no limitantes, el término prolongador o resto de prolongación puede usarse indistintamente con "sustituyente". Este puede ser el caso, por ejemplo, en modalidades en donde el prolongador/resto de prolongación (P) se une al aminoácido del polipéptido sin un enlazador (L_p), de manera que el sustituyente constituye del prolongador/resto de prolongación.

Para los propósitos de la comparación de dos o más secuencias de nucleótidos, el porcentaje de "**identidad de secuencia**" entre una primera secuencia de nucleótidos y una segunda secuencia de nucleótidos puede calcularse al dividir [el número de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos que son idénticos a los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de nucleótidos] por [el número total de nucleótidos en la primera secuencia de nucleótidos] y multiplicar por [100 %], en el que cada eliminación, inserción, sustitución o adición de un nucleótido en la segunda secuencia de nucleótidos — en comparación con la primera secuencia de nucleótidos — se considera como una diferencia en un solo nucleótido (posición). Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos puede calcularse mediante el uso de un algoritmo de computadora conocido para la alineación de secuencias tal como NCBI Blast v2.0, mediante el uso de configuraciones estándar. Algunas otras técnicas, algoritmos de computadora y configuraciones para determinar el grado de identidad de secuencia se describen, por ejemplo, en los documentos WO 04/037999, EP 0967284, EP 1085089, WO 00/55318, WO 00/78972, WO 98/49185 y GB 2357768. Usualmente, con el propósito de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de nucleótidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente, la secuencia de nucleótidos con el mayor número de nucleótidos se tomará como la "primera" secuencia de nucleótidos, y la otra secuencia de nucleótidos se tomará como la "segunda" secuencia de nucleótidos. Para los propósitos de la comparación de dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de "**identidad de secuencia**" entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también denominada en la presente descripción "**identidad de aminoácidos**")

pueden calcularse al dividir [el número de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácidos en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos] por [el número total de residuos de aminoácidos en la primera secuencia de aminoácidos] y multiplicar por [100 %], en el que cada eliminación, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos — en comparación con la primera secuencia de aminoácidos — se considera como una diferencia en un único residuo de aminoácido (posición), es decir, como un "**diferencia de aminoácidos**" tal como se define en la presente descripción. Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede calcularse mediante el uso de un algoritmo de computadora conocido, tal como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para las secuencias de nucleótidos, nuevamente mediante el uso de configuraciones estándar. Usualmente, con el propósito de determinar el porcentaje de "identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos de acuerdo con el método de cálculo descrito anteriormente, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácidos se tomará como la "primera" secuencia de aminoácidos, y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la "segunda" secuencia de aminoácidos. En la presente invención, la similitud e identidad se determinaron mediante el uso de Needleman (Needleman y *otros*, J. Mol. Biol. 1970; 48:443-453) de EMBOSS-6.6.0 mediante el uso de los parámetros 10 y 0,5 para la apertura y extensiones de las interrupciones, respectivamente (gapopen=10, gapextend=0,5).

El término "**sustituyente**", como se usa en la presente descripción, se refiere a un resto que se une covalentemente a un aminoácido de un polipéptido (por ejemplo, un ISVD, un V_{HH}, un polipéptido de ISVD, un polipéptido V_{HH}). Si un sustituyente está unido a un polipéptido, se dice que el polipéptido está "sustituido". Cuando un sustituyente se une covalentemente a un polipéptido o a un residuo de aminoácido, se dice que dicho polipéptido o aminoácido "porta" un sustituyente. El sustituyente puede comprender una serie de restos definidos individualmente; estos restos pueden denominarse "elementos sustituyentes". Los ejemplos no limitantes de "elementos sustituyentes" son un "prolongador" (o "resto de prolongación") y un "enlazador".

En algunas modalidades, el sustituyente puede ser capaz de formar interacciones de unión no covalentes con la albúmina, promoviendo de esta manera la circulación del compuesto en el torrente sanguíneo, y por lo tanto tiene el efecto de prolongar el tiempo en el que el compuesto está presente en el torrente sanguíneo, ya que el agregado del compuesto portador de sustituyente y la albúmina solo se desintegra lentamente para liberar la forma libre del compuesto; por lo tanto, el sustituyente, en su conjunto, también puede denominarse como una "fracción de unión a la albúmina", y puede decirse que el sustituyente tiene un "efecto de prolongación". El sustituyente puede comprender una porción que es particularmente relevante para el enlace de la albúmina y, de esta manera, la parte de la prolongación, puede denominarse "prolongador" o "resto de prolongación". El término "prolongador" y "resto de prolongación" se usan indistintamente en la presente descripción. El "prolongador" puede ser un resto lipófilo (por ejemplo, un ácido graso). El "prolongador" puede ser un ácido graso (por ejemplo, un ácido carboxílico C12-C22). Un ejemplo no limitante de un "prolongador" se muestra en la Tabla 7. Los ejemplos no limitantes de

sustituyentes se muestran en la Tabla 9. Otros ejemplos de sustituyentes adecuados se describen en, por ejemplo, los documentos WO23139187A1, WO19016300A1, WO16102562, WO21231676A1, WO22029231, WO23031455A1.

A menos que se indique de cualquier otra manera, “IL-6 que se une” se refiere a unirse a hIL-6 madura (SEQ ID NO: 89).

El término “**variante**” como se usa en la presente descripción se refiere a un ISVD o polipéptido que difiere de un ISVD o polipéptido parental por una o más eliminaciones, sustituciones o adiciones de aminoácidos, pero que conserva una o más funciones o actividades biológicas específicas del ISVD o polipéptido parental.

DOMINIO VARIABLE ÚNICO DE INMUNOGLOBULINA (ISVD)

En un primer aspecto, la descripción se refiere a un ISVD capaz de unirse a IL-6. El ISVD como se describe en la presente descripción puede ser un ISVD aislado. Preferentemente, el ISVD es un V_HH, tal como, por ejemplo, un V_HH humanizado.

En algunas modalidades, el ISVD es capaz de unirse específicamente a un epítipo de IL-6, en donde el epítipo comprende los residuos 26, 30, 33, 34, 73, 74, 75, 78, 171, 172, 175, 176, 178, 179, 182 y 183, como se establece en la SEQ ID NO: 89.

Un ejemplo no limitante de la estructura de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción puede considerarse que comprende cuatro regiones marco (FR), por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4, y dichas regiones marco se interrumpen por tres CDR, por ejemplo, CDR1, CDR2 y CDR3 (definición de Kabat). En tal secuencia de inmunoglobulina, las secuencias de marco pueden ser cualquier secuencia de marco adecuada, y los ejemplos de secuencias de marco adecuadas serán claros para el experto, por ejemplo, en base a libros de texto estándar y la descripción adicional mencionada en la presente descripción.

En algunas modalidades, el ISVD comprende:

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3), o una secuencia de aminoácidos con 1 o 2 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 3;

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7), o una secuencia de aminoácidos con 1, 2, 3 o 4 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 7;

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17), o una secuencia de aminoácidos con 1 o 2 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 17. (definición de Kabat)

En algunas modalidades, ISVD comprende una CDR1 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6; una CDR2 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16; y una CDR3 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, y SEQ ID NO: 20. (definición de Kabat).

En algunas modalidades, el ISVD comprende una CDR1 de SEQ ID NO: 3; una CDR2 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, y SEQ ID NO: 12; y una CDR3 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, y SEQ ID NO: 19. (definición de Kabat)

En algunas modalidades, el ISVD comprende

CDR1: NYWMY (SEQ ID NO: 6);

CDR2: GINTGGSTPDYADSVKG (SEQ ID NO: 16); y/o

CDR3: DTPRVFRLDHYP (SEQ ID NO: 20) (definición de Kabat).

En modalidades preferidas, el ISVD comprende CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3); CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y/o CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17) (definición de Kabat).

En algunas modalidades, el ISVD comprende una CDR1 seleccionada de Tabla 1, una CDR2 seleccionada de Tabla 2 y una CDR3 seleccionada de Tabla 3.

Tabla 1: Ejemplos no limitantes de CDR1 (definición de Kabat).

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID #
CDR1.1	EYAVG	SEQ ID NO: 3
CDR1.2	SYAVG	SEQ ID NO: 4
CDR1.3	EYAMA	SEQ ID NO: 5
CDR1.4	NYWMY	SEQ ID NO: 6

Tabla 2: Ejemplos no limitantes de CDR2 (definición de Kabat).

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID #
CDR2.1	DIGEQAENTWYAESVLG	SEQ ID NO: 7
CDR2.2	DIGENAENTWYAESVLG	SEQ ID NO: 8
CDR2.3	DIGENAENTWYAHSVLG	SEQ ID NO: 9
CDR2.7	DIGEQAENTWYAHSVLG	SEQ ID NO: 12
CDR2.8	DIGENADNTWYAHSVLG	SEQ ID NO: 13
CDR2.9	DIGESGGTWYADSVKG	SEQ ID NO: 14
CDR2.10	DIGENADNTWYAHSVKG	SEQ ID NO: 15
CDR2.11	GINTGGSTPDYADSVKG	SEQ ID NO: 16

Tabla 3: Ejemplos no limitantes de CDR3 (definición de Kabat).

CDR	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID #
CDR3.1	DKYGVGGNAQGYYS	SEQ ID NO: 17
CDR3.2	DSYGVGGGAQGYYS	SEQ ID NO: 18
CDR3.3	DSYGVGGGAERYYS	SEQ ID NO: 19
CDR3.4	DTPRVFRLDHYP	SEQ ID NO: 20

En algunas modalidades, el ISVD comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula II (SEQ ID No. 21):

X₁X₂QLVESGGGX₁₁VQPGGSLX₁₉LSCITSGRX₂₈FX₃₀X₃₁YAVGWFRQX₄₀PGX₄₃EREFVAX₅₀IGEX₅₄AX₅₆N
TWYAX₆₂SVX₆₅GRFTISRDX₇₄AKNTVYLX₈₂MX₈₄X₈₅LKPEDTAVYYCAADX₁₀₀YGVGGX₁₀₆AQGYYSWGQ
GTQVTVSS (SEQ ID NO: 21), en donde

X₁ es Q o E;

X₂ es L o V;

X₁₁ es L o W
 X₁₉ es K o Q;
 X₂₈ es R, T, E, H o K;
 X₃₀ es S, Q o D;
 X₃₁ es S o E;
 X₄₀ es A o G;
 X₄₃ es K o Q;
 X₅₀ es D o E;
 X₅₄ es Q, N, T o E;
 X₅₆ es E o D;
 X₆₂ es H o E;
 X₆₅ es K o L;
 X₇₄ es E, N o D;
 X₈₂ es E o Q;
 X₈₄ es D o N;
 X₈₅ es G o S;
 X₁₀₀ es K o S; y
 X₁₀₆ es N o G. (numeración consecutiva)

En modalidades preferidas, el ISVD comprende una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la Fórmula III (SEQ ID No. 22):

EVQLVESGGGX₁₁VQPGGSLX₁₉LSCTTSGRX₂₈FX₃₀EYAVGWFRQX₄₀PGX₄₃EREFVADIGEX₅₄AENTWYA
 X₆₂SVLGRFTISRDX₇₄AKNTVYLX₈₂MX₈₄X₈₅LKPEDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYYDSWGQGTQVTVSS
 (SEQ ID NO: 22), en donde

X₁₁ es L o W, preferentemente L;
 X₁₉ es K o Q;
 X₂₈ es R o K;
 X₃₀ es S o D;
 X₄₀ es A o G;
 X₄₃ es K o Q;
 X₅₄ es Q o N;
 X₆₂ es H o E;
 X₇₄ es E o D;
 X₈₂ es E o Q;
 X₈₄ es D o N, preferentemente D; y
 X₈₅ es G o S. (numeración consecutiva).

Convenientemente, un ISVD que tiene ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 y/o alanina o glicina en la posición de aminoácido 40 y/o histidina o ácido glutámico en la posición de aminoácido 62 y/o ácido glutámico en la posición de aminoácido 82 y/o ácido aspártico en la posición de aminoácido 84 puede

conducir a la desinmunización. Un ISVD de acuerdo con la descripción que tiene ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 y/o leucina en la posición de aminoácido 11 y/o ácido aspártico en la posición de aminoácido 84 puede tener una estabilidad química mejorada. El pI de un ISVD de acuerdo con la descripción puede reducirse convenientemente al tener ácido glutámico en la posición de aminoácido 1 y/o glutamina en la posición de aminoácido 19 y/o ácido aspártico en la posición de aminoácido 30 y/o glutamina en la posición de aminoácido 43 y/o ácido glutámico en la posición de aminoácido 62 y/o ácido aspártico en la posición de aminoácido 74 y/o glutamina o ácido glutámico en la posición de aminoácido 82 y/o ácido aspártico en la posición de aminoácido 84. La afinidad de unión de un ISVD de acuerdo con la descripción puede mejorarse al tener una lisina o arginina en la posición de aminoácidos 28 y/o ácido aspártico o serina en la posición de aminoácidos 30 y/o ácido glutámico en la posición de aminoácidos 31 y/o una asparagina o glutamina en la posición de aminoácidos 54 y/o ácido aspártico o ácido glutámico en la posición de aminoácidos 54 y/o una lisina o leucina en la posición de aminoácidos 65 y/o ácido aspártico o ácido glutámico en la posición de aminoácidos 74 y/o glicina o serina en la posición de aminoácidos 85 y/o lisina en la posición de aminoácidos 100 y/o asparagina en la posición de aminoácidos 106.

En algunas modalidades, el ISVD comprende o consiste en la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, o SEQ ID NO: 103.

En algunas modalidades, el ISVD comprende o consiste en la SEQ ID NO: 38. En algunas modalidades, el ISVD comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38.

En modalidades preferidas, el ISVD comprende o consiste en la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, o SEQ ID NO: 29.

En modalidades preferidas adicionales, el ISVD comprende o consiste en EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGEQAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 28). En algunas modalidades, el ISVD comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28.

En algunas modalidades, el ISVD comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28. En algunas modalidades, el ISVD comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28. En algunas modalidades, el ISVD consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID NO: 28.

En algunas modalidades, el ISVD se selecciona de la Tabla 4. En algunas modalidades, el ISVD comprende o consiste en cualquiera de las secuencias que se muestran en la Tabla 4.

En algunas modalidades, el ISVD comprende un triptófano en la posición 58 o 59 capaz de formar una interacción catión- π con Arg179 e interacción hidrófoba con Phe78 de hIL-6 madura (SEQ ID NO: 89).

En algunas modalidades, el ISVD es capaz de unirse a IL-6 a través de un parátipo que comprende el

residuo de aminoácido 50, 53, 54, 57, 58, 59, 101, 102, 103, 104, y 105, como se establece en la SEQ ID NO: 89. En modalidades particularmente preferidas, el ISVD es capaz de unirse a IL-6 mediante un parátipo que comprende los residuos de aminoácidos 50, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 65, 99, 101, 102, 103, 104, 105, 106, y 110, como se establece en la SEQ ID NO: 28.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos ilustrativas de ISVD. Las regiones de CDR estimadas se muestran en negrita y subrayadas.

ID de V _H H V _H H (CDR1, 2, 3)	Secuencia de aminoácidos (regiones CDR estimadas en negrita y subrayadas)	SEQ ID NO V _H H (CRD1, 2, 3) (definición de Kabat)
VHH_1.1 (CDR1.1, CDR2.7, CDR3.1)	EVQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRRFS <u>EYAV</u> <u>GWFRQAPGQEREFVADIGEQAENTWYAHSVLGR</u> FTISRDEAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYG</u> <u>VGGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	23 (3, 12, 17)
VHH_1.2 (CDR1.1, CDR2.1, CDR3.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSTTSGRRFS <u>EYAV</u> <u>GWFRQGPGKEREFEVADIGEQAENTWYAESVLGRF</u> TISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYGV</u> <u>GGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	24 (3, 7, 17)
VHH_1.3 (CDR1.1, CDR2.7, CDR3.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFS <u>EYAV</u> <u>GWFRQGPGKEREFEVADIGEQAENTWYAHSVLGR</u> FTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYG</u> <u>VGGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	25 (3, 12, 17)
VHH_1.4 (CDR1.1, CDR2.3, CDR3.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFD <u>EYAV</u> <u>GWFRQAPGKEREFEVADIGENAENTWYAHSVLGRF</u> TISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYGV</u> <u>GGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	26 (3, 9, 17)
VHH_1.5 (CDR1.1, CDR2.2, CDR3.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFD <u>EYAV</u> <u>GWFRQGPGKEREFEVADIGENAENTWYAESVLGRF</u> TISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYGV</u> <u>GGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	27 (3, 8, 17)
VHH_1.6 (CDR1.1, CDR2.1, CDR3.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSTTSGRRFS <u>EYAV</u> <u>GWFRQAPGKEREFEVADIGEQAENTWYAESVLGRF</u> TISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYGV</u> <u>GGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	28 (3, 7, 17)
VHH_1.7 (CDR1.1, CDR2.2, CDR3.1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFD <u>EYAV</u> <u>GWFRQGPGQEREFVADIGENAENTWYAESVLGR</u> FTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAAD <u>DKYG</u> <u>VGGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	29 (3, 8, 17)
VHH_1.8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTF <u>SEYAM</u>	30 (5, 14, 19)

(CDR1.3, CDR2.9, CDR3.3)	<u>A</u> WFRQAPGKEREFTVTDIGESGGTWYADSVKGRFT ISRDNANTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DSYGVG</u> <u>GGAERYYDS</u> WGQGTQVTVSS	
VHH_1.9 (CDR1.2, CDR2.10, CDR3.2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGRTFS <u>SYAV</u> <u>G</u> WFRQAPGKEREFTVAD <u>DIGENADNTWYAHSVKGR</u> FTISRDNANTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DSYG</u> <u>VGGGAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	31 (4, 15, 18)
VHH_1.10 (CDR1.3, CDR2.9, CDR3.3)	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTF <u>GEYAM</u> <u>A</u> WFRQAPGKEREFTVTDIGESGGTWYADSVKGRFT ISRDNANTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DSYGVG</u> <u>GGAERYYDS</u> WGQGTQVTVSS	32 (5, 14, 19)
VHH_1.11 (CDR1.2, CDR2.10, CDR3.2)	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRTFS <u>SYAV</u> <u>G</u> WFRQAPGKEREFTVAD <u>DIGENADNTWYAHSVKGR</u> FTISRDNANTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DSYG</u> <u>VGGGAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	33 (4, 15, 18)
VHH_1.12 (CDR1.2, CDR2.10, CDR3.2)	QLQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRTFS <u>SYAV</u> <u>G</u> WFRQAPGQEREFTVAD <u>DIGENADNTWYAHSVKGR</u> FTISRDNANTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DSYG</u> <u>VGGGAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	34 (4, 15, 18)
VHH_1.13 (CDR1.3, CDR2.9, CDR3.3)	EVQLVESGGGLVQAGGSLQLSCTASGGTF <u>SEYAM</u> <u>A</u> WFRQAPGQEREFTVTDIGESGGTWYADSVKGRFT ISRDNANTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DSYGVG</u> <u>GGAERYYDS</u> WGQGTQVTVSS	35 (5, 14, 19)
VHH_1.14 (CDR1.1, CDR2.7, CDR3.1)	QLQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRRFS <u>EYAV</u> <u>G</u> WFRQAPGQEREFTVAD <u>DIGEQAENTWYAHSVLGR</u> FTISRDEAKNTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DKYG</u> <u>VGGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	36 (3, 12, 17)
VHH_1.15 (CDR1.1, CDR2.7, CDR3.1)	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRRFS <u>EYAV</u> <u>G</u> WFRQAPGKEREFTVAD <u>DIGEQAENTWYAHSVLGRF</u> TISRDEAKNTVYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DKYGV</u> <u>GGNAQGYYDS</u> WGQGTQVTVSS	37 (3, 12, 17)
VHH_1.16 (CDR1.4, CDR2.11, CDR3.4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS <u>NYWM</u> <u>Y</u> WVRQAPGKGLEWVS <u>GINTGGSTPDYADSVKGR</u> FAISRDNANTLYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DTPR</u> <u>VFRLDHYSP</u> LGGGTQVTVSS	38 (6, 16, 20)
VHH_1.17 (CDR1.4, CDR2.11, CDR3.4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCAASGFTFS <u>NYWM</u> <u>Y</u> WVRQAPGQGLEWVS <u>GINTGGSTPDYADSVKGR</u> FAISRDNANTLYLLQMNSLRPEDTAVYYCAAD <u>DTPR</u>	103 (6, 16, 20)

	<u>VFRLDHYSPL</u> GQGTQVTSS	
--	------------------------------------	--

POLIPÉPTIDO

En un segundo aspecto, la descripción se refiere a un polipéptido que comprende un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención y una extensión, opcionalmente en donde la extensión es una extensión C-terminal.

En algunas modalidades, la extensión es de 1 a 20 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la extensión es de 1 a 15 aminoácidos de longitud, como 1 a 10 aminoácidos de longitud. En las modalidades preferidas, la extensión es de 1 a 6 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, la extensión es de entre 4 a 6 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la extensión es de 4 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la extensión es de 5 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la extensión es de 6 aminoácidos de longitud.

Un experto en la técnica entiende que una extensión puede vincularse al ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención como una extensión C-terminal de la misma, una extensión N-terminal de la misma o una extensión que se deriva de un residuo de aminoácido entre el C-terminal y el N-terminal del ISVD. Preferentemente, la extensión se vincula al ISVD como una extensión C-terminal de este o una extensión N-terminal de este. Aún con mayor preferencia, la extensión se vincula al ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención como una extensión C-terminal de la misma.

Se entiende además que la extensión puede proporcionarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la extensión puede expresarse de manera recombinante con el ISVD o conjugarse con el ISVD por cualquier medio adecuado, tal como por conjugación química o química de clic, por ejemplo.

En modalidades preferidas, la extensión comprende uno o más residuos de aminoácidos capaces de reaccionar con un sustituyente que tiene propiedades de extensión de vida media. En modalidades preferidas adicionales, la extensión comprende dos residuos de aminoácidos, cada residuo es capaz de reaccionar con un sustituyente que tiene propiedades de extensión de vida media. Ejemplos no limitantes de tales residuos de aminoácidos son la lisina y la cisteína. Si la extensión comprende dos o más residuos de aminoácidos que son capaces de reaccionar cada uno con un sustituyente que tiene propiedades de extensión de vida media, entonces cada residuo de aminoácido puede ser el mismo o diferente. Por ejemplo, la extensión puede comprender una lisina y una cisteína, por ejemplo, o una lisina y una lisina, por ejemplo, o una cisteína y una cisteína, por ejemplo. Convenientemente, en algunas modalidades, la extensión comprende dos residuos de aminoácidos de cisteína, en donde cada uno de los residuos de aminoácidos de cisteína individualmente es capaz de reaccionar con un sustituyente que tiene propiedades de extensión de vida media. En la presente descripción se describen ejemplos no limitantes de sustituyentes que tienen propiedades de extensión de la vida media.

En algunas modalidades, la extensión comprende o consiste en GGGGSCPC (SEQ ID NO: 90), que puede denominarse E3. En algunas modalidades, la extensión comprende o consiste en GGGGSC (SEQ ID NO: 91), que puede denominarse E4. En algunas modalidades, la extensión comprende o consiste en GGGGSKPK (SEQ ID NO: 92), que puede denominarse E5. En algunas modalidades, la extensión comprende o consiste en GGGGSKP (SEQ ID NO: 93), que puede denominarse E6.

En modalidades particularmente preferidas, la extensión comprende o consiste en GQACPC (SEQ ID NO: 72), que puede denominarse E2. Una lista de ejemplos no limitantes de polipéptidos que comprenden una extensión de la SEQ ID NO: 72 se muestra en la Tabla 6.

En algunas modalidades, la extensión comprende o consiste en GGGSHHHHHH (SEQ ID NO: 71), que puede denominarse E1. Una lista de ejemplos no limitantes de polipéptidos que comprenden una extensión de la SEQ ID NO: 71 se muestra en la Tabla 5.

En las modalidades preferidas, el polipéptido se selecciona de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, y SED ID NO: 102. En una modalidad aún más preferida, el polipéptido comprende una secuencia como se establece en la SEQ ID No. 78.

Los ejemplos no limitantes de polipéptidos de la descripción se muestran en la Tabla 6 y Tabla 5. En estas tablas, las entradas se identifican mediante un ID de polipéptido. Los componentes que forman parte del polipéptido (como el ISVD y la extensión) pueden entenderse a partir de la breve descripción de la columna de polipéptidos.

Tabla 5: Lista de polipéptidos que comprenden la extensión E1 de la SEQ ID NO: 71.

ID del polipéptido	Breve descripción del polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No. de polipéptido
1	[VHH_2.1]-E1	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCTTSGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVADIGENADNRWYAHS VKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADRYGVGGGAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	39
2	[VHH_2.2]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY WMYWVRQAPGKLEWVSGINTGGSTPDYADS VKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPADTAVYYC AADTPRSFRLNHYAPLGQGTQVTVSSGGGGSH HHHHH	40
3	[VHH_2.3]-E1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVADIGENADNRWYAHS VKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADRYGVGGGAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	41
4	[VHH_2.4]-E1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGRTFSTY AMGWFRQAPGKEREFVADINWNSDNLWYADS VKGRFTISRDNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYY CAVDSYGVGGGKPEYYDSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	42

5	[VHH_2.5]-E1	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY WMYWVRQAPGKGLEWVSGINTGGSTPDYADS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYC AADTPRVFRLDHYSPLGQGTQVTVSSGGGGSH HHHHH	43
6	[VHH_2.6]-E1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTFSDY AMAWFRQAPGKDREFVADIGTNSSENTWYAESV KGRFTISRDNNTKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCA ADSYGVGGGKQEYYDSWGQGAQVTVSSGGG GSHHHHHH	44
7	[VHH_2.7]-E1	EVQLVESGGRWVQPGASLRLSCTTSGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVADIGENADNRWYAHS VKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADRYGVGGGAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	45
8	[VHH_2.8]-E1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY WMYWVRQAPGKGLEWVSGINTGGSTPDYADS VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYC AADTPRSFRLNHYSPLGQGTQVTVSSGGGGSH HHHHH	46
9	[VHH_2.9]-E1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY WMYWVRQAPGKGLEWVSGIDTRGSTPDYADS VKGRFTISRDNASTFYLMNSLRPEDTAVYYC ATDTPRSFRLYHYVPLGQGTQVTVSSGGGGSH HHHHH	47
10	[VHH_2.10]-E1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGRTFSTY AMGWFRQAPGKEREFVADINWNSDNIWYADS VKGRFTISRDNANKVMYLMNSLKPEDTAVYY CAADSYGVGGGKEEYYDSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	48
11	[VHH_2.11]-E1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRSFSSY AMGWFRQAPGKEREFVADIGVNPNTWYADS AKGRFTISRDNANTMYLMNSLKPEDTAVYY CAADSYGVGGGAERYYSWGQGTQVTVSSG GGGSHHHHHH	49
12	[VHH_2.12]-E1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTFSSY AMAWFRQAPGKDREFVADIGENS DNIWYADSV KGRFTISRDNANTILLQMNSLKPEDTAVYYCA	50

		ADSYGVGGGKPEYYDSWGQGAQVTVSSGGG GSHHHHHH	
13	[VHH_2.13]-E1	EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCTVSGRTFSTY AMGWFRQAPGKEREFVADINWNSDNIWYADS VKGRFTISRDNANKVMYLQMNSLKPEDTAVYY CAADSYGVGGGKEEYYDSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	51
14	[VHH_2.14]-E1	QLQLVESGGGSVQVGDSLRLSCTFSGRSFSSY AMGWFRQAPGKEREFVADIGENADNTWYAHS VKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADSYGVGGGAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	52
15	[VHH_2.15]-E1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTFSEY AMAWFRQAPGKEREFVTDIGESGGTWYADSV KGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA ADSYGVGGGAERYYSWGQGTQVTVSSGGG GSHHHHHH	53
16	[VHH_2.16]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCTASGRTFSSY AMGWFRQAPGKEREFVADIGENADNRWYAHS VKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADRYGVGGGAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	54
17	[VHH_2.17]-E1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGRTFSTY AMGWFRQAPGKEREFVADINWNSDNIWYADS VKGRFTISRDNANKVMYLQMNSLKPEDTAVYY CAADSYGVGGGKEEYYDSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	55
18	[VHH_1.16]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNY WMYWVRQAPGKLEWVSGINTGGSTPDYADS VKGRFAISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC AADTPRVFRLDHYSPLGQGTQVTVSSGGGGSH HHHHH	56
19	[VHH_1.11]-E1	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRTFSSY AVGWFRQAPGKEREFVADIGENADNTWYAHS VKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADSYGVGGGAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	57
20	[VHH_2.18]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRHFDEY	58

		AVGWFRQAPGKEREADVADIGENADNTWYAHS VKGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	
21	[VHH_2.19]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRHFDEY AVGWFRQGPGRKEREADVADIGENADNTWYAHS VKGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	59
22	[VHH_1.2]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCITSGRRFSEY AVGWFRQGPGRKEREADVADIGEQAENTWYAES VLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	60
23	[VHH_2.20]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEY AVGWFRQAPGKEREADVADIGEQAENTWYAHS VLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	61
24	[VHH_1.3]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEY AVGWFRQGPGRKEREADVADIGEQAENTWYAHS VLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	62
25	[VHH_2.21]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEY AVGWFRQGPGRKEREADVADIGEQAENTWYAES VLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGG GGSHHHHHH	63
26	[VHH_2.22]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCITSGRKDEY AVGWFRQAPGKEREADVADIGENAENTWYAHSV LGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCA ADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGGG GSHHHHHH	64
27	[VHH_1.4]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKDEY AVGWFRQAPGKEREADVADIGENAENTWYAHSV LGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCA ADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSGGG	65

		GSHHHHHH	
28	[VHH_1.5]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFDEY AVGWFRQGPGKEREADVADIGENAENTWYAES VLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYDWSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	66
29	[VHH_1.6]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCCTTSGRRFSEY AVGWFRQAPGKEREADVADIGEQAENTWYAESV LGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCA ADKYGVGGNAQGYDWSWGQGTQVTVSSGGG GSHHHHHH	67
30	[VHH_2.23]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCCTTSGRRFSEY AVGWFRQGPGKEREADVADIGEQAENTWYAHS VLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYDWSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	68
31	[VHH_1.7]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFDEY AVGWFRQGPGQEREADVADIGENAENTWYAES VLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYC AADKYGVGGNAQGYDWSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	69
32	[VHH_2.24]-E1	EVQLVESGGGWVQPGGSLKLSCCTTSGRRFSE YAVGWFRQAPGKEREADVADIGEQAENTWYAH SVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYY CAADKYGVGGNAQGYDWSWGQGTQVTVSSG GGGSHHHHHH	70
33	[VHH_1.9]-E1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCCTTSGRTFSSY AVGWFRQAPGKEREADVADIGENADNTWYAHS VKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AADS YGVGGGAQGYDWSWGQGTQVTVSSGG GSHHHHHH	84
34	[VHH_1.8]-E1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTFSEY AMAWFRQAPGKEREADVTDIGESGGTWYADSV KGRFTISRDNANTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA ADSYGVGGGAERYDWSWGQGTQVTVSSGGG GSHHHHHH	85
35	[VHH_1.10]-E1	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTFGEY AMAWFRQAPGKEREADVTDIGESGGTWYADSV	86

		KGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCA ADSYGVGGGAERYYSWGQGTQVTVSSGGG GSHHHHHH	
47	[VHH_1.15]-E1	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCITSGRRFSE YAVGWFRQAPGKEREFVADIGEQAENTWYAH SVLGRFTISRDEAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQVTVSSG GGGSHHHHHH	99

Tabla 6: Lista de polipéptidos que comprenden la extensión E2 de la SEQ ID NO: 72.

ID de polipéptido	Breve descripción del polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No. de polipéptido
36	[VHH_1.1]-E2	EVQLVESGGGWVQPGGSLQLSCITSGRRF SEYAVGWFRQAPGQEREFVADIGEQAENT WYAHSVLGRFTISRDEAKNTVYLQMDSLKP EDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYYSWGQG TQVTVSSGQACPC	73
37	[VHH_1.2]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCITSGRRFS EYAVGWFRQGPGKEREFVADIGEQAENTW YAESVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPED TAVYYCAADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQ VTVSSGQACPC	74
38	[VHH_1.3]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCITSGRRFS EYAVGWFRQGPGKEREFVADIGEQAENTW YAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPED TAVYYCAADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQ VTVSSGQACPC	75
39	[VHH_1.4]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCITSGRKFD EYAVGWFRQAPGKEREFVADIGENAENTWY AHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDT AVYYCAADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQ VTVSSGQACPC	76
40	[VHH_1.5]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCITSGRKFD EYAVGWFRQGPGKEREFVADIGENAENTW YAESVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPED TAVYYCAADKYGVGGNAQGYYSWGQGTQ VTVSSGQACPC	77
41	[VHH_1.6]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCITSGRRFS	78

		EYAVGWFRQAPGKEREVADIGEQAENTW YAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPED TAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQGTQ VTVSSGQACPC	
42	[VHH_1.7]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFD EYAVGWFRQGPQGEREFVADIGENAENTW YAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPED TAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQGTQ VTVSSGQACPC	79
43	[VHH_1.16]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYWMYWVRQAPGKGLEWVSGINTGGSTPD YADSVKGRFAISRDNANTLYLQMNSLRPED TAVYYCAADTPRVFRLDHYSPLGQGTQVTV SSGQACPC	80
44	[VHH_1.12]-E2	QLQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRTF SSYAVGWFRQAPGQEREFVADIGENADNT WYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMDSLKP EDTAVYYCAADSYGVGGGAQGYDSWGQ GTQVTVSSGQACPC	81
45	[VHH_1.13]-E2	EVQLVESGGGLVQAGGSLQLSCTASGGTFS EYAMAWFRQAPGQEREFVTDIGESGGTWY ADSVKGRFTISRDNANTVYLQMDSLRPEDT AVYYCAADSYGVGGGAERYYSWGQGTQV TVSSGQACPC	94
46	[VHH_1.14]-E2	QLQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRRF SEYAVGWFRQAPGQEREFVADIGEQAENT WYAHSVLGRFTISRDEAKNTVYLQMDSLKP EDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQG TQVTVSSGQACPC	95
48	[VHH_1.17]-E2	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCAASGFTFS NYWMYWVRQAPGQGLEWVSGINTGGSTPD YADSVKGRFAISRDNANTLYLQMDSLRPED TAVYYCAADTPRVFRLDHYSPLGQGTQVTV SSGQACPC	102

Se entiende que las extensiones anteriores, así como también los polipéptidos ejemplificados (que comprenden un V_HH y una extensión), son solo ejemplos y no limitantes de ninguna manera. Varias alternativas son claras para un experto en la técnica. Por ejemplo, se entiende que la extensión E2 (SEQ ID No: 72) puede proporcionarse en el extremo N-terminal del ISVD. Por ejemplo, si este es el caso con

V_HH_1.6, esto puede crear un polipéptido que puede describirse brevemente como E2-[V_HH_1.6].

Un experto en la técnica entiende además que una porción de cualquiera de las extensiones E1-E6 puede usarse como una extensión. En ciertas modalidades, puede ser conveniente acortar la extensión, tal como por ejemplo acortar la extensión E2 (SEQ ID No. 72). Por ejemplo, en una modalidad, la extensión puede tener 4 o 5 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia de extensión E2 (SEQ ID No. 72), de manera que la extensión comprende la secuencia GQAC (E7; SEQ ID No. 128) o GQACP (E8; SEQ ID No. 129), por ejemplo. En una modalidad, la extensión puede comprender al menos 5 nucleótidos contiguos de la SEQ ID No. 72. En otra modalidad, la extensión puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos de GQACP (E8; SEQ ID No: 129). En otra modalidad, la extensión puede comprender al menos 4 nucleótidos contiguos de la SEQ ID No. 72. En otra modalidad, la extensión puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos de GQAC (E7; SEQ ID No. 128). Estos son solo ejemplos y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS

En un tercer aspecto, la descripción se refiere a un derivado polipeptídico que comprende un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención, y un sustituyente. Como un experto en la técnica entiende, el término derivado polipeptídico en este contexto se refiere al resultado de una construcción comprendida de un polipéptido (es decir, el polipéptido de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención, o un polipéptido que comprende un ISVD de acuerdo con el segundo aspecto de la invención) que lleva además al menos un sustituyente, como se describirá en detalle a continuación.

Como se describirá en detalle a continuación, el sustituyente puede comprender una serie de porciones definidas individualmente; estas porciones pueden denominarse “elementos sustituyentes”. Ejemplos no limitantes de “elementos sustituyentes” son un “prolongador”/“resto de prolongación” (P) y un “enlazador” (L_p). Tal enlazador (L_p) pueden componerse de uno o varios “elementos enlazadores”. Para facilitar la comprensión, en una descripción figurativa no limitante de un compuesto ilustrativo (compuesto 9) de acuerdo con esta descripción puede hacerse referencia en las Figuras 3A y 3B. También se proporciona un derivado polipeptídico preferido como Quím. 31 a continuación.

Convenientemente, el sustituyente es capaz de extender la vida media del derivado polipeptídico. Por ejemplo, el derivado polipeptídico tiene una vida media más larga que el polipéptido correspondiente.

El sustituyente puede ser capaz de formar interacciones de uniones no covalentes con la albúmina, para promover de esta manera la circulación del compuesto en el torrente sanguíneo y de esta forma tiene el efecto de prolongar el tiempo en que el compuesto está presente en el torrente sanguíneo, ya que el agregado del compuesto que porta el sustituyente y la albúmina se desintegra solo lentamente para liberar la forma libre del compuesto; de esta forma, el sustituyente, en su conjunto, también puede denominarse como un “resto de enlace a la albúmina”, y puede decirse que el sustituyente tiene un “efecto de prolongación”. Alternativamente, puede decirse que el sustituyente es un resto que extiende la vida media. Un sustituyente puede comprender una porción que es particularmente relevante para la unión a la albúmina y de esta manera la prolongación, cuya porción puede denominarse como un “prolongador” o una

“resto de prolongación”. El resto de prolongación o prolongador se une opcionalmente al ISVD o al polipéptido mediante un “enlazador” (L_p). Tal enlazador (L_p) pueden componerse de uno o varios “elementos enlazadores”. El prolongador/resto de prolongación (P) y el enlazador (L_p) pueden proporcionarse en serie tal como para formar $P-L_p$ o L_p-P , o más explícitamente $P-L_p-R_n$ o R_n-L_p-P , en donde R_n se refiere a un punto de unión de un ISVD o polipéptido, y n es un número entero de manera que cada punto de unión pueda etiquetarse R_1 , R_2 , R_3 , etcétera donde $R_1 \neq R_2 \neq R_3$ y etcétera.

Escrito de cualquier otra manera, en algunas modalidades, el derivado polipeptídico puede tener una estructura tal como $[ISVD]-E-L_p-P$ (ver las Figuras 1A o 1D por ejemplo) o $P-L_p-E-[ISVD]$ (ver las Figuras 1B o 1E por ejemplo), en donde “[ISVD]” se refiere al ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención, “E” se refiere a una extensión (tal como E_1 , E_2 , E_3 , etc.) como se describió anteriormente (de manera que el resultado de “[ISVD]-E” o “E-[ISVD]” corresponde a un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención), “ L_p ” se refiere al enlazador y “P” se refiere a un resto de prolongación. Se entiende que, aunque en estos ejemplos solo se describe que un sustituyente se une a la extensión E, pueden proporcionarse uno o más sustituyentes y dicho uno o más sustituyentes pueden unirse a diferentes residuos de la misma extensión E.

Además, un experto entiende que los ejemplos anteriores de derivados polipeptídicos son solo ejemplos y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera. Por ejemplo, en algunas modalidades, el sustituyente puede unirse a un residuo entre el N-terminal y el C-terminal de un ISVD o polipéptido que comprende un ISVD, tal como se muestra ilustrativamente en la Figura 1C (o la Figura 1F si el sustituyente consiste en un resto de prolongación).

Los derivados polipeptídicos descritos en la presente descripción tienen convenientemente al menos uno, preferentemente dos sustituyente(s). En algunas modalidades, cada uno de los sustituyentes se une a un residuo de aminoácido de cisteína o lisina correspondiente de la extensión.

En algunas modalidades, el uno o más sustituyentes se unen a un polipéptido de la descripción, tal como un polipéptido que comprende un ISVD de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. En algunas modalidades, un sustituyente se une a un ISVD de la descripción, tal como un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

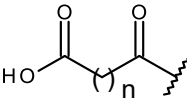
Prolongador/Resto de prolongación

El sustituyente puede comprender una porción que es particularmente relevante para el enlace de la albúmina y, de esta manera, la parte de la prolongación, puede denominarse “prolongador” o “resto de prolongación”. El término “prolongador” y “resto de prolongación” se usan indistintamente en la presente descripción. El “prolongador” puede ser un resto lipófilo (por ejemplo, un ácido graso). El “prolongador” puede ser un ácido graso (por ejemplo, un ácido carboxílico C_{16} - C_{22}). En modalidades preferidas, el prolongador es un ácido carboxílico C_{16} o uno C_{18} . Un ejemplo no limitante de un “prolongador” se muestra en la Tabla 7. En la estructura química identificada como Quím. 1,  se usa para describir un punto de unión al enlazador o al polipéptido mediante un enlace covalente.

El prolongador/resto de prolongación (“P”) puede comprender un grupo tetrazol. El prolongador/resto de prolongación puede comprender un grupo arilo. El prolongador/resto de prolongación puede comprender

un grupo ácido sulfónico. El prolongador/resto de prolongación puede comprender un grupo fenoxi. El prolongador/resto de prolongación puede comprender un grupo ácido benzoico.

Tabla 7: Ejemplo no limitante de un “prolongador”/“resto de prolongación”.

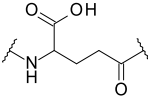
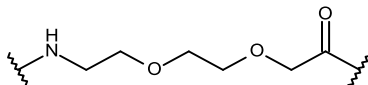
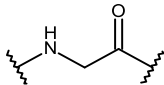
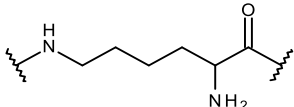
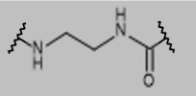
Quím. ID	Estructura
Quím. 1	 en donde n = 12, 14, 16, 18 o 20

Enlazador (L_P)

El sustituyente puede comprender una porción entre el resto de prolongación y el punto de unión al residuo de aminoácido del polipéptido, cuya porción puede denominarse como un “enlazador (L_P)”. El enlazador puede comprender varios “elementos enlazadores”. Los elementos enlazadores pueden seleccionarse de manera que mejoren las propiedades generales de la molécula, por ejemplo, de manera que mejoren la biodisponibilidad oral, la vida media de conversión y/o el efecto de prolongación, mejorando así el perfil de exposición general tras la administración oral del compuesto.

Los ejemplos no limitantes de elementos enlazadores se enumeran en Tabla 8. En las estructuras químicas identificadas como Quím. 2-6,  se usa para describir un punto de unión al prolongador o al polipéptido.

Tabla 8. Ejemplos no limitantes de elementos enlazadores.

Quím. ID	Estructura	Abreviaturas
Quím. 2		γGlu
Quím. 3		Ado
Quím. 4		Gly
Quím. 5		εLys;
Quím. 6		-

Sustituyente

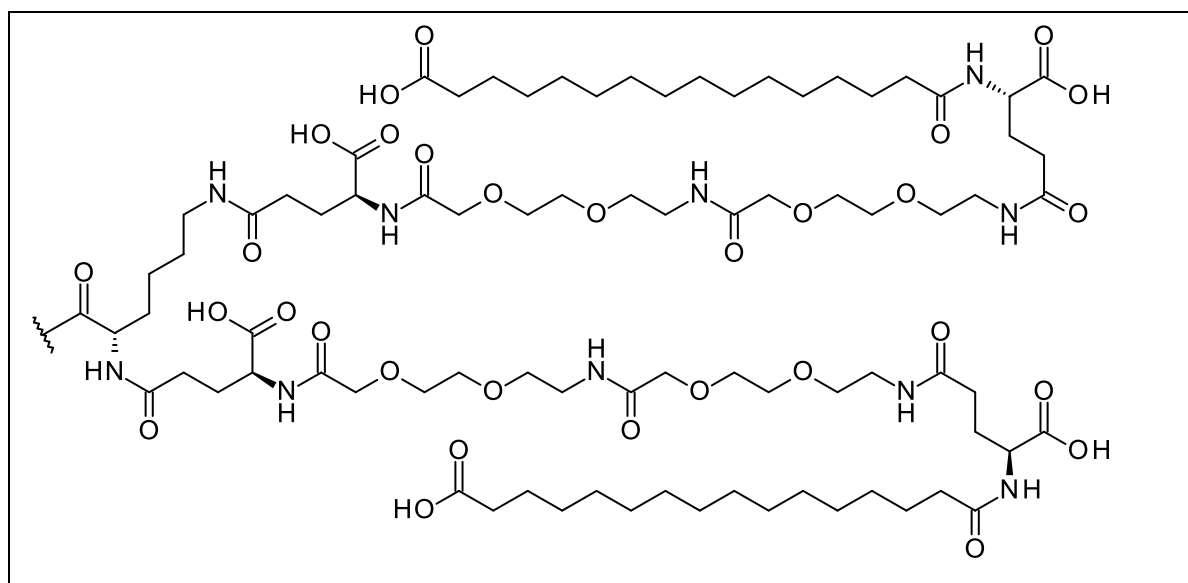
En algunas modalidades, el sustituyente se representa por “L_P-P”, en donde P comprende o consiste en un resto lipófilo con un ácido carboxílico distal y P tiene propiedades de prolongación.

En algunas modalidades, P es Quím. 1. El término “**ácido carboxílico distal**” como se usa en la presente descripción en el contexto del resto lipófilo, se refiere a un ácido carboxílico unido al punto más remoto (terminal) del resto lipófilo con relación al punto de unión del resto lipófilo a las porciones

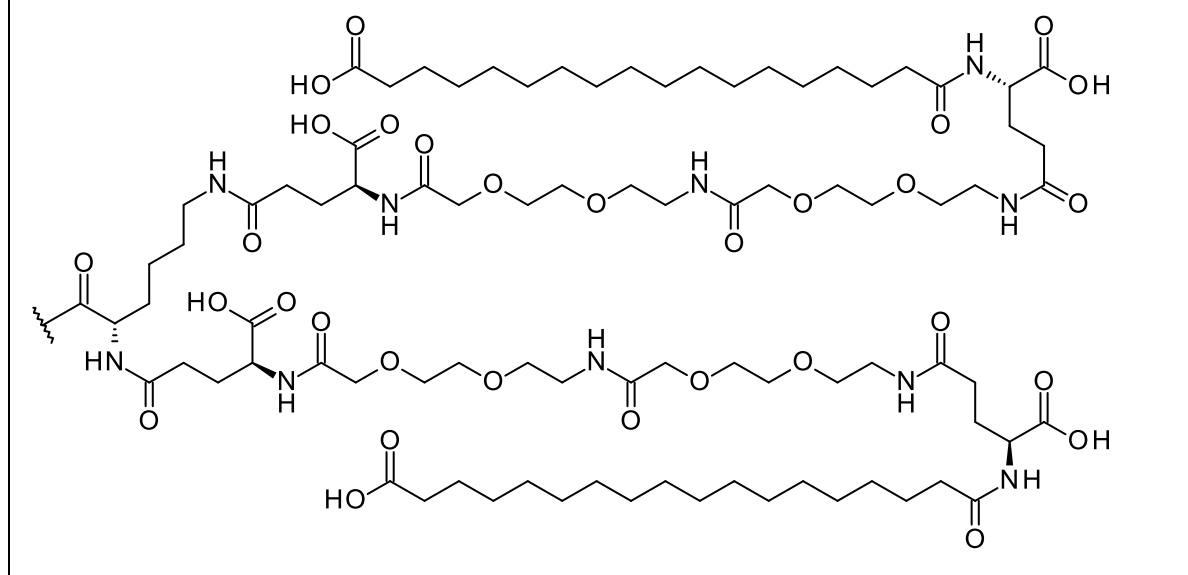
adyacentes, por ejemplo, en los compuestos como se describe en la presente descripción, el resto lipófilo con ácido carboxílico distal (por ejemplo, Quím. 1) es un resto de prolongación, y el ácido carboxílico se une al punto más remoto (terminal) del resto lipófilo con relación al punto de unión del resto lipófilo a los elementos enlazadores adyacentes (por ejemplo, Quím. 2, Quím. 3, Quím. 4, Quím. 5, o Quím. 6) o, en ausencia de elementos enlazadores, con relación al punto de unión del resto lipófilo al polipéptido adyacente. Un ejemplo no limitante de un resto lipófilo con ácido carboxílico distal es Quím. 1. En algunas modalidades, P es Quím. 1 y L_p es un enlazador que comprende elemento(s) enlazador, en donde cada elemento enlazador se selecciona de un grupo que consiste en el Quím. 2, Quím. 3, Quím. 4, Quím. 5 y Quím. 6. Los ejemplos no limitantes de sustituyentes que comprenden un resto lipófilo se enumeran en la Tabla 9. En algunas modalidades, el sustituyente se selecciona de la Tabla 9.

Tabla 9. Ejemplos de sustituyentes no limitantes.

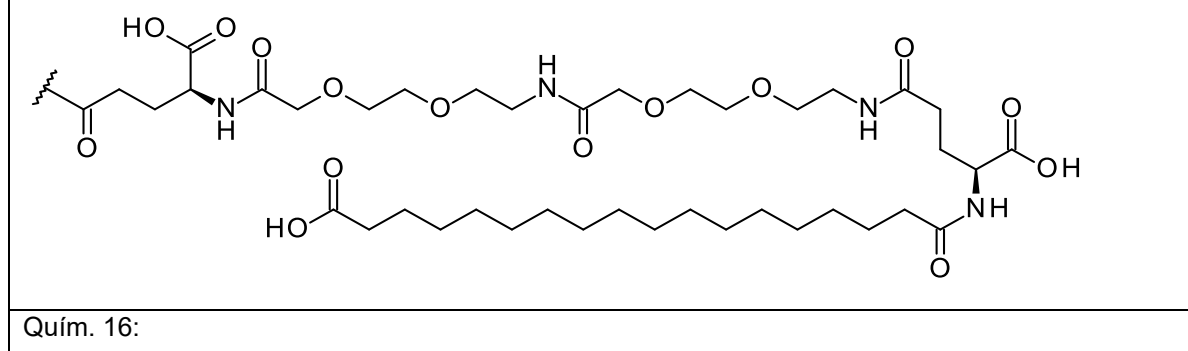
Quím. 7
Quím. 8
Quím.9
Quím. 10
Quím.11
Quím.12
Quím. 13



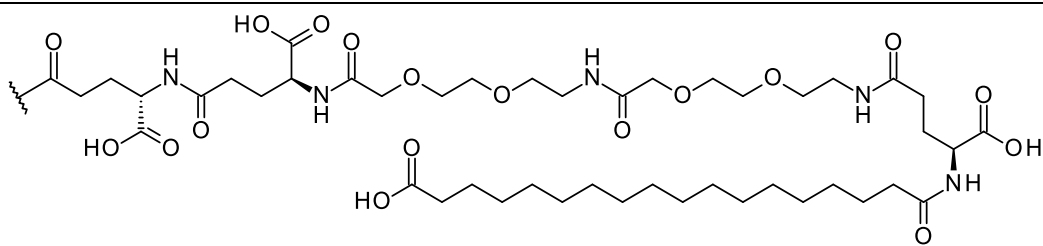
Quím. 14:



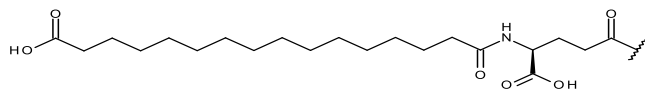
Quím. 15:



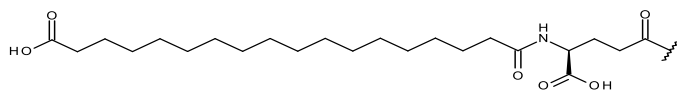
Quím. 16:



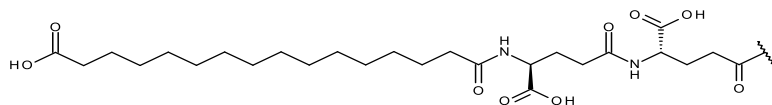
Quím. 17



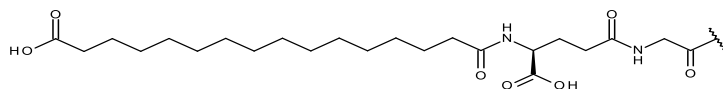
Quím. 18



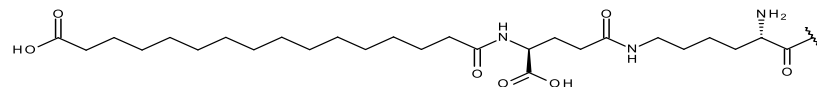
Quím. 19



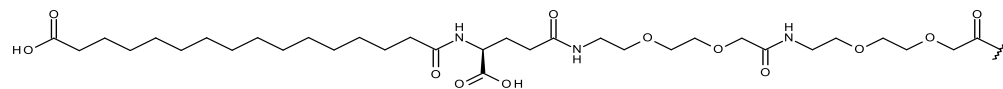
Quím. 20



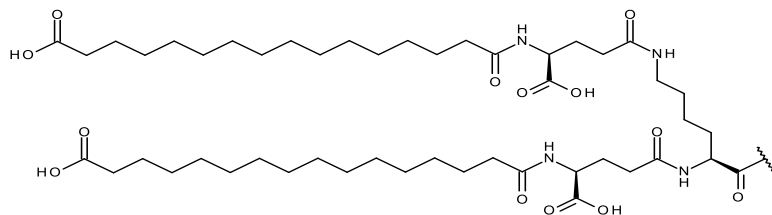
Quím. 21



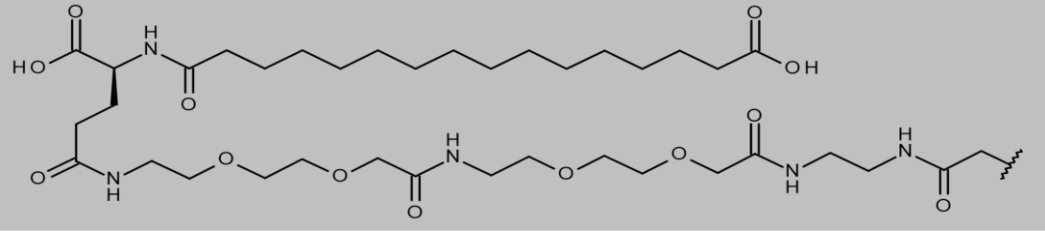
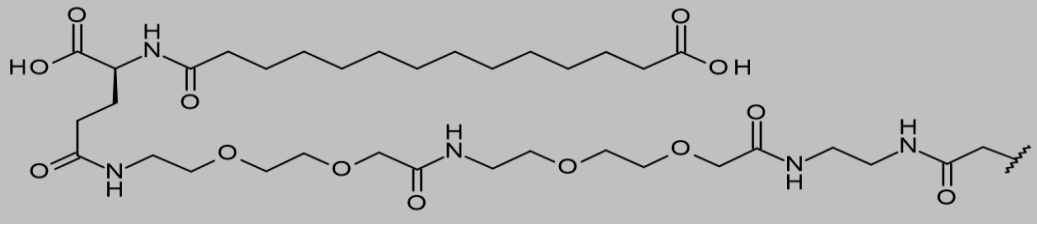
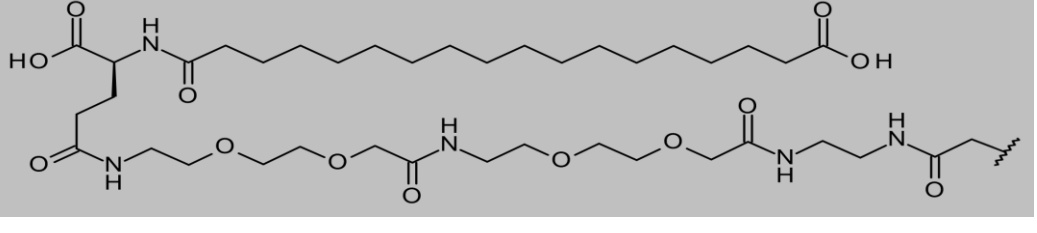
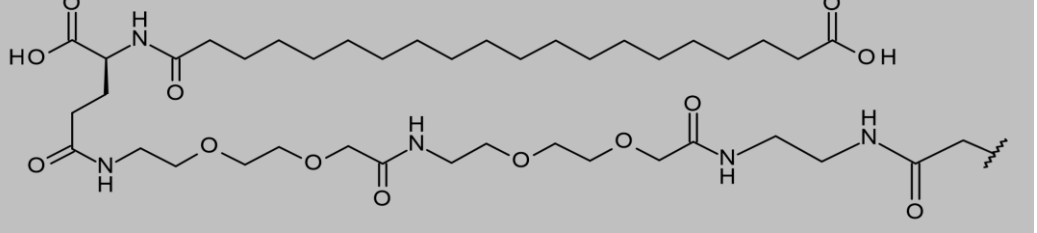
Quím. 22



Quím. 23



Quím. 24

	
Quím. 25	
Quím. 26	
Quím. 27	

En algunas modalidades, el sustituyente comprende un prolongador/resto de prolongación de acuerdo con el Quím. 1, en donde n es 14, 16 o 18; y opcionalmente un enlazador, en donde el enlazador comprende uno o más γ Glu (Quím. 2), y/o uno o más Ado (Quím. 3) y/o uno o más Gly (Quím. 4) y/o uno o más ϵ Lys (Quím. 5) y/o Quím. 6. En algunas modalidades, el sustituyente se selecciona de la Tabla 9. En modalidades preferidas, cada sustituyente es el Quím. 24.

En modalidades preferidas, el derivado polipeptídico comprende dos o más sustituyentes. Los dos o más sustituyentes pueden ser iguales o diferentes. En modalidades preferidas adicionales, el derivado polipeptídico comprende dos sustituyentes, en donde cada sustituyente se representa por el Quím. 24.

En algunas modalidades, el derivado polipeptídico se selecciona de la lista que consiste en el compuesto 1, el compuesto 2, el compuesto 3, el compuesto 4, el compuesto 5, el compuesto 6, el compuesto 7, el compuesto 8, el compuesto 9 y el compuesto 10. En una modalidad preferida, el derivado polipeptídico es el compuesto 9.

Los ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos se describen en la sección de Ejemplos y la Tabla 10.

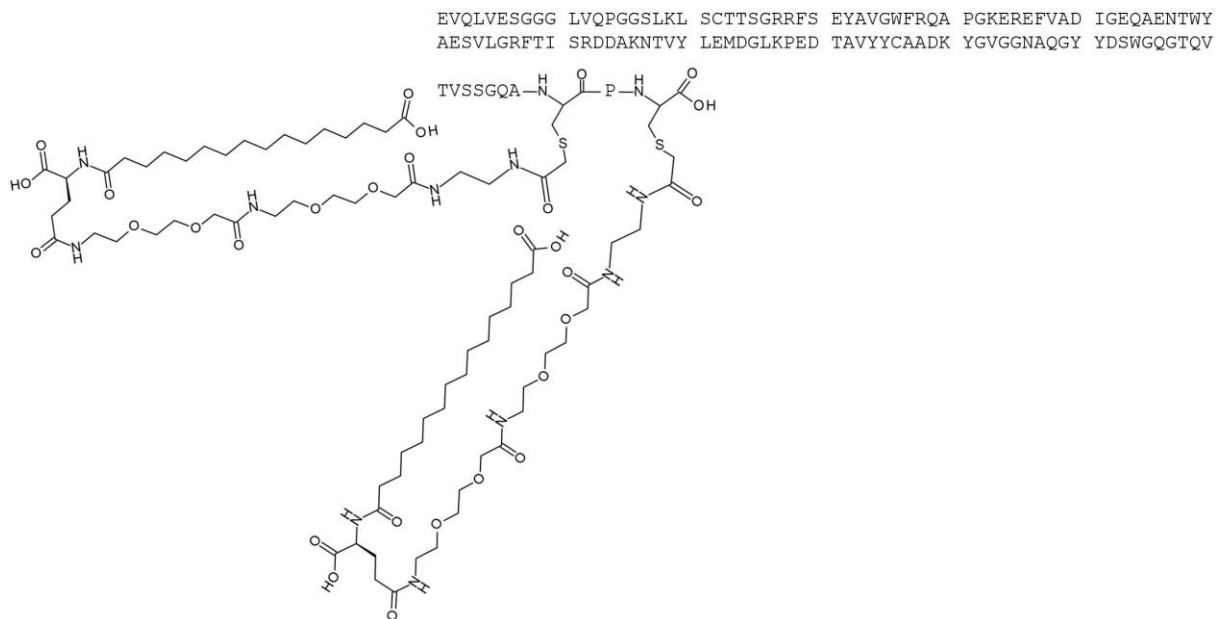
Tabla 10. Lista de ejemplos no limitantes de derivados polipeptídicos.

ID del compuesto	Sustituyente ¹	Polipéptido ²	
		V _H H	extensión
1	2xQuím. 24	V _H H_1.12; SEQ ID NO: 34	E2; SEQ ID NO: 72
2	2xQuím. 24	V _H H_1.13; SEQ ID NO: 35	E2; SEQ ID NO: 72
3	2xQuím. 24	V _H H_1.14; SEQ ID NO: 36	E2; SEQ ID NO: 72
4	2xQuím. 24	V _H H_1.1; SEQ ID NO: 23	E2; SEQ ID NO: 72
5	2xQuím. 24	V _H H_1.2; SEQ ID NO: 24	E2; SEQ ID NO: 72
6	2xQuím. 24	V _H H_1.3; SEQ ID NO: 25	E2; SEQ ID NO: 72
7	2xQuím. 24	V _H H_1.4; SEQ ID NO: 26	E2; SEQ ID NO: 72
8	2xQuím. 24	V _H H_1.5; SEQ ID NO: 27	E2; SEQ ID NO: 72
9	2xQuím. 24	V _H H_1.6; SEQ ID NO: 28	E2; SEQ ID NO: 72
10	2xQuím. 24	V _H H_1.7; SEQ ID NO: 29	E2; SEQ ID NO: 72
12	2xQuím. 24	V _H H_1.17; SEQ ID NO: 103	E2; SEQ ID NO: 72

¹ Los sitios de unión del sustituyente son Cys4 y Cys6 de E2 (SEQ ID NO: 72).

² El polipéptido consiste en un V_HH que tiene una extensión en su extremo C-terminal. Una estructura ilustrativa puede verse en la Figura 3A/3B, que muestra el Compuesto 9.

En una modalidad preferida, el derivado polipeptídico tiene una estructura como la siguiente:



(Quím. 31)

En algunas modalidades, el derivado polipeptídico tiene un peso molecular pequeño. En algunas modalidades, el peso molecular del derivado polipeptídico está entre 10 kDa y 20 kDa. En algunas modalidades, el peso molecular del derivado polipeptídico es de aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 11 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 13 kDa, aproximadamente 14 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 15,5 kDa, aproximadamente 16 kDa, aproximadamente 17

kDa, aproximadamente 18 kDa, aproximadamente 19 kDa o aproximadamente 20 kDa. En algunas modalidades, el peso molecular del derivado polipeptídico está entre 12-18 kDa, entre 13-17 kDa o 14-16 kDa. En modalidades preferidas, el peso molecular del derivado polipeptídico está entre 12-18 kDa. En una modalidad aún preferible, el peso molecular del derivado polipeptídico está entre 14-16 kDa. En una modalidad aún más preferible, el peso molecular del derivado polipeptídico es de aproximadamente 15,5 kDa. En algunas modalidades, el peso molecular del derivado polipeptídico es de aproximadamente 15 kDa.

Un experto en la técnica entiende que el derivado polipeptídico de la presente descripción puede ser capaz de unirse a IL-6 y proporcionar un efecto terapéutico mientras proporciona además un constructo de pequeño tamaño, tal como un peso molecular de entre 12-18 kDa, por ejemplo.

ANTICUERPOS O FRAGMENTOS DE ESTOS

En un cuarto aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un derivado polipeptídico, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo o el derivado polipeptídico es capaz de unirse a IL-6 en un epítipo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 26, 30, 33, 34, 73, 74, 75, 78, 171, 175, 178, 179, 182, y 183, como se establece en la SEQ ID NO: 89.

En modalidades preferidas, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo comprende triptófano en una posición que permite que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo forme la interacción catión-pi con Arg179 y/o la interacción hidrófoba con Phe78, como se establece en la SEQ ID NO: 89.

En modalidades preferidas, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo es un polipéptido o derivado polipeptídico que comprende un ISVD, en donde el ISVD comprende un triptófano en la posición 58 o 59.

En modalidades preferidas adicionales, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo es un polipéptido o derivado polipeptídico que comprende un ISVD, en donde el ISVD comprende un triptófano capaz de formar una interacción catión-pi con Arg179 y/o una interacción hidrófoba con Phe78, como se establece en la SEQ ID NO: 89.

En un aspecto adicional, la descripción se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un derivado de anticuerpo o un derivado polipeptídico, en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo o el derivado de anticuerpo o el derivado polipeptídico es capaz de unirse a IL-6 en un epítipo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 24, 27, 28, 31, 88, 92, 95, 99, 114, 116, 117, 118, 120, 121, 123, 124, 125, 127, 128, 138, y 139 como se establece en la SEQ ID NO: 89.

MÉTODOS Y USOS DEL ISVD/POLIPÉPTIDO/DERIVADO POLIPEPTÍDICO

En el quinto aspecto, la descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico, preferentemente en forma aislada, que codifica un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser ADN y/o ARN. El ADN genómico, ADNc, ARNm u otro ARN; de origen sintético, o cualquier combinación de los mismos puede codificar un ISVD o polipéptido de acuerdo con la descripción.

En el sexto aspecto, la descripción se refiere a un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con el quinto aspecto de la descripción.

En el séptimo aspecto, la invención se refiere a una célula huésped que porta un vector de expresión de acuerdo con el sexto aspecto de la descripción.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción, que comprende las etapas de e.

e. Cultivar una célula huésped de acuerdo con el séptimo aspecto de la descripción en condiciones que permitan la expresión de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción;

f. Recuperar el ISVD o el polipéptido que se obtiene en la etapa a; y/u opcionalmente

g. Unir uno o más sustituyentes capaces de extender la vida media del polipéptido, opcionalmente en donde cada sustituyente es el Quím. 24; y/u opcionalmente

h. purificar el ISVD o polipéptido o derivado polipeptídico obtenido de esta manera.

En algunas modalidades, los ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o los polipéptidos de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción se expresan con un rendimiento de al menos 0,5 g/l en el sobrenadante celular después de la fermentación inicial, preferentemente con un rendimiento de >1 g/l. En algunas modalidades, los ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o los polipéptidos de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción se expresan con un rendimiento de aproximadamente 0,5-5 g/l en el sobrenadante celular después de la fermentación inicial. La solubilidad debe ser > 5 mg/ml, preferentemente, > 20 mg/ml, sin agregación o degradación significativa de los ISVD o polipéptidos.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En un noveno aspecto, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la invención o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción. Preferentemente, la composición farmacéutica es para la administración oral.

En las modalidades preferidas, la composición farmacéutica es una forma de dosificación oral sólida, tal como una tableta.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un potenciador de la adsorción. En modalidades preferidas, el potenciador es una sal de ácido N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino) caprílico. En modalidades particularmente preferidas, el potenciador es N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (SNAC).

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un hidrótrofo. En modalidades preferidas, el hidrótrofo es nicotinamida.

En algunas modalidades, la composición comprende un lubricante. En modalidades preferidas, el lubricante es estearato de magnesio o fumarato de sodio.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un

derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción, SNAC, nicotinamida y opcionalmente un lubricante tal como estearato de magnesio o fumarato de sodio. En una modalidad preferida, la composición farmacéutica comprende el compuesto 9 (Tabla 10) y SNAC, y opcionalmente comprende además nicotinamida y un lubricante tal como por ejemplo estearato de magnesio; fumarato de sodio.

USO MÉDICO

En un décimo aspecto, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en medicina. En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria en donde el sujeto humano tiene o está en riesgo de tener una Proteína C-reactiva de alta sensibilidad (Hs-CRP) por encima de un valor de 1 mg/l, preferentemente por encima de un valor de 1,5 mg/l, con la máxima preferencia por encima o igual a un valor de 2 mg/l. En algunas modalidades, el sujeto humano tiene o está en riesgo de tener una Hs-CRP por encima o igual a un valor de 3 mg/l.

En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria en donde el sujeto humano tiene o está en riesgo de tener un valor de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) por encima o igual a 2 mg/l ($\text{hsCRP} \geq 2 \text{ mg/l}$). En algunas modalidades, el sujeto humano tiene o corre el riesgo de tener un valor de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) por encima o igual a 3 mg/l ($\text{hsCRP} \geq 3 \text{ mg/l}$).

En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de

acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD).

En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) definida como accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD).

En algunas modalidades, la descripción se refiere a un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD).

En algunas modalidades, la invención se refiere al uso de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD).

En algunas modalidades, la invención se refiere a un método para tratar una enfermedad inflamatoria el método que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad cardiovascular el método que comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad cardiovascular el método que comprende administrar a un sujeto que padece de enfermedad renal crónica (CKD) una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad cardiovascular, el método comprende administrar a un sujeto que padece de accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD) una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción

o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un método para tratar la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) el método comprende administrar a un sujeto que padece de accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD) una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con el primer aspecto de la descripción o un polipéptido de acuerdo con el segundo aspecto de la descripción o un derivado polipeptídico de acuerdo con el tercer aspecto de la descripción o una composición farmacéutica de acuerdo con el noveno aspecto de la descripción.

El término “tratamiento”, como se usa en la presente descripción, se refiere al tratamiento médico de cualquier sujeto humano que necesite de esto. El tratamiento puede ser preventivo, profiláctico, paliativo, sintomático y/o curativo. El momento y el propósito de dicho tratamiento pueden variar de un individuo a otro, de acuerdo con el estado de salud del sujeto.

LISTA DE MODALIDADES

La invención se describe adicionalmente mediante las siguientes modalidades no limitantes.

Dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD)

1. Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3), o una secuencia de aminoácidos con 1 o 2 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 3;

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7), o una secuencia de aminoácidos con 1, 2, 3 o 4 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 7;

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17), o una secuencia de aminoácidos con 1 o 2 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 17. (definición de Kabat)

2. Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que comprende una CDR1 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 6;

una CDR2 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16; y

una CDR3 seleccionada de la lista que consiste en la SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, y SEQ ID NO: 20. (definición de Kabat)

3. Un ISVD que comprende o que consiste en una secuencia de

X₁X₂QLVESGGGX₁₁VQPGGSLX₁₉LSCITSGRX₂₈FX₃₀X₃₁YAVGWFRQX₄₀PGX₄₃EREFVAX₅₀IGEX₅₄AX₅₆N TWYAX₆₂SVX₆₅GRFTISRDX₇₄AKNTVYLX₈₂MX₈₄X₈₅LKPEDTAVYYCAADX₁₀₀YGVGGX₁₀₆AQGYYSWGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO: 21),

en donde X₁ es Q o E; X₂ es L o V; X₁₁ es L o W, X₁₉ es K o Q; X₂₈ es R, T, E, H, o K; X₃₀ es S, Q, o D; X₃₁ es S o E; X₄₀ es A o G; X₄₃ es K o Q; X₅₀ es D o E; X₅₄ es Q, N, T, o E; X₅₆ es E o D; X₆₂ es H o E; X₆₅ es K o L; X₇₄ es E, N o D; X₈₂ es E o Q; X₈₄ es D o N; X₈₅ es G o S; X₁₀₀ es K o S; y X₁₀₆ es N o G. (numeración

consecutiva)

4. El ISVD de acuerdo con la modalidad 3, en donde X_1 es Q.
5. El ISVD de acuerdo con la modalidad 3, en donde X_1 es E.
6. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 5, en donde X_{11} es L.
7. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 5, en donde X_{11} es W.
8. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 7, en donde X_{19} es K.
9. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 7, en donde X_{19} es Q.
10. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 9, en donde X_{28} es R.
11. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 9, en donde X_{28} es T.
12. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 9, en donde X_{28} es E.
13. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 9, en donde X_{28} es H.
14. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 9, en donde X_{28} es K.
15. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 14, en donde X_{30} es S.
16. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 14, en donde X_{30} es Q.
17. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 14, en donde X_{30} es D.
18. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 17, en donde X_{31} es S.
19. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 17, en donde X_{31} es E.
20. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 17, en donde X_{40} es A.
21. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 17, en donde X_{40} es G.
22. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 21, en donde X_{43} es K.
23. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 21, en donde X_{43} es Q.
24. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 23, en donde X_{50} es D.
25. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 23, en donde X_{50} es E.
26. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 25, en donde X_{54} es Q.
27. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 25, en donde X_{54} es N.
28. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 25, en donde X_{54} es T.
29. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 25, en donde X_{54} es E.
30. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 29, en donde X_{56} es E.
31. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 29, en donde X_{56} es D.
32. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 31, en donde X_{62} es H.
33. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 31, en donde X_{62} es E.
34. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 33, en donde X_{65} es K.
35. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 33, en donde X_{65} es L.
36. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 35, en donde X_{74} es E.
37. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 35, en donde X_{74} es N.
38. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 35, en donde X_{74} es D.
39. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 38, en donde X_{82} es E.
40. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 38, en donde X_{82} es Q.

41. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 40, en donde X_{84} es D.
42. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 40, en donde X_{84} es N.
43. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 42, en donde X_{85} es G.
44. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 42, en donde X_{85} es S.
45. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 44, en donde X_{100} es K.
46. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 44, en donde X_{100} es S.
47. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 46, en donde X_{106} es N.
48. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 46, en donde X_{106} es G.
49. Una ISVD que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, o SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, o SEQ ID NO: 103.
50. Una ISVD que comprende o que consiste en la SEQ ID NO: 38.
51. Un ISVD que comprende o que consiste en
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGEQAENTWYAESVLGRF
TISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 28).
52. Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que comprende la secuencia de aminoácidos:
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGEQAENTWYAESVLGRF
TISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 28).
53. Un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) que consiste en la secuencia de aminoácidos:
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGEQAENTWYAESVLGRF
TISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGNAQGYDSWGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 28).
54. Un ISVD comprende o consiste en una secuencia que tiene al menos 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 38 o la SEQ ID NO: 28.
55. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):
CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);
CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y/o
CDR3: DKYGVGGNAQGYDS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)
56. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):
CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);
CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y
CDR3: DKYGVGGNAQGYDS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)
57. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de

región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGENAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 8); y/o

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)

58. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGENAENTWYAHSVLG (SEQ ID NO: 9); y/o

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)

59. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAHSVLG (SEQ ID NO: 12); y/o

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)

60. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y/o

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)

61. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAHSVLG (SEQ ID NO: 12); y/o

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)

62. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGENAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 8); y/o

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat)

63. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAMA (SEQ ID NO: 5);

CDR2: DIGESGGTWYADSVKG (SEQ ID NO: 14); y/o

CDR3: DSYGVGGGAERYYS (SEQ ID NO: 19). (definición de Kabat)

64. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: SYAVG (SEQ ID NO: 4);

CDR2: DIGENADNTWYAHSVKG (SEQ ID NO: 15); y/o

CDR3: DSYGVGGGAQGYYS (SEQ ID NO: 18). (definición de Kabat)

65. El ISVD de acuerdo con la modalidad 2, en donde el ISVD tiene las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: NYWMY (SEQ ID NO: 6);

CDR2: GINTGGSTPDYADSVKG (SEQ ID NO: 16); y/o

CDR3: DTPRVFRLDHYS (SEQ ID NO: 20). (definición de Kabat)

66. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 65, en donde el ISVD comprende una o más sustitución(es).

67. El ISVD de acuerdo con la modalidad 66, en donde la(s) sustitución(es) es(son) sustituciones conservadoras.

68. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-67, en donde el ISVD es un ISVD aislado.

69. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-68, en donde el ISVD es un V_HH, tal como V_HH humanizado.

70. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-69, en donde el ISVD es capaz de unirse a IL-6, preferentemente hIL-6 (SEQ ID NO: 89).

71. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-70, en donde el ISVD tiene un parátipo que comprende los residuos de aminoácidos D50, E53, N54, N57, T58, W59, Y60, K65, D99, Y101, G102, V103, G104, G105, G106, y Y110 (numeración consecutiva) o en donde el ISVD tiene un parátipo que comprende los residuos de aminoácidos D50, E53, Q54, N57, T58, W59, L65, D99, Y101, G102, V103, G104, G105, N106, y Y110 (numeración consecutiva).

72. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el ISVD tiene un pI en el intervalo de 3-6.

73. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el ISVD tiene un pI en el intervalo de 3,5-5,5.

74. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el ISVD tiene un pI en el intervalo de 4,0-5,0.

75. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el ISVD tiene un pI en el intervalo de 4,5-5,0.

76. El ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-71, en donde el ISVD tiene un pI de aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4 o aproximadamente 5,5.

Polipéptido

77. Un polipéptido que comprende un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 y una extensión.

78. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 77, en donde la extensión es una extensión C-terminal.
79. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 77, en donde la extensión es una extensión N-terminal.
80. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 77, en donde la extensión se proporciona entre el C-terminal y el N-terminal del ISVD.
81. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-80, en donde la extensión es de 1 a 6 residuos de aminoácidos de longitud.
82. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-80, en donde la extensión es de 1 a 10 residuos de aminoácidos de longitud.
83. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-80, en donde la extensión es de 1 a 20 residuos de aminoácidos de longitud.
84. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-80, en donde la extensión es de 1 a 13 residuos de aminoácidos de longitud.
85. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-84, en donde la extensión es de 4 a 6 residuos de aminoácidos de longitud.
86. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-85, en donde la extensión es de 4 residuos de aminoácidos de longitud.
87. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-85, en donde la extensión es de 5 residuos de aminoácidos de longitud.
88. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-85, en donde la extensión es de 6 residuos de aminoácidos de longitud.
89. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-88, en donde la extensión comprende un residuo de aminoácido cisteína.
90. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-88, en donde la extensión comprende dos residuos de aminoácidos de cisteína.
91. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-88, en donde la extensión comprende dos o más residuos de aminoácidos.
92. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-88, en donde la extensión comprende un residuo de aminoácido capaz de reaccionar con un resto que extiende la vida media.
93. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-88, en donde la extensión comprende dos residuos de aminoácidos capaces de reaccionar con un resto que extiende la vida media.
94. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 93, en donde cada uno de los dos residuos de aminoácidos se selecciona de Lys o Cys.
95. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 93, en donde cada uno de los dos residuos de aminoácidos es una Cys.
96. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-91, en donde la extensión comprende un al menos un residuo de aminoácido capaz de reaccionar con un sustituyente.

97. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 96, en donde el al menos un residuo de aminoácido capaz de reaccionar con un sustituyente es al menos 2 residuos de aminoácidos capaces de reaccionar con un sustituyente.
98. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 96-97, en donde cada uno de los al menos un residuo de aminoácido se selecciona de Lys y Cys.
99. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 96-97, en donde cada uno de los al menos un residuo de aminoácido es una Cys.
100. Los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-84 y 91-94, en donde la extensión comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 72, 71, 90, 91, 92, 93.
101. Los polipéptidos de acuerdo con la modalidad 100, en donde la extensión comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 72, 90, 91, 92, 93.
102. Los polipéptidos de acuerdo con la modalidad 100, en donde la extensión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No. 72.
103. Los polipéptidos de acuerdo con la modalidad 100, en donde la extensión consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No. 72.
104. Los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-84 y 91-94, en donde la extensión comprende 4 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia que se expone en la SEQ ID No. 72.
105. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 104, en donde la extensión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No. 128.
106. Los polipéptidos de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77-84 y 91-94, en donde la extensión comprende 5 residuos de aminoácidos contiguos de la secuencia que se expone en la SEQ ID No. 72.
107. El polipéptido de acuerdo con la modalidad 106, en donde la extensión comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No. 129.
108. El polipéptido de acuerdo con las modalidades 69 o 70, en donde la extensión comprende o consiste en los residuos de aminoácidos GQACPC (SEQ ID NO: 72).
109. El polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 69 a 83, en donde el polipéptido es capaz de unirse a IL-6, preferentemente hIL-6 (SEQ ID NO: 89).

Derivado polipeptídico

110. Un derivado polipeptídico que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las modalidades 77 a 109, en donde el derivado polipeptídico comprende un sustituyente.
111. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 110, en donde el sustituyente es capaz de extender la vida media y/o unir la albúmina.
112. Un derivado polipeptídico que comprende un ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las modalidades 77 a 109, en donde el

derivado polipeptídico comprende dos sustituyentes.

113. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 112, en donde al menos uno de los dos sustituyentes es capaz de extender la vida media y/o unir la albúmina.

114. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 112, en donde cada uno de los dos sustituyentes es capaz de extender la vida media y/o unir la albúmina.

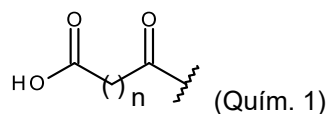
115. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 112, en donde cada uno de los dos sustituyentes es capaz de extender la vida media en comparación con ISVD o polipéptido sin el sustituyente.

116. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 112, en donde cada uno de los dos sustituyentes es capaz de unirse a la albúmina.

117. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 112, en donde cada/sustituyente es un resto de extensión de vida media.

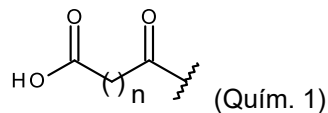
118. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 117, en donde cada/sustituyente comprende el Quím. 1.

119. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 117, en donde el sustituyente comprende



en donde $n = 12, 14, 16, 18$ o 20 .

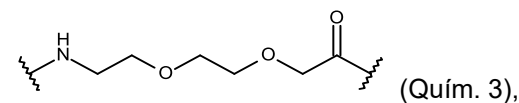
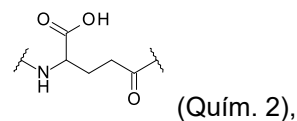
120. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 112 a 117, en donde cada uno de los dos sustituyentes comprende

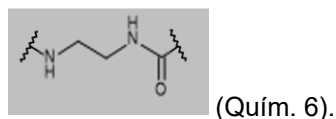
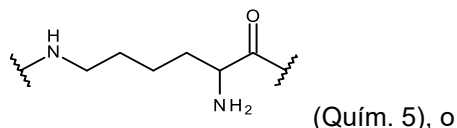
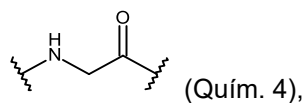


en donde $n = 12, 14, 16, 18$ o 20 .

121. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 120, en donde cada/sustituyente comprende además uno o más de Quím. 2, Quím. 3, Quím. 4, Quím. 5, o Quím. 6.

122. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 120, en donde cada/sustituyente comprende además uno o más de





123. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 122, en donde cada/sustituyente comprende o consiste esencialmente de un resto de prolongación y al menos un enlazador.

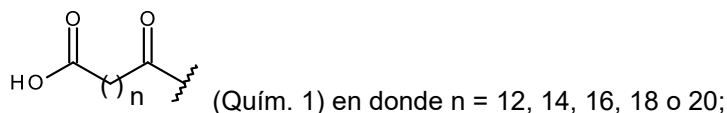
124. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 122, en donde cada/sustituyente comprende un resto de prolongación y al menos un enlazador.

125. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 122, en donde cada/sustituyente comprende un resto de prolongación y un enlazador.

126. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 123-125, en donde el resto de prolongación es

Quím. 1; $\text{HOOC-benceno-O-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO}^*$; o $\text{HO-S(=O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO}^*$; y en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18.

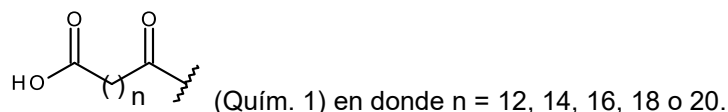
127. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 123-125, en donde el resto de prolongación comprende



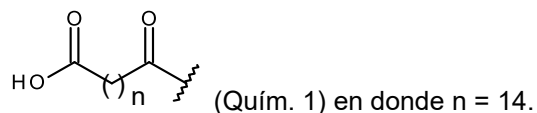
$\text{HOOC-benceno-O-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO}^*$, en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18; o

$\text{HO-S(=O)}_2\text{-(CH}_2\text{)}_x\text{-CO}^*$, en donde x es un número entero en el intervalo de 8-18.

128. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 123-127, en donde el resto de prolongación comprende

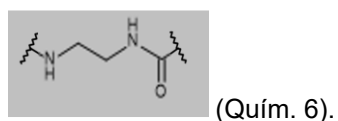
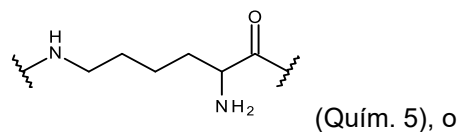
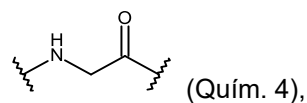
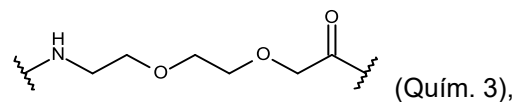
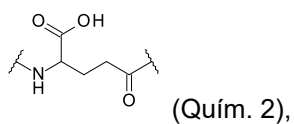


129. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 123-127, en donde el resto de prolongación comprende



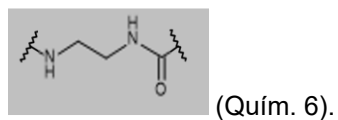
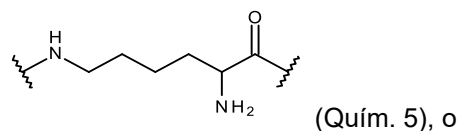
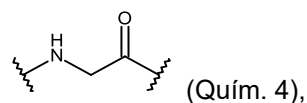
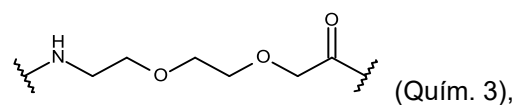
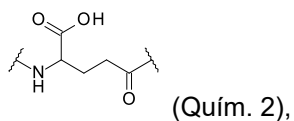
130. El derivado polipeptídico de acuerdo con las modalidades 121 o la modalidad 123, en donde el enlazador comprende uno o más de Quím. 2, Quím. 3, Quím. 4, Quím. 5, o Quím. 6.

131. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 123-129, en donde el enlazador comprende uno o más de



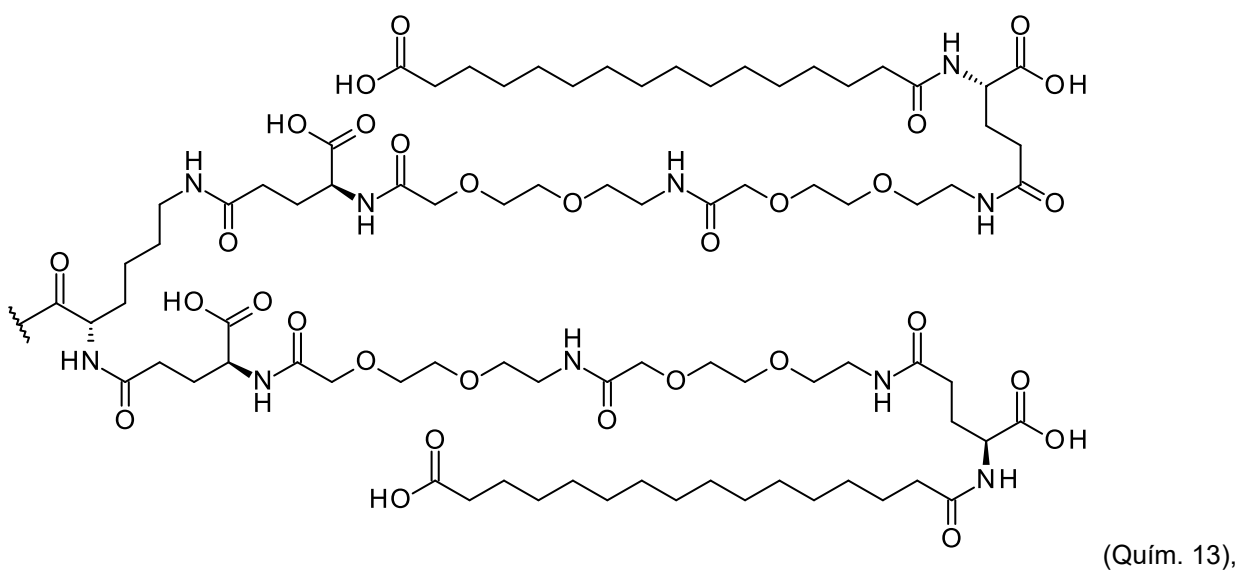
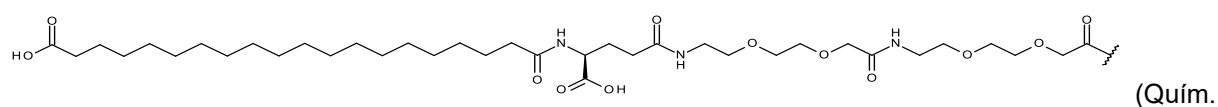
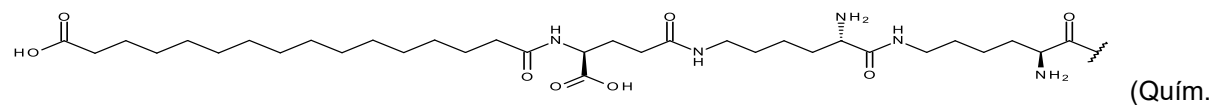
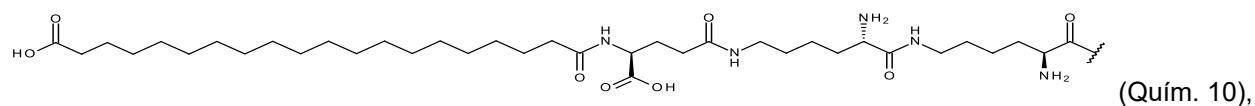
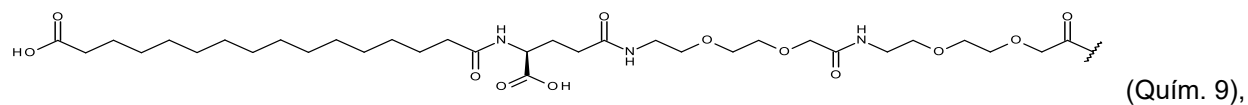
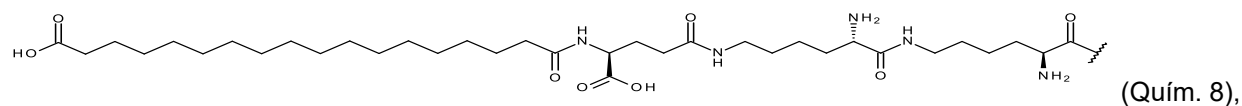
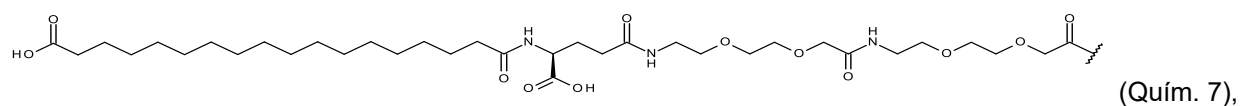
132. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 123-131, en donde el al menos un enlazador se compone de uno o más elementos enlazadores.

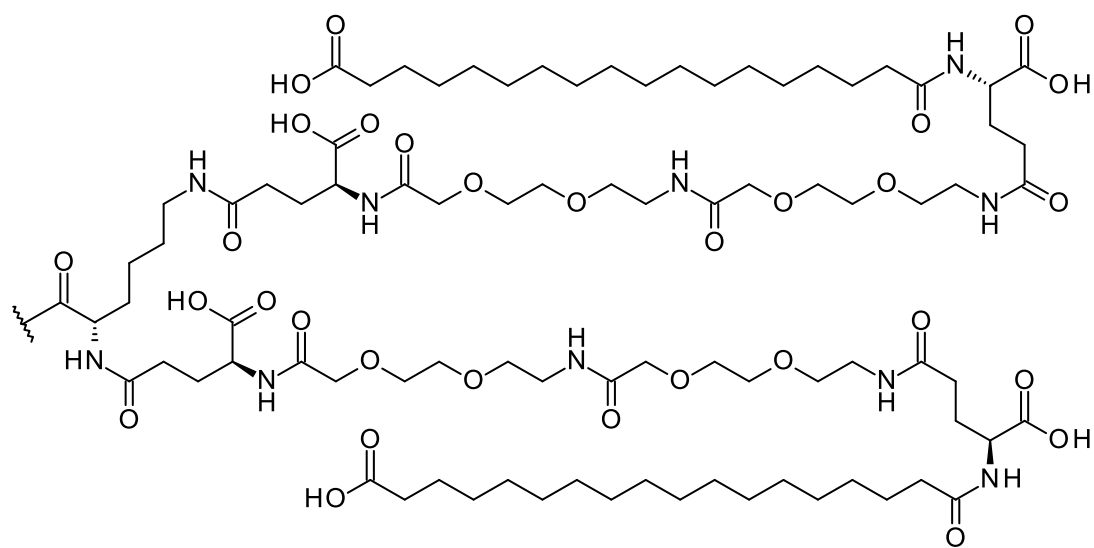
133. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 132, en donde los elementos enlazadores se seleccionan de



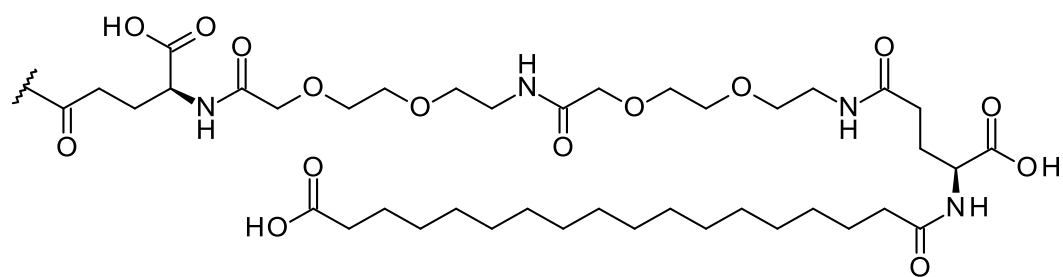
134. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 133, en donde cada/del sustituyente se selecciona de Quím. 7, Quím. 8, Quím. 9, Sustancia Quím. 10, Sustancia Quím. 11, Sustancia Quím. 12, Sustancia Quím. 13, Sustancia Quím. 14, Quím. 15., Quím. 16, Quím. 17, Quím. 18, Quím. 19, Quím. 20, Quím. 21, Quím. 22, Quím. 23 y Quím. 24.

135. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 133, en donde cada/sustituyente se selecciona de

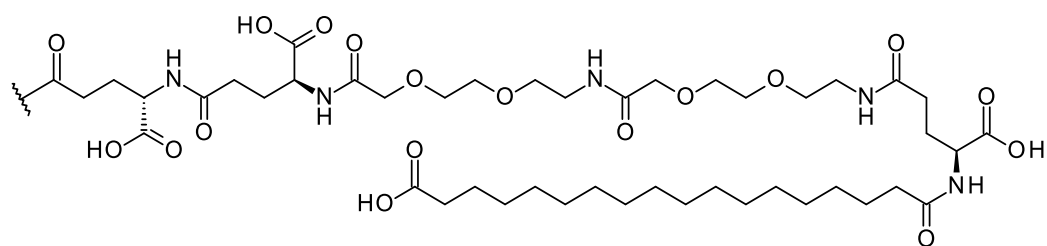




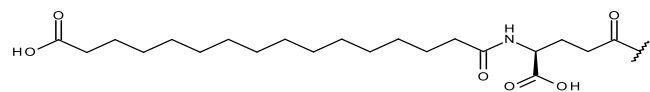
(Quím. 14),



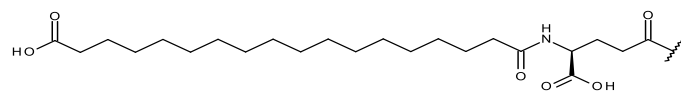
(Quím. 15),



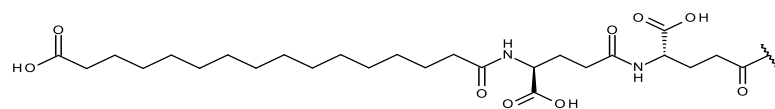
(Quím. 16),



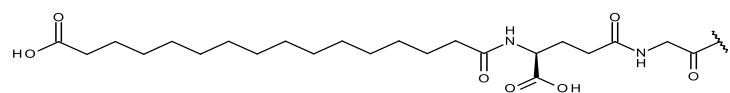
(Quím. 17),



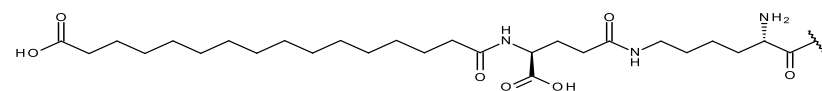
(Quím. 18),



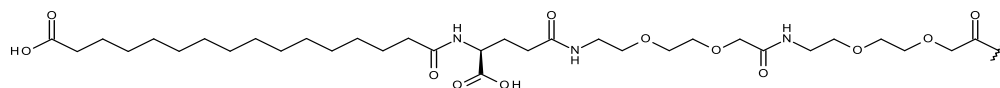
(Quím. 19),



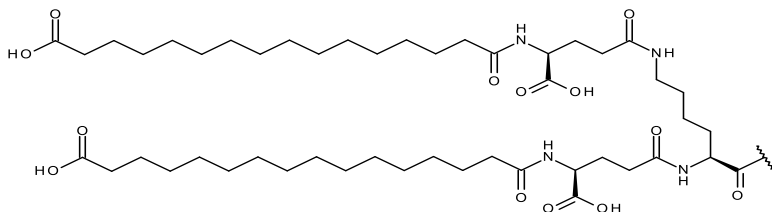
(Quím. 20),



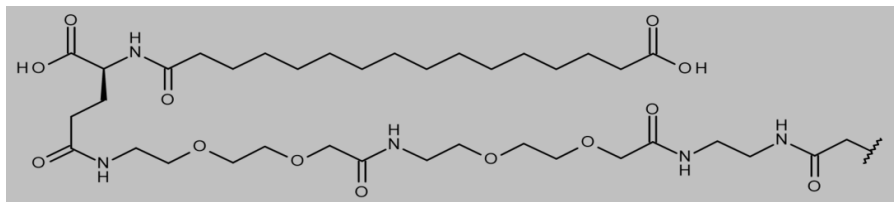
(Quím. 21),



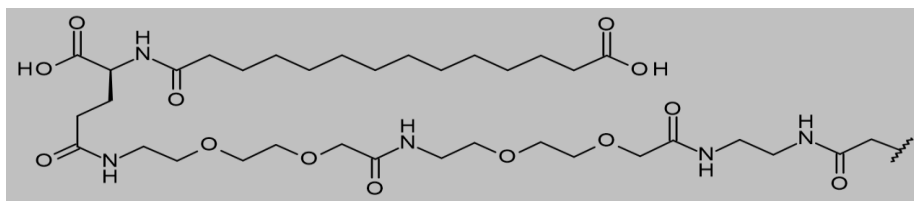
(Quím. 22),



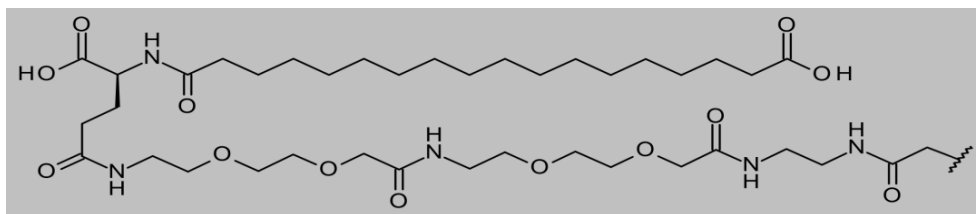
(Quím. 23),



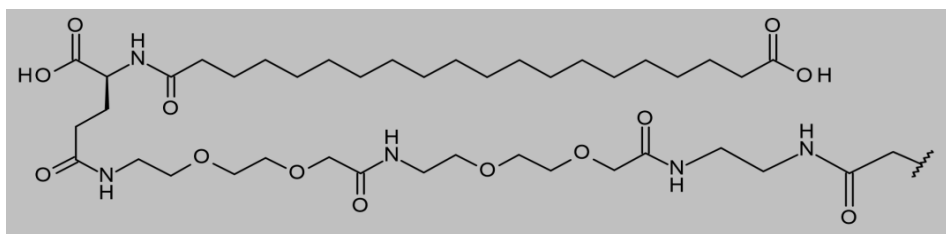
(Quím. 24),



(Quím. 25),

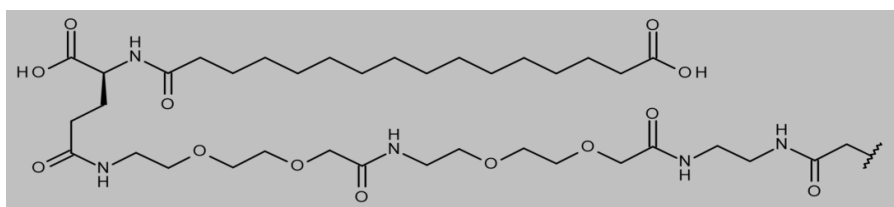


(Quím. 26), y

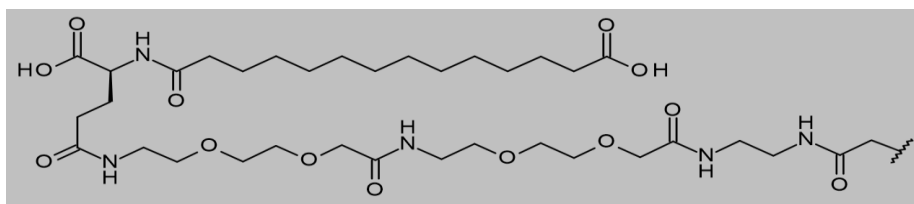


(Quím. 27),

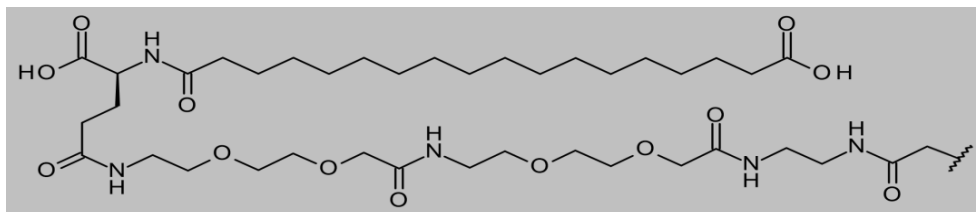
136. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 135, en donde cada/el sustituyente se selecciona de



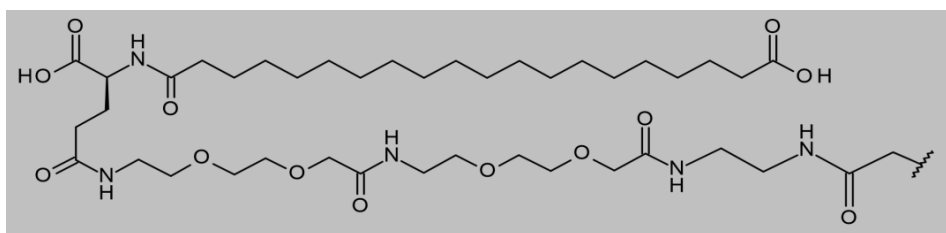
(Quím. 24),



(Quím. 25),

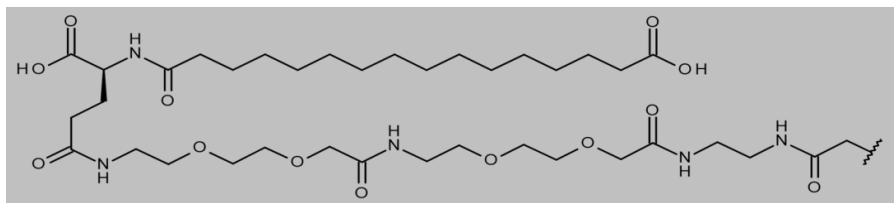


(Quím. 26), y



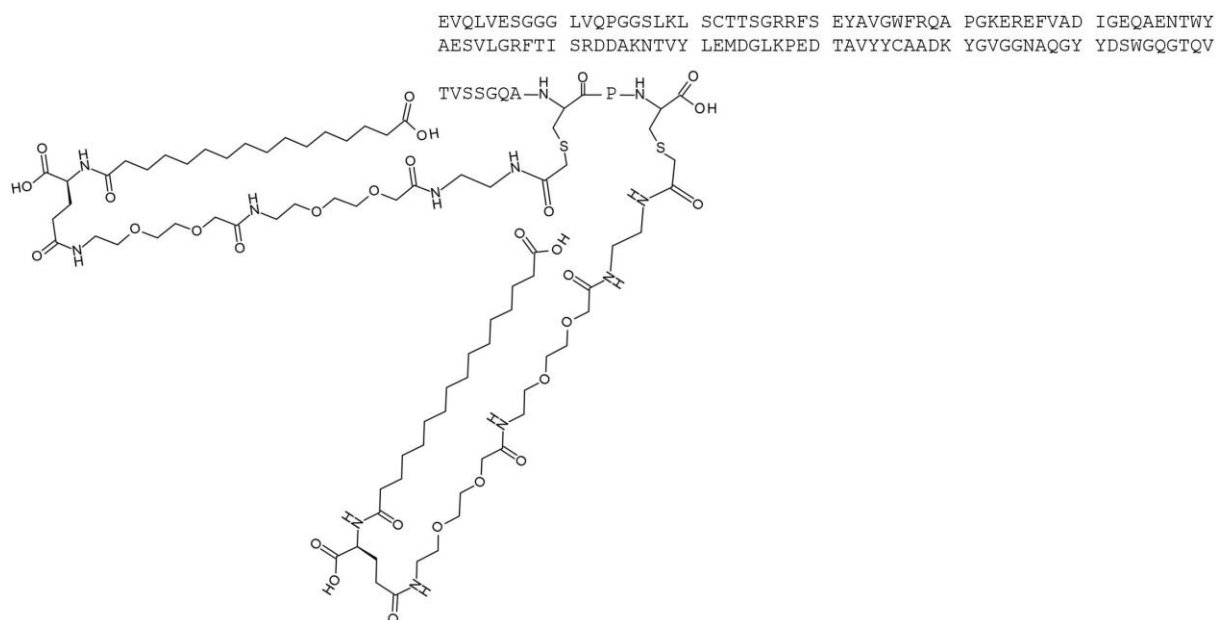
(Quím. 27)

137. El derivado polipeptídico de acuerdo con la modalidad 135, en donde cada/sustituyente es



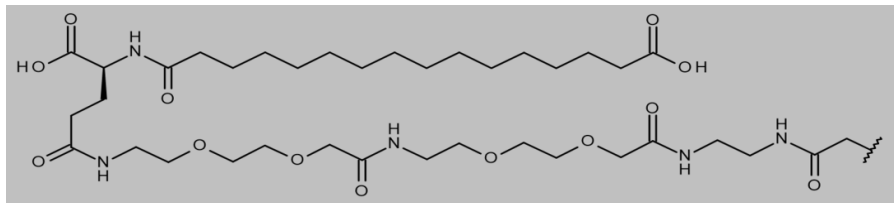
(Quím. 24).

138. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 137 que tiene la estructura de Quím. 31:



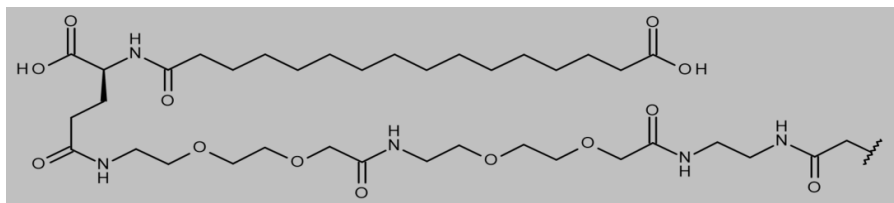
139. Un derivado polipeptídico que comprende un ISVD de SEQ ID NO: 28, en donde el ISVD se

140. Un derivado polipeptídico que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) de la SEQ ID NO: 28, en donde el ISVD se fusiona con una extensión C-terminal que consiste en la SEQ ID NO: 72, y en donde cada cisteína de la extensión C-terminal lleva un sustituyente que comprende la estructura



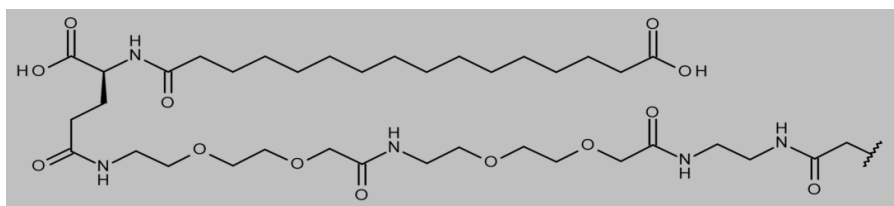
141. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión y dos sustituyentes, en donde el ISVD comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

en donde cada uno de los sustituyentes se une a una cisteína de la extensión y cada uno de los sustituyentes comprende la estructura



142. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión y dos sustituyentes, en donde el ISVD comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

en donde un primer sustituyente se une a la cisteína en la posición 4 de la extensión, un segundo sustituyente se une a la cisteína en la posición 6 de la extensión, y cada uno de los sustituyentes comprende la estructura



(Quím. 24).

143. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión, un primer sustituyente y un segundo sustituyente, en donde el ISVD comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17) (definición de Kabat),

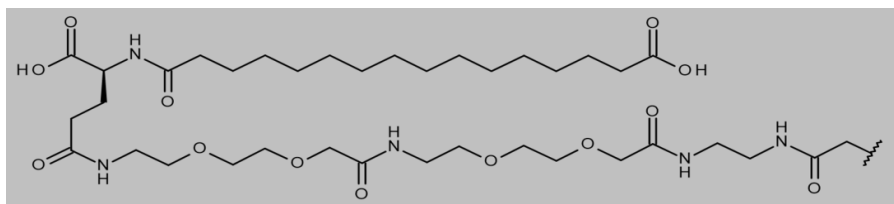
en donde la extensión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No.

72 con una cisteína en la posición 4 y la posición 6, y la extensión se une al C-terminal del ISVD,

en donde el primer sustituyente se une a la cisteína en la posición 4 de la extensión y el segundo

sustituyente se une a la cisteína en la posición 6 de la extensión, y

en donde cada uno del primer sustituyente y el segundo sustituyente comprende la estructura



(Quím. 24).

144. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión, un primer sustituyente y un segundo sustituyente, en donde el ISVD comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y

CDR3: DKYGVGGNAQGYYS (SEQ ID NO: 17) (definición de Kabat),

en donde la extensión comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No.

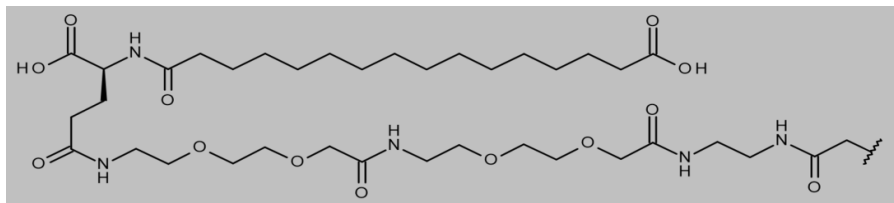
72 con una cisteína en la posición 4 y la posición 6 de la SEQ ID No. 72, y la extensión se une al C-

terminal del ISVD,

en donde el primer sustituyente se une a la cisteína en la posición 4 de la SEQ ID No. 72 y el segundo

sustituyente se une a la cisteína en la posición 6 de la SEQ ID No. 72, y

en donde cada uno del primer sustituyente y el segundo sustituyente comprende la estructura



(Quím. 24).

145. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un V_HH, una extensión, un

primer sustituyente y un segundo sustituyente, en donde el V_HH comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

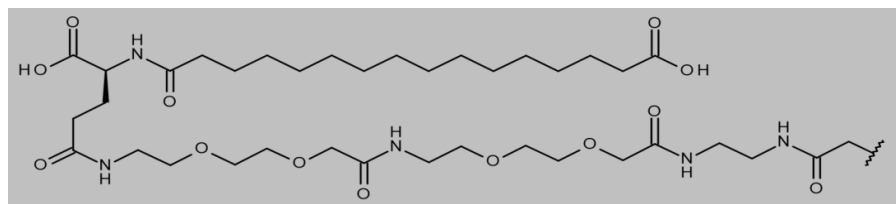
CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y

CDR3: DKYGVGGNAQGYDS (SEQ ID NO: 17) (definición de Kabat),

en donde la extensión se une al C-terminal del V_HH y comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No. 72,

en donde el primer sustituyente se une a una cisteína en la posición 4 de la SEQ ID No 72 y el segundo sustituyente se une a una cisteína en la posición 6 de la SEQ ID No 72, y

en donde cada uno del primer sustituyente y el segundo sustituyente comprende la estructura



(Quím. 24).

146. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión y dos sustituyentes, en donde el ISVD comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR)

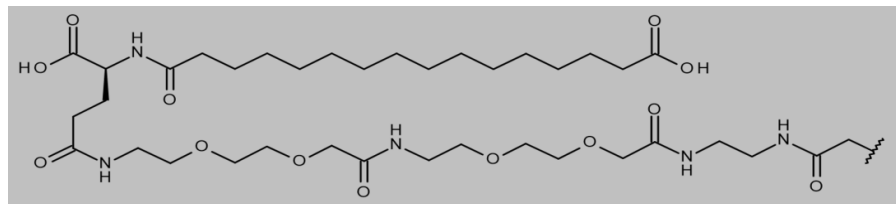
CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y

CDR3: DKYGVGGNAQGYDS (SEQ ID NO: 17) (definición de Kabat),

en donde la extensión se une al C-terminal del ISVD y consiste en una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No. 72, y

en donde cada uno de los sustituyentes se une a una cisteína y comprende la estructura



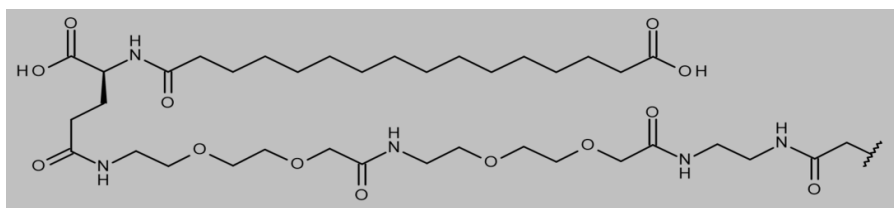
(Quím. 24).

147. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión y dos sustituyentes,

en donde el ISVD comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No 28, en

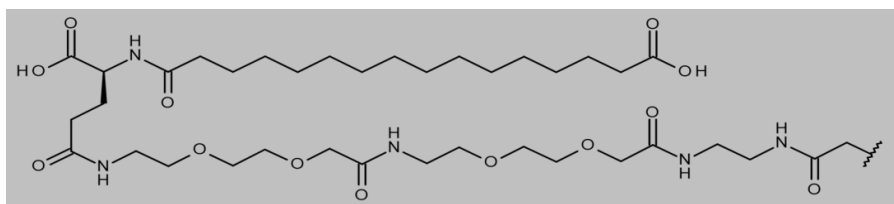
donde la extensión se une al C-terminal del ISVD y comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No 72, y

en donde cada uno de los sustituyentes se une a una cisteína de la extensión y comprende la estructura



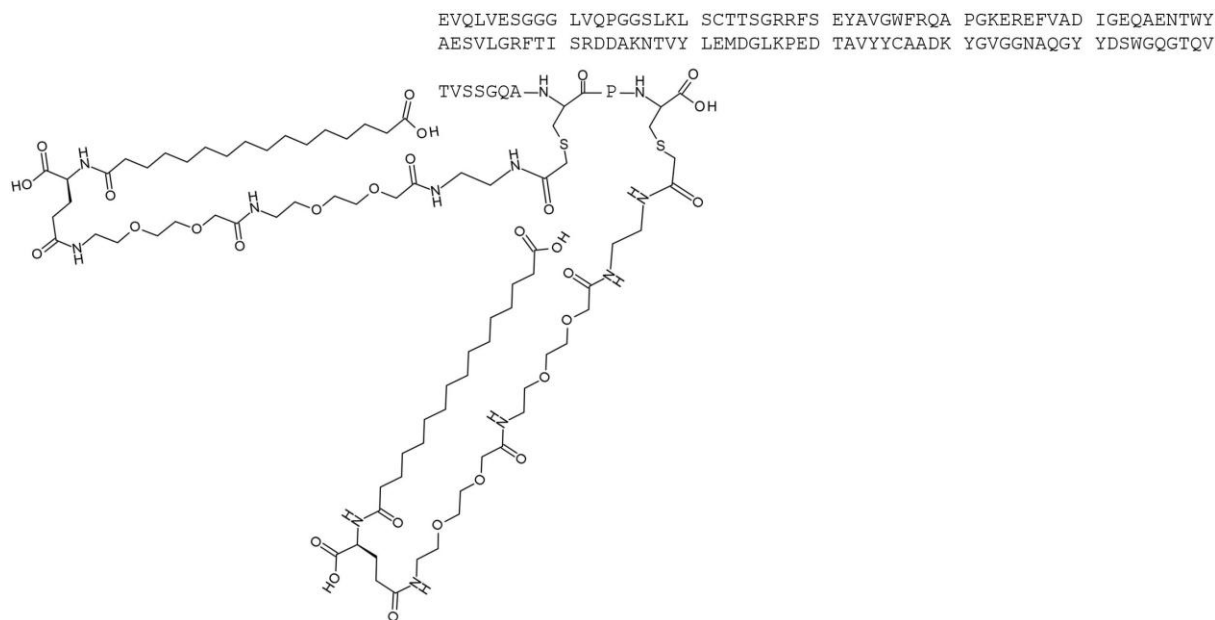
(Quím. 24)

148. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD), una extensión y dos sustituyentes, en donde el ISVD comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No 28, en donde la extensión se une al C-terminal del ISVD y comprende una secuencia de aminoácidos como se establece en la SEQ ID No 72, y en donde un primer sustituyente se une a la cisteína en la posición 4 de la extensión, un segundo sustituyente se une a la cisteína en la posición 6 de la extensión, y cada uno de los sustituyentes comprende la estructura



(Quím. 24).

149. Un derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 que tiene la estructura de Quím. 31:



150. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 149, en donde el ISVD es un V_HH, preferentemente un V_HH humanizado.

151. Los derivados polipeptídicos de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 150, en donde el derivado polipeptídico tiene una potencia *in vitro* de aproximadamente 1-50 pM.

152. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 150, en donde el

165. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el

peso molecular de dicho derivado polipeptídico está entre 12-18 kDa.

166. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el peso molecular de dicho derivado polipeptídico está entre 14-16 kDa.

167. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el peso molecular de dicho derivado polipeptídico es de aproximadamente 10 kDa, aproximadamente 11 kDa, aproximadamente 12 kDa, aproximadamente 13 kDa, aproximadamente 14 kDa, aproximadamente 15 kDa, aproximadamente 16 kDa, aproximadamente 17 kDa, aproximadamente 18 kDa, aproximadamente 19 kDa o aproximadamente 20 kDa.

168. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el peso molecular de dicho derivado polipeptídico es de 14 kDa.

169. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el peso molecular de dicho derivado polipeptídico es de aproximadamente 15 kDa.

170. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el peso molecular de dicho derivado polipeptídico es de aproximadamente 15,5 kDa.

171. El derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110 a 163, en donde el peso molecular de dicho derivado polipeptídico es de 16 kDa.

172. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 171, en donde el derivado polipeptídico tiene un pI en el intervalo de 3,5-5,5, tal como 4,0-5,0.

173. El derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 171, en donde el derivado polipeptídico tiene un pI de aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,5.

Modalidades adicionales

174. Una molécula de ácido nucleico, preferentemente en forma aislada, que codifica un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109.

175. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la modalidad 174.

176. Una célula huésped que porta un vector de expresión de acuerdo con la modalidad 175.

177. Un método para fabricar un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110-173, que comprende las etapas de

i. Cultivar una célula huésped de acuerdo con la modalidad 176 en condiciones que permiten la expresión de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109;

- j. Recuperar el ISVD o el polipéptido;
- k. Unir opcionalmente uno o más sustituyentes capaces de extender la vida media del polipéptido, opcionalmente en donde cada sustituyente es el Quím. 24; y
- l. Purificar opcionalmente el ISVD o polipéptido o derivado polipeptídico obtenido.

178. Un ISVD aislado para su uso como un intermediario en la fabricación de un derivado polipeptídico anti-IL6 que comprende las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3), o una secuencia de aminoácidos con 1 o 2 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 3;

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7), o una secuencia de aminoácidos con 1, 2 o 3 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 7

CDR3: DKYGVGGNAQGYDS (SEQ ID NO: 17), o una secuencia de aminoácidos con 1 o 2 diferencia(s) de aminoácido(s) con la SEQ ID NO: 17. (definición de Kabat).

179. Un dominio variable único de inmunoglobulina aislado (ISVD) para su uso como intermediario en la fabricación de un derivado polipeptídico anti-IL6 que comprende las siguientes secuencias de región determinante de complementariedad (CDR):

CDR1: EYAVG (SEQ ID NO: 3);

CDR2: DIGEQAENTWYAESVLG (SEQ ID NO: 7); y

CDR3: DKYGVGGNAQGYDS (SEQ ID NO: 17). (definición de Kabat).

Composición farmacéutica

180. Una composición farmacéutica que comprende un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110-173.

181. Una composición farmacéutica oral que comprende un ISVD de acuerdo con cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con cualquiera de las modalidades 110-173.

182. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 181, en donde la composición comprende un potenciador de adsorción.

183. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 181 o la modalidad 182, en donde la composición comprende una sal de ácido N-(8-2-hidroxibenzoil)amino) caprílico.

184. La composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 181 o la modalidad 182, que comprende N-(8-(2-hidroxibenzoil)amino)caprilato de sodio (SNAC).

185. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 181 a 184, que comprende además nicotinamida.

186. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 181 a 185, en donde dicha composición es una composición sólida.

Uso médico

187. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo

con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en la medicina.

188. Un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110-173 para su uso en la medicina.

189. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

190. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en donde el sujeto humano tiene o está en riesgo de tener una Proteína C-reactiva de Alta Sensibilidad (Hs-CRP) por encima de un valor de 1 mg/l, preferentemente por encima de un valor de 1,5 mg/l.

191. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en donde el sujeto humano tiene o está en riesgo de tener un valor de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (Hs-CRP) por encima o igual a 2 mg/l ($\text{hsCRP} \geq 2 \text{ mg/l}$).

192. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular.

193. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

194. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD) definida como accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD).

195. Un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD).

196. Uso de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, tal como, por ejemplo, la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

197. Uso de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de

acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad cardiovascular, tal como para el tratamiento del accidente cerebrovascular y/o el infarto de miocardio (MI) y/o la enfermedad arterial periférica (PAD).

198. Uso de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria.

199. Un método para tratar la enfermedad inflamatoria, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

200. Un método para tratar la enfermedad inflamatoria, el método comprende administrar a un sujeto que tiene una proteína C-reactiva de alta sensibilidad (Hs-CRP) por encima de un valor de 1 mg/l, preferentemente por encima de un valor de 1,5 mg/l, una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

201. Un método para tratar la enfermedad inflamatoria, el método comprende administrar a un sujeto que tiene un valor de proteína C-reactiva de alta sensibilidad (Hs-CRP) por encima o igual a 2 mg/l una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

202. Un método para tratar la enfermedad cardiovascular, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

203. Un método para tratar la enfermedad cardiovascular, el método comprende administrar a un sujeto que padece de accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD) una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

204. Un método para tratar la enfermedad cardiovascular, el método comprende administrar a un sujeto que padece de enfermedad renal crónica una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

205. Un método para tratar la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, el método comprende administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las

modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

206. Un método para tratar la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, el método comprende administrar a un sujeto que padece de accidente cerebrovascular y/o infarto de miocardio (MI) y/o enfermedad arterial periférica (PAD) una cantidad efectiva de un ISVD de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 76 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 77 a 109 o un derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 110 a 173.

Epítopo

207. Un ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 en un epítopo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 26, 30, 33, 34, 74, 75, 78, 171, 175, 178, 179, 182 y 183, como se establece en la SEQ ID NO: 89. (Numeración consecutiva)

208. Un ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 en un epítopo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 26, 30, 33, 34, 73, 74, 75, 78, 171, 175, 178, 179, 182 y 183, como se establece en la SEQ ID NO: 89. (Numeración consecutiva)

209. El ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 173, que comprende un residuo de triptófano capaz de formar una interacción catión-pi con Arg179 y/o una interacción hidrófoba con Phe78, como se establece en la SEQ ID NO: 89. (Numeración consecutiva)

210. Un ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 en un epítopo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 24, 27, 28, 31, 88, 92, 95, 99, 114, 116, 117, 118, 120, 121, 132, 124, 125, 127, 128, y 139 como se establece en la SEQ ID NO: 89. (Numeración consecutiva)

211. Un ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico capaz de unirse a IL-6 en un epítopo que comprende al menos los residuos de aminoácidos 24, 27, 28, 31, 88, 92, 95, 99, 114, 116, 117, 118, 120, 121, 132, 124, 125, 127, 128, 138, y 139 como se establece es la SEQ ID NO: 89. (Numeración consecutiva)

212. Un ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico que se une a hIL-6 (SEQ ID NO: 89) con una K_D de 10-60 pM, tal como 11-40 pM, tal como 12-30 pM.

213. El ISVD, polipéptido, o derivado polipeptídico de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 173, capaz de unirse a hIL-6 (SEQ ID NO: 89) con una K_D de 10-60 pM, tal como 11-40 pM, tal como 12-30 pM.

Equivalentes: Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, mediante el uso de no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descrita en la presente descripción. Tales equivalentes pretenden estar dentro del alcance de protección de las reivindicaciones anexas.

EJEMPLOS

LISTA DE ABREVIATURAS

CDR: Región determinante de complementariedad

EC ₅₀	Concentración efectiva semimáxima
ED ₅₀	Dosis efectiva semimáxima
FACS:	Clasificación de células activadas por fluorescencia
FBS/FCS:	Suero fetal bovino/de ternero
FR:	Región marco
HSA:	Solución salina tamponada con Hepes
HSA:	Albúmina sérica humana
IC ₅₀	Concentración inhibitoria semimáxima
ISVD:	Dominio variable único de inmunoglobulina
IV:	Vía intravenosa
MSX:	L-metionina sulfoximina
NAM:	Nicotinamida
MRTHL:	Vida media terminal tiempo medio de residencia
OEG:	ácido 8-amino-3,6-dioxa-octanoico
PBMC:	Células mononucleares de sangre periférica
PBS:	Solución salina tamponada con fosfato
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PK:	Farmacocinética
PO:	Por vía peroral
RGA:	Ensayo del gen reportero
RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SAA1:	Amiloide A1 sérico
SIA:	Análogo de secuencia idéntica
SC:	Subcutánea
SNAC:	N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino)caprilato de sodio
SPR:	Resonancia de plasmones superficiales
STAT:	Transductor de señales y activador de la transcripción
T _{1/2} :	Vida media
TMB:	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del Mab anti-IL6 de referencia y Fab anti-IL6 de referencia

Mab anti-IL6 de referencia (SEQ ID No. 130, con cadena pesada: SEQ ID NO: 97 y cadena ligera: SEQ ID NO: 101) (Tabla 35. Entrada 1) y un derivado Fab de este, que puede denominarse Fab anti-IL6 de referencia (VH-CH1 de la cadena pesada: SEQ ID NO: 100; cadena ligera: SEQ ID NO: 101), puede prepararse siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 2008/065378.

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID No.
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGD	130

TYYADSVKGRFTMSRDISKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIQMTQSPSTLSAS VGDRVITICRASQGSSWLAWYQQKPGKAPKVLIIKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDFFATYYCQQSWLGGSFQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMI WVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGDTYYADSVKGRFTMSRDISKNTVYLMNSLRAEDTA VYYCARWADDHPPWIDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE	
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGD TYYADSVKGRFTMSRDISKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	97
DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQGSSWLAWYQQKPGKAPKVLIIKASTLESGVP SRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQQSWLGGSFQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECEVQLVESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGDTYYADSVKGRFTMSRDISKNT VYLMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQGSSWLA WYQQKPGKAPKVLIIKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQQSW	101

LGGSGGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGE	
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGD TYYADSVKGRFTMSRDISKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGT LVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKY	100

Biología molecular general

Para técnicas generales de biología molecular, ver Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4ta edición, 2014, Sambrook, Fritsch y Maniatis eds., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY EE. UU.).

Expresión genérica de V_HH

Expresión genérica de V_HH en células HEK293

Los plásmidos de expresión para la expresión transitoria en células HEK293 se adquirieron de Twist Biosciences o ThermoFisher Scientific. Los plásmidos de Twist Biosciences se basaron en el vector pTT descrito en Durocher, Y. y otros., (2002) Nucleic Acid Res, 30: E9 mientras que los plásmidos de ThermoFisher Scientific se basaron en el vector pADNc34-Topo (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos se usaron para la transfección transitoria de células HEK293 en suspensión (293Expi, Invitrogen) siguiendo esencialmente las instrucciones del fabricante. Las células 293Expi se subcultivaron, típicamente, cada 3-4 días en medio de expresión para Expi293F (Invitrogen, número de catálogo A1435104) complementado con P/S al 1 % (GIBCO número de catálogo 15140-122). Las células Expi293F se transfectaron a una densidad celular de 2,5-3 millones/ml mediante el uso de Expifectamina. Para cada litro de células Expi293F, la transfección se realizó al diluir un total de 1 mg de ADN plasmídico en 50 ml de Optimem (GIBCO, núm. cat. 51985-026, dilución A) y al diluir 2,7 ml de Expifectamina en 50 ml de Optimem (dilución B). Para las cotransfecciones (*es decir*, Fab y mAb), los plásmidos se usaron en una relación 1:1. Las diluciones A y B se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. La mezcla de transfección se añadió a continuación a las células Expi293F y las células se incubaron a 37 °C en una incubadora humidificada con rotación orbital (85-140 rpm). Un día después de la transfección, las células transfectadas se complementaron con 5 ml del potenciador de la transfección ExpiFectamina 293 1 y 50 ml del potenciador de la transfección ExpiFectamina 293 2. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se recolectaron, típicamente, 4-5 días después de la transfección por centrifugación seguido de filtración.

Expresión genérica de V_HH en *S. cerevisiae*

Plásmidos para la expresión de polipéptidos V_HH en *S. cerevisiae* se construyeron mediante subclonación de fragmentos de ADN sintéticos que codifican los polipéptidos V_HH obtenidos de Genart AG (Regensburg, Alemania) en un vector de múltiples copias de levadura derivado de plásmidos de expresión del tipo cPOT descritos anteriormente en el documento EP0171142. Los plásmidos resultantes se transformaron en yFI3104, una cepa de *S. cerevisiae* patentada, mediante el uso del kit de transformación de levadura II Frozen-EZ (Zymo Research, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante u otros métodos estándar de transformación de levadura. Los transformantes de levadura se seleccionaron

mediante la utilización de glucosa como fuente de carbono en placas de agar que contenían extracto de levadura al 1 %, peptonas al 2 % y glucosa al 2 %. Cepas de levadura que contienen plásmidos que codifican los polipéptidos V_HH se cultivaron en medio mínimo como se describió por Verduyn y otros (Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P. (1992) Yeast 8, 501-517) con la adición de 7 g/l de extracto de levadura y 210 g/l de glucosa. Los sobrenadantes de levadura se cosecharon por centrifugación.

Purificación y análisis genéricos de V_HH

Los V_HH etiquetados con hexa-histidina o no etiquetados se purificaron por cromatografía de afinidad inmovilizada con metales (IMAC) en resina Ni-Excel (Cytiva) con imidazol o elución ácida seguida de una etapa de desalación (columnas PD con resina Sephadex G25, Cytiva) y, si es necesario, cromatografía de filtración en gel (columnas Superdex200 o Superdex75, Cytiva) en PBS o HBS. Los polipéptidos V_HH no etiquetados con His6 se purificaron mediante resinas multimodales (Cytiva) con elución ácida seguida de una etapa de desalación (*por ejemplo*, columnas de PD con resina Sephadex G25, Cytiva) y, si es necesario, cromatografía de filtración en gel (*por ejemplo*, Superdex200 o Superdex75, Cytiva) en PBS o HBS. La integridad de la proteína se analizó mediante el uso de un método de cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) configurado en un sistema Agilent LC 1100/1200 y mediante el uso de un BIOSEP (columna para separar biomoléculas)-SEC-3000 de 300×7,8 mm (Phenomenex, núm. cat. OOH-2146-K0) y un tampón de corrida compuesto por fosfato de Na 200 mM, pH 6,9, NaCl 300 mM e isopropanol al 10 %. Las masas moleculares de los lotes de polipéptidos V_HH purificados se analizaron mediante el uso de espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización por pulverización eléctrica (ESI-TOF-MS) en un sistema Agilent 6280 (Agilent Technologies) con una columna de desalación MassPREP (Waters) que se ejecutó a 0,4 ml/min en un tampón A compuesto de MQ-H₂O/0,1 % de ácido fórmico y tampón B compuesto de acetonitrilo/0,1 % de ácido fórmico para la elución de la etapa. Para medir la concentración de proteína final, se usó un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific) con coeficientes de extinción calculados teóricamente.

Análisis de fluorimetría diferencial de barrido (Nano DSF) de anti-IL-6 V_HH

El desdoblamiento térmico se midió mediante el uso del instrumento Prometheus NT.48 de Nanotemper Technologies. Se usó una rampa térmica lineal (1-1,5 °C/min, de 20 °C a 95 °C) y se midió la fluorescencia a 350 y 330 nm, y se determinaron los puntos medios de la reacción de desenrollamiento térmico (T_m) a partir de la primera derivada de la relación de fluorescencia (F₃₅₀/F₃₃₀).

La estabilidad térmica de varias variantes de polipéptidos V_HH se abordaron por Nano DSF. La concentración del compuesto final fue de aproximadamente 1 mg/ml y la concentración del tampón fue de 20 mM de HEPES, pH 7,4 que incluía 150 mM de NaCl.

Ensayo del gen reportero (RGA)

En detalle, el ensayo del gen reportero (RGA) probó el V de anti-IL-6_HLa capacidad de Hs para inhibir la fosforilación de STAT3 inducida por IL-6 y por lo tanto la transcripción del gen reportero de luciferasa en células indicadoras que expresan el IL-6R y gp130.

Para este propósito, se desarrolló una línea de células indicadoras de IL-6 mediante la transfección estable

de células HEK293 (ATCC CRL-1573) con un plásmido indicador que codifica un elemento de respuesta de STAT3 acoplado a luciferasa. Se aisló y propagó un clon de una única célula a la línea celular indicadora. Tras la exposición a IL-6, el factor de transcripción STAT3 se fosforila y activa la transcripción del gen de luciferasa aguas abajo del elemento de respuesta. La actividad de IL-6 puede medirse directamente mediante la detección de la bioluminiscencia en la conversión del sustrato de luciferasa luciferina a oxiluciferina.

Para realizar el ensayo, las células HEK293-STAT3-Luc se cultivaron en medio de crecimiento DMEM GlutaMAX (Gibco 31966-021), suero fetal bovino al 10 % (FBS, Gibco 10091-148), penicilina/estreptomicina al 1 % (P/S, Lonza DE17-602E) y puromicina 1 µg/ml (Gibco #A11138-03). El día del experimento, las células se resuspendieron en medio de ensayo (DMEM sin rojo fenol (Gibco #31053), FBS al 10 %, P/S al 1 % y 12 500 células/pocillo se sembraron en 22,5 µl/pocillo en una placa de 384 pocillos (Greiner #781086).

Los V_HH anti-IL-6 se diluyeron en serie y se preincubaron durante 30 minutos en medio de ensayo que contenía 1 nM de hIL-6 (interno). Se añadieron 2,5 µl/pocillo a las células sembradas en duplicados o triplicados, lo que dio como resultado una concentración final de 100 pM de IL-6. Después de la incubación durante toda la noche a 37 °C, 5 % de CO₂, se añadió reactivo de detección (Steady-GLO, Promega E2510) a 25 µl/pocillo y la placa se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se detectó la luminiscencia mediante un lector de placas EnVision Multimode (PerkinELmer). Para determinar la IC₅₀ de cada entrada, se realizó un ajuste de 4 parámetros sobre los datos sin procesar mediante el uso del software GraphPad Prism (versión 9.0.1 de GraphPad Prism para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos).

ISVD, POLIPÉPTIDOS Y DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS/CONSTRUCTOS DE ESTOS

Las listas a continuación de ISVD, polipéptidos y/o derivados polipeptídicos son listas no exhaustivas de estructuras de ejemplo que pueden describirse en la sección de ejemplo y se entiende que se presenta para facilitar la referencia. Las listas y tablas a continuación se presentan solo como ejemplos y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Dominios variables únicos de inmunoglobulinas (ISVD)

A continuación, se presentan ejemplos de dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) que comprenden un V_HH. Los ejemplos de V_HH no limitantes proporcionados en la Tabla 11 identifiquen además su secuencia de aminoácidos y SEQ ID NO en sus respectivas columnas. Los ejemplos a continuación son solo y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Tabla 11. Ejemplos no limitantes de ISVD que comprenden un V_HH

ID de V _H H	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
VHH_1 .1	EVQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGQREFVADIG EQAENTWYAHSVLRFTISRDEAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGQGTQVTVSS	23
VHH_1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQGPGKEREVADIGE	24

.2	QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGGGTQVTVSS	
VHH_1 .3	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQGPGKEREVADIG EQAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGGGTQVTVSS	25
VHH_1 .4	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE NAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGGGTQVTVSS	26
VHH_1 .5	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFEYAVGWFRQGPGKEREVADIG ENAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGGGTQVTVSS	27
VHH_1 .6	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGGGTQVTVSS	28
VHH_1 .7	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRKFEYAVGWFRQGPGQEREVADIG ENAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGGGTQVTVSS	29
VHH_1 .8	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTFSEYAMAWFRQAPGKEREVTDIGE SGGTWYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADSYGVGGG AERYYSWGGGTQVTVSS	30
VHH_1 .9	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTSGRTFSSYAVGWFRQAPGKEREVADIGE NADNTWYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGGG AQGYYSWGGGTQVTVSS	31
VHH_1 .10	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTFGEYAMAWFRQAPGKEREVTDIG ESGGTWYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADSYGVGG GAERYYSWGGGTQVTVSS	32
VHH_1 .11	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCCTTSGRTFSSYAVGWFRQAPGKEREVADIG ENADNTWYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG GAQGYYSWGGGTQVTVSS	33
VHH_1 .12	QLQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRTFSSYAVGWFRQAPGQEREVADIG ENADNTWYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG GAQGYYSWGGGTQVTVSS	34
VHH_1 .13	EVQLVESGGGLVQAGGSLQLSCTASGGTFSEYAMAWFRQAPGQEREVTDIG ESGGTWYADSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADSYGVGG GAERYYSWGGGTQVTVSS	35
VHH_1 .14	QLQLVESGGGWVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGQEREVADIG EQAENTWYAHSVLGRFTISRDEAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGGGTQVTVSS	36

VHH_1 .15	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIG EQAENTWYAHSVLGRFTISRDEAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGGQGTQVTVSS	37
VHH_1 .16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAPGKGLEWVSGIN TGGSTPDYADSVKGRFAISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTPRVFRL DHYSPLGQGTQVTVSS	38
VHH_1 .17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAPGQGLEWVSGIN TGGSTPDYADSVKGRFAISRDNANTLYLQMDSLRLPEDTAVYYCAADTPRVFRL DHYSPLGQGTQVTVSS	103
VHH_2 .1	QVQLVESGGDLVQPGGSLRLSCTTSGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVADIGE NADNRWYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRYGVGG GAQGYYSWGGQGTQVTVSS	104
VHH_2 .2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAPGKGLEWVSGIN TGGSTPDYADSVKDRFTISRDNANTLYLQMNSLRPADTAVYYCAADTPRSFRL NHAYPLGQGTQVTVSS	105
VHH_2 .3	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVADIG ENADNRWYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRYGVGG GAQGYYSWGGQGTQVTVSS	106
VHH_2 .4	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREVADIN WNSDNLWYADSVKGRFTISRDNANTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAVDSYGVG GGKPEYYDSWGGQGTQVTVSS	107
VHH_2 .5	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAPGKGLEWVSGIN TGGSTPDYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTPRVFRL DHYSPLGQGTQVTVSS	108
VHH_2 .6	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTFSDYAMAWFRQAPGKDREFVADIG TNSENTWYAESVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGGG KQEYYDSWGGGAQVTVSS	109
VHH_2 .7	EVQLVESGGRWVQPGASLRLSCTTSGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVADIG ENADNRWYAHSVKGRFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRYGVGG GAQGYYSWGGQGTQVTVSS	110
VHH_2 .8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMYWVRQAPGKGLEWVSGIN TGGSTPDYADSVKGRFTISRDNANTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAADTPRSFRL NHYSPLGQGTQVTVSS	111
VHH_2 .9	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMYWVRQAPGKGLEWVSGID TRGSTPDYADSVKGRFTISRDNASTFYLMNSLRPEDTAVYYCATDTPRSFRL YHYVPLGQGTQVTVSS	112
VHH_2 .10	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREVADIN WNSDNIWYADSVKGRFTISRDNANKVMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG	113

	GKEEYYDSWGQGTQVTVSS	
VHH_2 .11	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTASGRSFSSYAMGWFRQAPGKEREVADIG VNPDNTWYADSAKGRFTISRDNANKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG GAERYYDSWGQGTQVTVSS	114
VHH_2 .12	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTTSGRTFSSYAMAWFRQAPGKDREFVADIGE NSDNIWYADSVKGRFTISRDNANKNTILLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGGGK PEYYDSWGQGAQVTVSS	115
VHH_2 .13	EVQLVESGGGLVQAGGPLRLSCTVSGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREVADIN WNSDNIWYADSVKGRFTISRDNANKNVMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG GKEEYYDSWGQGTQVTVSS	116
VHH_2 .14	QLQLVESGGGSVQVGDLSRLSCTFSGRSFSSYAMGWFRQAPGKEREVADIG ENADNTWYAHSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG GAQGYYSWGQGTQVTVSS	117
VHH_2 .15	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCTASGGTFSEYAMAWFRQAPGKEREVTDIG ESGGTWYADSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADSYGVGG GAERYYDSWGQGTQVTVSS	118
VHH_2 .16	EVQLVESGGGLVQPGGSLSLSCTASGRTFSSYAMGWFRQAPGKEREVADIGE NADNRWYAHSVKGRFTISRDNANKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADRYGVGG GAQGYYSWGQGTQVTVSS	119
VHH_2 .17	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCTVSGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREVADIN WNSDNIWYADSVKGRFTISRDNANKNVMYLQMNSLKPEDTAVYYCAADSYGVGG GKEEYYDSWGQGTQVTVSS	120
VHH_2 .18	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRHFDEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE NADNTWYAHSVKGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGQGTQVTVSS	121
VHH_2 .19	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRHFDEYAVGWFRQGPGKEREVADIG ENADNTWYAHSVKGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGQGTQVTVSS	122
VHH_2 .20	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGQGTQVTVSS	123
VHH_2 .21	EVQLVESGGGLVQPGGSLQLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQGPGKEREVADIG EQAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYYSWGQGTQVTVSS	124
VHH_2 .22	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCCTSGRRKFDEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE NAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGQGTQVTVSS	125
VHH_2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCCTSGRRFSEYAVGWFRQGPGKEREVADIGE	126

.23	QAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	
VHH_2 .24	EVQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE EQAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYDYSWGQGTQVTVSS	127
VHH_3 .1	QVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	145
VHH_3 .2	ELQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	146
VHH_3 .3	EVQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE EQAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGG NAQGYDYSWGQGTQVTVSS	147
VHH_3 .4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRTFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	148
VHH_3 .5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSSYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	149
VHH_3 .6	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE NAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	150
VHH_3 .7	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QADNTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	151
VHH_3 .8	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAHSVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	152
VHH_3 .9	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVKGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	153
VHH_3 .10	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDNKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	154
VHH_3 .11	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMNLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYDYSWGQGTQVTVSS	155

VHH_3 .12	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDSLKPEDTAVYYCAADKYGVGGN AQGYYSWGGGTQVTVSS	156
VHH_3 .13	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADSYGVGGN AQGYYSWGGGTQVTVSS	157
VHH_3 .14	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTTSGRRFSEYAVGWFRQAPGKEREFVADIGE QAENTWYAESVLGRFTISRDDAKNTVYLEMDGLKPEDTAVYYCAADKYGVGGG AQGYYSWGGGTQVTVSS	158
VHH_3 .15	QLQLVESGGGWVQPGGSLKLSCTTSGRHFQEYAVGWFRQAPGKEREFVADIG ETA EVTWYAHSVKGRFTISRDNKNTVYLEMNGLPEDTAVYYCAADKYGVGG GAQGYYSWGGGTQVTVSS	160

Polipéptidos y compuestos/derivados polipeptídicos

A continuación, se presentan ejemplos de polipéptidos y/o derivados polipeptídicos. A los polipéptidos se les dará un identificador del tipo “polipéptido_n”, donde n es a un número entero para la identificación (por ejemplo, polipéptido_1, polipéptido_2, polipéptido_3, etcétera). De manera similar, a los derivados polipeptídicos se les dará un identificador con el prefijo “Compuesto”, de manera que el identificador resultante (ID) sea del tipo “Compuesto n”, donde n es un número entero para su identificación (por ejemplo, Compuesto 1, Compuesto 2, Compuesto 3, etcétera). En la tabla a continuación, se entiende que cualquier referencia a una posición dada de un sustituyente en una extensión se refiere a la posición relativa en la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de dicha extensión, desde el extremo N al extremo C de la extensión. Por ejemplo, si se debe hacer referencia a la posición de un sustituyente como “Cys en la posición 4 de la extensión”, entonces se entiende que se hace referencia al residuo de cisteína que se encuentra en la posición 4 de acuerdo con la longitud completa de la secuencia de la extensión como se define por la SEQ ID No. proporcionada en la columna de extensión respectiva para el derivado polipeptídico dado, comenzando con el residuo número 1 que es el más cercano al extremo N. Además, se entiende que la columna de posición cuando se refiere a la extensión se refiere al posicionamiento de la extensión con referencia al V_HH. Por ejemplo, si el estado de entrada es “extremo C” en la columna de posición de la extensión, se entiende que se refiere al hecho de que dicha extensión se encuentra en el extremo C del V_HH por ese polipéptido, que a su vez puede ser el polipéptido encontrado en un derivado polipeptídico.

El Quím. 24 se refiere al sustituyente identificado como tal en la Tabla 9. La extensión/etiqueta se identifica por su SEQ ID No. En el caso de una extensión que es una combinación de subelementos (tal como una extensión con una etiqueta de his, por ejemplo), la ID identificará el nombre de los subelementos y la SEQ ID No. se refiere a la secuencia completa de la extensión.

Los ejemplos a continuación son solo y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera. El derivado polipeptídico con ID “Compuesto 13” se omite a propósito.

Tabla 12. Ejemplos no limitantes de polipéptidos y derivados polipeptídicos

Polipéptido		Deriva do polipe ptídico	V _H H		SEQ ID No. de la etiqueta / extensión				Sustituyente	
ID	SE Q ID No.	ID	ID	SE Q ID No.	Posició n relativa a V _H H	SEQ	ID	SE Q ID No.	ID	Posición
Polipéptido _1	39	-	VHH_2. 1	104	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _2	40	-	VHH_2. 2	105	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _3	41	-	VHH_2. 3	106	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _4	42	-	VHH_2. 4	107	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _5	43	-	VHH_2. 5	108	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _6	44	-	VHH_2. 6	109	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _7	45	-	VHH_2. 7	110	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _8	46	-	VHH_2. 8	111	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _9	47	-	VHH_2. 9	112	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _10	48	-	VHH_2. 10	113	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _11	49	-	VHH_2. 11	114	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _12	50	-	VHH_2. 12	115	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _13	51	-	VHH_2. 13	116	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _14	52	-	VHH_2. 14	117	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido	53	-	VHH_2.	118	extremo	GGGGSHHHH	E1	71	-	-

_15			15		C	HH				
Polipéptido _16	54	-	VHH_2. 16	119	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _17	55	-	VHH_2. 17	120	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _18	56	-	VHH_1. 16	38	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _19	57	-	VHH_1. 11	33	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _20	58	-	VHH_2. 18	121	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _21	59	-	VHH_2. 19	122	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _22	60	-	VHH_1. 2	24	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _23	61	-	VHH_2. 20	123	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _24	62	-	VHH_1. 3	25	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _25	63	-	VHH_2. 21	124	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _26	64	-	VHH_2. 22	125	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _27	65	-	VHH_1. 4	26	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _28	66	-	VHH_1. 5	27	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _29	67	-	VHH_1. 6	28	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _30	68	-	VHH_2. 23	126	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _31	69	-	VHH_1. 7	29	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _32	70	-	VHH_2. 24	127	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _33	84	-	VHH_1. 9	31	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-

Polipéptido _34	85	-	VHH_1. 8	30	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _35	86	-	VHH_1. 10	32	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _36	73	-	VHH_1. 1	23	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _37	74	-	VHH_1. 2	24	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _38	75	-	VHH_1. 3	25	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _39	76	-	VHH_1. 4	26	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _40	77	-	VHH_1. 5	27	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _41	78	-	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _42	79	-	VHH_1. 7	29	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _43	80	-	VHH_1. 16	38	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _44	81	-	VHH_1. 12	34	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _45	94	-	VHH_1. 13	35	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _46	95	-	VHH_1. 14	36	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _47	99	-	VHH_1. 15	37	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _48	102	-	VHH_1. 17	103	extremo C	GQACPC	E2	72	-	-
Polipéptido _49	131	-	VHH_3. 1	145	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _50	132	-	VHH_3. 2	146	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _51	133	-	VHH_3. 3	147	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido	134	-	VHH_3.	148	extremo	GGGGSHHHH	E1	71	-	-

_52			4		C	HH				
Polipéptido _53	135	-	VHH_3. 5	149	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _54	136	-	VHH_3. 6	150	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _55	137	-	VHH_3. 7	151	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _56	138	-	VHH_3. 8	152	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _57	139	-	VHH_3. 9	153	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _58	140	-	VHH_3. 10	154	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _59	141	-	VHH_3. 11	155	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _60	142	-	VHH_3. 12	156	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _61	143	-	VHH_3. 13	157	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _62	144	-	VHH_3. 14	158	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
Polipéptido _63	159	-	VHH_3. 15	160	extremo C	GGGGSHHHH HH	E1	71	-	-
-	-	Comp uesto 1	VHH_1. 12	34	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 2	VHH_1. 13	35	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la

										extensión
-	-	Comp uesto 3	VHH_1. 14	36	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 4	VHH_1. 1	23	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 5	VHH_1. 2	24	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 6	VHH_1. 3	25	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 7	VHH_1. 4	26	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la

										posición de la extensión
-	-	Comp uesto 8	VHH_1. 5	27	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 9	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 10	VHH_1. 7	29	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 12	VHH_1. 17	103	extremo C	GQACPC	E2	72	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 14	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPHHHH HH	E8- [eti que	161	Quím 24	Cys en la posición de la

							ta de 6x His]			extensión
-	-	Comp uesto 15	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPHHHH HH	E8- [eti que ta de 6x His]	161	Quím 26	Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 16	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPHHHH HH	E8- [eti que ta de 6x His]	161	Quím 27	Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 17	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPCHHH HHH	E2- [eti que ta de 6x His]	162	Quím 24 Quím 24	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 18	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPCHHH HHH	E2- [eti que ta de 6x His]	162	Quím 26 Quím 26	Cys en la posición de la extensión Cys en la posición de la extensión
-	-	Comp uesto 19	VHH_1. 6	28	extremo C	GQACPCHHH HHH	E2- [eti que ta	162	Quím 27 Quím 27	Cys en la posición de la extensión

							de 6x His]			Cys en la posición de la extensión
--	--	--	--	--	--	--	------------------	--	--	---

EJEMPLO 1: INMUNIZACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECA DE V_HH

El propósito de este ejemplo es construir una biblioteca de V_HH anti-IL-6 para desarrollar polipéptidos V_HH anti-IL6 adecuados para un desarrollo adicional en candidatos farmacológicos para la administración oral y/o subcutánea.

Al principio, se generó una biblioteca de V_HH anti-IL-6. El conjunto más prometedor de V_HH en términos de, por ejemplo, afinidades de unión KD apropiadas, valores de IC₅₀ y estabilidades biofísicas, se seleccionaron para una mayor optimización, que, por ejemplo, incluyó reducir el pI, la humanización y añadir prolongadores para el desarrollo de, por ejemplo, un candidato farmacológico oral anti-IL-6 optimizado.

1.1 Inmunización

Los anticuerpos de dominio único se obtuvieron de llamas inmunizadas con la proteína de IL-6 humana con etiqueta de His en el N-terminal (SEQ ID NO: 82; hIL-6-His). Los animales se inmunizaron con seis inyecciones subcutáneas a intervalos semanales (100 µg de antígeno en las dos primeras inyecciones y 50 µg de antígeno en las inyecciones restantes). Una semana después de la última inyección, se recolectaron sueros para definir los títulos de anticuerpos contra hIL-6-His biotinilada (SEQ ID NO: 82; bio-hIL-6-His) e IL-6 de cynomolgus biotinilada con etiqueta de His en el N-terminal (SEQ ID NO: 83; bio-cyIL-6-His) mediante ELISA. En este ELISA, las placas de 96 pocillos (Maxisorp; Nunc) se recubrieron con neutravidina (Thermo Scientific) a 5 µg/ml, diluido en PBS (pH 7,4), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS-Tween 0,05 % (pH 7,4) y se bloquearon a temperatura ambiente durante 2 horas con 1 % de caseína (Sigma). Después del bloqueo, se capturaron los antígenos bio-hIL-6-His y bio-cyIL-6-His a 1 nM, diluidos en caseína al 0,1 %/PBS (pH 7,4), y luego se añadieron las muestras de suero diluidas secuencialmente en caseína al 0,1 %/PBS (pH 7,4). La presencia de anticuerpos anti-hIL-6 se demostró mediante el uso de un anticuerpo IgG anti-llama de ratón seguido de un anticuerpo conjugado de peroxidasa de inmunoglobulina anti-ratón de burro (Jackson ImmunoResearch). Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre las etapas de incubación, las placas se lavaron con PBS de Tween 0,05 % (pH 7,4) y se realizó un lavado final con PBS (pH 7,4) antes del desarrollo. El desarrollo de la señal de ELISA se realizó mediante la adición de la solución de sustrato (solución TMB) a las placas, seguido de H₂SO₄. Las señales de ELISA se obtuvieron mediante el uso de un lector de placas a 450 nm.

Tabla 13. Reactivos usados para el cribado de la inmunización y el aislamiento de V_HHs.

Breve descripción	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID #
IL-6 humana con etiqueta de His en el	HHHHHHGGGGSVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISA LRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFSQSGFNEETCLV KIITGLLEFEVYLEYLQNRFSSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLD	82

N-terminal	AITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM	
IL-6 de cynomolgus con etiqueta de His en el N-terminal	HHHHHHGGGGSAPVLPGEDSKDVAAPHSQPLTSSERIDKHIRYILDGISALRKETCNRSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEDTCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM	83
IL-6 humana Avi etiquetada con etiqueta de His en el N-terminal	HHHHHHGGGGSGLNDIFEAQKIEWHEGGGGSVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM	96

1.2 Construcción de la biblioteca

El ARN se extrajo de PBMC de dos llamas inmunizadas. El ARN extraído se usó para la síntesis de ADNc mediante el uso de cebadores aleatorios. El ADNc se usó en una amplificación de PCR primaria mediante el uso de cebadores no etiquetados que se hibridan en la secuencia del líder y en las regiones CH1 de bisagra, seguidos de una amplificación de PCR secundaria que introduce sitios de endonucleasa de restricción para la clonación de genes de V_HH en el vector fagémido. Las bibliotecas se electroporaron en células de E. coli TG1 y las reservas bacterianas en glicerol de las bibliotecas inmunitarias se almacenaron a - 80 °C.

1.3 Aislamiento de los V_HH

Se usó la producción en fagos a partir del grupo de bibliotecas de V_HH de llama en tres rondas consecutivas de selecciones de presentación de fagos mediante el uso de IL-6 humana biotinilada etiquetada con His N-terminal (bio-hIL-6-Avi-His, SEQ ID NO: 96) y proteínas bio-cyIL-6-His (SEQ ID NO: 83) en concentraciones decrecientes a pH 7,4 (tampón de PBS) (bio-hIL-6-Avi-His y bio-cyIL-6-His a 50 nM, 5 nM y 0,5 nM (precapturado en perlas) en la primera ronda, bio-hIL-6-Avi-His a 50 nM, 5 nM y 0,5 nM en la segunda ronda y bio-hIL-6-Avi-His y bio-cyIL-6-His a 50 nM, 5 nM, 0,5 nM y 0,05 nM en la última ronda) con el lavado del fagos no específicos, seguido de la elución del fago con tripsina (elución total) e inhibición de la actividad proteasa de tripsina con 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilfluoruro y elución específica mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 ("Mab anti-IL6 de referencia"; SEQ ID NO: 130, con cadena pesada: SEQ ID NO: 97 y cadena ligera: SEQ ID NO: 101). Se realizaron diluciones seriadas del fagos eluidos y se usaron para infectar TG1 que crece exponencialmente. TG1 infectado se sembró en LB+Carb¹⁰⁰+Glu² % y valores de enriquecimiento calculados sobre el fondo (sin antígeno para la selección).

Los clones individuales de la segunda y tercera rondas de salidas de las condiciones de selección se recogieron en placas maestras de 96 pocillos y se probaron como extracto periplasmático (P.E.) para la unión a las proteínas bio-hIL-6-Avi-His (SEQ ID NO: 96) y bio-cyIL-6-His (SEQ ID NO: 83) capturadas a través de ELISA de unión con neutravidina. Para el ELISA de unión a P.E., las placas ELISA MaxiSorp™

de alta capacidad de unión a proteínas de 96 pocillos se recubrieron con neutravidina (Thermo Scientific) a 5 µg/ml, diluido en PBS (pH 7,4), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las placas se lavaron con PBS-Tween al 0,05 % (pH 7,4) y se bloquearon a temperatura ambiente durante 2 horas con caseína al 1 % (Sigma). Después de la inactivación, se capturaron los antígenos de bio-hIL-6-Avi-His (SEQ ID NO: 96) y bio-cylL-6-His (SEQ ID NO: 83) a 1 nM, diluidos en caseína/PBS al 0,1 % (pH 7,4). Extractos periplasmáticos que contienen V_HH soluble se añadieron a las placas y se incubaron a una dilución de 1:5 en caseína al 0,1 %/PBS (pH 7,4). La detección de la unión de la muestra de P.E. se realizó mediante el uso del anticuerpo anti-c-Myc de ratón (Roche) seguido del conjugado de peroxidasa de inmunoglobulina anti-ratón del anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch). Las incubaciones se realizaron durante 1 hora a temperatura ambiente y entre las etapas de incubación las placas se lavaron con PBS-Tween 0,05 % (pH 7,4) y un lavado final con PBS (pH 7,4) antes del desarrollo. El desarrollo de la señal de ELISA se realizó mediante la adición de la solución de sustrato (solución TMB) a las placas, seguido de H₂SO₄. Las señales de ELISA se obtuvieron mediante el uso de un lector de placas a 450 nm.

Se secuenciaron los genes de V_HH de los aglutinantes positivos. Los clones se clasificaron por variantes de acuerdo con las secuencias diferentes de HCDR3. Se secuenciaron los genes de V_HH de los aglutinantes positivos. Los clones se clasificaron por variantes de acuerdo con las secuencias diferentes de HCDR3. Se seleccionaron 182 secuencias V_HH para obtener más caracterizaciones en base a las similitudes de secuencia y a la cinética de velocidad de asociación/disociación mediante el uso de un instrumento Fortebio como se describió por el vendedor (instrumento Octet Fortebio Red384 de Sartorius). En particular, se seleccionaron 22 secuencias para caracterizaciones exhaustivas que incluyen mediciones de afinidad, *in vitro* y ensayo biofísico. Una descripción general de las secuencias V_HH seleccionadas se proporciona en la Tabla 14, en donde las propiedades de los polipéptidos V_HH se presentan además en la Tabla 15. Como puede entenderse por un experto en la técnica, las secuencias polipeptídicas V_HH descritas identificadas a continuación comprenden la secuencia V_HH en sí misma, así como una etiqueta de His C-terminal GGGGSHHHHHH (Extensión E1, SEQ ID NO. 71), que alternativamente puede denominarse como una extensión C-terminal del V_HH.

Tabla 14. Descripción general de la composición de 22 secuencias V_HH seleccionadas

Polipéptido		V _H H		C-term. Etiqueta / Extensión	
ID	SEQ ID No.	ID	SEQ ID No.	ID	SEQ ID No.
Polipéptido_1	39	VHH_2.1	104	E1	71
Polipéptido_2	40	VHH_2.2	105	E1	71
Polipéptido_3	41	VHH_2.3	106	E1	71
Polipéptido_4	42	VHH_2.4	107	E1	71
Polipéptido_5	43	VHH_2.5	108	E1	71
Polipéptido_6	44	VHH_2.6	109	E1	71
Polipéptido_7	45	VHH_2.7	110	E1	71

Polipéptido_8	46	VHH_2.8	111	E1	71
Polipéptido_9	47	VHH_2.9	112	E1	71
Polipéptido_10	48	VHH_2.10	113	E1	71
Polipéptido_11	49	VHH_2.11	114	E1	71
Polipéptido_12	50	VHH_2.12	115	E1	71
Polipéptido_13	51	VHH_2.13	116	E1	71
Polipéptido_14	52	VHH_2.14	117	E1	71
Polipéptido_15	53	VHH_2.15	118	E1	71
Polipéptido_16	54	VHH_2.16	119	E1	71
Polipéptido_17	55	VHH_2.17	120	E1	71
Polipéptido_18	56	VHH_1.16	38	E1	71
Polipéptido_19	57	VHH_1.11	33	E1	71
Polipéptido_33	84	VHH_1.9	31	E1	71
Polipéptido_34	85	VHH_1.8	30	E1	71
Polipéptido_35	86	VHH_1.10	32	E1	71

Tabla 15. Descripción general de las propiedades de las 22 secuencias V_HH seleccionadas.

Polipéptido		pI	Rendimiento de cosecha, expresado en Expi293F [mg/l]	T _m de nDSF [°C]	K _d de SPR [M]	Ensayo del gen reportero [pM]
ID	SEQ ID No.					
Polipéptido_1	39	7,53	174	54,5	6,27E-10	47,4
Polipéptido_2	40	8,41	37	51,6	1,31E-09	20,7
Polipéptido_3	41	8,09	188	56,7	8,72E-10	39,8
Polipéptido_18	56	7,88	214	54,9	7,05E-10	18,5
Polipéptido_4	42	7,12	216	75,5	1,46E-09	198,0
Polipéptido_5	43	8,11	181	55,1	6,96E-10	23,2
Polipéptido_6	44	6,85	68	66,3	1,52E-09	73,4
Polipéptido_7	45	8,39	80	56,1	6,31E-10	42,1
Polipéptido_8	46	8,70	68	59,9	8,16E-10	36,8
Polipéptido_9	47	8,67	49	56,2	9,03E-10	33,7
Polipéptido_10	48	6,85	42	71,3	1,03E-09	113,5
Polipéptido_11	49	6,98	111	55,3	7,01E-11	98,2
Polipéptido_34	85	6,42	283	63,9	1,00E-12	43,6
Polipéptido_12	50	6,85	239	61,5	1,00E-12	77,4
Polipéptido_13	51	6,70	273	66,4	1,00E-12	80,9
Polipéptido_33	84	7,07	197	64,2	3,58E-10	62,1
Polipéptido_14	52	6,94	220	63,3	3,96E-10	72,9

Polipéptido_35	86	6,61	308	62,4	1,00E-12	24,6
Polipéptido_15	53	6,61	293	52,8	1,00E-12	16,8
Polipéptido_19	57	7,19	265	65,5	1,00E-12	40,6
Polipéptido_16	54	7,40	317	57,9	1,00E-12	52,4
Polipéptido_17	55	6,85	265	70,6	2,57E-10	84,1

Como puede derivarse de la Tabla 15, las entradas polipéptido_19 (SEQ ID No. 57), polipéptido_35 (SEQ ID No. 86), polipéptido_33 (SEQ ID No. 84) y polipéptido_34 (SEQ ID No. 85) mostraron no solo diversidad de secuencia, sino que cada secuencia V_HH también mostró una estabilidad, expresabilidad, afinidad de unión y potencia óptimas. Por lo tanto, estos cuatro polipéptidos se eligieron para optimizar aún más y avanzar en el desarrollo.

EJEMPLO 2: MAPEO DE EPÍTOPOS

El propósito de este ejemplo fue resolver las estructuras cristalinas de polipéptidos V_HH anti-IL-6 seleccionados (SEQ ID NO: 84, 86, y 57), en complejo con IL-6 humana, para determinar la interacción de parátipo y epítipo entre los V_HH anti-IL-6 seleccionado y la IL-6 humana. Los polipéptidos V_HH anti-IL-6 seleccionados fueron polipéptido_33 (SEQ ID No: 84), polipéptido_35 (SEQ ID No: 86) y polipéptido_19 (SEQ ID No: 57), identificados en detalle en la Tabla 14.

Los resultados condujeron a una mejor comprensión del modo de acción molecular detallado y guiaron una optimización adicional de los polipéptidos V_HH, en particular, con respecto a la optimización adicional de la potencia mediante la introducción de mutaciones en los lazos de CDR y otros residuos de parátipo.

2.1 Preparación de estructuras cristalinas

Una mezcla de IL-6 (1 equiv.) y polipéptido V_HH (1,2 equiv.) disuelto en tampón HBS se incubó durante 60 minutos a 4 °C y se purificó por cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex75 16/60 que se ejecutó en Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM. Se recolectaron, agruparon y concentraron las fracciones de pico de elución de SEC de los complejos purificados hasta 5-20 mg/ml y se usaron para ensayos de cristalización en gotas de 96 pocillos mediante el uso de tamices de cristalización comerciales.

2.1.1 Cristalización y determinación de la estructura de la SEQ ID NO: 84 (polipéptido 33) en complejo con IL-6.

Se obtuvieron cristales con la siguiente condición del depósito: Sulfato de amonio 2 M, Bis-Tris 0,1 M pH 6,5. Los cristales se protegieron con glicerol y se congelaron en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X se recolectaron en un ánodo giratorio Rigaku FR-X con un detector Rigaku Dectris Pilatus3R 1M, procesados en XDS/XSCALE hasta una resolución de 2,4 Å en el grupo espacial 5 (C2). La estructura se determinó por reemplazo molecular que se ejecuta en Phenix mediante el uso de las siguientes entradas de PDB como modelos de búsqueda; IL-6 (PDBid: 1alu) y V_HH plantilla (PDBid: 5ivo). La solución del reemplazo molecular estaba en el grupo espacial 5 (C2) y tenía dos complejos IL-6/SEQ ID NO: 84 en la unidad asimétrica. La estructura se refinó en Phenix.refine a una resolución de 2,4 Å. Los dos complejos en la unidad asimétrica mostraron una alta similitud estructural con una RMSD de 0,286 Å calculada en PyMOL mediante el uso de "Align". Ambas moléculas de IL-6 en la unidad asimétrica mostraron una alta similitud estructural con la entrada de PDB de IL-6 1alu: RMSD por debajo de 0,48 Å para ambas moléculas

de IL-6 calculadas en PyMOL mediante el uso de “Align”.

2.1.2 Cristalización y determinación de la estructura de la SEQ ID NO: 86 (polipéptido 35) en complejo con IL-6.

Se obtuvieron cristales con la siguiente condición del depósito: Cloruro de magnesio hexahidratado 0,2 M, HEPES de sodio 0,1 M pH 7,5, PEG 3350 al 25 % p/v. Los cristales se protegieron con glicerol y se congelaron en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X de sincrotrón se recolectaron en la Fuente de Luz Suiza, se procesaron en XDS/XSCALE hasta una resolución de 3,0 Å en el grupo espacial 90 (P4212). La estructura se determinó por reemplazo molecular que se ejecuta en Phenix mediante el uso de las siguientes entradas de PDB como modelos de búsqueda; IL-6 (PDBid: 1alu) y VHH plantilla (PDBid: 5ivo). La solución del reemplazo molecular estaba en el grupo espacial 90 (P4212) y tenía dos IL-6/SEQ ID NO: 86 complejos en la unidad asimétrica. La estructura se refinó en Phenix.refine hasta una resolución de 3,0. Los dos complejos en la unidad asimétrica mostraron una alta similitud estructural con una RMSD de 0,337 Å calculada en PyMOL mediante el uso de “Align”. Ambas moléculas de IL-6 en la unidad asimétrica mostraron una alta similitud estructural con la entrada de PDB de IL-6 1alu: RMSD por debajo de 0,58 Å para ambas moléculas de IL-6 calculadas en PyMOL mediante el uso de “Align”.

2.1.3 Cristalización y determinación de la estructura de la SEQ ID NO: 57 (polipéptido 19) en complejo con IL-6.

Se obtuvieron cristales con la siguiente condición del depósito: Sulfato de amonio 2,0 M, acetato de sodio 0,1 M 4,6. Los cristales se protegieron con glicerol y se congelaron en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X de sincrotrón se recolectaron en la Fuente de Luz Suiza, se procesaron en XDS/XSCALE hasta una resolución de 2,4 Å en el grupo espacial 20 (C2221). La estructura se determinó por reemplazo molecular que se ejecuta en Phenix mediante el uso de IL-6/SEQ ID NO: 33 como modelo de búsqueda. La solución del reemplazo molecular estaba en el grupo espacial 20 (C2221) y tenía una IL-6/SEQ ID NO: 57 en la unidad asimétrica. La estructura se refinó en *Phenix.refine* hasta una resolución de 2,4. La molécula de IL-6 en la unidad asimétrica mostró una alta similitud estructural con la entrada de pdb de IL-6 1alu: RMSD = 0,554 Å calculado en PyMOL mediante el uso de “Align”.

2.2 Mapeo de epítomos y parátomos

Los epítomos de IL-6 y los parátomos de los VHH se describen por dos métodos diferentes.

Método 1

Se usó la interfaz PyMOL con un corte de 1,0 para calcular la diferencia en el área superficial accesible entre los componentes del complejo y los componentes libres y de esta manera definir los residuos de interfaz.

Método 2

El Método 2 se basa en la distancia entre los residuos de aminoácidos de IL-6 y los residuos de aminoácidos de los VHH mediante el uso de un corte de distancia <4,5 Å, mediante inspección manual.

Las estructuras cristalinas de la SEQ ID NO: 84 y la SEQ ID NO: 86 en complejo con IL-6 contienen cada una dos complejos (*cfr.* Tabla 16 & Tabla 17. Indicados por “Comp1”, “Comp2” para las SEQ ID NO: 84 y SEQ ID NO: 86) en la unidad asimétrica.

La estructura cristalina de la SEQ ID NO: 57 en complejo con IL-6 contiene solo un complejo en la unidad asimétrica denominado complejo 1 de la SEQ ID NO: 57.

Los residuos de epítipo y parátipo de los complejos IL-6/polipéptidos se enumeran en la Tabla 16 y Tabla 17, respectivamente.

Tabla 16. Residuos de epítipos de IL-6.

SEQ ID NO: 84				SEQ ID NO: 86				SEQ ID NO: 57	
Método 1		Método 2		Método 1		Método 2		Método 1	Método 2
Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp1
S22									
				E23					
D26	D26	D26	D26	D26	D26	D26	D26	D26	D26
					I29				
R30	R30	R30	R30	R30	R30	R30	R30	R30	R30
L33	L33	L33	L33	L33	L33	L33	L33	L33	L33
D34	D34	D34	D34	D34	D34	D34	D34	D34	D34
				R40	R40	R40	R40		
				K41					
								K66	
C73	C73	C73	C73	C73	C73	C73	C73	C73	C73
F74	F74	F74	F74	F74	F74	F74	F74	F74	F74
Q75	Q75	Q75	Q75	Q75	Q75	Q75	Q75	Q75	Q75
S76	S76			S76				S76	
F78	F78	F78	F78	F78	F78	F78	F78	F78	F78
K171	K171	K171	K171	K171	K171	K171	K171	K171	K171
E172	E172			E172	E172			E172	E172
Q175	Q175	Q175	Q175	Q175	Q175	Q175	Q175	Q175	Q175
S176	S176	S176	S176	S176	S176			S176	S176
L178	L178	L178	L178	L178	L178	L178	L178	L178	L178
R179	R179	R179	R179	R179	R179	R179	R179	R179	R179
						A180		A180	
R182	R182	R182	R182	R182	R182	R182	R182	R182	R182
Q183	Q183	Q183	Q183	Q183	Q183	Q183	Q183	Q183	Q183

Tabla 17. Residuos de parátipo de V_HH.

SEQ ID NO: 84				SEQ ID NO: 86				SEQ ID NO: 57	
Método 1		Método 2		Método 1		Método 2		Método 1	Método 2
Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp1

Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	Comp1	Comp1
				E31	E31	E31	E31		
F47		F47	F47	F47	F47				
D50	D50	D50	D50	D50	D50	D50	D50	D50	D50
E53	E53	E53	E53	E53	E53	E53	E53	E53	E53
N54	N54			S54	S54			N54	N54
N57	N57	N57	N57	T57	T57	T57	T57	N57	N57
T58	T58	T58	T58	W58	W58	W58	W58	T58	T58
W59	W59	W59	W59	Y59	Y59	Y59	Y59	W59	W59
Y60	Y60	Y60	Y60					Y60	Y60
				K64	K64	K64	K64		
K65	K65	K65	K65					K65	K65
				D98	D98	D98	D98		
D99	D99	D99	D99					D99	D99
				Y100	Y100	Y100	Y100		
Y101	Y101	Y101	Y101	G101	G101	G101	G101	Y101	Y101
G102	G102	G102	G102	V102	V102	V102	V102	G102	G102
V103	V103	V103	V103	G103	G103	G103	G103	V103	V103
G104	G104	G104	G104	G104	G104	G104	G104	G104	G104
G105	G105	G105	G105	G105	G105	G105	G105	G105	G105
G106	G106	G106	G106					G106	G106
				R108					
				Y109	Y109	Y109	Y109		
Y110	Y110	Y110	Y110					Y110	Y110

Como se puede ver en la Figura 4A, se puede observar una interacción de pi aromático-catión entre la cadena lateral aromática de Trp59 (polipéptido_19; SEQ ID NO: 57) y la cadena lateral básica de Arg179 (IL-6 humana), que parece ser importante para la afinidad y las potencias muy fuertes observadas *in vitro* e *in vivo* para el V_HH, así como también para las variantes del mismo.

En base a los experimentos cristalográficos, se obtuvieron estructuras moleculares a resoluciones de 2,4 y 3,0 Å que muestran las interacciones epítopo:parátipo detalladas entre la IL-6 humana y los polipéptidos V_HH anti-IL-6 evaluados. Estos datos se usaron como datos de entrada para optimizar los polipéptidos V_HH como se describe en la presente descripción como parte de las optimizaciones del ciclo de diseño.

2.3 Modelado computacional para la predicción de estructuras

Se usó la versión 2.2.0 de AlphaFold-Multimer para generar la estructura compleja de V_HH y hIL-6 mediante el uso de un enfoque basado en la secuencia. La versión 2.2.0 de AlphaFold-Multimer genera varias estructuras por modelo de forma predeterminada, y el modelo superior se seleccionó mediante la puntuación ranking_confidence y se seleccionó el rango 1. Ranking_confidence es una combinación lineal de la puntuación de interfaz ipTM (puntuación de modelo de plantilla prevista por la interfaz) y la puntuación

estructural general pTM: 0,8ipTM + 0,2pTM. El residuo de interfaz se analizó de la misma manera que el Método 1.

Tabla 18. Comparación de los residuos de epítipo de IL-6 obtenidos mediante la estructura de rayos X mediante el uso de la SEQ ID NO: 84 y mediante la predicción de la estructura computacional mediante el uso de la SEQ ID NO: 84.

SEQ ID NO: 84				
Método 1		Método 2		Método computacional
Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	
S22				
D26	D26	D26	D26	D26
R30	R30	R30	R30	R30
L33	L33	L33	L33	L33
D34	D34	D34	D34	D34
C73				C73
F74	F74	F74	F74	F74
Q75	Q75	Q75	Q75	Q75
S76	S76			S76
F78	F78	F78	F78	F78
K171	K171	K171	K171	K171
E172	E172			E172
Q175	Q175	Q175	Q175	Q175
S176	S176	S176	S176	S176
L178	L178	L178	L178	L178
R179	R179	R179	R179	R179
R182	R182	R182	R182	R182
Q183	Q183	Q183	Q183	Q183

Tabla 19. Comparación de los residuos de parátomos de V_{HH} de la SEQ ID NO: 84 obtenidos por estructura de rayos X y por predicción computacional.

SEQ ID NO: 84				
Método 1		Método 2		Método computacional
Comp1	Comp2	Comp1	Comp2	
F47		F47	F47	F47
D50	D50	D50	D50	D50
				G52
E53	E53	E53	E53	E53
N54	N54			N54
				D56

N57	N57	N57	N57	N57
T58	T58	T58	T58	T58
W59	W59	W59	W59	W59
Y60	Y60	Y60	Y60	Y60
K65	K65	K65	K65	K65
D99	D99	D99	D99	D99
Y101	Y101	Y101	Y101	Y101
G102	G102	G102	G102	G102
V103	V103	V103	V103	V103
G104	G104	G104	G104	G104
G105	G105	G105	G105	G105
G106	G106	G106	G106	G106
Y110	Y110	Y110	Y110	Y110

La Tabla 18 y la Tabla 19 muestran una comparación entre la estructura compleja determinada experimentalmente y la predicción de la estructura computacional y la resolución de la información parátipo:epítipo a alta resolución. Observamos una diferencia de estructura de sub-angstrom en una alineación de la cadena principal de proteínas entre dos metodologías, así como también una alta precisión de la cadena lateral cuando la predicción de la cadena principal es precisa. Como resultado, la determinación del parátipo:epítipo de dos métodos alcanza un acuerdo cercano. Para racionalizar además la predicción de epítipo/parátipo para el complejo estructuralmente no resuelto.

Tabla 20. Residuos de epítipos de IL-6 y residuos de parátipos de V_HH basados en la predicción de estructura computacional de una SEQ ID NO: 56 e hIL-6 mediante el uso de un enfoque de aprendizaje profundo con el suministro de información de secuencia.

Epítipo	Parátipo
R24	V37
K27	Q39
Q28	G42
Y31	K43
I88	G44
L92	L45
E95	Y95
E99	R105
A114	L106
Q116	D107
M117	H108
S118	Y109
K120	L112

V121	Q114
I123	
Q124	
F125	
Q127	
K128	
T138	
P139	

EJEMPLO 3: CICLO DE DISEÑO Y GENERACIÓN DE POLIPÉPTIDOS

3.1 Ciclo de diseño

Para optimizar los polipéptidos anti-IL-6, se realizaron una serie de ciclos de diseño. Estos ciclos de diseño se realizaron para optimizar uno o más de los siguientes:

- las interacciones parátipo:epítipo al introducir mutaciones que mejoraron la afinidad y el efecto de la potencia funcional,
- mutaciones que redujeron el pI del V anti-IL-6_Hpolipéptido H que mejora de esta manera la biodisponibilidad oral,
- mutaciones para humanizar la secuencia V_HH derivada de llama y por lo tanto eliminan el riesgo de inmunogenicidad por exposición humana,
- introducir un resto prolongador de ácido graso (sustituyente) al conjugar el resto prolongador a los residuos de cisteína de la extensión C-terminal de los polipéptidos V_HH, y
- fijación de residuos responsables, tales como la mutación de la glutamina posicionada en el extremo N-terminal a glutamato para obstaculizar la formación de piroglutamato.

3.2 Generación de polipéptidos

Ejemplos de polipéptidos V_HH generados como parte del ciclo de diseño.

Como se describió anteriormente, como parte de las campañas de optimización del ciclo de diseño, la Tabla 21 a continuación muestra polipéptidos que se optimaron mediante mutaciones para aumentar la potencia/afinidad, mutaciones para aumentar la biodisponibilidad oral, mutaciones para reducir el riesgo de inmunogenicidad y/o mutaciones para fijar los residuos susceptibles. Este ciclo de diseño se basó en polipéptido_19 (SEQ ID No. 57) como se identificó originalmente en EJEMPLO 1: INMUNIZACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECA DE VHH. Para facilitar la referencia, el V_HH subyacente para cada uno de los polipéptidos se proporciona en la Tabla 21, también puede referirse a Tabla 12 para la composición detallada de los polipéptidos de ejemplo.

Por ejemplo, a partir del polipéptido_19, la SEQ ID No. 57 (o más específicamente el V_HH que compone el polipéptido_19), el polipéptido_29 se generó y comprende las mutaciones identificadas más adelante:

- mutaciones para aumentar la potencia/afinidad: T28R, S31E, N54Q, D56E, H62E, K65L, N74D, S85G, S100K, G106N;
- mutaciones para aumentar la biodisponibilidad oral: Q1E, S31E, H62E, K65L, N74D, Q82E, N84D;

- mutaciones para reducir el riesgo de la inmunogenicidad: Q1E, L2V, W11L, H62E, Q82E, N84D;
- y
- mutaciones para arreglar residuos susceptibles: Q1E, W11L.

Tabla 21. Descripción general de los polipéptidos V_HH claves del ciclo de diseño basados en el polipéptido_19 de la SEQ ID NO. 57.

Polipéptido		Modificaciones al V _H H del polipéptido_19 de referencia	V _H H	
ID	SEQ ID No.		ID	SEQ ID No.
Polipéptido_19 (Referencia)	57	-	VHH_1.11	33
Polipéptido_20	58	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28H, S30D, S31E, N74D, Q82E, N84D, S85G, S100K, G106N	VHH_2.18	121
Polipéptido_21	59	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28H, S30D, S31E, A40G, N74D, Q82E, N84D, S85G, S100K, G106N	VHH_2.19	122
Polipéptido_22	60	Q1E, L2V, W11L, T28R, S31E, A40G, N54Q, D56E, H62E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_1.2	24
Polipéptido_23	61	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28R, S31E, N54Q, D56E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_2.20	123
Polipéptido_24	62	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28R, S31E, A40G, N54Q, D56E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_1.3	25
Polipéptido_25	63	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28R, S31E, A40G, N54Q, D56E, H62E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_2.21	124
Polipéptido_26	64	Q1E, L2V, W11L, T28K, S30D, S31E, D56E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_2.22	125
Polipéptido_27	65	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28K, S30D, S31E, D56E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_1.4	26
Polipéptido_28	66	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28K, S30D, S31E, A40G, D56E, H62E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_1.5	27
Polipéptido_29	67	Q1E, L2V, W11L, T28R, S31E, N54Q, D56E, H62E, K65L, N74D, Q82E, N84D, S85G, S100K, G106N	VHH_1.6	28

Polipéptido_30	68	Q1E, L2V, W11L, T28R, S31E, A40G, N54Q, D56E, K65L, N74D, Q82E, N84D, S85G, S100K, G106N	VHH_2.23	126
Polipéptido_31	69	Q1E, L2V, W11L, K19Q, T28K, S30D, S31E, A40G, K43Q, D56E, H62E, K65L, N74D, Q82E, N84D, S85G, S100K, G106N	VHH_1.7	29
Polipéptido_32	70	Q1E, L2V, T28R, S31E, N54Q, D56E, K65L, N74D, N84D, S100K, G106N	VHH_2.24	127

Tabla 22. Descripción general de las propiedades de los polipéptidos V_HH claves del ciclo de diseño basados en el polipéptido_19 (SEQ ID NO. 57).

Polipéptido		pI	T _m (°C, estabilidad)	Rendimiento de expresión, expresado en Expi293F [mg/l]
ID	SEQ ID No.			
Polipéptido_19 (Referencia)	57	7,2	65	ND
Polipéptido_20	58	6	50	69
Polipéptido_21	59	6	48	73
Polipéptido_22	60	6,1	59	74
Polipéptido_23	61	6,3	59	93
Polipéptido_24	62	6,3	55	116
Polipéptido_25	63	5,8	57	128
Polipéptido_26	64	6,3	59	76
Polipéptido_27	65	6,1	57	98
Polipéptido_28	66	5,4	57	105
Polipéptido_29	67	5,8	59	88
Polipéptido_30	68	6,3	54	74
Polipéptido_31	69	5	52	143
Polipéptido_32	70	6,6	60	53

Como se observa en la Tabla 22, se demostró que los polipéptidos indicados tienen valores de pI reducidos (los cálculos de pI se realizan como se describió en la presente descripción) obtenidos a través de mutaciones de residuos específicos expuestos en la superficie como se identifica en la Tabla 21. Como se puede observar, estos polipéptidos mostraron una reducción distinta del pI en comparación con el polipéptido de referencia. Los valores de T_m medidos también se mostraron en la tabla para los polipéptidos indicados, que se midieron como se describió en la sección MATERIALES Y MÉTODOS genérica: Análisis de fluorimetría diferencial de barrido (Nano DSF) de anti-IL-6 VHH. Todos los polipéptidos anteriores mostraron temperaturas de fusión relativamente altas entre 48-60°C, con la mayoría entre 50-60°C, que fueron temperaturas de fusión aceptables para un compuesto farmacéutico adecuado para la

administración humana, en donde la temperatura fisiológica normal es de 37 °C.

Específicamente, el polipéptido_29 mostró un *pl* reducido de 5,8 en comparación con el polipéptido_19 de referencia mientras mantenía una temperatura de fusión adecuada de 59°C. Tal polipéptido, o más específicamente el V_HH subyacente en su interior, proporcionando así un perfil farmacéutico, tal como *pl*, temperatura de fusión y potencia (ver ejemplos adicionales más abajo), que son convenientes. Se proporcionarán detalles adicionales en los ejemplos más abajo.

EJEMPLO 4: ACTIVIDAD IN VITRO DE VARIANTES DE VHH ANTI-IL-6 EN EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO STAT-3-LUC, DECONVOLUCIÓN DE RESIDUOS QUE INTERACTÚAN CON IL-6 MUTADOS EN VHH_1.6

Propósito

El propósito de este ejemplo fue probar la capacidad de las variantes de residuos de CDR/FR deconvolucionadas VHH_1.6 de V_HH anti-IL-6 para inhibir la señalización de STAT3 dependiente de IL-6 y, por lo tanto, la actividad de IL-6 *in vitro*. Por lo tanto, esto proporciona una comprensión del efecto de los residuos individuales de CDR/FR para la interacción del VHH_1.6 anti-IL-6 con IL-6 humana. Los datos se presentan en Tabla 23 y Tabla 24.

Métodos

Mutagénesis in silico para el muestreo de mutaciones energéticamente favorables para la mejora de la unión

Se obtuvo la estructura cristalina por rayos X del complejo de proteína VHH-IL-6. La estructura se limpió para eliminar cualquier residuo o átomo faltante mediante el uso de PyMOL (Schrödinger, LLC). Se añadieron átomos de hidrógeno y las estructuras se minimizaron para aliviar cualquier choque estérico mediante el uso de RosettaSuite. Los residuos dentro de 5 Å de la superficie de IL-6 se identificaron como posibles sitios de mutación. Para cada residuo identificado, se realizó la mutagénesis de saturación de sitios in silico (SSM) al mutar computacionalmente el residuo a las 19 posibles sustituciones de aminoácidos y evaluar el impacto en la energía de unión mediante el uso de la función de puntuación de Rosetta (es decir, Función de puntuación denominada *ref2015*). Los sustitutos del polipéptido_29 de referencia (SEQ ID No. 67) que comprende VHH_1.6 se resumen en la Tabla 23. Para simular mejor el movimiento de la cadena principal tras la introducción de mutaciones, se permitió una perturbación de la cadena principal de 0,2 Å.

Para las mutaciones mejor clasificadas de la SSM, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (MD) para evaluar aún más la afinidad de unión y recapitular la dinámica de unión. El campo de fuerza AMBER99SB se usó para la proteína, y las simulaciones se llevaron a cabo mediante el uso del paquete de software GROMACS. Cada sistema se minimizó, se equilibró y luego se sometió a una corrida de producción de 100 ns a 300 K y 1 atm de presión. Las trayectorias seleccionadas se extrajeron para calcular la energía de unión mediante el uso de la aplicación *ddg* cartesiana de Rosetta.

Ensayo del gen reportero (RGA)

El ensayo del gen reportero se realizó como se describió en la sección MATERIALES Y MÉTODOS. Los valores informados son las medias de dos réplicas técnicas (Tabla 24).

Resultados

Como se describió anteriormente, el polipéptido_29 del ciclo de diseño se identificó como un punto de partida. Cada una de las mutaciones explorada como parte del ciclo de diseño en comparación con polipéptido_19 (SEQ ID No. 57, identificado originalmente en EJEMPLO 1: INMUNIZACIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECA DE VHH) se deconvolucionó para obtener una mejor comprensión del papel individual de las modificaciones de residuos dadas. La Tabla 23 a continuación proporciona una descripción general de los polipéptidos de este ejemplo, donde la columna de polipéptidos proporciona la información de cada entrada, la columna de modificación identifica la modificación del residuo en comparación con polipéptido_29 y la columna de VHH identifica el VHH subyacente para cada uno de los polipéptidos. También se puede hacer referencia a la Tabla 12 para la composición detallada de los polipéptidos de ejemplo. La Tabla 24 muestra la potencia (IC₅₀) de las entradas de polipéptidos VHH anti-IL6 y la potencia relativa con respecto al polipéptido_29 de referencia. Tabla 23 y Tabla 24 identifican además el polipéptido_19 de referencia para facilitar la comprensión.

Tabla 23. Descripción general de los polipéptidos variantes de VHH anti-IL6 probados como parte de la deconvolución del polipéptido_29

Polipéptido		Modificaciones al V _H H del polipéptido_29 de referencia	V _H H	
ID	SEQ ID No.		ID	SEQ ID No.
Polipéptido_19	57	E1Q, V2L, L11W, R28T, E31S, Q54N, E56D, E62H, L65K, D74N, E82Q, D84N, G85S, K100S, N106G	VHH_1.11	33
Polipéptido_29 (Referencia)	67	-	VHH_1.6	28
Polipéptido_49	131	E1Q	VHH_3.1	145
Polipéptido_50	132	V2L	VHH_3.2	146
Polipéptido_51	133	L11W	VHH_3.3	147
Polipéptido_52	134	R28T	VHH_3.4	148
Polipéptido_53	135	E31S	VHH_3.5	149
Polipéptido_54	136	Q54N	VHH_3.6	150
Polipéptido_55	137	E56D	VHH_3.7	151
Polipéptido_56	138	E62H	VHH_3.8	152
Polipéptido_57	139	L65K	VHH_3.9	153
Polipéptido_58	140	D74N	VHH_3.10	154
Polipéptido_59	141	D84N	VHH_3.11	155
Polipéptido_60	142	G85S	VHH_3.12	156
Polipéptido_61	143	K100S	VHH_3.13	157

Polipéptido_62	144	N106G	VHH_3.14	158
----------------	-----	-------	----------	-----

Tabla 24. Potencia (IC50) y potencia relativa de polipéptidos variantes de VHH anti-IL6. La potencia relativa es en comparación con el polipéptido_29 de referencia.

Polipéptido		IC50 (nM)	IC50 relativa con respecto al polipéptido_29 de referencia
ID	SEQ ID No.		
Polipéptido_19	57	0,185	5,4
Polipéptido_29 (Referencia)	67	0,034	1,0
Polipéptido_49	131	0,051	1,5
Polipéptido_50	132	0,049	1,4
Polipéptido_51	133	0,053	1,5
Polipéptido_52	134	0,055	1,6
Polipéptido_53	135	0,050	1,5
Polipéptido_54	136	0,150	4,4
Polipéptido_55	137	0,278	8,1
Polipéptido_56	138	0,168	4,9
Polipéptido_57	139	0,080	2,3
Polipéptido_58	140	0,047	1,4
Polipéptido_59	141	0,043	1,2
Polipéptido_60	142	0,057	1,7
Polipéptido_61	143	0,054	1,6
Polipéptido_62	144	0,130	3,8

Como se muestra en la Tabla 24, el polipéptido_29 mostró una potencia de 0,034 nM. Los polipéptidos de variantes generalmente dieron como resultado una menor potencia. Por ejemplo, el polipéptido_54, el polipéptido_55 y el polipéptido_56 mostraron una disminución de 4,4, 8,1 y 4,9 veces en la potencia, respectivamente, en comparación con el polipéptido_29. Estos polipéptidos variantes incorporaron mutaciones en las posiciones 54, 56 y 62, lo que enfatiza la importancia de estos residuos. Además, también se observó una disminución de 2,3 veces en la potencia en el polipéptido variante_57 mutado en la posición 65, mientras que la mutación en la posición 106 que se muestra en el polipéptido variante_62 dio como resultado una disminución de 3,8 veces en la potencia.

Estos datos demostraron que las mutaciones identificadas en el ciclo de diseño para polipéptido_29 desempeñaron un papel en la obtención de la mayor potencia, lo cual es conveniente. En algunos casos, los datos de deconvolución mostraron que cambiar algunos de estos residuos resulta en una pérdida de potencia de 2 o más veces. Los datos mostraron que los residuos 54Q, 56E, 62E y 106N que se encuentran en polipéptido_29 (o más específicamente que se encuentran en el VHH_1.6 subyacente) desempeñaron un papel importante en el aumento del puente de sal (54Q y 56E) o la generación de un nuevo puente de

sal (62E y 106N) entre el V_HH anti-IL6 y la IL-6. Un análisis estructural de las estabilizaciones del puente salino en las posiciones 54, 56, 62 y 106 que garantizan una mejor unión a IL-6 y, por lo tanto, aumentan la potencia del polipéptido_29 se muestran en la Figura 5.

EJEMPLO 5: ACTIVIDAD IN VITRO DE VHH_1.6 ANTI-IL-6 Y LOS COMPARADORES EN EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO STAT-3-LUC

Propósito

El propósito de este ejemplo fue comparar la potencia de VHH_1.6 en la inhibición de la señalización de STAT3 dependiente de IL-6, y por lo tanto la actividad de IL-6 *in vitro*, con el de otros anticuerpos inhibidores de IL-6.

Métodos

El ensayo del gen reportero se realizó como se describió en la sección MATERIALES Y MÉTODOS. Los valores informados son las medias de dos réplicas técnicas.

El polipéptido_29 (que comprende VHH_1.6) y el Fab anti-IL6 de referencia se prepararon como se describió anteriormente en la presente descripción.

Dos constructos de comparador se produjeron recombinantemente como se describió genéricamente anteriormente en las secciones de Materiales y Métodos “Expresión genérica de V_HH” y “Purificación y análisis genérico de V_HH” y se usa para la comparación cara a cara de las mediciones de IC₅₀ y para el cálculo de la potencia relativa. Un análogo de secuencia idéntica (SIA) del dominio anti-IL-6R (SEQ ID No: 163) del anticuerpo de dominio biespecífico Vobarilizumab (núm. de registro CAS: 1628814-88-9) se preparó como primer comparador. Además, un análogo de secuencia idéntica (SIA) del bloque de construcción de VHH anti-IL-6 7G05 encontrado en los constructos de ISVD multiespecíficos descritos en el documento WO2022/129572 (SEQ ID No. 165) se preparó como el segundo comparador.

Resultados

Tabla 25. Potencias (IC₅₀) y potencias relativas con respecto al polipéptido_29 y al Fab anti-IL6 de referencia

ID de entrada	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ relativa con respecto al polipéptido_29	IC ₅₀ relativa con respecto al Fab anti-IL6 de referencia
Fab anti-IL6 de referencia	0,039	0,9	1
Polipéptido_29	0,044	1	1,1
Comparador SIA del dominio anti-IL-6R de Vobarilizumab	0,114	2,6	2,9
comparador SIA del bloque de construcción de VHH anti-IL-6 7G05	0,115	2,6	2,9

Como se puede ver más arriba, el Fab anti-IL6 de referencia y el polipéptido_29 tenían potencias

comparables a 39 y 44 pM, respectivamente. Además, se observó que el análogo de secuencia idéntica (SIA) del dominio anti-IL-6R del anticuerpo biespecífico Vobarilizumab y el análogo de secuencia idéntica (SIA) del bloque de construcción de VHH anti-IL-6 7G05 tenía valores de IC50 más altos, que eran ambos aproximadamente 2,6 veces más altos que el polipéptido_29. Escrito de cualquier otra manera, los datos mostraron que los comparadores tienen una potencia que es 2,6 veces menor que la de Polipeptido_29.

Conclusión

Como se desprende de lo anterior, se mostró que el polipéptido_29 tenía una potencia sustancialmente mayor en comparación con los constructos anti-IL6 comparadores. Se mostró que el polipéptido_29 o, más específicamente, el VHH_1.6 subyacente proporcionaba una potencia que era similar a la demostrada por el Fab anti-IL6 de referencia. Se entiende que lograr una alta potencia es un rasgo muy conveniente.

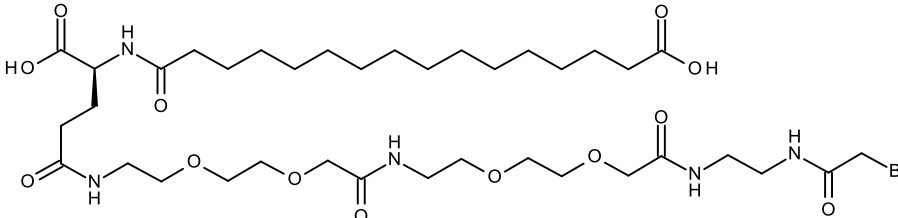
EJEMPLO 6: GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS

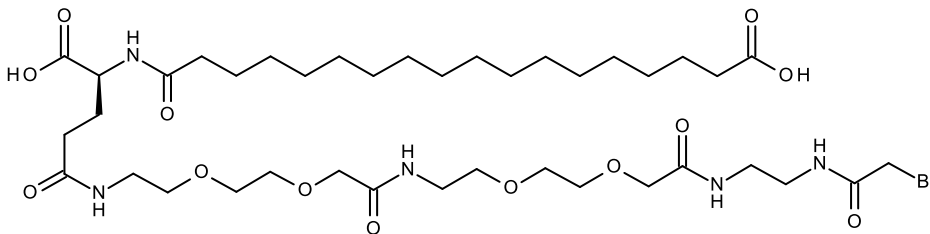
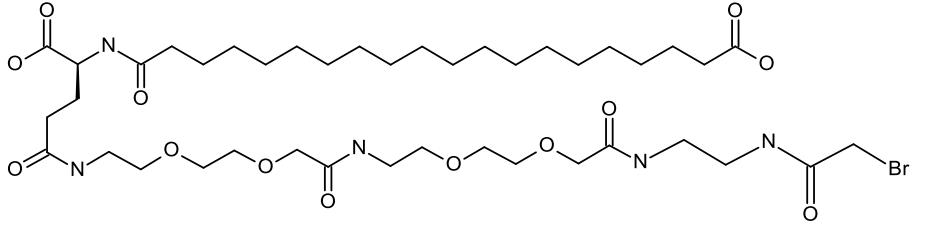
Para mejorar las propiedades farmacocinéticas, los polipéptidos que comprenden dos residuos de cisteína libres en la extensión C-terminal se conjugaron con dos sustituyentes, cada uno de los cuales comprende un resto de prolongación de ácido graso y elementos enlazadores. La construcción resultante que se forma por lo tanto polipéptidos derivados, como se describe adicionalmente más abajo.

Para unir el sustituyente a los polipéptidos, se usó un reactivo intermedio en forma de un sustituyente modificado (por ejemplo, Quím. 28, ver Tabla 26).

El reactivo intermedio que comprende el resto de prolongación se preparó como se describe en el documento WO 2016/102562 y ejemplos no limitativos de reactivos intermedios para sustituyentes adecuados adicionales (por ejemplo, para sustituyentes mostrados en la Tabla 9) se muestra en la Tabla 26 a continuación:

Tabla 26. Ejemplo de un reactivo intermedio que comprende el resto de prolongación.

Estructura de reactivos intermedios y nombre IUPAC (nombre abreviado)	Quím. #
 ácido 15-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[[2-(2-[[2-(2-bromoacetil-amino)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]metoxi}etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]pentadecanoico (reactivo enlazador diácido C16)	Quím. 28

 ácido 17-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-bromoacetyl-amino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]heptadecanoico (reactivo enlazador diácido C18)	Quím. 29
 ácido 19-[(S)-1-carboxi-3-[2-(2-[2-(2-[2-(2-bromoacetyl-amino)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]metoxi)etoxi)etilcarbamoil]propilcarbamoil]nonadecanoico (reactivo enlazador diácido C20)	Quím. 30

Conjugación, purificación y análisis

A la solución formulada de agua o PBS o HBS que contiene el polipéptido V_{HH} purificado con residuos de cisteína introducidos para la conjugación, 5 eq. Se añadió BSPP (sal de bis(p-sulfonatofenil)fenilfosfina dihidratada de dipotasio) o 1,1 eq TCEP (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina) por cisteína protegida (es decir cisteínas que están bloqueadas, de la expresión recombinante en células huésped, con pequeños tioles tales como cisteínas, homocisteína, glutatión, etc.). Después de 1-2 h de agitación, se ajustó el pH a 8,5 con NaOH ac. y se añadieron 5 eq. del reactivo intermedio Quím. 28 en NaHCO₃ 0,1 M (ac.) por cisteína libre en el polipéptido V_{HH} respectivo. La mezcla se agitó suavemente durante 1,5-16 horas en la oscuridad. La mezcla de reacción se diluyó con agua antes de la purificación por el método de intercambio aniónico (AIEX) mediante el uso de un sistema Äkta. El polipéptido V_{HH} con la conjugación de la cadena lateral se purificó mediante el uso de un método de separación de cromatografía de AIEX. Por lo tanto, la resina AIEX Fuente 30Q empaquetada en una columna adecuada se usó junto con un programa de gradiente de cloruro de sodio o acetato de amonio en un sistema de cromatografía Äkta Avant. Los sistemas de tampón usados fueron un tampón de equilibrio compuesto de Tris 20 mM, pH 8,5 y un tampón de elución compuesto de Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,5; o Tris 20 mM, acetato de amonio 1 M, pH 8,5. La mezcla de reacción se ajustó a pH 8,5 y se diluyó a una conductividad por debajo de 4 mS/cm mediante el uso de MilliQ-H₂O o tampón de equilibrio. La muestra se aplicó a la columna y la columna se lavó después de la aplicación con 5 a 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio. A continuación, se realizó la cromatografía de separación mediante el uso de un gradiente superficial de 30 a 50 volúmenes de columna. El gradiente

usado fue de 0 % y hasta 50 % en dependencia del pl del derivado polipeptídico V_HH que se purificó. Generalmente, los polipéptidos V_HH parentales no conjugados se eluyeron temprano en el gradiente, los polipéptidos V_HH con conjugación única eluyen en el medio del gradiente y los polipéptidos V_HH con multiconjugaciones, lo que significa más de una conjugación de cadena lateral por molécula de polipéptido V_HH, eludida tarde en el gradiente. La agrupación de fracciones sobre el pico principal se llevó a cabo de manera que se obtuvieron altas purezas entre el 90 y el 99 % de polipéptido V_HH con preparaciones con doble conjugado. El análisis de pureza se realizó mediante el uso de un método de cromatografía líquida de ultrarrendimiento de fase inversa (RP-UPLC) basado en la columna HALO DiPhenyl 1000 Å, 2,7 µm, 150x2,1 mm (Scantec Nordic USDPF001316) y tampones de corrida compuestos de A) TFA al 0,1 % v/v en agua y B) TFA al 0,09 % v/v en configuración de acetonitrilo en un sistema Waters Acquity UPLC con detector de UV y FLD. La temperatura de la columna se fijó en 60 °C. El programa de gradiente fue 1) 0,0-8,0 min: 20-50 % de B, 2) 8,0-8,1 min: 50-80 % de B, 3) 8,1-9,0 min: 80 % de B, 4) 9,0-9,1 min: 80-20 % de B y 5) 9,1-11,0 min: 20 % de B. El polipéptido V_HH parental no conjugado se eluyó entre 4,6-4,8 minutos. El derivado polipeptídico de V_HH con conjugación única eluyó entre 5,1-5,6 min. El derivado polipeptídico V_HH con dobles conjugaciones eluyó entre 5,7-5,8 y posteriormente para los polipéptidos V_HH multiconjugados fuera del sitio. La integridad de los polipéptidos V_HH con conjugación(ones) se analizó mediante el uso de un método de SE-HPLC configurado en un sistema Agilent LC 1100/1200 y una columna BIOSEP-SEC-3000 de 300x7,8 mm (Phenomenex, núm. cat. OOH-2146-K0) y un tampón de corrida compuesto por fosfato de Na 200 mM, pH 6,9, NaCl 300 mM e isopropanol al 10 %. Las masas moleculares de polipéptido V_HH con conjugación(ones) se analizaron mediante el uso de ESI-TOF-MS en un sistema Agilent 6280 (Agilent Technologies) con una columna de desalación MassPREP (Waters) que se ejecutó a 0,4 ml/min en un tampón A compuesto de MilliQ-H₂O/0,1 % de ácido fórmico y tampón B compuesto de acetonitrilo/0,1 % de ácido fórmico para la elución de la etapa. También se usó un método de ESI-TOF-MS para evaluar y con el método de pureza de UPLC de fase inversa descrito anteriormente mediante el análisis de masas de proteínas intactas y masas de péptidos a partir de proteínas digeridas trópticamente que se recolectaron en los picos de elución indicados descritos anteriormente para el método de corrida de RP-UPLC. Para medir la concentración de proteínas de preparaciones de lotes del derivado polipeptídico de V_HH con conjugación(ones), se usó un espectrofotómetro NanoDrop™ (Thermo Scientific) con coeficientes de extinción calculados teóricamente.

Ejemplos de derivados polipeptídicos

Una descripción general de los derivados polipeptídicos sintetizados se muestra en la Tabla 27 para facilitar la referencia. Puede referirse además a la Tabla 12 para obtener una descripción general de los derivados polipeptídicos. Los datos de caracterización de los derivados polipeptídicos se muestran en la Tabla 28. Se entiende que estos son solo ejemplos y no deben interpretarse como limitantes de ninguna manera.

Tabla 27. Descripción general de los derivados polipeptídicos.

ID del compuesto	V _H H		Extensión C-terminal		Sustituyente ¹
	ID	SEQ ID #	ID	SEQ ID #	Quím. #
Compuesto 1	VHH_1.12	34	E2	72	24

Compuesto 2	VHH_1.13	35	E2	72	24
Compuesto 3	VHH_1.14	36	E2	72	24
Compuesto 4	VHH_1.1	23	E2	72	24
Compuesto 5	VHH_1.2	24	E2	72	24
Compuesto 6	VHH_1.3	25	E2	72	24
Compuesto 7	VHH_1.4	26	E2	72	24
Compuesto 8	VHH_1.5	27	E2	72	24
Compuesto 9	VHH_1.6	28	E2	72	24
Compuesto 10	VHH_1.7	29	E2	72	24
Compuesto 12	VHH_1.17	103	E2	72	24

¹ Dos sustituyentes. Un sustituyente unido a Cys en la posición 4 y un sustituyente unido a Cys en la posición 6 de la SEQ ID NO: 72. Para un dibujo esquemático, ver las Figuras 3A/3B que muestran el Compuesto 9.

Tabla 28. Datos de caracterización de los derivados polipeptídicos.

ID del compuesto	Calc. Mw [Da]	Mw encontrada [Da]	Método de UPLC ¹ – pureza [%]
Compuesto 1	15532	15532	99,4
Compuesto 2	15302	15299	94,4
Compuesto 3	15755	15 736 [incl. pos1 Gln a formación de piroGlu]	98,9
Compuesto 4	15740	15740	95,3
Compuesto 5	15631	15631	94,9
Compuesto 6	15639	15639	88,7
Compuesto 7	15639	15639	92,0
Compuesto 8	15617	15616	96,1
Compuesto 9	15616	15615	94,3
Compuesto 10	15588	15587	95,8

¹ Para detalles del método, ver el método de RP-UPLC que usa la columna HALO DiPhenyl proporcionado en la sección Conjugación, purificación y análisis.

Propiedades de derivados polipeptídicos seleccionados

Tabla 29. Propiedades de derivados polipeptídicos seleccionados

ID del compuesto	pI	Tm (°C, estabilidad)	Rendimiento de expresión, expresado en Expi293F [mg/l]
Compuesto 4	4,65	53,0	130
Compuesto 5	4,69	55,8	74
Compuesto 6	4,78	51,5	116
Compuesto 7	4,67	54,7	143

Compuesto 8	4,49	55,0	105
Compuesto 9	4,61	56,1	88
Compuesto 10	4,34	48,7	143

Como se observó en la Tabla 27, Tabla 28 y Tabla 29, los constructos de compuesto indicados han mostrado altas purezas y pesos moleculares medidos correctos, así como también valores de pl reducidos (los cálculos de pl se realizan como se describe en la presente descripción) obtenidos a través de mutaciones de residuos específicos expuestos en la superficie (como se indicó anteriormente en la Tabla 21) y a través de conjugados de sustituyentes diácidos. Por lo tanto, estos compuestos mostraron, una vez más, una reducción distinta del pl en comparación con el polipéptido_19 de referencia y/o un constructo polipeptídico correspondiente sin sustituyente(s) como se describió anteriormente con referencia a la Tabla 21 y Tabla 22. Los valores de T_m medidos también se muestran en la Tabla 29 para los compuestos/derivados polipeptídicos indicados, que se midieron como se describió en la sección MATERIALES Y MÉTODOS: Análisis de fluorimetría diferencial de barrido (Nano DSF) de anti-IL-6 VHH. Todos los compuestos mostraron temperaturas de fusión relativamente altas entre 48,7-56,1 °C, la mayoría por encima de 51 °C, que fueron temperaturas de fusión aceptables para un compuesto farmacéutico adecuado para la administración humana, en donde la temperatura fisiológica normal es de 37 °C.

Los niveles de expresión de los polipéptidos precursores que conducen a la producción de estos conjugados polipeptídicos estuvieron en el intervalo de 74 a 143 mg/l mediante el uso del sistema de expresión transitorio de mamíferos Expi293F, que es un nivel de expresión inicial aceptable para un trabajo de desarrollo y fabricación escalable adicional.

Específicamente, el compuesto 9 mostró un pl de 4,61 y una temperatura de fusión de 56,1 °C que son convenientes en un constructo farmacéutico. Se proporcionarán detalles adicionales en los ejemplos más abajo.

Conclusión

La generación de polipéptidos y derivados polipeptídicos como se describió anteriormente proporcionó el desarrollo de constructos que muestran perfiles farmacéuticos convenientes. Los polipéptidos y/o derivados polipeptídicos demostraron un pl más bajo mientras mantenían temperaturas de fusión adecuadas y una expresabilidad adecuada. Por ejemplo, el compuesto 9 mostró un pl bajo, una temperatura de fusión alta y una buena expresabilidad.

EJEMPLO 7: ACTIVIDAD IN VITRO DE VARIANTES DE VHH ANTI-IL-6 EN EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO STAT-3-LUC, EFECTO DEL SUSTITUYENTE DE ÁCIDO GRASO

Propósito

El propósito de este ejemplo fue probar el efecto de la longitud del prolongador de ácidos grasos en el extremo C-terminal sobre la potencia de los variantes para inhibir la señalización de STAT3 dependiente de IL-6 y, por lo tanto, la actividad de IL-6 *in vitro*. Esto elucida el efecto de la unión a la albúmina sérica sobre la potencia de derivados polipeptídicos de VHH anti-IL-6 para unirse a IL-6 humana.

Métodos

El ensayo del gen reportero se realizó como se describió en la sección MATERIALES Y MÉTODOS. Los

valores informados son las medias de dos réplicas técnicas o dos réplicas experimentales (n=2).

Resultados

Tabla 30 identifica los derivados polipeptídicos probados como parte de este experimento, etiquetado como “Compuesto”, y proporciona la composición detallada de cada uno de los derivados polipeptídicos. También se puede hacer referencia Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos. Como se puede ver, el compuesto 14 al compuesto 19 son derivados polipeptídicos que comprenden VHH_1.6 en ellos, que comprenden una extensión C-terminal con 1 o 2 cisteínas. Estas cisteínas fueron el sitio de conjugación de 1 o más sustituyentes con ácidos grasos diferentes.

La Tabla 33 muestra los valores medios de IC50 y los valores de IC50 relativos al polipéptido no prolongado (polipéptido_29) que comprende el mismo VHH subyacente (VHH_1.6). Los derivados polipeptídicos, identificados como compuestos, tenían uno o más sustituyentes unidos al polipéptido, que comprendía una prolongación de ácido graso. Se observó el efecto de conjugar 1 o 2 sustituyentes, mientras se explora además el efecto de diferentes tipos de restos de prolongación mediante el uso de ácidos grasos C16, C18 y C20. Los derivados polipeptídicos identificados como Compuesto 14 y Compuesto 17 comprendieron 1x o 2x ácido(s) graso(s) C16 (Quím. 24), respectivamente. Los derivados polipeptídicos identificados como Compuesto 15 y Compuesto 18 comprendieron 1x o 2x ácido(s) graso(s) C18 (Quím. 26), respectivamente. Los derivados polipeptídicos identificados como Compuesto 16 y Compuesto 19 comprendieron 1x o 2x ácido(s) graso(s) C20 (Quím. 27), respectivamente. La potencia del polipéptido_29 que comprende el mismo VHH subyacente (VHH_1.6) y una extensión sin sustituyentes también se proporciona en Tabla 33 para propósitos de comparación.

Tabla 30. Lista de derivados polipeptídicos probados como parte del experimento y composición detallada.

ID de entrada	VHH		Extensión / etiqueta C-terminal			Sustituyente	
	ID	SEQ ID no.	ID	SEQ ID No.	ID	ID	Posición
Compuesto 14	VHH_1.6	28	E8- [etiqueta de 6xHis]	161	Quím. 24		Cys en la posición 4 de la extensión
Compuesto 15	VHH_1.6	28	E8- [etiqueta de 6xHis]	161	Quím. 26		Cys en la posición 4 de la extensión
Compuesto 16	VHH_1.6	28	E8- [etiqueta de 6xHis]	161	Quím. 27		Cys en la posición 4 de la extensión
Compuesto 17	VHH_1.6	28	E2- [etiqueta	162	Quím. 24		Cys en la posición 4 de la extensión

			de 6xHis]		Quím. 24	Cys en la posición 6 de la extensión
Compuesto 18	VHH_1.6	28	E2-[etiqueta de 6xHis]	162	Quím. 26 Quím. 26	Cys en la posición 4 de la extensión Cys en la posición 6 de la extensión
Compuesto 19	VHH_1.6	28	E2-[etiqueta de 6xHis]	162	Quím. 27 Quím. 27	Cys en la posición 4 de la extensión Cys en la posición 6 de la extensión

Tabla 31. Potencia (IC50) y potencia relativa de derivados polipeptídicos que comprenden VHH_1.6 conjugado con sustituyentes variables. La potencia relativa es en comparación con el polipéptido_29, que comprende el mismo VHH_1.6 y ningún sustituyente.

ID de entrada	Nota sobre el sustituyente	n	IC50 (nM) media	IC50 relativa con respecto al polipéptido_29
Polipéptido_29 (Referencia)	Sin sustituyente	1	0,039	1
Compuesto 14	Quím. 24 (1x)	2	0,041	1,1
Compuesto 15	Quím. 26 (1x)	2	0,046	1,3
Compuesto 16	Quím. 27 (1x)	2	0,054	1,6
Compuesto 17	Quím. 24 (2x)	1	0,040	1,0
Compuesto 18	Quím. 26 (2x)	2	0,043	1,2
Compuesto 19	Quím. 27 (2x)	2	0,042	1,1

Conclusión

Los derivados polipeptídicos que comprendían un sustituyente de ácidos grasos mostraron valores de IC50 que eran comparables a los del polipéptido_29 de referencia no prolongado. Los datos demostraron que la potencia permaneció generalmente estable independientemente de si había un único sustituyente o un sustituyente doble unido al polipéptido o si el sustituyente comprendía el Quím. 24, Quím. 25 o Quím. 26. El compuesto 17, con dos sustituyentes (uno unido al residuo de cisteína en la posición 4 de la extensión de extremo C y el otro unido al residuo de cisteína en la posición 6 de la extensión de extremo C), dio como resultado la menor cantidad de variación en la potencia del derivado polipeptídico.

EJEMPLO 8: ENSAYO DEL GEN REPORTERO Y EXPERIMENTOS DE SPR

La caracterización *in vitro* se realizó como parte de las optimizaciones de los V_HH en forma de polipéptidos y derivados polipeptídicos mediante el uso de ensayo del gen reportero y ensayo basado en SPR de unión directa.

8.1: Actividad *in vitro* de V_HH anti-IL-6 en ensayo del gen reportero *stat-3-luc*

Propósito

El propósito de este ejemplo fue probar la capacidad de los V_HH para inhibir la señalización de STAT3

dependiente de IL-6 y, por lo tanto, la actividad de IL-6 *in vitro*.

El ensayo también se usó para investigar que las modificaciones adicionales, tales como las mutaciones del pl, las mutaciones de desinmunización y las conjugaciones de ácidos grasos, no dieron como resultado una reducción no deseada de la potencia del polipéptido V_{HH} y/o derivado polipeptídico, que incluye en presencia de HSA.

Métodos

El ensayo del gen reportero se realizó como se describió en la sección MATERIALES Y MÉTODOS. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el FBS se reemplazó por albúmina sérica humana al 1 % (HSA, (Sigma #A9511)) para la prueba de VHH acilados. Los valores informados se promediaron en todos los experimentos.

Un análogo de secuencia idéntica (SIA) del anticuerpo de dominio biespecífico Vobarilizumab (núm. de registro del CAS: 1628814-88-9, SEQ ID No. 164), y el dominio anti-IL-6R de este (SEQ ID No. 163, descrito anteriormente en la Tabla 26) se muestran con fines de comparación. El anticuerpo de dominio biespecífico Vobarilizumab y el dominio anti-IL-6R del mismo se produjeron de manera recombinante como se describió genéricamente anteriormente en las secciones de Materiales y Métodos “Expresión genérica de V_{HH}” y “Purificación y análisis genérico de V_{HH}”.

También se muestra el Fab Anti-IL6 de referencia descrito en detalle anteriormente.

Resultados

La Tabla 32 a continuación muestra los valores de IC₅₀ de polipéptidos V_{HH} anti-IL-6 seleccionados (identificados con una ID de polipéptido) o derivados polipeptídicos (identificados con una ID de compuesto) en un medio con albúmina sérica humana al 1 % (HSA) o sin HSA. Para facilitar la referencia, se muestra el V_{HH} subyacente para cada uno de estos polipéptidos / derivados polipeptídicos. Puede referirse además a la Tabla 12 para la composición detallada de los polipéptidos / derivados polipeptídicos de ejemplo. Las IC₅₀ se determinan al realizar un ajuste de 4 parámetros a una dilución seriada 1:3 de 12 etapas.

Tabla 32. Valores de IC₅₀ de los polipéptidos / derivados polipeptídicos de V_{HH} anti-IL-6 en medio con 1 % o sin HSA. n=número de experimentos.

Entra da	ID de polipéptido / ID de compuesto	ID de V _{HH}	HSA	n	IC 50 (nM)	STD (nM)	SEM (nM)
1A	Polipéptido_18	VHH_1.16	0%	2	0,020	0,002	0,002
1B	Polipéptido_18	VHH_1.16	1%	1	0,020		
2A	Polipéptido_34	VHH_1.8	0%	5	0,066	0,024	0,011
2B	Polipéptido_34	VHH_1.8	1%	2	0,046	0,010	0,007
3A	Polipéptido_19	VHH_1.11	0%	12	0,117	0,090	0,026
3B	Polipéptido_19	VHH_1.11	1%	2	0,064	0,006	0,005
4A	Polipéptido_47	VHH_1.15	0%	6	0,017	0,004	0,002
4B	Polipéptido_47	VHH_1.15	1%	1	0,010		
5A	Compuesto 1	VHH_1.12	0%	1	0,029		
5B	Compuesto 1	VHH_1.12	1%	3	0,060	0,005	0,003

6B	Compuesto 12	VHH_1.17	1%	2	0,021	0,001	0,001
7A	Compuesto 2	VHH_1.13	0%	2	0,065	0,001	0,001
7B	Compuesto 2	VHH_1.13	1%	2	0,041	0,003	0,002
8A	Polipéptido_46	VHH_1.14	0%	1	0,021		
9A	Compuesto 3	VHH_1.14	0%	1	0,029		
9B	Compuesto 3	VHH_1.14	1%	1	0,029		
10A	Polipéptido_22	VHH_1.2	0%	1	0,029		
11A	Polipéptido_24	VHH_1.3	0%	1	0,019		
12A	Polipéptido_27	VHH_1.4	0%	1	0,026		
13A	Polipéptido_28	VHH_1.5	0%	1	0,027		
14A	Polipéptido_29	VHH_1.6	0%	8	0,035	0,014	0,005
15A	Polipéptido_31	VHH_1.7	0%	1	0,023		
16A	Compuesto 4	VHH_1.1	0%	1	0,024		
16B	Compuesto 4	VHH_1.1	1%	1	0,015		
17A	Compuesto 5	VHH_1.2	0%	1	0,019		
17B	Compuesto 5	VHH_1.2	1%	1	0,012		
18A	Compuesto 6	VHH_1.3	0%	1	0,018		
18B	Compuesto 6	VHH_1.3	1%	1	0,016		
19A	Compuesto 7	VHH_1.4	0%	2	0,025	0,001	0,001
19B	Compuesto 7	VHH_1.4	1%	2	0,019	0,006	0,005
20A	Compuesto 8	VHH_1.5	0%	1	0,020		
20B	Compuesto 8	VHH_1.5	1%	1	0,017		
21A	Compuesto 9	VHH_1.6	0%	3	0,022	0,002	0,001
21B	Compuesto 9	VHH_1.6	1%	2	0,014	0,004	0,003
23A	Compuesto 10	VHH_1.7	0%	1	0,022		
23B	Compuesto 10	VHH_1.7	1%	1	0,016		
24A	Fab anti-IL6 de referencia	-	0%	21	0,026	0,010	0,002
24B	Fab anti-IL6 de referencia	-	1%	4	0,017	0,008	0,004
25A	Comparador SIA del dominio anti-IL-6R de Vobarilizumab	-	0%	1	0,114		
25B	Comparador SIA de vobarilizumab	-	0%	1	Sin inhibición		

Conclusión

El Se demostró que los polipéptidos / derivados polipeptídicos de V_HH anti-IL-6 inhiben la señalización de IL-6 a valores de IC₅₀ entre 10 y 117 pM (Tabla 32).

Como puede verse, el polipéptido_19 V_HH inicial seleccionado (SEQ ID NO: 57) mostró una potencia IC₅₀ de aproximadamente 117 pM. La introducción de mutaciones seleccionadas y la conjugación C-terminal de dos ácidos grasos diácidos C16 (Quím. 24) en Cys4 y Cys6 en la extensión C-terminal E2 de la SEQ ID No. 72 mostró además una IC₅₀ / potencia adecuada en presencia de HSA de aproximadamente 60 pM o menos. Por ejemplo, el compuesto 9 tenía una IC₅₀ / potencia en presencia de HSA de 14 pM.

Los datos muestran adicionalmente que la potencia de los polipéptidos (o más específicamente del V_HH subyacente) no se vio afectada por los sustituyentes de ácidos grasos unidos a los mismos, como se analizó en el EJEMPLO 7: ACTIVIDAD IN VITRO DE VARIANTES DE V_HH ANTI-IL-6 EN EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO STAT-3-LUC, EFECTO DEL SUSTITUYENTE DE ÁCIDO GRASO. Por el contrario, el comparador análogo de secuencia idéntica de Vobarilizumab (núm. de registro de CAS: 1628814-88-9, SEQ ID No: 164) dio como resultado una pérdida completa de potencia cuando se conjugó con su dominio anti-HSA. Como puede observarse en los datos, mientras que el análogo de secuencia idéntica del dominio anti-IL-6R en la entrada 25A (SEQ ID No. 163) de Vobarilizumab demostró alguna inhibición de la señalización de IL-6 de baja potencia (como se discutió anteriormente con referencia a Tabla 25), la inclusión del dominio anti-HSA de Vobarilizumab dio como resultado una pérdida de las propiedades inhibitorias de IL-6 del constructo.

Además, los V_HH anti-IL-6 con conjugaciones de ácidos grasos, denominados derivados polipeptídicos en la presente descripción (identificados como Compuestos 1-10 en Tabla 32) no mostraron una disminución de la actividad cuando estaban en presencia de HSA en el medio de ensayo (0 % frente a 1 % de HSA).

La introducción de mutaciones que potencian la eficacia, mutaciones de desinmunización y mutaciones de corrección de la responsabilidad (ver ejemplos de mutaciones en la Tabla 21) resultó en derivados polipeptídicos de V_HH con potencias de IC₅₀ altas de entre 12 y 25 pM, respectivamente (Tabla 32, entradas 16A-23B). Los resultados demostraron además que los derivados polipeptídicos como se describe en la presente descripción proporcionaron una potencia de IC₅₀ que estaba a la par de, si no era mejor que, la potencia proporcionada por el Fab anti-IL6 de referencia. Tales potencias altas son convenientes para desarrollar un candidato a fármaco oral, y en particular, candidatos a fármaco orales basados en un armazón de anticuerpo, ya que la biodisponibilidad oral es generalmente menor en comparación con otras vías de administración.

Estas altas potencias se proporcionaron en combinación con el pI bajo, la alta temperatura de fusión y la buena expresabilidad discutida anteriormente. Por ejemplo, el Compuesto 9 se mostró en los ejemplos anteriores para proporcionar un pI bajo de 4,61, y una temperatura de fusión alta de 56,1 °C, mientras que la Tabla 32 demostró además que el mismo derivado polipeptídico proporcionado para una potencia de IC₅₀ alta de 14-22 pM (Entradas 21A, 21B) que se mantuvo, o incluso se mejoró, con la presencia de HSA. Esta combinación de características es conveniente y demuestra la posible idoneidad de este derivado polipeptídico para un producto terapéutico.

8.2: Análisis de SPR mediante el uso de IL-6 etiquetado con HPC4 como analito

Propósito

El propósito de este ejemplo fue estimar las constantes de unión de los V_HH anti-IL-6 seleccionados con IL-6 humana. La interacción parátipo:epítipo podría optimizarse deliberadamente al introducir mutaciones específicas dirigidas a, por ejemplo, disminuir el pI, desinmunizar, mejorar la funcionalidad, al medir las constantes de unión de los polipéptidos modificados para garantizar que esas modificaciones no afecten negativamente la afinidad de unión a la IL-6 humana.

Análisis de SPR de IL-6 etiquetada con HPC4

La unión de los VHH anti-IL-6 purificados a IL-6 humana recombinante etiquetada con HPC4 (SEQ ID NO: 98) se sondeó mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR).

Brevemente, un anticuerpo anti-HPC4 (como se describió anteriormente (Rezaie y otros (1992) Expression and Purification of a Soluble Tissue Factor Fusion Protein with an Epitope for an Unusual Calcium-Dependent Antibody. Protein Expression and Purification 3: 453-460; Stearns y otros (1988) The Interaction of a Ca²⁺-dependent Monoclonal Antibody with the Protein C Activation Peptide Region. JBC 263: 826-832)) se inmovilizó en un chip sensor CM4 (Cytiva) o un Xantec HLC200M (Xantec) mediante el uso de química de acoplamiento de amina estándar a pH 5. Los niveles de inmovilización de 5500-6500 RU se obtienen después de la inyección del anticuerpo @ 25 µg/ml a 10 µl/min durante 420 segundos. La IL-6 se capturó a un régimen de flujo de 10 µl/min durante 30 segundos.

Anticuerpo anti-HPC4	
<u>Cadena pesada (anti HPC4 HC)</u> QVTLLSGPGILQPSQTLTLTCSLSGFSRLTSGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRY NPVLKSRLIISKDTSRKQVFLKIASVDTADTATYYCVRMMDDYDAMDYWGQGTSVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	SEQ ID NO. 1
<u>Cadena ligera (anti HPC4 LC)</u> QIILTQSPAIMSASLGEEITLCSATSSVTYVHWYQQKSGTSPKLLIYGTSNLAGVPSRFSG SGSGTFYSLTVSSVEAEDAADYYCHQWNSYPHTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	SEQ ID NO. 2

Posteriormente, series de concentraciones de polipéptidos V_HH de acuerdo con la Tabla 33 se inyectaron a un régimen de flujo de 50 µl/min durante 200 segundos para permitir la unión al polipéptido V_HH anti-IL-6 seguido de 600 segundos de inyección de tampón de corrida (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,05 % (v/v) de surfactante P20, 1 mg/ml de albúmina sérica bovina, pH 7,4) que permite la disociación de IL-6. El tampón de corrida también se usó para la dilución de VHH anti-IL-6 e IL-6. La regeneración del chip se logró mediante el uso de un tampón de regeneración que consiste en EDTA 50 mM en tampón de

corrida sin CaCl₂, tiempo de contacto de 30 segundos y un régimen de flujo de 30 µl/min aplicado dos veces a la superficie. Los datos de unión se recolectaron a 25 °C en un instrumento Biacore (Cytiva AB, Uppsala) o un Bruker SPR32 (Bruker Daltonics). Los datos se analizaron de acuerdo con un modelo 1:1 mediante el uso de BiaEvaluation o Biacore Insight Evaluation (Cytiva AB, Uppsala) o Bruker Analyser (Bruker Daltonics).

Resultados

La tabla a continuación identifica las constantes de unión calculadas de los polipéptidos y derivados polipeptídicos en base a los datos cinéticos obtenidos en HPC4-IL6 humana. Para facilitar la referencia, se muestra el V_{HH} subyacente para cada uno de estos polipéptidos / derivados polipeptídicos. Puede referirse además a la Tabla 12 para la composición detallada de los polipéptidos / derivados polipeptídicos de ejemplo.

Tabla 33. Constantes de unión calculadas de V_{HH} y derivados basados en datos cinéticos obtenidos en HPC4-IL6 humana.

Entra da	ID de polipéptido / ID de compuesto	ID de V _{HH}	Velocidad de asociación (k _{dir}) [M ⁻¹ s ⁻¹]	Velocidad de disociación (k _{inv}) [s ⁻¹]	Afinidad (K _D) [M] ^a
1	Polipéptido_34	VHH_1.8	2,88E+07 2,88E+07		1,36E-11 1,36E-11
2	Polipéptido_47	VHH_1.15	2,59E+07 1,05E+07 2,03E+07	1,40E-04 2,08E-04 1,37E-04	5,42E-12 1,82E-11 6,74E-12
3	Polipéptido_22	VHH_1.2	2,03E+07	1,47E-04	7,21E-12
4	Polipéptido_24	VHH_1.3	4,12E+07	1,32E-04	3,21E-12
5	Polipéptido_27	VHH_1.4	2,16E+07	1,63E-04	7,55E-12
6	Polipéptido_28	VHH_1.5	2,56E+07	1,30E-04	5,08E-12
7	Polipéptido_29	VHH_1.6	2,23E+07	8,69E-05	3,90E-12
8	Polipéptido_31	VHH_1.7	8,82E+06	1,54E-04	1,75E-11
9	Compuesto 4	VHH_1.1	4,90E+06 4,75E+06	6,98E-05 9,08E-05	1,42E-11 1,91E-11
10	Compuesto 5	VHH_1.2	4,94E+06 4,65E+06	7,82E-05 9,95E-05	1,59E-11 2,14E-11
11	Compuesto 6	VHH_1.3	4,94E+06 4,65E+06	7,82E-05 9,95E-05	1,61E-11 2,14E-11
12	Compuesto 7	VHH_1.4	5,05E+06 4,56E+06	1,27E-04 1,54E-04	2,52E-11 3,38E-11
13	Compuesto 8	VHH_1.5	4,58E+06 4,16E+06	1,01E-04 1,23E-04	2,21E-11 2,96E-11

14	Compuesto 9	VHH_1.6	4,66E+06	8,71E-05	1,87E-11
			4,82E+06	1,05E-04	2,18E-11
			4,53E+06	1,01E-04	2,23E-11
15	Compuesto 10	VHH_1.7	4,48E+06	9,33E-05	2,08E-11
			5,68E+06	1,08E-04	1,91E-11
16	Compuesto 1	VHH_1.12	5,67E+06	3,64E-04	6,37E-11
			8,18E+06	3,71E-04	4,54E-11
17	Compuesto 12	VHH_1.17	7,36E+06	2,16E-04	5,43E-11
18	Compuesto 2	VHH_1.13	6665000	3,48E-04	5,23E-11

^a Se calcula como $K_D = k_{inv}/k_{dir}$.

Conclusión

Puede observarse que se obtuvieron afinidades de K_D de pM bajas a través de los ciclos de diseño y que solo se observaron efectos menores sobre las afinidades de unión a través de las optimizaciones del ciclo de diseño. Escrito de cualquier otra manera, puede observarse que se logró y mantuvo una afinidad adecuada en el intervalo de pM para los derivados polipeptídicos. Por ejemplo, el derivado polipeptídico V_HH del compuesto 1 mostró una afinidad de aproximadamente 45-63 pM, mientras que otros derivados polipeptídicos tales como los compuestos 4-10, mostraron afinidades entre 14 y 34 pM.

Tener una afinidad de pM en combinación con la alta potencia, bajo pI y alta temperatura de fusión es una combinación conveniente. Entre otros, el compuesto 9 demostró una K_D conveniente de 18-22 pM sobre las propiedades de alta potencia, bajo pI y alta temperatura de fusión.

EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Los derivados polipeptídicos identificados como Compuesto 1, Compuesto 2, Compuesto 3, Compuesto 7 y Compuesto 9 se seleccionaron para continuar en una serie de experimentos *in vivo*.

EJEMPLO 9: ESTUDIO FARMACOCINÉTICO INTRAVENOSO *IN VIVO* EN RATAS, EFECTO DEL SUSTITUYENTE DE ÁCIDO GRASO, EJEMPLO 10: ESTUDIOS DE RESPUESTA A LA DOSIS EN EL MODELO AGUDO DE IL-6 HUMANA EN RATÓN, EJEMPLO 11: PK INTRAVENOSA EN MINICERDOS, y EJEMPLO 13: ESTUDIO FARMACOCINÉTICO PERORAL E INTRAVENOSO EN PERROS: DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS DE VHH FORMULADOS CON SNAC Y NAM, descritos más abajo, muestran los datos *in vivo*.

EJEMPLO 9: ESTUDIO FARMACOCINÉTICO INTRAVENOSO *IN VIVO* EN RATAS, EFECTO DEL SUSTITUYENTE DE ÁCIDO GRASO

Propósito

El propósito de este ejemplo fue probar el efecto de los tipos y números (1 y 2) de sustituyentes de ácido graso del compuesto anti-IL-6 V_HH sobre los parámetros farmacocinéticos (PK) en ratas Sprague Dawley sanas después de la dosificación intravenosa.

Métodos

Las formulaciones líquidas de derivados polipeptídicos anti-IL-6 V_HH, denominados en la sección de ejemplos como compuestos, se administraron por vía intravenosa (IV) (formulación IV.: Hepes 20 mM, NaCl

150 mM, pH 7,4). Los compuestos formulados se administraron por vía IV a grupos paralelos de ratas Sprague Dawley aclimatadas al menos una semana internamente antes del estudio y se mantuvieron en jaulas de grupo con acceso *ad libitum* a alimentos y agua estándar. El día de la administración de la dosis, todas las ratas se aclimataron en la sala de procedimientos durante 30 minutos.

Las soluciones de dosificación de las diferentes variantes de VHH anti-IL6 se administraron en el momento 0 y las muestras de sangre se recolectaron después de 5 min y luego a las 4, 24, 48, 96, 144, 168 y 240 horas después de la dosificación. Las muestras de sangre se tomaron del plexo sublingual de la lengua (150 µl) en viales recubiertos con EDTA, (Microvette 200K3E núm. de referencia 20.1288.100, Sarstedt). El plasma se separó (4 °C, 8000 RPM, 5 min) y se transfirió a tubos (Mirconic) para medir la exposición plasmática. Las concentraciones plasmáticas de los compuestos de conjugado de V_HH se midieron mediante el uso de un inmunoanálisis basado en etiquetado con His, en el que se usaron un anticuerpo anti-V_HH (Novo Nordisk, Dinamarca) y un anticuerpo anti-etiqueta His hacia los compuestos de prueba. Aquí, las placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc, 439454) se recubrieron con 2 µg/ml de anticuerpo anti-etiqueta His (R&D systems, MAB050), se lavaron y bloquearon mediante el uso de PBS; tween20 al 0,05 %; BSA al 1 %; pH 7,4. Después de una etapa de lavado, se incubaron en la placa calibradores específicos de los compuestos (0, 2,7, 8,2, 24,7, 74, 222, 667, 2000 pM) en muestras de plasma con EDTA al 1 % de rata y plasma con EDTA de rata en una dilución mínima de 100x, en donde los compuestos de conjugado de V_HH se capturaron a través de su etiqueta His. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió un anticuerpo específico de V_HH interno biotinilado a la placa (0,5 nM) para preparar el ELISA tipo sándwich. Después de una etapa de lavado final, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) a la placa como el reactivo de detección. La cantidad de anticuerpo marcado con biotina unido al derivado polipeptídico V_HH se detectó después de la adición de un sustrato cromogénico (por ejemplo, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina). La densidad óptica se midió mediante el uso de un espectrómetro (por ejemplo, un espectrómetro SpectraMax® M2 (Molecular Devices)). La respuesta fue proporcional a la concentración de peroxidasa, que nuevamente fue proporcional a la concentración del compuesto de derivado polipeptídico V_HH.

Resultados

Los derivados polipeptídicos probados como parte de este experimento, etiquetados como “Compuesto”, corresponden a los descritos en detalle en el EJEMPLO 7: ACTIVIDAD IN VITRO DE VARIANTES DE VHH ANTI-IL-6 EN EL ENSAYO DEL GEN REPORTERO STAT-3-LUC, EFECTO DEL SUSTITUYENTE DE ÁCIDO GRASO. Tabla 30 identifica los derivados polipeptídicos probados y proporciona la composición detallada de cada uno de los derivados polipeptídicos. También se puede hacer referencia Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos.

Como se puede ver, el compuesto 14 al compuesto 19 son derivados polipeptídicos que comprenden VHH_1.6 en ellos, y que comprenden una extensión C-terminal con 1 o 2 cisteínas. Estas cisteínas fueron el sitio de conjugación de 1 o más sustituyentes con ácidos grasos diferentes.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 34 más adelante, identificando los derivados polipeptídicos de semivida terminal (T_½), identificados como compuestos, así como también el polipéptido libre de

sustituyentes (es decir, no prolongado) (polipéptido_29) que comprende el mismo V_HH subyacente (VHH_1.6) como referencia. También se proporcionan los resultados de otro polipéptido libre de sustituyentes (polipéptido_63). Los derivados polipeptídicos, identificados como compuestos, tenían uno o más sustituyentes unidos al polipéptido, que comprendía una prolongación de ácido graso. Para facilitar la referencia, estos se identifican en la columna de nota de sustituyente.

Tabla 34. Semivida terminal (T_{1/2}) de derivados polipeptídicos anti-IL-6 con diferentes sustituyentes

ID	Nota sobre el sustituyente	Dosis nmol/kg	n	T _{1/2} (horas) Media ± SD
Polipéptido_29 (Referencia)	Sin sustituyente	10	1	0,6 ± n/a
Polipéptido_63	Sin sustituyente	217	3	0,6 ± 0,01
Compuesto 14	Quím. 24 (x1)	10	3	5,1 ± 0,7
Compuesto 15	Quím. 26 (x1)	10	1	25,6 ± n/a
Compuesto 16	Quím. 27 (x1)	10	3	37,7 ± 2,6
Compuesto 17	Quím. 24 (x2)	10	3	29,6 ± 1,2
Compuesto 18	Quím. 26 (x2)	10	2	28,2 ± 1,8
Compuesto 19	Quím. 27 (x2)	10	3	26,0 ± 1,0

Los datos mostraron que los polipéptidos no prolongados (que también pueden denominarse polipéptidos que no tienen sustituyentes en estos), polipéptido_29 y polipéptido_63, se eliminan rápidamente en ratas con una semivida de poco más de media hora. Todos los derivados polipeptídicos, con un conjugado de diácido graso, mostraron mayores semividas que fueron al menos un orden de magnitud superior. Más específicamente, podría observarse que el compuesto 15-compuesto 19 mostraron semividas que fueron aproximadamente 40-60 veces superiores en comparación con los polipéptidos V_HH libres de sustituyentes (polipéptido_29 y polipéptido_63).

Conclusión

La provisión de un sustituyente de diácido graso mostró aumentos en la semivida.

Junto con la observación de que tales derivados polipeptídicos con un sustituyente de diácido graso mostraron una potencia conservada en comparación con el polipéptido libre de sustituyente (polipéptido_29) que comprende la misma V_HH (ver anteriormente), tales resultados farmacocinéticos mejorados para estos derivados polipeptídicos son convenientes, particularmente cuando tal perfil de PK se combina con otras propiedades farmacéuticas convenientes. Por ejemplo, se demostró que el compuesto 17, que se alinea con el derivado polipeptídico identificado como compuesto 9 en la presente descripción (ver Tabla 12, VHH_1.6 con dos sustituyentes Quím. 24) tiene una alta semivida de 29,6 horas, y al mismo tiempo se demostró en los otros ejemplos que tiene, entre otras cosas, una alta potencia.

EJEMPLO 10: ESTUDIOS DE RESPUESTA A LA DOSIS EN EL MODELO AGUDO DE IL-6 HUMANA EN RATÓN

El propósito de este estudio fue investigar la capacidad de los V_HH para inhibir la respuesta del biomarcador de amiloide sérico A1 (SAA1) en un modelo agudo de IL-6 humana en ratón. Se eligió el biomarcador de lectura *in vivo* SAA1, ya que es una molécula efectora proaterogénica bien establecida regulada por los

niveles de IL-6, que se ha usado en modelos de ratones ateroscleróticos (Thompson JC y otros (2015)). Un breve aumento de la amiloide A sérica es suficiente para aumentar la aterosclerosis (J Lipid Res. 56(2):286-93). Los niveles de SAA1 se han asociado con la enfermedad cardiovascular, con la inducción sinérgica de los niveles de IL-6, así como también con los polimorfismos de un solo nucleótido que promueven la enfermedad (Hagihara K (2004) IL-6 desempeña un papel crítico en la inducción sinérgica del gen de la amiloide sérico humano (SAA) cuando se estimula con citocinas proinflamatorias, según se analiza con un sistema de ensayo de RT-PCR cuantitativa en tiempo real de isoforma de SAA. Biochem Biophys Res Commun. 314(2):363-9; Carty CL y otros (2009) Association of genetic variation in serum amyloid-A with cardiovascular disease and interactions with IL-6, IL1RN, IL1beta and TNF genes in the Cardiovascular Health Study. J Atheroscler Thromb. 16(4):419-30). Por lo tanto, SAA1 se eligió como lectura principal en base a su uso en ensayos clínicos en humanos y su sensibilidad en el modelo agudo de ratón.

En este modelo de ratón *in vivo*, se administró IL-6 humana (hIL-6, SEQ ID NO: 82) a ratones sanos para provocar una respuesta de reactante de fase aguda, medida como SAA1, debido a la limitada reactividad cruzada de los derivados polipeptídicos de V_HH anti-IL-6 evaluados (ver más arriba) a IL-6 murina.

Métodos

Los ratones BALB/c machos sanos (Charles River, Alemania, n=7-8 por grupo) se inyectaron con el antagonista de IL-6 por vía intravenosa (i.v.) 30 minutos antes de inyectar hIL-6 (producido internamente (SEQ ID NO: 82) i.v. en la vena de la cola a una dosis de 3,6 nmol/kg. Cinco (5) horas después de la inyección de hIL-6, se recolectó una muestra de sangre para determinar los niveles de SAA1 mediante el uso de un kit ELISA disponible comercialmente (kit de ELISA de SAA de ratón, R&D Systems, Inc. una marca Bio-Techne, MSAA00)). La concentración del compuesto se determinó a través de un inmunoensayo de canalización de oxígeno de luminiscencia (LOCI).

Los datos se normalizaron en relación con la ventana entre el nivel en animales de control sanos (establecido en 100 %) y el nivel después de la regulación positiva de SAA1 por hIL-6 solo (establecido en 0 %). La dosis efectiva semimáxima (DE₅₀) se proporciona como la dosis del antagonista que reduce en un 50 % la SAA1 en comparación con el grupo que se regula positivamente con la IL-6 humana. En base a las concentraciones plasmáticas del compuesto (exposición) si están disponibles, la concentración efectiva semimáxima (EC₅₀) se informa como la concentración plasmática del antagonista que da una reducción del 50 % de SAA1 en comparación con el grupo que se regula positivamente con hIL-6.

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 35. Puede referirse además a la Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos.

Tabla 35. Un resumen de las condiciones de administración de la dosis, así como también de los resultados del estudio (ED₅₀ & EC₅₀) en base al biomarcador suero amiloide A 1 y la modelización mediante el uso de la ecuación de Hill.

Entrada	ID de compuesto	Dosis de V _H H (nmol/kg)	Dosis de hIL-6 (nmol/kg)	ED ₅₀ (nmol/kg)	EC ₅₀ (nM)

1	Mab anti-IL6 de referencia	0,8, 1,4, 2,4, 4,1	3,6	1,9	-
2	Compuesto 1	1,7, 8,3, 41,4, 207,1	3,6	7,1	48
3	Compuesto 2	5,0, 10,0, 25,0, 50,0	3,6	9,4	177
4	Compuesto 3	1,5, 5,0, 15,0, 30,0	3,6	3,9	51
5	Compuesto 7	1,0, 2,5, 5,0, 20,0	3,6	4,3	36
6	Compuesto 9	1,0, 2,5, 5,0, 20,0	3,6	1,9	25

Conclusión

Los datos mostraron una reducción dependiente de la dosis de SAA1 en ratones tratados con derivados polipeptídicos de V_HH anti-IL-6. Los derivados polipeptídicos más potentes probados fueron el compuesto 7 y el compuesto 9 con una potencia de EC₅₀ de aproximadamente 36 y 25 nM, respectivamente, que fueron comparables con las potencias observadas que se observan con ensayo del gen reportero *in vitro* (ver arriba).

EJEMPLO 11: PK INTRAVENOSA EN MINICERDOS

Objetivo

El objetivo del estudio fue determinar los parámetros farmacocinéticos después de la administración i.v. de derivados polipeptídicos de V_HH anti-IL-6. Todos los derivados polipeptídicos probados comprendieron un V_HH extendido en C-terminal con dos sustituyentes que comprenden un resto de ácido graso diácido C16 para mejorar la vida media. Puede referirse además a Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos detallados a continuación. Los polipéptidos V_HH (es decir, constructos de V_HH no prolongados) demostraron tener una vida media corta (menos de 15 horas en minicerdos, datos no mostrados).

Métodos

Los estudios se realizaron en minicerdos hembras Göttingen (Ellegaard Minipigs A/S, Dalmmo, Dinamarca) con un peso corporal de aproximadamente 25 kg y la dosis administrada fue de 5 nmol/kg administrada por vía intravenosa a través de un catéter permanente, n=3 por grupo. El vehículo para los anticuerpos de dominio único fue HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, concentración objetivo 100 nmol/ml.

Se tomaron muestras de sangre durante hasta 912 horas (39 días) a través de un catéter venoso permanente implantado y se recolectaron en tubos con EDTA (Sarstedt, Alemania). El plasma se separó y analizó para determinar la concentración del compuesto mediante el uso de un inmunoensayo de canalización de oxígeno de luminiscencia (LOCI).

El análisis farmacocinético no compartimental (NCA) se realizó en Phoenix® WinNonlin® v. 8.1 (Certara L.P. Princeton, NJ, Estados Unidos). El AUC se calculó mediante el uso del método “trapezoidal lineal logarítmico”. La fase de eliminación terminal se ajustó a través de la regresión lineal con ponderación uniforme. Se usaron tiempos de muestreo nominales y dosis reales para NCA.

Los resultados se muestran en la Tabla 36. Puede referirse además a la Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos.

Tabla 36. Parámetros farmacocinéticos de derivados polipeptídicos seleccionados.

Entrada	ID del compuesto	T promedio ^{1/2} [h]	Aclaramiento medio (CI) [L/h/kg]	Volumen medio de distribución (Vz) [L/kg]	Tiempo medio de residencia (MRT) [h]	Última obtención de muestras [día]
1	Compuesto 1 ¹	236	ND	ND	ND	22*
2	Compuesto 2	166	0,000094	0,0225	243	39
3	Compuesto 3 ¹	226	ND	ND	ND	22*
4	Compuesto 7	204	0,000128	0,0373	290	39
5	Compuesto 9	165	0,000138	0,0325	234	39

ND: no se determina

¹tiempo de muestreo demasiado corto para una estimación precisa de los parámetros farmacocinéticos.

No se observaron clínicamente observaciones relacionadas con los compuestos de prueba durante los estudios.

Conclusión

La vida media observada de los derivados polipeptídicos (identificados como compuestos en la tabla anterior) probados estuvo entre 165 y 236 horas, lo que es más de 10 veces mayor en comparación con polipéptidos V_HH (es decir, constructos no prolongados). Dado que la vida media reportada de la albúmina en cerdos es de aproximadamente 197 horas, las vidas medias observadas del compuesto derivado polipeptídico observadas se acercaron a un valor teórico. Escrito de cualquier otra manera, la vida media observada se acercó al límite superior potencial de cuánto una prolongación a base de albúmina de una molécula candidata de fármaco, tal como un derivado polipeptídico V_HH, podría ganar teóricamente (Dich J y otros (1963) Metabolism and Distribution of I-labelled Albumin in the Pig. Can J Comp Med Vet Sci. 27(11):269-73).

EJEMPLO 12: FORMULACIÓN DE DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS DE V_HH ANTI-IL-6 CON SNAC Y NIACINAMIDA EN UNA FORMA DE DOSIFICACIÓN ADECUADA PARA LA ADMINISTRACIÓN PERORAL

Para prepararse para estudios orales que usan tabletas con N-(8-[2-hidroxibenzoil] amino) caprilato de sodio (SNAC), niacinamida (NAM) y estearato de magnesio (MgSt) o estearil fumarato de sodio (SSF) como excipientes para la administración oral, se siguió el siguiente procedimiento.

Método 1: Mezcla para la granulación seca

La mezcla se llevó a cabo mediante mezcla geométrica manual de V_HH anti-IL-6 con SNAC y niacinamida seguido de la mezcla en un mezclador turbula durante 7 min a 25 rpm. Lubricar (MgSt o SSF) se añadió

en una etapa de mezclado secundaria mediante mezcla geométrica manual seguida de mezcla en un mezclador turbula durante 2 minutos a 25 rpm. El producto mezclado se usó para un procesamiento adicional.

Método 2: Granulación en seco

La granulación en seco se llevó a cabo mediante simulación de compactación con rodillo en un simulador de compactación STYL'One Evo mediante el uso de perforaciones de cara plana con dimensiones de 10 mm (ancho) y 20 mm (longitud). Las configuraciones se establecieron para simular el Mini-Pactor de Gerteis con una velocidad de máquina de 3 rpm.

Después de la granulación en seco, se llevó a cabo el tamizado manual de los riblets en gránulos mediante el uso de un tamiz de malla conidur de 800 μ m en un molino manual Gerteis. El granulado se usó para procesamiento adicional por compresión.

Método 3: Mezcla para la compresión directa

En los casos en los que la etapa de granulación en seco no se incluye en la formulación, se usaron gránulos intermedios preeleaborados que contienen SNAC, niacinamida y SSF para mezclar con conjugados de V_HH anti-IL-6 secados por pulverización. La mezcla se llevó a cabo mediante mezcla geométrica manual de los granulados intermedios con V_HH anti-IL-6 seguido de la mezcla en un mezclador turbula durante 7 minutos a 25 rpm. El producto se usó para procesamiento adicional por compresión.

Método 4: Compresión de las tabletas

Las tabletas se comprimieron en un simulador de compactación STYL'One Evo mediante el uso de un único conjunto de perforadores con dimensiones de 8 mm x 14 mm u 8,1 mm x 14,3 mm, lo que dio como resultado tabletas ovaladas. Los ajustes se establecieron para simular el prensado giratorio Fette 102i con una velocidad de máquina de 20 rpm. La profundidad de llenado se ajustó para obtener tabletas que tenían pesos objetivo en base a la composición. Las fuerzas de compresión variaron de 10 kN a 20 kN para obtener tabletas con una densidad aparente de alrededor de 1,18-1,22 g/m³.

Método 5: Análisis de las tabletas

Para el análisis de contenido de conjugados de V_HH anti-IL-6, SNAC y NAM, las tabletas se pesan antes de la extracción de los componentes. Las tabletas se disolvieron en una cantidad relevante de tampón de fosfato 50 mM con acetonitrilo al 20 % a pH 7,4 durante dos horas. Las muestras centrifugadas se transfirieron a un vial adecuado para HPLC. Estándares de la cantidad relevante de conjugados de V_HH anti-IL-6, SNAC y NAM se prepararon mediante el uso del mismo diluyente que para las muestras. Se usó el sistema UPLC para la determinación del contenido de conjugados de V_HH anti-IL-6, SNAC y NAM.

Preparación de la formulación de tableta oral

Las formulaciones se prepararon de acuerdo con la Tabla 37. Las composiciones de las formulaciones se prepararon mediante el uso de una combinación de los métodos definidos anteriormente. Las formulaciones 1-4 y 8 se produjeron mediante el uso de los métodos de mezclado para la granulación en seco, la granulación en seco, y la compresión de tabletas (métodos 1, 2 y 4). Las formulaciones 5-7 se produjeron mediante el uso de los métodos de mezclado para la compresión directa y la compresión de tabletas (métodos 3 y 4).

Todas las formulaciones de tabletas se analizaron mediante el uso del método 5. Puede referirse además a la Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos usados (es decir, el componente del compuesto identificado en la tabla más abajo).

Tabla 37. Composición de las formulaciones de tabletas orales que contienen derivados polipeptídicos de V_HH anti-IL-6.

Formulación #	Componente	Cantidad
#1	Compuesto 1	15 mg
	SNAC	300 mg
	Niacinamida	200 mg
	Estearato de magnesio	2,5 mg
#2	Compuesto 1	15 mg
	SNAC	300 mg
	Niacinamida	200 mg
	Estearilfumarato de sodio	11,4 mg
#3	Compuesto 2	15 mg
	SNAC	300 mg
	Niacinamida	200 mg
	Estearilfumarato de sodio	11,4 mg
#4	Compuesto 3	15 mg
	SNAC	300 mg
	Niacinamida	200 mg
	Estearilfumarato de sodio	11,4 mg
#5	Compuesto 9	15 mg
	SNAC	300 mg
	Niacinamida	200 mg
	Estearilfumarato de sodio	11,4 mg
#6	Compuesto 7	15 mg
	SNAC	300 mg
	Niacinamida	200 mg
	Estearilfumarato de sodio	11,4 mg

EJEMPLO 13: ESTUDIO FARMACOCINÉTICO PERORAL E INTRAVENOSO EN PERROS: DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS DE V_HH FORMULADOS CON SNAC Y NAM

Propósito

El propósito del presente estudio fue evaluar el efecto de derivados polipeptídicos de V_HH anti-IL-6 que comprenden una prolongación de ácido graso como parte del sustituyente para mejorar la vida media, y para evaluar si la reducción del pl conduce a una mayor biodisponibilidad oral.

Métodos

Formulaciones apropiadas de los derivados polipeptídicos V_HH anti-IL-6 se administraron, respectivamente,

por vía intravenosa (la formulación para i.v. se basó en tampón HBS) o se prepararon como tabletas como se describe en el EJEMPLO 12: FORMULACIÓN DE DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS DE V_HH ANTI-IL-6 CON SNAC Y NIACINAMIDA EN UNA FORMA DE DOSIFICACIÓN ADECUADA PARA LA ADMINISTRACIÓN PERORAL y se administra por vía peroral a grupos de perros Beagle. Los perros se administraron la dosis por la mañana después de ayunar durante toda la noche y se mantuvieron en ayunas durante 4 horas después de una única administración de la dosis. En un subconjunto (§) de estudios orales a los perros se les administró una dosis s.c. de aproximadamente 3 nmol/kg de glucagón 10 min antes de la administración oral. Se recolectaron muestras de sangre inmediatamente antes de la administración de la dosis y posteriormente en diferentes puntos temporales posteriores a la dosis. Las concentraciones plasmáticas de los polipéptidos V_HH con sustituyentes de diácidos grasos se midieron mediante el uso de un inmunoensayo basado en perlas denominado alfaLISA, en el que la proteína de receptor de IL-6 humano recombinante (Novo Nordisk, Dinamarca) se une al polipéptido V_HH junto con un anti-gamma-Glu (Novo Nordisk, Dinamarca) hacia el motivo de la cadena de lado del conjugado de la molécula de prueba se usaron. Primero, se añadió a placas de 384 pocillos (Revivity AlphaPlate-384, 6005359) un calibrador específico del compuesto (0, 6, 13, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 pM) en plasma de perro con EDTA y muestras de plasma de perro con EDTA en una dilución mínima de 30x, posteriormente se añadieron perla de receptor de IL-6 humano biotinilado y anticuerpo anti-enlazador gamma-Glu conjugado con perlas de alfaLISA para capturar el compuesto polipeptídico V_HH. Después de incubar durante toda la noche (16-24 horas), se añadieron perlas donantes recubiertas con estreptavidina alfa a la placa de 384 pocillos. Cuando el analito se presentó en la muestra, la perla donante y la aceptora se unieron. Tras la excitación, un fotosensibilizador dentro de la perla donante convierte el oxígeno ambiente en un estado único excitado. El oxígeno monofásico se difunde hasta 200 nm para producir una reacción quimioluminiscente en la perla de acoplamiento, lo que conduce a la emisión de luz. Las lecturas de luminiscencia se midieron mediante el uso de un espectrómetro (por ejemplo, Enspire (Perkin Elmer)). La respuesta fue proporcional a la concentración del compuesto polipeptídico V_HH.

En un experimento separado y adicional, las concentraciones plasmáticas después de proporcionar los compuestos 1-3, 7 y 9, así como también para un ejemplo de polipéptido V_HH (es decir, sin sustituyentes de diácido graso) como referencia, se evaluaron mediante preparación de muestras de plasma y se analizaron mediante LC-MS. Los calibradores se prepararon al añadir plasma de perro en blanco con analitos para lograr concentraciones finales que variaban típicamente de 1 a 500 nM. Los calibradores, los blancos de plasma o las muestras del estudio se mezclaron 1:1 con clorhidrato de guanidina 8 M hasta una concentración final de 4 M y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para disociar las interacciones de proteínas no covalentes. Luego, el sobrenadante se diluyó con 2 volúmenes de agua Milli-Q filtrada, denominada en adelante agua Milli-Q, que contenía ácido fórmico al 1 % antes de la inyección en el sistema LC-MS. El sistema utilizado era un sistema Transcend II TLX-2 con bombas RSLC Ultimate 3000 de Thermo Scientific y un muestreador automático TriPlus RSI, acoplado a un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus de Thermo Scientific. La LC se equipó con una columna Cyclone (CH-953288, Thermo Scientific) como la columna de captura de primera dimensión a temperatura ambiente y usó una columna

analítica XBridge Protein BEH C4 (2,1 x 50 mm de Waters) a 60 °C. La fase móvil A consistió en agua Milli-Q, ácido fórmico al 1 % y metanol/acetonitrilo al 5 % (50/50), mientras que la fase móvil B consistió en metanol/acetonitrilo (50/50), ácido fórmico al 1 % y agua Milli-Q al 5 %. Se realizó una elución de gradiente con un gradiente de rampa de 0 % de fase móvil B a 30 % de fase móvil B en 0,25 minutos, de 30 % de fase móvil B a 45 % de fase móvil B en 1,17 minutos, y de 45 % de fase móvil B a 100 % de fase móvil B en 1,17 minutos. El espectrómetro de masas Q-Exactive Plus (ThermoFisher Scientific) se usó como detector en modo de monitoreo de iones individuales (m/z 1624,8-1628,8). Curvas de calibración lineales (ponderación $1/x^2$) se usaron para calcular las concentraciones del compuesto de prueba en las muestras de plasma. Se incluyeron muestras de control de calidad para analitos. La desviación entre la concentración nominal y la calculada en los calibradores y las muestras de control de calidad fue inferior al 15 % y la desviación de muestra de LLOQ fue inferior al 20 %.

En base a estos datos de exposición, los parámetros farmacocinéticos no compartimentales se calcularon mediante el uso de Phoenix WinNonlin o el software de análisis estadístico de código abierto R (paquete 'NonCompart').

Resultados

Los resultados se proporcionan en la Tabla 39 y Tabla 38 a continuación para cinco derivados polipeptídicos de V_{HH} (identificados como compuestos) y muestran

- a) el efecto de la prolongación con ácidos grasos sobre la vida media, y
- b) que la reducción del pl conduce a una mayor biodisponibilidad oral.

Puede referirse además a la Tabla 12 para la composición detallada de los derivados polipeptídicos.

Más específicamente, la Tabla 38 más adelante muestra un primer conjunto de resultados donde se recolectó la semivida IV de los compuestos 1-3, 7 y 9, así como también la de un polipéptido V_{HH} de referencia (sin un sustituyente) polipéptido_63. Para cada una de estas entradas, la n es de 2 y a cada animal se le proporcionó una dosificación de 0,05 mg/kg.

Tabla 38. Datos de PK IV de derivados polipeptídicos con mutaciones del pl manipuladas por ingeniería genética y sustituyentes de diácido graso probadas en un modelo de perro.

ID del compuesto	pl (teórico)	n animales	Dosificación (mg/kg)	Semivida (IV) (horas)
Polipéptido_63 (Referencia)	6,49	2	0,05	1,2
Compuesto 1	4,79	2	0,05	227
Compuesto 2	4,40	2	0,05	197
Compuesto 3	4,74	2	0,05	152
Compuesto 9	4,61	2	0,05	185
Compuesto 7	4,67	2	0,05	183

Como se observa anteriormente, los compuestos 1-3, 7 y 9 proporcionaron una semivida que fue varios órdenes de magnitud más alta que la proporcionada por el polipéptido V_{HH} de referencia, polipéptido_63. En la Tabla 39 a continuación, un segundo conjunto de resultados donde se proporcionan los datos de

biodisponibilidad oral para los compuestos 1-3, 7 y 9. Aunque los resultados a continuación identifican el ID del compuesto, se entiende que la formulación IV se basó en amortiguador de HBS y la formulación oral fueron comprimidos como se describe en el EJEMPLO 12: FORMULACIÓN DE DERIVADOS POLIPEPTÍDICOS DE V_HH ANTI-IL-6 CON SNAC Y NIACINAMIDA EN UNA FORMA DE DOSIFICACIÓN ADECUADA PARA LA ADMINISTRACIÓN PERORAL. El uso del ID del compuesto es para facilitar la referencia.

Tabla 39. Datos de biodisponibilidad oral de derivados polipeptídicos con mutaciones de pl manipuladas por ingeniería genética probadas en un modelo de perro.

ID del compuesto	pl (teórico)	n animales	Semivida (PO) (horas)	BA % PO frente a IV
Compuesto 1	4,79	6	178	1,76 %
Compuesto 2	4,40	6	224	1,78 %
Compuesto 3	4,74	6	156	0,91 %
Compuesto 9	4,61	8	203	0,77 %
Compuesto 7	4,67	8	213	1,33 %

Para la biodisponibilidad oral observada en perros, los derivados polipeptídicos formulados con NAM/SNAC, por ejemplo, tuvieron un efecto pronunciado que permitió que la biodisponibilidad oral y por encima de un nivel que es clínicamente relevante. Los niveles alcanzados son particularmente relevantes dado las otras propiedades farmacéuticas convenientes logradas para estos mismos compuestos tales como potencia, vida media, etc.

Conclusión

Se observó que se logró una excelente vida media y biodisponibilidad oral. Los derivados polipeptídicos de V_HH (es decir, los polipéptidos V_HH con sustituyentes de diácido graso) se compararon con un polipéptido V_HH de referencia no sustituido, polipéptido_63, y demostraron un aumento de dos órdenes de magnitud en las semividas. Además, se mostró que la biodisponibilidad en comparación con la IV estaba en el intervalo de aproximadamente 1-2 %.

En general, considerando la potencia, la vida media y la biodisponibilidad oral, se esperaría que los derivados polipeptídicos de V_HH como se describe en la presente descripción sean un fármaco antiinflamatorio de primera clase administrado por vía oral y similar a un anticuerpo que se dirige a IL-6. Por ejemplo, se ha demostrado que el Compuesto 9 logra un equilibrio conveniente en las características farmacéuticas de alta potencia, larga vida media y alta biodisponibilidad, lo que destaca su idoneidad como un producto terapéutico.

Mientras determinadas características de la invención se han ilustrado y descrito en la presente descripción, a los expertos en la técnica ahora se les ocurrirán muchas modificaciones, sustituciones, cambios y equivalentes. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones anexas pretenden cubrir todas esas modificaciones y cambios que caen dentro del verdadero espíritu de la invención.