

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 275**

15 Folleto corregido: T3

Texto afectado: Reivindicaciones

48 Fecha de publicación de la corrección: 29.10.2020

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA CORREGIDA

T9

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2015 PCT/US2015/059532**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2016 WO16073890**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2015 E 15797538 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3215530**

54 Título: **Anticuerpos contra IL-6 mejorados**

30 Prioridad:

**07.11.2014 US 201462077105 P**

**04.12.2014 US 201462087448 P**

**28.10.2015 US 201562247705 P**

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

**27.04.2020**

73 Titular/es:

**SESEN BIO, INC. (100.0%)**

**245 First Street, Suite 1800**

**Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es:

**SCHMIDT, MICHAEL MARCH;**

**TISDALE, ALISON;**

**FURFINE, ERIC STEVEN y**

**ZARBIS-PAPASTOITSIS, GRIGORIOS**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

ES 2 756 275 T9

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos contra IL-6 mejorados

**5 Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica la prioridad sobre la solicitud provisional estadounidense n.º 62/077.105, presentada el 7 de noviembre de 2014; la solicitud provisional estadounidense n.º 62/087.448, presentada el 4 de diciembre de 2014; y la solicitud provisional estadounidense n.º 62/247.705, presentada el 28 de octubre de 2015.

10

**Campo de la invención**

El campo de la invención se refiere a IL-6. Más particularmente, el campo se refiere a moduladores de IL-6 y su uso en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades de los ojos.

15

**Antecedentes**

La IL-6 es una citocina pleiotrópica con papeles notificados en inflamación, hematopoyesis, angiogénesis, diferenciación celular y supervivencia neuronal. La presente invención se refiere a anticuerpos contra IL-6 mejorados y usos de los mismos. Los documentos WO 2014/074905, WO 2007/076927, WO 2008/144763, Kalai (1997) Europ J Biochem 249, 690-700, Finch (2011) J Mol Biol 411, 791-807 y WO 2004/045507 dan a conocer anticuerpos anti-IL-6 y su uso terapéutico. Los documentos US 6277375 B1, Rudikoff (1982), PNAS 79, 1979-1983, Winkler (2000), J Immunol 165, 4505-4514, Chien (1989) PNAS 86, 5532-5536 y Panka (1993) Mol Immunol 30, 1013-1020 dan a conocer la generación y modificación de anticuerpos.

20

25

**Sumario**

La divulgación se refiere a anticuerpos contra IL-6 y fragmentos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno) o derivados de los mismos, así como a ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos contra IL-6 y fragmentos. La divulgación también se refiere a usos de tales anticuerpos, fragmentos o derivados. Los anticuerpos y fragmentos o derivados de los mismos pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6. En realizaciones, el anticuerpo, fragmento o derivado del mismo puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a una IL-6, por ejemplo, a una IL-6 humana. En realizaciones, el anticuerpo, fragmento o derivado del mismo puede unirse (por ejemplo, unirse específicamente) al sitio II de una IL-6 (por ejemplo, sitio II de la IL-6 humana).

30

35

La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:37 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:38. La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:41 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42. La presente invención se refiere a un Fab que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:54 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42. La presente invención se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:47 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42.

40

45

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

45

50

En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:37. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO:37.

50

55

En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:41. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO:41.

55

En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con EBI-029 o un fragmento del mismo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una CDR1 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:5 y opcionalmente una CDR3 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:6. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:17. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de

60

65

unión a antígeno que comprende SEQ ID NO:24. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende o consiste en SEQ ID NO:11.

5 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende secuencias de EBI-030 o EBI-031 tal como se proporciona en la tabla 4. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende dominios de EBI-030 o EBI-031 tal como se muestra en la figura 15 (por ejemplo, uno o más de FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, CH1, bisagra, CH2 y CH3 de la secuencia de cadena pesada y/o FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 y CK de la secuencia de cadena ligera). En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una cadena pesada y una cadena ligera. En realizaciones, las cadenas pesada y ligera se unen mediante uno o más enlaces disulfuro. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un Fab. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un scFv. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es fragmento Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFv o Fv.

15 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una o más secuencias correspondientes de EBI-029, o secuencias de un anticuerpo descrito en el documento WO2014/074905. En realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana y/o potencia aumentada en comparación con tocilizumab.

Tabla 4: resumen general de secuencias de EBI-029, EBI-030 y EBI-031

Descripción	SEQ ID NO:	Secuencia
Secuencia de aa de HC de EBI-029 (IgG2)	SEQ ID NO:11	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
H311A de HC de EBI-029	SEQ ID NO:10	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVSVLTVV <u>AQDWLNGKEY</u> KCKVSNKGLP APIEKTISKT KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Secuencia de aa de LC de EBI-029	SEQ ID NO:12	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT <u>INCREASESVD</u> NYGIPFMNWX QKPKGPPK LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL <u>IFGQGTKEI</u> KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
Secuencia de aa de HC de Fab de EBI-029 (IgG1)	SEQ ID NO:24	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV <u>ITPGSGTINY</u> AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR <u>WDPLYYYALE</u> YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKTV EPKSCDKTHT
Secuencia de aa de VH de EBI-029	SEQ ID NO:17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNYLIE WVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTINYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSR <u>WDPLYYYALEY</u> WGQGTITVTVSS

ES 2 756 275 T9

Secuencia de aa de VL de EBI-029	SEQ ID NO:18	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWWYQQ KPGQPPKLLIYAASNRRGSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQSEEVPLTFGQGKLEIKRTV
CDR1 de HC de EBI-029	SEQ ID NO:4	GYALSNYLIE
CDR2 de HC de EBI-029	SEQ ID NO:5	VITPGSGTIN
CDR3 de HC de EBI-029	SEQ ID NO:6	SRWDPLYYYALEY
CDR1 de LC de EBI-029	SEQ ID NO:7	RASESVDNYGIPFMN
CDR2 de LC de EBI-029	SEQ ID NO:8	AASNRRGS
CDR3 de LC de EBI-029	SEQ ID NO:9	QQSEEVPLT
Secuencia de aa de HC de EBI-030 (IgG2)	SEQ ID NO:41	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSRWDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNV DDKK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Secuencia de aa de LC de EBI-030	SEQ ID NO:42	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWWY QKPKGQPPKL LIYAASNRRGSGVDPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPLTFGQGKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC
Secuencia de aa de HC de Fab de EBI-030 (IgG1)	SEQ ID NO:39	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSRWDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKTV EPKSCDKTHT
Secuencia de aa de HC de Fab de EBI-030 (IgG2)	SEQ ID NO:54	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA TTPGGGTINY AQKFQGRVTITADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSRWD PLYYYALEYWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCN VDHKPSNTKVDKTV ERK
Secuencia de aa de VH de EBI-030	SEQ ID NO:37	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSRWDPLYYYALE YWGQGTITVTV SS
Secuencia de aa de VL de EBI-030	SEQ ID NO:38	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWWYQQKPGQPPKLLIY AASNRRGSGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQQSEEVPLTFG QGKLEIKRTV
CDR1 de HC de EBI-030	SEQ ID NO:31	GYVLPNYLIE
CDR2 de HC de EBI-030	SEQ ID NO:32	V TTPGGGTIN
CDR3 de HC de EBI-030	SEQ ID NO:33	SRWDPLYYYALEY

CDR1 de LC de EBI-030	SEQ ID NO:34	RASESVDNYGIPFMN
CDR2 de LC de EBI-030	SEQ ID NO:35	AASNRGS
CDR3 de LC de EBI-030	SEQ ID NO:36	QQSEEVPLT
Secuencia de aa de HC de EBI-031 IgG2	SEQ ID NO:47	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV TTPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR WDP <del>LY</del> YYALE YWGQGT <del>TV</del> TV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTVPSNFGT QTYTCNV <del>D</del> HK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVS <del>V</del> LT <del>V</del> V AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYK <del>T</del> TPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
Secuencia de aa de VH-VL de scFv	SEQ ID NO:52	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWMGV TTPGGGTINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARS <del>R</del> WD PLYYYALEYWGQGT <del>TV</del> VSSGGGGSGGGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCRASESVDNYGIPFMN <del>W</del> YQQKPGQPPKLLIYAASNRGSGVPDRFS GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGT <del>K</del> LEIKRTV
Secuencia de aa de VL-VH de scFv	SEQ ID NO:53	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMN <del>W</del> YQQKPGQPPKLLIY AASNRGSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQ GKLEIKRTVGGGGSGGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKAS GYVLP NYLIEWVRQAPGQGLEWMGV TTPGGGTINYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYYCARS <del>R</del> WDPLYYYALEYWGQGT <del>TV</del> VSS
aa= aminoácido; na=ácido nucleico; HC=cadena pesada; LC=cadena ligera; VH=región variable de cadena pesada; VL=región variable de cadena ligera		

La afinidad aumentada y/o potencia aumentada pueden evaluarse usando los métodos descritos en el presente documento y/o métodos conocidos en la técnica.

5 En realizaciones, la afinidad se evalúa usando resonancia de plasmón superficial (RPS).

En realizaciones, la afinidad se aumenta en al menos 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 ó 4 veces.

10 En realizaciones, la potencia se aumenta. En realizaciones, la potencia se aumenta tal como se indica mediante una disminución en la CI50 y/o una disminución en la CI90. En realizaciones, la CI50 se disminuye en al menos 5, 10, 20, 30, 40 ó 50 veces. En realizaciones, la CI50 se disminuye en al menos aproximadamente 50 veces. En realizaciones, la CI90 se disminuye en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 ó 500 veces. En realizaciones, la CI90 se disminuye en al menos aproximadamente 100 veces.

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

20 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización en cis de IL-6, por ejemplo, tal como se evalúa basándose en el valor de CI50 o CI90 obtenido usando un ensayo HEK-Blue™ descrito en el presente documento, por ejemplo, con IL-6 libre 20 pM.

25 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una CI50 de menos de 47 pM y/o una CI90 de menos de 4350 pM. En realizaciones, la CI50 es menos de 47 pM, por ejemplo, menos de 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 ó 1 pM. En realizaciones, la CI90 es menos de 4350 pM, por ejemplo, menos de 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 ó 5 pM. En realizaciones, la CI50 y/o la CI90 se evalúan en un ensayo HEK-Blue™ con IL-6 20 pM.

30 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno bloquea la IL-6 libre con mayor potencia en comparación con tocilizumab, por ejemplo, tal como se evalúa basándose en los valores de CI50 obtenidos usando un ensayo HEK-Blue™ con IL-6 20 pM. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la IL-6 con más de 900 veces mayor potencia en comparación con tocilizumab. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es EBI-031 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una CI50 de menos de 15 pM, por ejemplo, una CI50 de 14,2 pM,

para la inhibición de IL-6.

5 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno bloquea la señalización en trans de IL-6, por ejemplo, tal como se evalúa usando un ensayo HEK-Blue™ descrito en el presente documento, por ejemplo, con hiper IL-6 200 pM. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización por hiper IL-6. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización por hiper IL-6 con mayor potencia que tocilizumab, por ejemplo, con más de 900 veces mayor potencia en comparación con tocilizumab. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización por hiper IL-6 con una CI50 de menos de 1 μM. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización por hiper IL-6 con una CI50 de menos de 1 nM. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno inhibe la señalización por hiper IL-6 con una CI50 de menos de 100 pM o menos de 50 pM, por ejemplo, con una CI50 de aproximadamente 14-15 pM. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es EBI-031 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

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

20 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es eficaz en el bloqueo de la señalización de IL-6 en el ojo durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses, por ejemplo, tras la administración intravítrea. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno bloquea el 95% de la señalización de IL-6 en el ojo durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses, por ejemplo, tras la administración intravítrea. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno bloquea el 95% de la señalización de IL-6 en el ojo durante aproximadamente 150 días.

25 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana en relación con un anticuerpo de control, por ejemplo, en relación con EBI-029 o un fragmento del mismo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene afinidad aumentada para la IL-6 humana en relación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que es por lo demás idéntico excepto que no comprende dicho uno o más aminoácidos seleccionados de V28, P30, T51 y G55, y en cambio, comprende uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4) seleccionados de A28, S30, I51 y S55. En realizaciones, la afinidad se aumenta en al menos 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 3 ó 4 veces. En realizaciones, la afinidad se evalúa usando resonancia de plasmón superficial (RPS).

35 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene potencia aumentada en relación con un anticuerpo de control, por ejemplo, en relación con EBI-029 o un fragmento del mismo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene potencia aumentada en relación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que es por lo demás idéntico excepto que no comprende dicho uno o más aminoácidos seleccionados de V28, P30, T51 y G55, y en cambio, comprende uno o más aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4) seleccionados de A28, S30, I51 y S55.

40 En realizaciones, la potencia se aumenta tal como se indica mediante una disminución en la CI50 y/o una disminución en la CI90. En realizaciones, la CI50 se disminuye en al menos 5, 10, 20, 30, 40 ó 50 veces. En realizaciones, la CI50 se disminuye en al menos aproximadamente 50 veces. En realizaciones, la CI90 se disminuye en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 ó 500 veces. En realizaciones, la CI90 se disminuye en al menos aproximadamente 100 veces.

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

50 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una CI50 de menos de 47 pM y/o una CI90 de menos de 4350 pM. En realizaciones, la CI50 es menos de 47 pM, por ejemplo, menos de 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2 ó 1 pM. En realizaciones, la CI90 es menos de 4350 pM, por ejemplo, menos de 4000, 2000, 1000, 100, 50, 40, 30, 20, 15, 10 ó 5 pM. En realizaciones, la CI50 y/o la CI90 se evalúan en un ensayo HEK-Blue™ con IL-6 20 pM.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende V28, P30, T51 y G55 y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno muestra afinidad mejorada para la IL-6 humana y/o potencia mejorada en comparación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que es por lo demás idéntico excepto que comprende A28, S30, I51 y S55.

60 En realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento comprende además una región variable de cadena ligera o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que comprende una CDR1 de VL, una CDR2 de VL y una CDR3 de VL.

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

En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende además una región variable de cadena

ligera secuencia que comprende SEQ ID NO:38. En realizaciones, la secuencia de la región variable de cadena ligera consiste en SEQ ID NO:38.

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

En realizaciones, la secuencia de cadena ligera consiste en SEQ ID NO:42.

10 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende

(i) una CDR1 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:31, una CDR2 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:32 y una CDR3 de VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO:33 y

15 (ii) una CDR1 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO:34, una CDR1 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO:35 y una CDR3 de VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO:36.

20 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o un fragmento de los mismos. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo IgG1 o IgG2 o un fragmento de los mismos. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un Fab de IgG1 o un Fab de IgG2. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo IgG2 o fragmento de unión a antígeno.

25 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se modifica por ingeniería para reducir o eliminar la actividad de CCDA.

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

30 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende o que consiste en SEQ ID NO:37 y una región variable de cadena ligera que comprende o que consiste en SEQ ID NO:38.

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

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

40 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:47 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42.

45 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de cadena pesada que es idéntica a SEQ ID NO:47 y una secuencia de cadena ligera que es idéntica a SEQ ID NO:42. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un Fab.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un Fab de IgG1.

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

55 En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un Fab de IgG2.

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

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

65

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

5 En realizaciones, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse a una IL-6 con una  $T_f$  de 70°C o mayor.

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

10 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno del mismo) se une a al menos uno de R24, K27, Y31, D34, S118 y V121 de una IL-6 humana.

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

20 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal humanizado. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal humano.

25 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno presenta <10% de agregación a una concentración de 100-150 mg/ml, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 142 mg/ml en PBS, pH 7.4. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con otro agente terapéutico, por ejemplo, en comparación con tocilizumab, bevacizumab, ranibizumab y/o Eylea®. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene retención mejorada en el ojo cuando se administra al ojo, por ejemplo, por vía intravítrea, por ejemplo, mediante inyección intravítrea. En realizaciones, se indica la retención mejorada en el ojo mediante una semivida aumentada en el ojo, por ejemplo, en el vítreo, la retina, el humor acuoso, la coroides y/o la esclerótica.

30 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una semivida en el vítreo de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 días. En realizaciones, la semivida en el vítreo es al menos de 10 días. En realizaciones, la semivida en el vítreo se evalúa en un animal, por ejemplo, en un conejo o un mono. En realizaciones, la semivida en el vítreo se evalúa en un ser humano.

35 En realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento tiene una semivida sistémica reducida (por ejemplo, una  $T_{1/2\beta}$  inferior) y/o un aclaramiento sistémico mejorado, por ejemplo, una semivida sistémica reducida o un aclaramiento sistémico más rápido en comparación con los de otro agente terapéutico, por ejemplo, tocilizumab, bevacizumab, ranibizumab y/o aflibercept (Eylea®). En realizaciones, la semivida sistémica (por ejemplo,  $T_{1/2\beta}$ ) es inferior que la de tocilizumab y/o aflibercept (Eylea®). En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio Fc que comprende una mutación (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 mutaciones) en una o más posiciones correspondientes a H311, D313, I254 o H436 (numeración como en SEQ ID NO:41). En realizaciones, la mutación se selecciona de una o más de H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R y H436A. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende un dominio Fc que comprende una mutación correspondiente a H311A (numeración como en SEQ ID NO:41). En realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1. En realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG2.

40 En realizaciones, el dominio Fc es un dominio Fc de IgG1 humana que tiene la secuencia de SEQ ID NO:50 y opcionalmente comprende una mutación en una o más de las posiciones subrayadas: (H90, D92, I33 y H215):

DKTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP  
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID

55 NO:50).

En realizaciones, el dominio Fc de IgG1 comprende una mutación correspondiente a una o más de H90A, H90E, H90N, D92T, I33A, I33R y H215A (numeración según SEQ ID NO:50).

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

VECP<sup>PC</sup>PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQD<sup>W</sup>LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIS  
 KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK<sup>T</sup>TPP  
 MLDS<sup>D</sup>GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV<sup>F</sup>SCSV<sup>M</sup>HEALHN<sup>H</sup>Y<sup>T</sup>QKSL<sup>S</sup>LS<sup>P</sup>SGK  
 (SEQ ID NO:51).

5 En realizaciones, el dominio Fc de IgG2 comprende una mutación correspondiente a una o más de H86A, H86E, H86N, D88T, I29A, I29R y H211A (numeración según SEQ ID NO:51).

10 En realizaciones, la mutación de Fc reduce la acumulación sistémica del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, aumenta el aclaramiento o disminuye la semivida, por ejemplo, la  $T_{1/2\beta}$ ) del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. En realizaciones, la acumulación sistémica se reduce en comparación con la de otro agente terapéutico (por ejemplo, tocilizumab, bevacizumab, ranibizumab y/o aflibercept). En realizaciones, la acumulación sistémica se reduce en comparación con la de tocilizumab y/o aflibercept. En realizaciones, la acumulación sistémica se reduce en comparación con la acumulación sistémica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno correspondiente que no comprende la mutación. En realizaciones, la acumulación sistémica se evalúa tras la administración intravítrea del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

20 En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método de reducción de los efectos sistémicos de la inhibición de una IL-6 en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un dominio Fc mutado tal como se describe en el presente documento. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede inhibir una actividad de IL-6 y tiene actividad de Fc reducida (por ejemplo, unión reducida a FcRn) en comparación con un anticuerpo o fragmento del mismo correspondiente que tiene un dominio Fc de tipo natural. En algunos casos, el método de reducción de los efectos sistémicos de la inhibición de una IL-6 en un sujeto incluye administrar al sujeto un antagonista de IL-6 que comprende un dominio Fc mutado tal como se describe en el presente documento.

30 En un aspecto adicional, se proporciona en el presente documento un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento. En realizaciones, el ácido nucleico codifica para una secuencia de aminoácidos dada a conocer en el presente documento. En aspectos, el ácido nucleico comprende SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:43 o SEQ ID NO:48. En realizaciones, el ácido nucleico codifica para una secuencia dada a conocer en la tabla 4.

35 Además, se proporciona en el presente documento un vector que comprende el ácido nucleico. Además, se proporciona en el presente documento una célula que comprende el ácido nucleico o el vector.

40 En realizaciones, un anticuerpo contra IL-6 o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento es para su uso en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) con una enfermedad asociada con IL-6. En realizaciones, la enfermedad es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6, por ejemplo, en el vítreo.

45 En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es para su uso en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, ser humano) con edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, uveítis, glaucoma, sequedad ocular (por ejemplo, enfermedad de sequedad ocular o síndrome de sequedad ocular), conjuntivitis alérgica, dolor ocular, desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es para su uso en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) con EMD.

50 En aspectos, un anticuerpo contra IL-6 o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento es para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6. En realizaciones, la enfermedad es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el vítreo. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, uveítis, sequedad ocular (por ejemplo, enfermedad de sequedad ocular o síndrome de sequedad ocular), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es edema macular diabético. En realizaciones, el medicamento se formula para la administración al vítreo del ojo del sujeto (por ejemplo, para inyección intravítrea).

Además, se proporciona en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento. En realizaciones, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 En realizaciones, la composición es para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6. En realizaciones, la enfermedad es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el vítreo. En realizaciones, la composición es para su uso en el tratamiento de edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, uveítis, sequedad ocular (por ejemplo, enfermedad de sequedad ocular o síndrome de sequedad ocular), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo.

15 Además, se proporciona en el presente documento un método de tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6, comprendiendo el método administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra IL-6 o fragmento descrito en el presente documento. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es una enfermedad ocular, por ejemplo, una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el vítreo. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, uveítis, sequedad ocular (por ejemplo, enfermedad de sequedad ocular o síndrome de sequedad ocular), degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es edema macular diabético.

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

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

35 Además, se proporciona en el presente documento un anticuerpo o fragmento (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno) del mismo (por ejemplo, un anticuerpo contra IL-6 o fragmento del mismo tal como se describe en el presente documento), o una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de este tipo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6 (por ejemplo, para su uso en el tratamiento de un sujeto, por ejemplo un sujeto humano, que tiene una enfermedad asociada con IL-6).

40 En realizaciones, dicha enfermedad es una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6, por ejemplo, en el vítreo. En realizaciones, dicha enfermedad es edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, uveítis, sequedad ocular (por ejemplo, sequedad ocular trastorno o enfermedad de sequedad ocular), conjuntivitis alérgica, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo. En realizaciones, dicha enfermedad es EMD. En realizaciones, dicha enfermedad es enfermedad de sequedad ocular. En realizaciones, dicha enfermedad es uveítis. En realizaciones, dicha enfermedad es DMAE. En realizaciones, dicha enfermedad es RDP. En realizaciones, dicha enfermedad es trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento (por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno) del mismo es adecuado para la administración al vítreo del ojo. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento (por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno) del mismo se administra al vítreo del ojo.

50 Además, se proporciona en el presente documento un método de tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6, comprendiendo el método administrar a un sujeto un anticuerpo contra IL-6 o fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno del mismo), por ejemplo, un anticuerpo contra IL-6 o fragmento del mismo tal como se describe en el presente documento. En realizaciones, el anticuerpo contra IL-6 o fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno del mismo), se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6 en el vítreo. En realizaciones, la enfermedad asociada con IL-6 es edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, uveítis, síndrome de sequedad ocular, enfermedad de sequedad ocular, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo.

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

65

Además, se proporciona en el presente documento un kit que comprende un anticuerpo contra IL-6 o una composición dados a conocer en el presente documento y, opcionalmente, instrucciones para su uso.

- 5 Además, se proporciona en el presente documento un recipiente o dispositivo, por ejemplo, un dispositivo de administración de fármacos, que comprende un anticuerpo contra IL-6 o una composición dados a conocer en el presente documento. En realizaciones, dicho dispositivo se configura para la administración del anticuerpo o la composición al ojo, por ejemplo, al vítreo. Además, se proporciona en el presente documento un kit que comprende dicho recipiente o dispositivo.
- 10 Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” es sinónimo de inmunoglobulina y se entenderá tal como se conoce habitualmente en la técnica. El término anticuerpo no está limitado por ningún método particular de producción del anticuerpo. Por ejemplo, el término anticuerpo incluye, entre otros, anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo es un tetrámero, y a menos que se dé a conocer lo contrario, cada uno está compuesto de dos pares idénticos de
- 15 cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. El extremo amino terminal de cada cadena comprende una región variable de aproximadamente 100 a 120 o más aminoácidos que desempeña un papel principal en el reconocimiento de antígenos. La porción carboxilo terminal de cada cadena comprende una región constante con un papel principal en la función efectora de los anticuerpos. Las clases de cadena ligera humana se denominan cadenas ligeras kappa y lambda. Las clases de cadena pesada son mu, delta, gamma, alfa o
- 20 épsilon, y definen el isotipo de un anticuerpo. Los isotipos de anticuerpos son IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas ligera y pesada, las regiones variable y constante se unen mediante una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región “D” de aproximadamente tres o más aminoácidos.
- 25 Las regiones variables de cada par de cadenas pesada/ligera (VH y VL), respectivamente, forman el sitio de unión a antígeno. Por consiguiente, un anticuerpo IgG intacto, por ejemplo, tiene dos sitios de unión. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de unión son el mismo.
- 30 Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos presentan la misma estructura general de regiones de entramado (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones de hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. El término “variable” se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y están implicadas en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. La variabilidad reside principalmente en las CDR, que están separadas por las regiones de entramado (FR) más sumamente
- 35 conservadas. La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza según las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chothia y Lesk, *J Mol Biol* 196:901-917 (1987); Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883 (1989), que describen métodos conocidos en la técnica.
- 40 “De tipo natural” puede referirse al alelo o la especie más prevalente encontrado en una población o al anticuerpo obtenido de un animal no manipulado, en comparación con un alelo o polimorfismo, o una variante o un derivado obtenido mediante una forma de manipulación, tal como mutagénesis, el uso de métodos recombinantes, etcétera, para cambiar un aminoácido de la molécula de unión a antígeno.
- 45 El término “fragmento de anticuerpo” se refiere a una porción de una cadena o un anticuerpo intacto o de longitud completa, generalmente la región variable o de unión a la diana. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Un “fragmento funcional” o “análogo de un anticuerpo anti-sitio II de IL-6” es un fragmento que puede impedir o reducir sustancialmente reduce la capacidad de la IL-6 para unirse a un receptor, reducir la capacidad del complejo IL-6/IL-6R para unirse a la gp130, o reducir la
- 50 capacidad del ligando para unirse a la gp130 o para iniciar la señalización. Tal como se usa en el presente documento, “un fragmento de unión a antígeno” o “fragmento funcional” generalmente es sinónimo de “fragmento de anticuerpo” y puede referirse a fragmentos, tales como Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, etcétera, que pueden impedir o reducir sustancialmente la capacidad de la IL-6 para unirse a un receptor, reducir la capacidad del complejo IL-6/IL-6R para unirse a la gp130, o para iniciar la señalización.
- 55 Un “derivado” de un anticuerpo es un polipéptido que incluye al menos una CDR de un anticuerpo dado a conocer en el presente documento. Normalmente, el derivado puede unirse al sitio II de la IL-6.
- 60 “Competir” significa que un primer anticuerpo, o fragmento del mismo, puede competir por la unión con un segundo anticuerpo o un fragmento del mismo, de manera que la unión del primer anticuerpo con su epítipo se disminuye de manera detectable en presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. En algunos casos, el término también puede referirse a la unión del segundo anticuerpo a su epítipo que se disminuye de manera detectable en presencia del primer anticuerpo. El mecanismo de tal competición puede ser a través de, en ejemplos no limitativos, impedimento estérico, cambio conformacional,
- 65 unión a un epítipo común.

El término “porcentaje de identidad de secuencia” en el contexto de secuencias de ácido nucleico significa los residuos en dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para determinar la máxima correspondencia. La longitud de comparación de identidad de secuencia puede ser por encima de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, por ejemplo, al menos aproximadamente 18 nucleótidos, al menos aproximadamente 24 nucleótidos, al menos aproximadamente 28 nucleótidos, al menos aproximadamente 32 nucleótidos, al menos aproximadamente 36 nucleótidos, o al menos aproximadamente 48 o más nucleótidos. Pueden usarse algoritmos conocidos en la técnica para medir la identidad de secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, pueden compararse secuencias de polinucleótidos usando FASTA, Gap o Bestfit (Wisconsin Package versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). FASTA incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, proporciona las alineaciones y el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor coincidencia entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol Biol* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol* 266:227-258 (1996); Pearson, *J Mol Biol* 276:71-84 (1998)). Se usan normalmente los parámetros por defecto para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico puede determinarse usando FASTA con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) o usando Gap con sus parámetros por defecto tal como se proporcionan en la versión 6.1 de GCG.

El término “porcentaje de identidad de secuencia” en el contexto de secuencias de aminoácidos significa los residuos en dos secuencias que son los mismos cuando se alinean para determinar la máxima correspondencia. La longitud de comparación de identidad de secuencia puede ser por encima de al menos aproximadamente cinco residuos de aminoácido, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 residuos de aminoácido, al menos aproximadamente 30 residuos de aminoácido, al menos aproximadamente 50 residuos de aminoácido, al menos aproximadamente 100 residuos de aminoácido, al menos aproximadamente 150 residuos de aminoácido, o al menos aproximadamente 200 o más residuos de aminoácido. La identidad de secuencia para polipéptidos se mide normalmente usando software de análisis de secuencias. Los algoritmos para la determinación de porcentaje de identidad de secuencia se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, pueden compararse secuencias de aminoácidos usando FASTA, Gap o Bestfit (Wisconsin Package versión 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI). El software de análisis de proteínas empareja secuencias usando mediciones de semejanza asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluyendo sustituciones de aminoácidos conservadoras. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como “Gap” y “Bestfit”, que pueden usarse con los parámetros por defecto tal como se especifica en los programas para determinar la homología de secuencia o identidad de secuencia entre polipéptidos altamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo natural y un análogo de la misma. Véase, por ejemplo, GCG versión 6.1 (Universidad de Wisconsin, Madison, WI). Pueden compararse también secuencias de polipéptido usando FASTA, usando los parámetros por defecto o recomendados, véase GCG versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) proporciona las alineaciones y el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de la mejor coincidencia entre las secuencias de consulta y búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol Biol* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo que puede usarse cuando se compara una secuencia con una base de datos que contiene un gran número de secuencias de diferentes organismos es el programa informático BLAST, por ejemplo, *blastp* o *tblastn*, usando los parámetros por defecto tal como se proporcionan con los programas. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, *J Mol Biol* 215:403-410 (1990); Altschul *et al.*, *Nucleic Acid Res* 25:3389-402 (1997).

Una proteína o un polipéptido es “sustancialmente puro”, “sustancialmente homogéneo” o “sustancialmente purificado” cuando al menos aproximadamente del 60 al 75% de una muestra presenta una única especie de polipéptido. El polipéptido o la proteína puede ser monomérico o multimérico. Una proteína o un polipéptido sustancialmente puro puede comprender aproximadamente el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% puro; por ejemplo, una proteína o un polipéptido sustancialmente puro es el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% puro. La pureza u homogeneidad de proteínas puede evaluarse mediante cualquier medio apropiado, tal como electroforesis en gel de poli(acrilamida) de una muestra de proteína seguida por la visualización de una o más bandas asociadas con la proteína o el polipéptido (por ejemplo, tras la tinción del gel), HPLC de exclusión molecular, HPLC de intercambio de cationes, electroforesis capilar reducida en SDS, mapeo de péptidos o mapeo de glicanos. Puede lograrse una mayor resolución usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, u otros medios de purificación.

El término “semejanza sustancial” cuando se refiere a un ácido nucleico o fragmento del mismo, significa que cuando se alinea de manera óptima con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas con otro ácido nucleico (o su cadena de complementariedad), existe identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente el 85%, al menos aproximadamente el 90%, y al menos aproximadamente el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de las bases del nucleótido, por ejemplo, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 98% o el 99% de identidad de secuencia tal como se mide mediante cualquier algoritmo conocido de identidad de secuencia, tal como FASTA, BLAST o Gap.

Tal como se aplica a los polipéptidos, el término “identidad sustancial” o “semejanza sustancial” significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean de manera óptima, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando los valores de hueco por defecto tal como se suministran con los programas, comparten al menos aproximadamente el 70%, el 75%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad de

secuencia; por ejemplo, el 70%, el 75%, el 80%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% de identidad de secuencia. En determinadas realizaciones, las posiciones de residuos que no son idénticos difieren en las sustituciones de aminoácidos conservadoras.

5 “Cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que va a administrarse que mejorará al menos un signo o síntoma de una enfermedad que va a tratarse o potenciará o mejorará el/los efecto(s) profiláctico(s) y/o terapéutico(s) de otra terapia (por ejemplo, otro agente terapéutico) útil para tratar una enfermedad asociada con IL-6. Se entiende que la cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse en múltiples dosis a lo largo de una cantidad limitada de tiempo o como un tratamiento crónico.

10 “Tratar”, “que trata” y “tratamiento” se refieren a un método de mejora de uno o más signos o síntomas de una enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad” incluye enfermedades y trastornos.

15 Las características y ventajas adicionales de la invención se describen más particularmente a continuación.

### Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 es un gráfico que ilustra los resultados de un experimento en el que un anticuerpo anti-IL-6 se administró IVT en un modelo de NVC de rata. Se administró anticuerpo anti-VEGF como control positivo y el control negativo fue vehículo solo.  $p = 0,0054$  en el día 15 y  $p = 0,0005$  en el día 22 para anti-IL-6 frente a control de vehículo.

25 La figura 2 es un gráfico que ilustra los resultados de un experimento de unión que somete a prueba la capacidad del anticuerpo 64 murino para inhibir la unión de IL-6/IL-6R a gp130.

30 La figura 3A es gráfico que ilustra un experimento en el que se sometió a prueba la 020 para determinar la capacidad de bloquear la señalización de IL-6 en ausencia de un exceso de IL-6R $\alpha$  soluble. Los experimentos se realizaron en células HEK-Blue-IL-6 con IL-6 0,2 ng/ml e IL6R $\alpha$  2  $\mu$ g/ml.

La figura 3B es un gráfico que ilustra un experimento en el que se sometió a prueba la 020 para determinar la capacidad de bloquear la señalización de IL-6 en presencia de un exceso de IL-6R $\alpha$  soluble. Los experimentos se realizaron en células HEK-Blue-IL-6 con IL-6 0,2 ng/ml e IL6R $\alpha$  2  $\mu$ g/ml.

35 La figura 4 es un gráfico que ilustra los resultados de un experimento el que un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 (“bloqueo de IL-6”) se administró IVT en un modelo de NVC de ratón. Los controles fueron sin tratamiento (ojo contralateral), inyección intravítrea de un anticuerpo anti-VEGF (“bloqueo de VEGF”) o inyección intravítrea de un anticuerpo de control de isotipo anti-HRP (“anticuerpo de control”).

40 La figura 5 muestra la unión a IL-6, en relación con el anticuerpo de tipo natural (EBI-029), en anticuerpos que tienen las siguientes mutaciones (1) I51T/S55G, (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G y (4) A28V/S30P/I51T/S55G (también denominado EBI-030).

45 La figura 6 muestra la señalización fraccional en células indicadoras de IL6 HEK-Blue™ tratadas con IL-6 y uno de los siguientes Fab: (1) WT (EBI-029), (2) A28V/I51T/S55G, (3) S30P/I51T/S55G, (4) A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030).

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

55 La figura 8 muestra la señalización fraccional en células indicadoras IL6 HEK-Blue™ tratadas con IL-6 20 pM y diversas concentraciones de (1) IgG2 de EBI-029 (EBI029) producida en células HEK-6E, (2) IgG2 de EBI-030 (EBI030) producida en células HEK-6E y (3) IgG2-H311A de EBI-030 (EBI-030 H311A) producida en células HEK-6E; (4) tocilizumab (TOCI) y (5) IgG2 de EBI-030 producida en una reserva estable de CHO (EBI-030 CHO).

La figura 9 representa el modelo farmacocinético descrito en el ejemplo 20.

60 La figura 10 representa el efecto del aumento de la potencia de anticuerpo sobre la duración de la inhibición de IL-6 en el ojo, tal como se simula usando el modelo farmacocinético descrito en el ejemplo 20.

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

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

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

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

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

10

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

15 La figura 16A muestra la señalización fraccional en células indicadoras de IL-6 HEK-Blue™ tratadas con IL-6 20 pM y diversas concentraciones de EBI-031 o tocilizumab.

La figura 16B muestra la señalización fraccional en células indicadoras de IL-6 HEK-Blue™ tratadas con hiper IL-6 200 pM y diversas concentraciones de EBI-031 o tocilizumab.

20

La figura 17 muestra los resultados de las simulaciones computacionales descritas en el ejemplo 24.

La figura 18 muestra un diagrama esquemático de las tres isoformas estructurales diferentes de los anticuerpos IgG2 debido a intercambio de disulfuro.

25

La figura 19 muestra cromatogramas de RP-HPLC de muestras de EBI-031: no tratadas (panel superior), DTT 5 mM (panel medio), cisteína 10 mM (panel inferior).

La figura 20 muestra cromatogramas de RP-HPLC de muestras de EBI-031 recogidas de diferentes líneas celulares de EBI-031: un cultivo a escala de 200 l de una línea celular clonal (panel superior), un cultivo a escala de 10 l a partir de una línea celular parental (panel medio) y una reserva transfectada de manera estable de células (panel inferior).

30

La figura 21 muestra el cromatograma de RP-HPLC de EBI-031 recogido de un cultivo a escala de 200 l de una línea celular clonal, y designa y cuantifica qué isoformas están representadas por cada pico en el cromatograma.

35

La figura 22A es un gráfico que muestra los datos farmacocinéticos de un mono verde africano (K797), tal como se describe en el ejemplo 26.

40 La figura 22B es un gráfico que muestra los datos farmacocinéticos de un mono verde africano (K679), tal como se describe en el ejemplo 26.

La figura 23 es un gráfico que muestra los datos farmacocinéticos tanto de monos verdes africanos (K797 o K679) como de curvas de ajuste.

45

La figura 24A muestra la concentración de fármaco de EBI-031 en el humor vítreo a lo largo del tiempo tras la administración intravítrea.

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

50

La figura 24C muestra la concentración de fármaco de EBI-031 en la coroides a lo largo del tiempo tras la administración intravítrea.

55 La figura 24D muestra la concentración de fármaco de EBI-031 en la conjuntiva a lo largo del tiempo tras la administración intravítrea.

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

60

La figura 24F muestra la concentración de fármaco de EBI-031 en el cuerpo ciliar del iris a lo largo del tiempo tras la administración intravítrea.

La figura 24G muestra la concentración de fármaco de EBI-031 en el cristalino a lo largo del tiempo tras la administración intravítrea.

65

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

5 La figura 24I muestra la concentración de fármaco de EBI-031 en la esclerótica a lo largo del tiempo tras la administración intravítrea.

### Descripción detallada

10 Se ha implicado que la IL-6 desempeña un papel en varias enfermedades tales como artritis reumatoide, y se ha notificado que se regula por incremento significativamente en varias enfermedades, incluyendo enfermedades oculares. La IL-6 puede actuar a través tanto de mecanismos cis como trans. En el mecanismo cis, se cree que la IL-6 libre se une al receptor de IL-6 unido a la membrana (IL-6R también se denomina IL-6R $\alpha$  y CD126), y luego el complejo IL-6/IL-6R interactúa con la gp130 (también denominada CD130, receptor de oncostatina M, IL-6R beta y transductor de señal de IL-6), para activar la señalización en la célula que contiene el complejo. En el mecanismo 15 trans, la IL-6 libre se une al receptor de IL-6 soluble (sIL-6R). Luego el complejo IL-6/sIL-6R puede unirse a la gp130 presente en una membrana celular. Una diferencia clave entre estos mecanismos que más tipos de células expresan la gp130 que expresan la IL-6R, cuya expresión es más limitada. Por tanto, en enfermedades para las que es deseable inhibir la señalización de IL-6, por ejemplo, en aquellas en las que es deseable inhibir de manera amplia la señalización de IL-6, es útil para inhibir tanto la señalización en cis como en trans de IL-6. Los solicitantes han modificado por ingeniería antagonistas de IL-6, por ejemplo, anticuerpos anti-IL-6, fragmentos y derivados que pueden inhibir tanto la señalización en cis como en trans por IL-6. Además, los solicitantes han modificado por ingeniería tales antagonistas de IL-6 para lograr un aclaramiento sistémico más rápido. Los antagonistas de IL-6, por ejemplo, anticuerpos contra IL-6 y fragmentos o derivados de los mismos, se describen en el documento WO2014/074905. La presente invención se refiere a anticuerpos contra IL-6 mejorados y usos de los mismos.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos en singular, incluyendo, pero sin limitarse a “un”, “una” o “el”, “la” incluyen el plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

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

30 En general, un antagonista de IL-6 (IL-6a) descrito en el presente documento se une específicamente al sitio II (sitio 2) de una IL-6 y es un útil para el tratamiento de una enfermedad ocular asociada con IL-6 y determinadas otras enfermedades. Una enfermedad ocular asociada con IL-6 es una en la que un síntoma o una actividad biológica no deseable de la enfermedad se asocia con la expresión o presencia de IL-6. En algunas realizaciones el IL-6a tiene alta afinidad tanto por la IL-6 libre como la unida, es relativamente estable en un organismo, puede inhibir la unión a gp130 de una IL-6 unida a IL-6R (denominada en el presente documento un complejo IL-6/IL-6R o IL-6/IL-6R), y puede tener un efecto terapéutico. En general, el IL-6a es un anticuerpo o se deriva de un anticuerpo. Por ejemplo, un IL-6a es un Fab humanizado de alta afinidad que puede unirse específicamente al sitio II de una IL-6 y bloquea de manera potente tanto la señalización en cis como en trans de IL-6. En otro ejemplo, el IL-6a es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG2.

45 En algunas realizaciones, el Fab también se configura como una secuencia de Fc modificado por ingeniería o está en un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el IL-6a de Fc modificado por ingeniería (por ejemplo, el Fab de Fc modificado por ingeniería) tiene aclaramiento sistémico más rápido en comparación con un control apropiado, por ejemplo, en comparación con el anticuerpo, fragmento, o derivado del mismo correspondiente que no tiene el Fc modificado por ingeniería. Estas y otras características de un IL-6a se describen además en el presente documento.

50 Los solicitantes han diseñado antagonistas de IL-6 que se unen de manera selectiva al sitio II de la IL-6 para proporcionar una inhibición amplia de señalización de IL-6 ya que tales moléculas pueden inhibir la unión de gp130 a IL-6, sin importar si la IL-6 está libre o unida a la IL-6R de membrana o sIL-6R. Además, seleccionando como diana el ligando (IL-6) en lugar del receptor de IL-6 puede evitarse el aclaramiento mediado por receptores y la toxicidad debida a la CCDA (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Debido a que la IL-6 desempeña papeles tanto patológicos como protectores en la enfermedad, el uso de un antagonista de IL-6 (IL-6a) para tratar una enfermedad 55 asociada con IL-6 aumentada puede mejorar determinados aspectos de un estado, pero también puede provocar efectos adversos significativos, por ejemplo, efectos sistémicos. Esta dualidad de rutas de IL-6 (es decir, la capacidad para tener efectos deseables e indeseables) puede hacer indeseable tratar un trastorno asociado con IL-6 con un inhibidor sistémico. Por consiguiente, las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento pueden ser útiles para los tratamientos que inhiben al menos una actividad de IL-6, pero no tienen un efecto indebido sobre las actividades de IL-6 positivas, en parte porque las composiciones pueden formularse para la administración local, por ejemplo, para administración local al ojo. Por ejemplo, en determinados aspectos, el IL-6a se diseña para ser de un tamaño adecuado para la administración a un sitio particular. En algunas realizaciones, el IL-6a es un anticuerpo de longitud completa. En algunas realizaciones, el IL-6a se deriva de un anticuerpo y está en un formato que no puede tener ninguna residencia más larga en el vítreo del ojo ni ningún derrame sistémico limitado. En algunas realizaciones, el IL-6a es un anticuerpo modificado (por ejemplo, un anticuerpo con un dominio Fc modificado) que tiene una residencia más larga en el vítreo del ojo y/o más derrame sistémico limitado en

comparación con un anticuerpo no modificado correspondiente. En algunas realizaciones, el IL-6a es un anticuerpo IgG2.

5 En algunos aspectos, el IL-6a es un IL-6a relativamente pequeño tal como un fragmento de un anticuerpo u otro derivado de un anticuerpo que es menos que un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un Fab que se deriva de un anticuerpo contra IL-6. En algunos casos, un IL-6a está en un formato que puede pasar de una parte de un tejido a otra con cinética aumentada en comparación con un anticuerpo de longitud completa contra IL-6 correspondiente. En algunas realizaciones, el IL-6a es un Fab que se ha modificado por ingeniería para ser una molécula más grande, que es más probable que tenga una residencia aumentada en la ubicación a la que se administró en comparación con el Fab solo, por ejemplo, el IL-6a se dimeriza a través del dominio Fc. En determinadas realizaciones, el dominio Fc se ha modificado por ingeniería de manera que un resto de Fc tiene unión a FcRn extirpada o reducida que puede reducir la acumulación sistémica en comparación con la misma entidad de unión a IL-6 que incluye un Fc de tipo natural. El dominio Fc modificado por ingeniería puede ser, por ejemplo, un dominio de IgG1 o un dominio de IgG2.

15 Normalmente, los antagonistas de IL-6 descritos en el presente documento tienen una afinidad suficientemente alta para su diana, IL-6, para ser eficaces en la mejora de al menos un efecto indeseable de IL-6 y son suficientemente estables para ser útiles como agente terapéutico.

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

#### 25 *Identificación de antagonistas de IL-6 que se unen al sitio II*

En general, cualquier método conocido en la técnica puede usarse para generar una molécula que puede unirse a una IL-6, por ejemplo, pueden examinarse genotecas polipeptídicas o genotecas moleculares para determinar los compuestos candidatos en un ensayo para determinar la capacidad de un polipéptido o compuesto para unirse a IL-6. Una vez que se identifica un compuesto candidato de este tipo, puede determinarse el sitio de unión del compuesto usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede someterse a prueba una molécula para determinar la capacidad para unirse a IL-6 de tipo natural y la unión en comparación con la capacidad del compuesto para unirse a una IL-6 mutada en el sitio I, sitio II o sitio III. En realizaciones, un IL-6a tal como se describe en el presente documento retiene la capacidad para unirse a un complejo IL-6/IL-6R $\alpha$  y a IL-6, e impide la unión de IL-6/IL-6R $\alpha$  a gp130. En realizaciones, un IL-6a tal como se describe en el presente documento puede competir con gp130 por la unión al complejo IL-6/IL-6R $\alpha$ , por ejemplo, por la unión al sitio II de la IL-6. Tales actividades de unión pueden evaluarse usando métodos conocidos en la técnica.

40 Los IL-6a candidatos pueden someterse a prueba, por ejemplo, usando un sistema de ensayo de IL-6 HEK-Blue™ (InvivoGen, San Diego). Las células de IL-6 HEK-Blue™ son células HEK293 que se transfectan de manera estable con IL-6R humano y un gen indicador de SEAP inducible por STAT3. En presencia de IL-6, se activa el STAT3 y se secreta SEAP. SEAP se evalúa usando, por ejemplo, QUANTI-Blue™ (InvivoGen, San Diego). La adición de un antagonista de IL-6 a las células impide la secreción o disminuye el nivel de SEAP como resultado de la inhibición de la IL-6 unida al receptor tanto libre como soluble.

45  $K_D$  se refiere a la constante de equilibrio de afinidad de unión de una interacción anticuerpo-antígeno o interacción fragmento de anticuerpo-antígeno particular. En realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento se une a un antígeno (por ejemplo, IL-6) con una  $K_D$  que es menos de o igual a 250 pM, por ejemplo, menos de o igual a 225 pM, 220 pM, 210 pM, 205 pM, 150 pM, 100 pM, 50 pM, 20 pM, 10 pM o 1 pM. La  $K_D$  puede determinarse usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el sistema BiaCore™.

50  $K_{off}$  se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno o complejo fragmento de anticuerpo-antígeno particular. La constante de velocidad de disociación puede determinarse usando resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, usando el Sistema BiaCore™. Una  $K_{off}$  relativamente baja puede contribuir a características deseables de un agente terapéutico, por ejemplo, permitiendo una administración menos frecuente del inhibidor a un sujeto que necesita tal tratamiento.

#### 60 *Especificidad*

En algunas realizaciones, un IL-6a descrito en el presente documento se une específicamente a una diana, por ejemplo, una IL-6. En general, "unión específica" tal como se usa en el presente documento indica que una molécula se une de manera preferente a una molécula seleccionada y presenta mucha menor afinidad de unión por una o más de otras moléculas. En realizaciones, la afinidad de unión para otra molécula es 1, 2, 3 o más órdenes de magnitud menor que la afinidad de unión por la diana.

Tal como se comentó anteriormente, la IL-6 puede estar presente como IL-6 libre y como IL-6 unida a IL-6R $\alpha$  soluble. Los solicitantes han identificado el sitio II de la IL-6 como una diana óptima para un antagonista de IL-6 en comparación con un inhibidor que se une al sitio I de una IL-6. Un inhibidor del sitio I puede inhibir la unión de IL-6 libre a IL-6R $\alpha$ . Sin embargo, un inhibidor de este tipo no puede impedir la actividad iniciada por complejos IL-6/IL-6R preexistentes excepto mediante la sustitución limitada por la  $K_{off}$  del complejo. Otra alternativa, un inhibidor que se une a una IL-6R $\alpha$ , es menos adecuada porque puede tener capacidad limitada para impedir la actividad de IL-6 a menos que esté presente en concentraciones de saturación. Debido a que la cantidad de receptor de IL-6 es generalmente bastante alta en comparación con la cantidad de IL-6, este enfoque puede requerir la administración de una cantidad indeseablemente grande de una composición que inhibe la actividad de IL-6 uniéndose al receptor. En realizaciones, los antagonistas de IL-6 descritos en el presente documento (por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos y derivados de los mismos descritos en el presente documento) pueden bloquear la actividad de IL-6 incluso cuando la IL-6 se une a IL-6R. Por consiguiente, una ventaja de un IL-6a tal como se describe en el presente documento es que es necesario administrar relativamente menos composición para lograr un efecto terapéutico en comparación con un inhibidor que selecciona como diana un receptor de IL-6. Se han notificado anticuerpos antirreceptores que van a aclararse rápidamente mediante aclaramiento mediado por receptores que limitan significativamente su PK, requiriendo así grandes dosis, una administración de dosis más frecuente, o ambas. De manera adicional, tanto los anticuerpos antirreceptores como los anti-sitio I de IL-6 tienen un problema ya que aumentan la concentración en tejido de IL-6 interrumpiendo la ruta de aclaramiento mediado por receptores normal del ligando, exponiendo de ese modo al sujeto a niveles potencialmente indeseables de IL-6 en un tejido. Además, el uso de un inhibidor que selecciona como diana IL-6R $\alpha$  puede necesitar la presencia del inhibidor cerca de ambos sitios en los que se busca la inhibición y un sitio en el que no es deseable, por ejemplo, tratamiento sistémico. El uso de un IL-6a que se une al sitio II, el sitio al que se une gp130, permite la inhibición a través de IL-6 libre así como IL-6 que está unida a un IL-6R, pero no se ha activado aún una ruta de IL-6 a través de gp130. Por consiguiente, sin querer limitarse a la teoría, los antagonistas de IL-6 descritos en el presente documento se diseñan para unirse a ambas formas de IL-6 (soluble y unida al receptor), específicamente los antagonistas de IL-6 se unen al sitio II de la IL-6, que es accesible en ambas formas. Las composiciones que contienen un IL-6a tal como se describe en el presente documento pueden inhibir tanto la señalización en cis como en trans por IL-6.

En algunos casos los compuestos y métodos proporcionados en el presente documento se diseñan para proporcionar un bloqueo de IL-6 eficaz suficiente para tratar al menos un signo o síntoma de un trastorno asociado con IL-6, por ejemplo, inhibiendo la angiogénesis y/o la inflamación.

Los compuestos descritos en el presente documento son útiles para tratar enfermedades oculares caracterizadas por un nivel indeseablemente alto de IL-6, por ejemplo, en el vítreo (véanse Yuuki *et al.*, J Diabetes Compl 15:257 (2001); Funatsu *et al.*, Ophthalmology 110: 1690,(2003); Oh *et al.*, Curr Eye Res 35:1116 (2010); Noma *et al.*, Eye 22:42 (2008); Kawashima *et al.*, Jpn J Ophthalmol 51:100 (2007); Kauffman *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci 35:900 (1994); Miao *et al.*, Molec Vis 18:574(2012)).

En general, un IL-6a tal como se describe en el presente documento es un potente antagonista de la señalización de IL-6. En algunas realizaciones, un IL-6a descrito en el presente documento tiene una alta afinidad por IL-6, por ejemplo, una  $CI_{50}$  menos de o igual a 100 pM en un ensayo de IL-6 HEK-Blue usando IL-6 10 pM. Puede determinarse la alta afinidad de un IL-6a basándose en la  $K_D$  del IL-6a, por ejemplo, una  $K_D$  de menos de o igual a 1 nM, menos de o igual a 500 pM, menos de o igual a 400 pM, menos de o igual a 300 pM, menos de o igual a 240 pM, o menos de o igual a 200 pM.

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

Para administrar de manera eficaz un antagonista de IL-6, es necesario que el inhibidor tenga solubilidad compatible con la concentración a la que se administrará. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo IL-6a de longitud completa, la solubilidad es mayor de o igual a 20 mg/ml, mayor de o igual a 10 mg/ml, mayor de o igual a 5 mg/ml, o mayor de o igual a 1 mg/ml.

Además, para ser un tratamiento viable, el inhibidor debe tener alta estabilidad a la temperatura corporal de los sitios de administración y actividad así como estabilidad en almacenamiento. En realizaciones, el inhibidor tiene una  $T_f$  mayor de o igual a 60°C (por ejemplo, mayor de o igual a 60°C, mayor de o igual a 62,5°C, mayor de o igual a 65°C, mayor de o igual a 70°C, mayor de o igual a 73°C, o mayor de o igual a 75°C). En realizaciones, el inhibidor tiene una  $T_{aparición}$  mayor de o igual a 45°C, por ejemplo, mayor de o igual a 50°C, mayor de o igual a 51°C, mayor de o igual a 55°C, o mayor de o igual a 60°C. Los métodos de determinación de las  $T_f$  y  $T_{aparición}$  pueden determinarse usando métodos conocidos en la técnica.

Los antagonistas que tienen las características deseadas pueden seleccionarse de tipos adecuados de moléculas conocidas en la técnica, por ejemplo, anticuerpos, incluyendo fragmentos y derivados de un anticuerpo que

selecciona como diana el sitio II de la IL-6 que retiene o mantiene generalmente suficientes características del anticuerpo contra la IL-6 original (por ejemplo, propiedades de unión deseadas). Tales antagonistas incluyen fragmentos de  $F_{ab}$ , scFv, fragmentos de  $F_{ab}$  modificados por ingeniería para incluir un resto de Fc y anticuerpos de longitud completa modificados por ingeniería para tener una región de entramado diferente del anticuerpo que selecciona como diana el sitio II de la IL-6 original.

En algunos aspectos, el IL-6a dado a conocer en el presente documento comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo humano que puede competir o competir de manera cruzada con un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse al sitio II de la IL-6. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento del mismo puede estar compuesto por un dominio VH y un dominio VL dados a conocer en el presente documento, y los dominios VH y VL comprenden un conjunto de CDR de un anticuerpo de unión al sitio II de la IL-6 dado a conocer en el presente documento.

Cualquier método adecuado puede usarse para determinar el dominio y/o epítipo unido por un IL-6a, por ejemplo, mutando diversos sitios de una IL-6. Los sitios en los que las mutaciones impiden o disminuyen la unión del IL-6a y el ligando de IL-6 están implicados o bien directamente en la unión al IL-6a o bien afectan indirectamente al sitio de unión, por ejemplo, afectando la conformación de la IL-6. Pueden usarse otros métodos para determinar los aminoácidos unidos por un IL-6a. Por ejemplo, puede usarse una exploración de unión a péptido, tal como un inmunoensayo ligado a enzimas basado en PEPSCAN (ELISA). En una exploración de unión a péptido de este tipo, se seleccionan de manera sistemática péptidos solapantes cortos derivados del antígeno para determinar la unión a un miembro de unión. Los péptidos pueden acoplarse de manera covalente a una superficie de apoyo para formar un alineamiento de péptidos. Los péptidos pueden estar en una conformación lineal o restringida. Una conformación restringida puede producirse usando péptidos que tienen un residuo cisteína (cys) terminal en cada extremo de la secuencia del péptido. Los residuos cys pueden acoplarse de manera covalente directa o indirectamente a una superficie de apoyo de manera que el péptido se mantenga en una conformación en bucle. Por consiguiente, un péptido usado en el método puede tener un residuo cys añadido a cada extremo de una secuencia del péptido correspondiente a un fragmento del antígeno. También pueden usarse péptidos con doble bucle, en los que un residuo cys se ubica de manera adicional en o cerca de la mitad de la secuencia del péptido. Los residuos cys pueden unirse de manera covalente directa o indirectamente a una superficie de apoyo de manera que los péptidos formen una conformación en doble bucle, con un bucle en cada lado del residuo cys central. Los péptidos pueden generarse de manera sintética, y por tanto, los residuos cys pueden modificarse por ingeniería en las ubicaciones deseadas, a pesar de que no se producen de manera natural en la secuencia del sitio II de la IL-6. Opcionalmente, los péptidos lineales y restringidos pueden seleccionarse ambos en un ensayo de unión a péptido. Una exploración de unión a péptido puede implicar la identificación (por ejemplo, usando un ELISA) de un conjunto de péptidos a los que se une el miembro de unión, en la que los péptidos tienen secuencias de aminoácidos correspondientes a fragmentos de un IL-6a (por ejemplo, péptidos que incluyen aproximadamente 5, 10 ó 15 residuos contiguos de un IL-6a), y la alineación de los péptidos para determinar una huella de residuos unidos al miembro de unión, en la que la huella comprende residuos comunes a péptidos solapantes. Alternativa o adicionalmente, el método de exploración de unión a péptido puede usarse para identificar péptidos a los que se une el IL-6a con al menos una razón señal:ruido seleccionada.

Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para determinar los residuos unidos por un anticuerpo, y/o para confirmar los resultados de exploración de unión a péptido, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento), intercambio de hidrógeno-deuterio, espectrometría de masas, RMN y cristalografía de rayos X.

Normalmente, un IL-6a útil tal como se describe en el presente documento es una molécula de anticuerpo humano, una molécula de anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión de la misma. En general, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El origen de un anticuerpo de este tipo puede ser humano, murino, de rata, camélido, de conejo, ovino, porcino o bovino, y puede generarse según métodos conocidos por los expertos en la técnica.

En general, un IL-6a comprende al menos las CDR de un anticuerpo que puede unirse específicamente a una IL-6 (por ejemplo, una IL-6 humana), por ejemplo, al sitio II de una IL-6. La estructura para portar una CDR o un conjunto de CDR de la invención puede ser una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una porción sustancial de la misma en la que la CDR o el conjunto de CDR se ubica en una ubicación correspondiente a la CDR o el conjunto de CDR de dominios variables VH y VL de anticuerpos que se producen de manera natural codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse en referencia a Kabat *et al.*, 1983 (National Institutes of Health), y actualizaciones del mismo que pueden encontrarse como "Kabat" usando cualquier herramienta de búsqueda en Internet.

Un IL-6a, tal como se da a conocer en el presente documento, es normalmente un anticuerpo que comprende generalmente un dominio VH y/o dominio VL de anticuerpo. Un dominio VH comprende un conjunto de CDR de cadena pesada (VHCDR), y un dominio VL comprende un conjunto de CDR de cadena ligera (VLCDR). Los ejemplos de tales CDR se proporcionan en el presente documento en los ejemplos. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende una VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3 y una región de entramado. Puede alternativamente o también comprender un dominio VL de anticuerpo que comprende una VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 y una región de entramado.

En el presente documento se dan a conocer antagonistas de IL-6 que comprenden una VHCDR1 y/o una VHCDR2 y/o una VHCDR3 tal como las dadas a conocer en el presente documento y/o una VLCDR1 y/o una VLCDR2 y/o una VLCDR3 tal como las dadas a conocer en el presente documento. El IL-6a puede comprender una o más CDR de cualquiera de los anticuerpos, fragmentos o derivados descritos en el presente documento. El IL-6a puede comprender un conjunto de VHCDR (por ejemplo, VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3), y opcionalmente también puede comprender un conjunto de VLCDR (por ejemplo, VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3). Las CDR pueden derivarse de uno o más anticuerpos, fragmentos o derivados descritos en el presente documento. Por ejemplo, las VLCDR pueden derivarse del mismo o de un anticuerpo diferente que las VHCDR.

En general, un dominio VH se aparea con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Por ejemplo, el dominio de HC de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 se aparea con el dominio de LC de SEQ ID NO:2.

En realizaciones, la molécula de anticuerpo, fragmento o derivado de la misma comprende una VHCDR1, VHCDR2 y VHCDR3 de SEQ ID NO:37. En realizaciones, la molécula de anticuerpo, fragmento o derivado de la misma comprende VLCDR1, VLCDR2 y VLCDR3 de SEQ ID NO: 38

Un IL-6a tal como se describe en el presente documento puede comprender regiones constantes de anticuerpos o partes de las mismas, por ejemplo, regiones constantes de anticuerpos humanos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C-terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpos incluyendo cadenas CK o CL humanas. De manera similar, un IL-6a basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C-terminal a toda o una parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, particularmente IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se modifica por ingeniería para reducir o eliminar la actividad de CCDA.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo IgG2. En una realización, el anticuerpo de la invención comprende una región de entramado de IgG2, una región constante de IgG2 o una región Fc de IgG2 tal como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos IgG2 pueden existir como las tres isoformas estructurales principales: IgG2-A, IgG2-B e IgG2-A/B (Wypych J. *et al.* Journal of Biological Chemistry. 2008, 283:16194-16205). Esta heterogeneidad estructural es debida a las distintas configuraciones de los enlaces disulfuro que unen los brazos Fab a la región bisagra de la cadena pesada. En la isoforma IgG2-A, no hay enlaces disulfuro que unan los brazos Fab a la región bisagra. En la isoforma IgG2-B, ambos brazos Fab tienen enlaces disulfuro que unen la cadena pesada y ligera a la región bisagra. La isoforma IgG2-A/B es un híbrido entre las isoformas IgG2-A e IgG2-B, teniendo un sólo un brazo Fab con enlaces disulfuro que unen la cadena pesada y ligera de un brazo Fab a la región bisagra. La conversión de un anticuerpo IgG2 entre dos o todas las isoformas estructurales diferentes, también denominada intercambio de disulfuro, se produce de manera natural *in vivo* e *in vitro* tanto para anticuerpos que se producen de manera natural como recombinantes. Como resultado, las formulaciones de anticuerpos IgG2 en la técnica comprenden una mezcla heterogénea de isoformas IgG2-A, IgG2-B e IgG2-A/B. Las diferentes isoformas de IgG2 pueden tener propiedades funcionales únicas y diferentes, tales como diferencias en estabilidad, agregación, viscosidad, unión al receptor Fc o potencia. La presencia de múltiples isoformas o niveles aumentados de una isoforma particular en una formulación de anticuerpo IgG2 puede afectar de manera negativa a la estabilidad, la agregación o la potencia.

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

Las composiciones que comprenden el anticuerpo de la invención comprenden principalmente isoformas IgG2-A y/o IgG2-A/B del anticuerpo. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento comprende al menos el 50, el 60, el 70, el 80, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de las isoformas IgG2-A o IgG2-A/B del anticuerpo. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento comprende al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 95, el 96, el 97, el 98 o el 99% de las isoformas IgG2-A e IgG2-A/B de manera colectiva. En tales realizaciones, una composición que comprende un anticuerpo descrito en el presente documento no comprende una cantidad sustancial de las isoformas IgG2-B del anticuerpo. Por ejemplo, la composición comprende menos del 10%, el 5%, el 2%, el 1%, el 0,5% o el 0,1% de las isoformas IgG2-B del anticuerpo.

En algunos casos, un anticuerpo de la invención se modifica además usando métodos conocidos en la técnica que crean una secuencia que tiene un alotipo específico, por ejemplo, un alotipo que predomina en una población que tiene un origen geográfico particular. En algunos casos, la región constante de la cadena pesada se modifica con este propósito.

Un IL-6a puede ser una molécula de anticuerpo, un fragmento de unión del mismo o una variante, que tiene una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR, dentro de una región de entramado de un anticuerpo. Por ejemplo, una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo tal como se describe en el presente documento) puede injertarse en una región de entramado (por ejemplo, región de entramado humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo. Las regiones de entramado pueden derivarse de secuencias de genes de línea germinal humana, o puede ser no de línea germinal en origen.

Los residuos de regiones de entramado VH y/o VL pueden modificarse tal como se comenta y ejemplifica en el presente documento, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida al sitio.

Los cambios de aminoácidos pueden realizarse en una o más regiones de entramado y/o una o más CDR derivadas de un anticuerpo IL-6a dirigido al sitio II de la IL-6 (denominado en el presente documento un "anticuerpo de referencia contra IL-6") usando métodos y parámetros conocidos en la técnica. Además, se incluyen en el presente documento un antagonista de IL-6 resultante que retiene la unión al sitio II de una IL-6 (por ejemplo, sitio II de una IL-6 humana) y normalmente tiene al menos la misma afinidad de unión o aumentada en comparación con el anticuerpo de referencia contra IL-6. En algunos casos, para mejorar un parámetro tal como la estabilidad, puede introducirse un cambio que da como resultado una disminución en la afinidad de unión del IL-6a derivado en comparación con el IL-6a de referencia (por ejemplo, el anticuerpo de referencia) para crear un IL-6a útil. En algunas realizaciones, por ejemplo, en algunos casos en los que la referencia se refiere a unión a FcRn o a un parámetro farmacocinético (PK) tal como la semivida en el vítreo o la semivida sistémica (por ejemplo, en sangre, plasma, suero, linfa, hígado, riñón, otro tejido o líquido corporal), un anticuerpo de referencia puede ser un anticuerpo que no se une específicamente a una IL-6.

Un cambio en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-6a puede incluir la sustitución de uno o más residuos de aminoácido con un aminoácido que no se produce de manera natural o no habitual, modificando uno o más residuos de aminoácido en una forma que no se produce de manera natural o no habitual, o insertando uno o más aminoácido que no se producen de manera natural o no habituales en la secuencia. Los ejemplos de números y ubicaciones de las alteraciones en las secuencias de la invención se describen en otra parte en el presente documento. Los aminoácidos que se producen de manera natural incluyen los 20 L-aminoácidos "habituales" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos habituales de una letra. Los aminoácidos no habituales incluyen cualquier otro residuo que puede incorporarse en un esqueleto polipeptídico o resultar de la modificación de un residuo de aminoácido existente. Los aminoácidos no habituales pueden producirse de manera natural o producirse de manera no natural. Se conocen en la técnica varios aminoácidos no habituales que se producen de manera natural, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina y N-acetilserina. Los residuos de aminoácido que se derivatizan en su posición N-alfa sólo estarán ubicados en el extremo N-terminal de una secuencia de aminoácido. El aminoácido es normalmente un L-aminoácido. En algunos casos el aminoácido es un D-aminoácido. Por tanto, la alteración puede comprender la modificación de un L-aminoácido en, o la sustitución con, un D-aminoácido. Se conocen también las formas metiladas, acetiladas y/o fosforiladas de los aminoácidos, y los aminoácidos en la presente invención pueden someterse a tal modificación.

Las secuencias de aminoácidos en miembros de unión y dominios de anticuerpos de la invención pueden comprender aminoácidos no naturales o no habituales tal como se comenta en el presente documento. Los aminoácidos no habituales (por ejemplo, D-aminoácidos) pueden incorporarse en una secuencia de aminoácidos usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo en la síntesis de la molécula o mediante la modificación o la sustitución tras la síntesis de un aminoácido. En algunos casos, se usa un D-aminoácido para aumentar la PK de un IL-6a.

Las regiones de VH o VL novedosas que portan secuencias derivadas de CDR de la invención pueden generarse usando mutagénesis aleatoria de una o más secuencias de ácido nucleico de VH y/o VL seleccionadas para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. Por ejemplo, puede usarse PCR propensa a error (Chao *et al.*, Nature Protocols, 1:755-768 (2006)). En algunas realizaciones, se realizan una o dos sustituciones de aminoácido dentro de un dominio variable completo o conjunto de CDR. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para generar mutaciones, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, normalmente en una o más CDR.

Un método para producir un anticuerpo IL-6a es alterar un dominio VH tal como los dados a conocer en el presente documento añadiendo, delecionando, sustituyendo o insertando uno o más aminoácidos. El dominio VH alterado puede combinarse con un dominio VL (por ejemplo, un dominio VL dado a conocer en el presente documento), que también puede alterarse tal como se describe en el presente documento y usando métodos conocidos en la técnica. Tales moléculas alteradas se someten a prueba para determinar su capacidad para unirse al sitio II de la IL-6 y opcionalmente para determinar otras propiedades deseadas tales como la afinidad aumentada en comparación con una molécula de referencia. En algunos casos, un dominio VH o VL variante puede tener 1, 2, 3, 4 ó 5 de tales alteraciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácido).

En realizaciones, un IL-6a de la invención es un fragmento de un anticuerpo que se une al sitio II de una IL-6 y comprende un sitio de unión a antígeno, por ejemplo, puede unirse al sitio II de una IL-6. Los fragmentos de

anticuerpos de la invención se obtienen generalmente empezando con una molécula de anticuerpo de referencia (original), tal como una molécula de anticuerpo que comprende SEQ ID NO:41 y SEQ ID NO:42. Los fragmentos de anticuerpos pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica tales como ADN recombinante, escisión enzimática (por ejemplo, usando pepsina o papaína), escisión química de un anticuerpo (por ejemplo, reducción química de puentes de disulfuro). Los fragmentos de anticuerpos que comprenden un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd y región variable estabilizada por disulfuro (dsFv). Varias otras moléculas de anticuerpo incluyendo uno o más sitios de unión a antígeno de anticuerpos pueden modificarse por ingeniería, incluyendo por ejemplo F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>3</sub>, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos. Los ejemplos de moléculas de anticuerpos y métodos para su construcción y uso se describen en Holliger y Hudson, 2005, Nat Biotechnol 23:1126-1136. Los ejemplos no limitativos de fragmentos de unión son un fragmento Fab que está compuesto de dominios VL, VH, dominio constante de cadena ligera (CL) y dominio constante de cadena pesada 1 (CH1); un fragmento Fd que está compuesto de dominios VH y CH1; un fragmento Fv que está compuesto de los dominios VL y VH de un único anticuerpo; un fragmento dAb que está compuesto de un dominio VH o VL; regiones CDR aisladas; un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos; una molécula de Fv de cadena única (scFv), en la que un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un ligador peptídico que permite a los dos dominios asociarse para formar un sitio de unión a antígeno; un dímero biespecífico de Fv de cadena única (por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento WO 1993/011161) y un diacuerpo, que es un fragmento multivalente o multiespecífico construido usando fusión de genes (por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento WO94/13804). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes de disulfuro que unen los dominios VH y VL. Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también pueden usarse como un IL-6a. Otros fragmentos y derivados de un anticuerpo que pueden usarse como un IL-6a incluyen un Fab', que difiere de un fragmento Fab en la adición de unos pocos residuos de aminoácido en el extremo carboxilo terminal del dominio de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

En algunos casos, un IL-6a que es un fragmento de anticuerpo se ha modificado químicamente para mejorar o introducir una propiedad deseada, por ejemplo, la pegilación para aumentar la semivida o la incorporación.

Un dAb (anticuerpo de dominio) es un pequeño fragmento de unión a antígeno monomérico de un anticuerpo (la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo). Los dAb de VH se producen de manera natural en camélidos (por ejemplo, camellos y llamas) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando células B específicas de antígeno y clonando directamente los genes de dAb de células B individuales. Un IL-6a de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente tal como se expone en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente tal como se expone en el presente documento.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos biespecíficos en los que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula. Un IL-6a puede incorporarse como parte de un anticuerpo biespecífico preparado usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, preparado químicamente o a partir de hibridomas híbridos. Una molécula de este tipo puede ser un fragmento de anticuerpo biespecífico de un tipo comentado anteriormente. Un ejemplo no limitativo de un método para generar un anticuerpo biespecífico es la tecnología BiTE™ en la que pueden usarse dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad y unidos directamente a través de péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos sobre una cadena polipeptídica única corta. Los diacuerpos y el scFv pueden construirse sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo posiblemente los efectos de reacción anti-idiotípica. Los anticuerpos biespecíficos pueden construirse como IgG completa, como Fab'<sub>2</sub> biespecífico, como Fab'PEG, como diacuerpos o si no como scFv biespecífico. Además, dos anticuerpos biespecíficos pueden unirse usando métodos habituales conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, son útiles, en parte debido a que pueden construirse y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión apropiadas pueden seleccionarse fácilmente usando visualización de fagos (documento WO 1994/13804) a partir de genotecas. Si un brazo del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el sitio II de la IL-6, luego puede obtenerse una genoteca en la que se varía el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada.

Los anticuerpos biespecíficos completos pueden obtenerse mediante métodos de modificación por ingeniería alternativos tal como se describe en los documentos WO 1996/27011, WO 1998/50431 y WO 2006/028936.

En algunos casos, un IL-6a de la invención comprende un sitio de unión a antígeno dentro de una molécula no de anticuerpo, por ejemplo, incorporando una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR, en un armazón proteínico no de anticuerpo, tal como se comentará adicionalmente a continuación. En algunos casos, las CDR se incorporan en un armazón no de anticuerpo. Un sitio de unión al sitio II de la IL-6 puede proporcionarse mediante la disposición de CDR en armazones proteínicos no de anticuerpo, tales como fibronectina o citocromo B, o aleatorizando o mutando residuos de aminoácido de un bucle dentro de un armazón proteínico para proporcionar especificidad de

unión para un sitio II de la IL-6. Los esqueletos para modificar por ingeniería los sitios de unión novedosos en proteínas se conocen en la técnica. Por ejemplo, se dan a conocer armazones proteínicos para miméticos de anticuerpos en el documento WO200034784, que describe proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un armazón adecuado en el que injertar una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR, puede proporcionarse mediante cualquier miembro de dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón proteínico no de anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpos. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad para entrar en células, penetrar profundamente en tejidos o alcanzar dianas dentro de otras estructuras, o unirse dentro de cavidades de la proteína del antígeno diana. Son típicas proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en las que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles se muta específicamente o de manera aleatoria para crear un sitio de unión a antígeno que se une al antígeno diana. Tales proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, usando el 10<sup>o</sup> dominio de fibronectina tipo III), lipocalinas así como gamma-cristalina y otros armazones de Affilin™ (Scil Proteins, Halle, Alemania). Los ejemplos de otros enfoques incluyen microcuerpos sintéticos basados en ciclotidas-pequeñas proteínas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares, microproteínas (por ejemplo, Versabodies™, Amunix Inc., Mountain Vista, CA) y proteínas de repeticiones de anquirina (DARPin, por ejemplo, de Molecular Partners AG, Zurich-Schlieren, Suiza). Tales proteínas también incluyen dominios de proteínas modificados por ingeniería pequeños tales como, por ejemplo, inmunodominios (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses n.ºs 2003/082630 y 2003/157561). Los inmunodominios contienen al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo.

Un IL-6a puede comprender aminoácidos adicionales, por ejemplo, para conferir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno.

En algunos casos, un IL-6a porta una etiqueta detectable, o se conjuga con una toxina o un resto o una enzima de direccionamiento (por ejemplo, a través de un enlace peptídico o un ligador). Por ejemplo, un IL-6a puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión a antígeno (por ejemplo, un sitio de unión para el sitio II de una IL-6), de manera que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y, por tanto, selecciona como diana el sitio catalítico para la IL-6 o el complejo IL-6/IL-6R. El sitio catalítico puede inhibir además, en algunos casos, una función biológica de una IL-6, por ejemplo, mediante escisión de la IL-6, el IL-6R u otra molécula que se asocia con el complejo IL-6a/IL-6.

En algunos aspectos, la invención incluye un anticuerpo IL-6a que se ha modificado en comparación con un anticuerpo de referencia para alterar, por ejemplo, aumentar, disminuir o eliminar, la función de efecto biológico del IL-6a. En un ejemplo, se modifica la región Fc o se sustituye el dominio Fc parental por un dominio Fc modificado para alterar la farmacocinética del IL-6a modificado en comparación con el original no modificado. En algunas realizaciones, el IL-6a se modifica por ingeniería para tener una región de entramado de IgG2. En otras realizaciones, el IL-6a está en una región de entramado de IgG1 o IgG2 y tiene un Fc modificado que aumenta la afinidad de unión del IL-6a a pH 6,0 y no altera sustancialmente la afinidad de unión a pH 7,0 en comparación con uno original u otro IL-6a de referencia. En realizaciones, se modifica el dominio Fc y el IL-6a tiene acumulación sistémica reducida, una semivida disminuida y/o un aclaramiento sistémico aumentado en comparación con uno original u otro IL-6a de referencia.

En algunas realizaciones, un anticuerpo IL-6a se modifica para aumentar la fijación de complementos y la citotoxicidad dependiente de complementos. En otros aspectos, el anticuerpo IL-6a se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo en comparación con un anticuerpo de referencia para activar células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA). En algunos casos, los anticuerpos tal como se dan a conocer en el presente documento pueden modificarse tanto para potenciar su capacidad de activación de células efectoras y participación en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) como para potenciar su capacidad de fijación de complementos y participación en la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC).

En algunas realizaciones, los anticuerpos dados a conocer en el presente documento se modifican para reducir su capacidad para fijar complementos y participar en la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). En otras realizaciones, los anticuerpos se modifican para reducir su capacidad para activar células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA). En aún otras realizaciones, un anticuerpo tal como se da a conocer en el presente documento puede modificarse tanto para reducir su capacidad para activar células efectoras y participar en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) como para reducir su capacidad para fijar complementos y participar en la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC).

Generalmente, es ventajoso evitar la administración frecuente de una dosis de un IL-6a, por ejemplo, cuando se administra mediante inyección en el ojo. Para facilitar esta característica, en determinadas realizaciones, la semivida en el sitio de administración, por ejemplo, el vítreo, de un IL-6a tal como se da a conocer en el presente documento es de al menos 4 días, por ejemplo, al menos 7 días, al menos 9 días, al menos 11 días o al menos 14 días. En determinadas realizaciones, la semivida media de un IL-6a es de al menos 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días,

7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 25 días, 30 días, 40 días, 50 días o 60 días. Los métodos para aumentar la semivida de un anticuerpo se conocen en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 6.277.375 y las publicaciones internacionales n.ºs WO 1998/23289 y WO 1997/3461. En algunas realizaciones, la semivida de un IL-6a es mayor en el sitio de administración diana, por ejemplo, el vítreo, que la semivida sistémica, por ejemplo, semivida en sangre, suero, plasma, linfa, hígado, riñón, u otro tejido o líquido corporal).

En otra realización, la invención proporciona un artículo de fabricación incluyendo un recipiente. El recipiente incluye una composición que contiene un IL-6a tal como se da a conocer en el presente documento, y un prospecto o una etiqueta que indica que la composición puede usarse para tratar un trastorno asociado con IL-6. Normalmente, la composición es un IL-6a en una composición que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, la invención es un kit que comprende una composición que contiene un IL-6a tal como se da a conocer en el presente documento, e instrucciones para administrar la composición a un sujeto que necesita el tratamiento.

En realizaciones en las que es deseable una mayor cantidad de IL-6a, por ejemplo, para potenciar la retención del IL-6a en o cerca de su sitio de administración, puede asociarse un resto que aumenta el tamaño pero que no afecta significativamente de manera adversa la función del IL-6a (por ejemplo, afinidad de unión de la IL-6 para la IL-6 o el complejo IL-6/IL-6R) con la IL-6a. Por ejemplo, un Fab puede modificarse por ingeniería genética para expresarse como polipéptidos únicos que contienen un Fab y un resto de Fc.

En realizaciones en las que es deseable un tamaño relativamente pequeño para el IL-6a, pueden usarse fragmentos de un anticuerpo contra IL-6, por ejemplo, un scFv o un fragmento Fab. Un anticuerpo IgG es de aproximadamente 150 kD en tamaño, una Fab es de aproximadamente 50 kD y un scFv es de aproximadamente 25 kD. En algunas realizaciones, un IL-6a tal como se describe en el presente documento es de menos de aproximadamente 50 kD en tamaño. Un antagonista de este tipo puede ser, por ejemplo, de menos de o igual a 50kD y mayor de 10 kD, menos de o igual a 50 kD y mayor de 20 kD, o menos de o igual a 50 kD y mayor de o igual a 25 kD.

En algunos casos, la estabilidad de un antagonista de IL-6, por ejemplo, un anticuerpo u otro inhibidor que tiene disulfuros, se mejora creando una variante en la que uno o más de los puentes de disulfuro son más estables que en la molécula original.

Otra ventaja de determinadas moléculas de IL-6a descritas en el presente documento puede ser la disponibilidad de moléculas eficaces que tienen un tamaño adecuado para su modo de administración, sitio de administración o modo de actividad. Por ejemplo, un IL-6a en un formato de Fab puede usarse para una aplicación tópica. Los métodos de modificación por ingeniería de tales moléculas se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

#### Indicaciones/enfermedad asociada con IL-6

Las enfermedades que pueden tratarse con un IL-6a de la invención incluyen aquellas enfermedades en las que IL-6 elevada está asociada con el estado patológico o como un requisito previo para el estado patológico. Tales enfermedades incluyen aquellas en las que la angiogénesis y la inflamación motivadas por IL-6 contribuyen a la patología de la enfermedad. Esto incluye enfermedades en las que la IL-6 es elevada en comparación con los niveles normales, por ejemplo, enfermedades en las que la IL-6 es elevada en el vítreo (tal como, por ejemplo, edema macular diabético, retinopatía diabética y uveítis) o los tejidos del ojo. Los ejemplos incluyen determinadas enfermedades oculares incluyendo, sin limitación, sequedad ocular (por ejemplo, enfermedad de sequedad ocular o síndrome de sequedad ocular), conjuntivitis alérgica, uveítis, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), edema macular diabético (EMD), desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO). Otros trastornos oculares que pueden tratarse incluyen los provocados por traumatismo tal como trasplante de córnea, abrasión corneal u otra tal lesión física en el ojo. Por consiguiente, la invención incluye tratar a un sujeto que tiene una enfermedad asociada con IL-6 con un IL-6a descrito en el presente documento.

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

En algunas realizaciones, la enfermedad es dolor ocular.

En algunas realizaciones, el tratamiento de un sujeto también incluye determinar si el sujeto tiene una enfermedad asociada con IL-6, y opcionalmente, si el sujeto es resistente a otros tratamientos no inhibidores de IL-6 tales como corticoides o agente terapéutico anti-VEGF.

Un problema con determinados agentes terapéuticos basados en anticuerpos que son eficaces en un locus específico tales como el ojo, por ejemplo, en el vítreo, son efectos adversos que resultan de una administración sistémica. Una solución es proporcionar un agente terapéutico que puede administrarse de manera local en lugar de

manera sistémica tal como se ejemplifica por las moléculas descritas en el presente documento. Debido a que algunos agentes terapéuticos que se administran de manera local, por ejemplo, al vítreo, aparecerán, en alguna extensión, de manera sistémica, es ventajoso diseñar una molécula que tendrá una renovación sistémica relativamente rápida. Los solicitantes han modificado por ingeniería ejemplos de anticuerpos contra IL-6 diseñados para la renovación sistémica rápida, por ejemplo, en comparación con la molécula parental o un anticuerpo de referencia. Esto se realizó mutando el dominio Fc para modificar la unión a FcRn de la molécula, por ejemplo, para reducir el reciclado mediado por FcRn de la IL-6a.

*Edema macular diabético (EMD)*. El edema macular diabético (EMD) implica la oclusión y el derrame de vasos sanguíneos de la retina, provocando agudeza visual reducida y posiblemente ceguera. Los tratamientos habituales para el EMD incluyen la administración local de corticoides o anticuerpos anti-VEGF. Sin embargo, muchos pacientes son resistentes a estas terapias. La patogénesis del edema macular diabético implica componentes de angiogénesis, inflamación y estrés oxidativo. La IL-6 se induce por hipoxia e hiperglucemia y puede aumentar la inflamación vascular, la permeabilidad vascular y la angiogénesis patológica. La IL-6 puede inducir directamente la expresión de VEGF y puede promover la neovascularización coroidea en modelos animales. En pacientes con EMD, los niveles de IL-6 ocular se correlacionan de manera positiva con el grosor macular y la gravedad de la enfermedad. Al parecer, los niveles de IL-6 son elevados en pacientes que dejan la terapia anti-VEGF mientras que disminuye en pacientes que responden a anti-VEGF. Por consiguiente, la administración de un IL-6a tal como se describe en el presente documento es útil para el tratamiento de diabéticos en combinación con un agente terapéutico anti-VEGF o como una alternativa a un tratamiento anti-VEGF, incluyendo los pacientes que no responden a terapia anti-VEGF. El tratamiento del edema macular con un IL-6a también puede mejorar la seguridad eliminando la necesidad de inhibir de manera completa cualquier mecanismo para inhibir la patología conservando, por tanto, algunos de los papeles fisiológicos deseados de cada citocina. Por consiguiente, el tratamiento local con IL-6a en combinación con la inhibición de VEGF puede reducir la frecuencia de dosis y reducir los efectos adversos del tratamiento.

En EMD existen correlaciones positivas entre los niveles vítreos de IL-6 y tanto la gravedad de la enfermedad como los sujetos resistentes a VEGF. Por consiguiente, un IL-6a tal como se describe en el presente documento puede usarse para tratar sujetos con EMD que son resistentes a la terapia esteroidea, la terapia anti-VEGF, o ambas. En algunos casos, se usa un IL-6a en combinación con terapia anti-VEGF o terapia esteroidea, por ejemplo, para tratar el EMD.

Un IL-6a descrito en el presente documento también puede usarse para tratar trastornos tales como cáncer, por ejemplo, cáncer de próstata, leucemia, mieloma múltiple, enfermedad inflamatoria (tal como enfermedades proliferativas inflamatorias crónicas) y autoinmunitaria, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Castleman (hiperplasia de ganglios linfáticos angiofolliculares o gigantes, hamartoma linfoide, hiperplasia de ganglios linfáticos angiofolliculares), artritis idiopática juvenil (incluyendo artritis idiopática juvenil poliarticular y artritis idiopática juvenil sistémica), enfermedad de Still (que abarca artritis idiopática juvenil y enfermedad de Still de aparición en adultos), enfermedad de Still de aparición en adultos, amiloidosis A amiloide, polimialgia reumática, sinovitis simétrica seronegativa remitente con edema con fovea, espondiloartritis, enfermedad de Behçet (incluyendo el tratamiento de manifestaciones oculares), aterosclerosis, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, polimiositis (una miopatía inflamatoria), policondritis recidivante, hemofilia A adquirida, esclerosis múltiple, anemia de inflamación y enfermedad de Crohn.

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

Otras enfermedades que pueden tratarse con un IL-6a descrito en el presente documento incluyen, sin limitación, esclerosis sistémica, arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes, enfermedad de injerto contra huésped y síndrome periódico asociado al receptor de TNF (TRAPS).

#### Dosificación

Un anticuerpo contra IL-6 o fragmento del mismo puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, un paciente) que expresa, por ejemplo, niveles anómalamente altos de IL-6. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse una vez, o puede administrarse múltiples veces. El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, desde tres veces al día hasta una vez cada seis meses o más. La administración puede ser en una pauta posológica tal como tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez cada mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse de manera continua a través de una minibomba u otra vía tal como una cápsula de liberación lenta que puede implantarse o mediante una célula encapsulada que produce el anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse a través de una vía mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, intraocular o intratumoral. El anticuerpo o fragmento del mismo puede administrarse una vez, al menos dos veces o durante al menos el periodo de tiempo hasta que el estado se trate, se palie o se cure. El anticuerpo o fragmento del mismo se administrará generalmente mientras que el estado esté presente. El anticuerpo o fragmento del mismo se administrará generalmente como parte de una composición farmacéutica tal como se describe en el presente

documento. La dosificación del anticuerpo estará generalmente en el intervalo de 0,1 a 100 mg/kg, de 0,5 a 50 mg/kg, de 1 a 20 mg/kg y de 1 a 10 mg/kg. La concentración sérica del anticuerpo o fragmento del mismo puede medirse mediante cualquier método adecuado. Una característica de determinados compuestos descritos en el presente documento es que requieren una administración de dosis relativamente infrecuente, por ejemplo, una vez  
 5 por semana, dos veces por semana, tres veces por semana, una vez cada cuatro semanas, una vez cada dos semanas, una vez cada 8 semanas, una vez cada 12 semanas, una vez cada 16 semanas, una vez cada 32 semanas, una vez por mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses, o una vez cada seis meses. En algunos casos el compuesto se administra según se necesite, determinado, por ejemplo, por un estado del sujeto. Una característica de los antagonistas de IL-6 descritos en el presente documento es que permiten una  
 10 administración de dosis relativamente infrecuente, es la combinación de alta potencia que se logra, al menos en parte, mediante una velocidad de disociación lenta una vez unidos a una IL-6 y la capacidad para administrar una concentración relativamente alta del compuesto.

En algunos casos, el IL-6a se administra como una monoterapia. En otras realizaciones, el IL-6a se administra de  
 15 manera concomitante con metotrexato u otro fármaco antiartrítico que modifica la enfermedad.

#### Generación de anticuerpos

Un anticuerpo IL-6a o derivado o fragmento del mismo puede producirse usando métodos conocidos en la técnica  
 20 tales como la metodología de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, véase Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495). Pueden emplearse también otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales tales como transformación viral u oncogénica de linfocitos B. Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado usando métodos conocidos en la técnica. El ADN que  
 25 codifica para las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir de un hibridoma murino de interés y modificarse por ingeniería para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden unirse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones  
 30 CDR murinas pueden insertarse en una región de entramado humana usando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.225.539, y las patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370).

En realizaciones, un IL-6a descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6 o derivado o  
 35 fragmento del mismo) puede unirse específicamente a IL-6 humana. En realizaciones, el IL-6a puede unirse específicamente al sitio II de la IL-6 (por ejemplo, el sitio II de la IL-6 humana).

En algunas realizaciones, un anticuerpo IL-6a es un anticuerpo monoclonal humano. Tales anticuerpos pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que comprenden porciones de un sistema inmunitario humano en vez del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen "ratones con Ig  
 40 humana" tal como el HuMAB Mouse® y KM Mouse® (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; la patente estadounidense n.º 5.545.807; las publicaciones PCT n.ºs: WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962; y la publicación PCT n.º WO 01/14424).

En otro aspecto, los anticuerpos anti-IL-6 humanos pueden obtenerse usando un ratón que porte secuencias de  
 45 inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humano y un transcromosoma de cadena ligera humano. Tales ratones se describen en detalle en la publicación PCT n.º WO 02/43478.

Otros sistemas de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la  
 50 técnica y pueden usarse para obtener un anticuerpo IL-6a. Por ejemplo, puede usarse un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse™ (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584; y 6.162.963. Además, están disponibles en la técnica sistemas de animales transcromosómicos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse  
 55 para obtener un anticuerpo IL-6a. Por ejemplo, los ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humano como un transcromosoma de cadena ligera humano se describen en Tomizuka *et al.* (2000, Proc Natl Acad Sci USA 97:722-727). Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden prepararse usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que puede generarse una respuesta a anticuerpos humanos tras la inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las patentes  
 60 estadounidenses n.ºs 5.476.996 y 5.698.767.

#### Genotecas de visualización de fagos

En algunos casos, un anticuerpo IL-6a o derivado o fragmento del mismo se produce en un método que implica  
 65 sintetizar una genoteca de anticuerpos humanos usando un fago, cribar la genoteca con una IL-6, por ejemplo, una IL-6 humana o un fragmento de la misma, aislar el fago que se une a IL-6, y obtener el anticuerpo a partir del fago.

Puede aislarse también un anticuerpo IL-6a humano recombinante cribando una genoteca de anticuerpos combinatorios recombinantes. En general, la genoteca es una genoteca de visualización de fagos de scFv, generada usando ADNc de VL y VH humanos preparados a partir de ARNm aislado de células B. Los métodos para preparar y  
 5 cribar tales genotecas se conocen en la técnica. Los kits para generar genotecas de visualización de fagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema Pharmacia Recombinant Phage Antibody, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de visualización de fagos Stratagene SurfZAP™, n.º de catálogo 240612). Otros métodos y reactivos que pueden usarse en la generación y el cribado de genotecas de exposición de anticuerpos se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.223.409; las publicaciones PCT n.ºs WO  
 10 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs *et al.*, Bio/Technology 9:1370-1372 (1991); Hay *et al.*, Hum Antibod Hybridomas 3:81-85 (1992); Huse *et al.*, Science 246:1275-1281 (1989); McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990); Griffiths *et al.*, EMBO J 12:725-734 (1993); Hawkins *et al.*, J Mol Biol 226:889-896 (1992); Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991); Gram *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 89:3576-3580 (1992); Garrad *et al.*, Bio/Technology 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom *et al.*, Nuc  
 15 Acid Res 19:4133-4137 (1991); y Barbas *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 88:7978-7982 (1991).

En un ejemplo para aislar y producir anticuerpos contra IL-6 humanos con las características deseadas, en primer lugar, se usó un anticuerpo contra IL-6 humano para seleccionar secuencias de cadena pesada y ligera humanas que tienen actividad de unión similar hacia IL-6, usando métodos de impresión de epítopos descritos en la  
 20 publicación PCT n.º WO 93/06213. Las genotecas de anticuerpos usadas en este método son generalmente genotecas de scFv preparadas y cribadas tal como se describe en la publicación PCT n.º WO 92/01047; McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554 (1990); y Griffiths *et al.*, EMBO J 12:725-734 (1993).

Una vez que se seleccionan los dominios VL y VH humanos iniciales, se realizan experimentos de "mezcla y apareamiento", en los que diferentes pares de los segmentos de VL y VH seleccionados inicialmente se criban para determinar la unión a IL-6 para seleccionar combinaciones de pares VL/VH preferidas. Para seleccionar para las características deseables de un IL-6a, los segmentos de VL y/o VH de un par seleccionado pueden mutarse de manera aleatoria. Esta maduración por afinidad *in vitro* puede realizarse, por ejemplo, amplificando dominios VH y VL usando cebadores de PCR complementarios a una CDR de uno o ambos de los dominios VH y VL  
 30 seleccionados, cebadores que contienen una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótido en determinadas posiciones de manera que el producto de la PCR resultante codifique para segmentos de VH y VL en los que se han introducido mutaciones aleatorias en el VH y/o el VL. Tales segmentos VH y VL mutados de manera aleatoria pueden volverse a seleccionar para IL-6, por ejemplo, al sitio II de la IL-6.

Tras la selección y el aislamiento de un anticuerpo IL-6a a partir de una genoteca de expresión de inmunoglobulina recombinante, pueden recuperarse ácidos nucleicos que codifican para el anticuerpo seleccionado a partir del paquete de visualización (por ejemplo, a partir del genoma del fago) y subclonarse en otros vectores de expresión usando técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Tales anticuerpos pueden manipularse  
 40 adicionalmente para producir un fragmento de anticuerpo tal como los descritos en el presente documento.

#### 40 Farmacocinética (PK)

La prueba para determinar la PK puede realizarse usando los métodos descritos en el presente documento y/o métodos conocidos en la técnica. Una barrera para las determinaciones que requieren el uso de un animal, por  
 45 ejemplo, la determinación de PK, es que la IL-6 humana tiene menos del 50% de homología con la de algunos animales habitualmente usados para tal prueba. Por tanto, un método de prueba de PK es usar un ratón transgénico que expresa IL-6 humana. En algunas realizaciones, se usa un primate no humano para determinar PK.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-IL6 se muta para alterar su PK, por ejemplo, alterando la sensibilidad al pH de la unión a FcRn. Un método de obtención de tales mutaciones se describe en los ejemplos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el IL-6a tiene una PK sistémica alterada en comparación con un IL-6a parental o una molécula de referencia. En algunos casos, la PK no se altera o se mejora en el vítreo. En algunas realizaciones, el IL-6a tiene una PK sistémica reducida (por ejemplo, semivida disminuida y/o aclaramiento aumentado, por ejemplo, tal como se evalúa en un líquido circulatorio tal como sangre, plasma, linfa o suero) en comparación con un IL-6a  
 50 parental o una molécula de referencia.

#### Modelos para someter a prueba un antagonista de IL-6

Los antagonistas de IL-6 pueden someterse a prueba en modelos de enfermedad para determinar la administración asociada con IL-6, particularmente para determinar la eficacia del tratamiento y los efectos perjudiciales limitados sobre las propiedades de IL-6 ventajosas. Por ejemplo, puede someterse a prueba la uveítis en un modelo de uveítis autoinmunitario experimental en ratas o ratones (Caspi, Invest Ophthalmol Vis Sci 52:1873; Agarwal *et al.*, 900:443-69, 2012) usando la proteína de unión a interfectorreceptores retinoides (IRBP) en inmunización con adyuvante de Freund (CFA). Otros modelos incluyen los conocidos en la técnica para uveítis inducida por células dendríticas, transferencia adoptiva de células T efectoras cultivadas, EAU espontánea en TCR de IRBP de ratones Tg, uveítis inducida por endotoxina, uveoretinitis autoinmunitaria (Haruta *et al.*, Invest Ophthalmol Vis Sci 53:3264 (2011);  
 65

Yoshimura *et al.*, *Rheumatology* 48:347-354 (2009)).

Otros sistemas modelo que pueden usarse para examinar los efectos de un IL-6a en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6 son, por ejemplo, un modelo de neovascularización coroidea (NVC) (Izumi-Nagai *et al.*, *Am J Pathol* 170:6 (2007); Krzystolik *et al.*, *Arch Ophthalmol* 120:338 (2002)) y modelos de diabetes tales como los descritos en Kern *et al.* (Animal Models Of Diabetic Complications Consortium (P01 DK57733), informe de actualización (septiembre 2001 - enero 2004)). Los modelos animales útiles para someter a prueba un IL-6a en artritis reumatoide se conocen en la técnica, por ejemplo, véanse Asquith *et al.* (*Eur J Immunol* 39:2040-4 (2009)) y Kollias *et al.* (*Ann Rheum Dis* 70:1357-62 (2011)).

Los modelos de NVC son representativos, por ejemplo, de los estados humanos de DMAE y EMD. Los modelos de neovascularización retiniana son útiles, por ejemplo, para estudiar retinopatías isquémicas, por ejemplo, retinopatía diabética o retinopatía de la prematuridad. Diversos modelos de neovascularización coroidea y retiniana se conocen en la técnica (véanse, por ejemplo, Grossniklaus, H.E. *et al.* *Prog Retin Eye Res.* 2010 Nov;29(6):500-19. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.05.003. Epub de 19 de mayo de 2010; Saisin, Y *et al.* (2003) *Journal of Cellular Physiology*, 195:241-248; Takahashi, K. *et al.* (2003) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(1):409-415; Lima e Silva, R. *et al.* (2007) *FASEB Journal*, 21:3219-3230; Tobe *et al.* (1998) *American Journal of Pathology*, 153(5):1641-1646; Dong, A *et al.* (2011) *PNAS*, 108(35): 14614-14619; Dong *et al.* (2009) *J Cell Physiol* 219:544-552; Smith, LE *et al.* 1994 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-111; Shen, J. *et al.* (2007) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(9):4335-4341) y pueden usarse para investigar la eficacia de un IL-6a. La neovascularización coroidea (NVC) puede inducirse, por ejemplo, mediante láseres, luz, cirugía o modificaciones genéticas. Los modelos de neovascularización retiniana inducida por oxígeno se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Smith, LE *et al.* 1994 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-111; Shen, J. *et al.* (2007) *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(9):4335-4341.

Puede usarse también un modelo de isquemia/reperfusión. Véase, por ejemplo, Zheng, L *et al.* *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 48 n.º 1 págs. 361-367, 2007. Por ejemplo, en el día 1, se inserta una aguja de calibre 30 unida a una bolsa de fluidos en la córnea de ratones anestesiados y se eleva la presión intraocular (PIO) hasta aproximadamente 120 mmHg para generar isquemia. Después de 30-90 minutos, se retira la aguja, se normaliza la PIO, y se produce un reflujo de la circulación retiniana. La expresión de marcadores inflamatorios incluyendo TNF- $\alpha$  e ICAM-1 puede evaluarse mediante inmunotransferencia de tipo Western y qPCR en el día 2-6. De manera adicional, la pérdida de células de los ganglios nerviosos puede evaluarse mediante histología en el día 3-14 y se mide la degeneración capilar mediante la técnica de digestión de tripsina en el día 10-14. Para estudios terapéuticos, el artículo de prueba (por ejemplo, 1  $\mu$ l de una concentración apropiada, por ejemplo, 20 mg/ml, de un IL6a) se inyecta por vía intravítrea o bien poco antes o después de la inducción de isquemia.

#### Terapias de combinación

En algunas realizaciones, se administra un IL-6a en combinación con una segunda entidad terapéutica. Por ejemplo, se administra un IL-6a en un régimen de tratamiento que incluye un inhibidor de VEGF tal como, por ejemplo, ranibizumab. En algunas realizaciones, se administra un IL-6a en un régimen de tratamiento que incluye un inhibidor de PDGF tal como, por ejemplo, un anticuerpo anti-PDGF o anticuerpo del receptor anti-PDGF (por ejemplo, imatinib). En algunas realizaciones, se administra un IL-6a en combinación con un inhibidor de la ruta de complementos, por ejemplo, lampalizumab (inhibidor del factor D) o un inhibidor de C5.

#### Administración de antagonista de IL-6

Un antagonista de IL-6 o una composición descritos en el presente documento puede administrarse de manera local, o bien en contacto directo con o bien cerca de una célula o un tejido que va a seleccionarse como diana para la inhibición de IL-6. Los ejemplos no limitativos de tales métodos de administración incluyen inyección, infusión o implantación de una sustancia que contiene un antagonista de IL-6.

En realizaciones, el IL-6a o la composición se administra por vía intraocular, por ejemplo, por vía intravítrea, por ejemplo, a través de inyección intravítrea, un inserto oftálmico o administración genética.

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

En algunas realizaciones, la composición de IL-6a se formula para administración intravítrea.

En algunas realizaciones, la composición de IL-6a se formula para administración tópica, por ejemplo, al ojo. La formulación tópica puede ser una formulación líquida o semisólida, por ejemplo, una formulación tópica puede incluir una disolución acuosa, una suspensión acuosa, una pomada o un gel. Una formulación oftálmica de IL-6a puede

- aplicarse por vía tópica a la parte delantera del ojo, bajo el párpado superior, sobre el párpado inferior y en el fondo de saco. Normalmente, la formulación oftálmica es estéril. Una formulación oftálmica de IL-6a puede contener uno o más excipientes farmacéuticos adecuados para la preparación de formulaciones oftálmicas. Los ejemplos de tales excipientes son agentes conservantes, agentes de tamponamiento, agentes quelantes, agentes antioxidantes y sales para regular la presión osmótica. Las formulaciones oftálmicas, incluyendo tanto pomadas como suspensiones, tienen normalmente una viscosidad que se adapta a la vía de administración. En algunas realizaciones, la formulación oftálmica tiene una viscosidad de desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 30.000 centipoise.
- En algunas realizaciones, la formulación es una formulación líquida que comprende un polímero. Un polímero de este tipo puede usarse para mejorar la biodisponibilidad, elevar la viscosidad o reducir el drenaje del ojo de una formulación líquida. Los polímeros adecuados incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Wagh *et al.* (Asian J Pharm, 2:12-17, 2008). En ejemplos no limitativos, el polímero es hialuronasa de sodio, quitosano, una ciclodextrina (por ejemplo, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina), ácido poligalactorónico, xiloglucano, goma de xantano, goma gelán, un tiómero, un poli(orto éster) (por ejemplo, Einmahl, Adv Drug Deliv Rev 53:45-73, 2001), o un polisacárido de semilla de tamarindo (por ejemplo, Ghelardi *et al.*, Antimicrob Agents Chemother 48:3396-3401, 2004).
- En algunas realizaciones, una formulación que comprende una composición de IL-6a para administración oftálmica puede comprender uno o más de tensioactivos, adyuvantes, tampones, antioxidantes, agentes de ajuste de la tonicidad, conservantes (por ejemplo, EDTA, BAK (cloruro de benzalconio), clorito de sodio, perborato de sodio, policuaturnio-1), espesantes o modificadores de la viscosidad (por ejemplo, carboximetilcelulosa, hidroximetilcelulosa, poli(alcohol vinílico), polietilenglicol, glicol 400, propilenglicol, hidroximetilcelulosa, hidroxipropil guar, ácido hialurónico e hidroxipropilcelulosa), y similares. Pueden incluirse aditivos en la formulación, pero no se limitan a, cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, ácido sórbico, metil parabeno, propil parabeno, clorhexidina, aceite de ricino y perborato de sodio.
- En algunas realizaciones, se usa agua purificada o desionizada en la composición. El pH puede ajustarse añadiendo cualquier ácido, base o tampón de ajuste del pH fisiológica y oftálmicamente aceptable dentro del intervalo de aproximadamente 5,0 a 8,5, por ejemplo, pH 7,0, pH 7,3, pH 7,4 o pH 7,5. Los ejemplos oftálmicamente aceptables de ácidos incluyen acético, bórico, cítrico, láctico, fosfórico, clorhídrico, y similares, y ejemplos de bases incluyen hidróxido de sodio, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio, acetato de sodio, lactato de sodio, trometamina, trishidroximetilaminometano, y similares. Los ejemplos de sales y tampones que pueden usarse en una formulación incluyen citrato/dextrosa, bicarbonato de sodio, cloruro de amonio y mezclas de los ácidos y bases mencionados anteriormente.
- En algunas realizaciones, la presión osmótica de la composición oftálmica puede ser desde aproximadamente 10 miliosmolar (mOsM) hasta aproximadamente 400 mOsM, por ejemplo, de 200 a 400 mOsM o de 220 a 370 mOsM. Generalmente, la presión osmótica se puede ajustar usando sales o excipientes fisiológica y oftálmicamente aceptables. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio se incluye en una formulación, por ejemplo, el cloruro de sodio está presente en una formulación en una concentración que oscila entre el 0,01% y el 1% en peso, o desde el 0,05% hasta el 0,45% en peso, basándose en el peso total de la composición. Las cantidades equivalentes de una o más sales compuestas de cationes como potasio, amonio, y similares, y aniones como cloruro, citrato, ascorbato, borato, fosfato, bicarbonato, sulfato, tiosulfato, bisulfato, bisulfato de sodio, sulfato de amonio, y similares también se pueden usar además de o en lugar de cloruro de sodio para lograr osmolalidades dentro del intervalo deseado. En algunas realizaciones, también se usa un azúcar tal como manitol, dextrosa, sorbitol, glucosa, y similares para ajustar la osmolalidad.
- En algunas realizaciones, los métodos implican formar o suministrar un depósito del agente en contacto con la superficie externa del ojo. Un depósito se refiere a una fuente de agente que no se elimina rápidamente por lágrimas u otros mecanismos de depuración ocular. Esto permite que haya altas concentraciones continuas y sostenidas de agente en el fluido en la superficie externa del ojo mediante una sola aplicación. En algunas realizaciones, el depósito puede permanecer hasta ocho horas o más. En algunas realizaciones, la formulación de depósito oftálmico incluye, pero no se limita a, suspensiones poliméricas acuosas, pomadas e insertos sólidos.
- En algunas realizaciones, una composición semisólida es una formulación líquida que aumenta en viscosidad tras la aplicación al ojo, normalmente debido a la presencia de un polímero en la formulación líquida para la que un aumento en la viscosidad se produce con un cambio en la temperatura, el pH o la concentración de electrolito. El polímero puede ser, por ejemplo, acetatato de celulosa, ácido poliacrílico, goma gelán, hialuronasa, quitosano, sales de ácido algínico (por ejemplo, alginato de sodio) o un copolímero de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno (por ejemplo, Pluronic®, BASF; poloxámero). En alguna realización, el ácido poliacrílico es ácido acrílico reticulado (por ejemplo, Carbopol®). En algunas realizaciones, la composición semisólida comprende una mezcla de carbopol y un copolímero de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno; una mezcla de metilcelulosa e hidroxietilcelulosa; o una mezcla de polietilenglicol y un copolímero de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno.
- En algunas realizaciones, la formulación oftálmica que contiene IL-6a es una pomada o un gel. En alguna

- realización, la formulación oftálmica es un vehículo de administración con base de aceite. Por ejemplo, la formulación puede comprender una base de petróleo o lanolina a la que se le añade la composición de IL-6a (por ejemplo, a del 0,1 al 2%), y excipientes. Las bases habituales pueden incluir, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la pomada se aplica como una cinta sobre el párpado inferior.
- 5 En algunos casos, la composición oftálmica es un inserto oftálmico. En realizaciones, la composición se administra por vía intravítrea a través de un inserto oftálmico.
- 10 Por ejemplo, el inserto oftálmico es biológicamente inerte, blando, bioerosionable, viscoelástico, estable a la esterilización después de la exposición a agentes terapéuticos, resistente a infecciones de bacterias transmitidas por el aire, bioerosionable, biocompatible y/o viscoelástico. En algunas realizaciones, el inserto comprende una matriz oftálmicamente aceptable, por ejemplo, una matriz polimérica. La matriz es típicamente un polímero y la composición de IL-6a se dispersa dentro de la matriz o se une a la matriz polimérica. En algunas realizaciones, el agente se libera
- 15 lentamente de la matriz a través de la disolución o hidrólisis de un enlace covalente. En algunas realizaciones, el polímero es bioerosionable (soluble) y la velocidad de disolución del mismo puede controlar la velocidad de liberación del agente disperso en el mismo. En otra forma, la matriz polimérica es un polímero biodegradable que se descompone, tal como por hidrólisis, para liberar de ese modo el agente unido al mismo o dispersado en el mismo. En realizaciones adicionales, la matriz y el agente pueden rodearse con un recubrimiento polimérico adicional para
- 20 controlar más la liberación. En algunas realizaciones, el inserto comprende un polímero biodegradable tal como policaprolactona (PCL), un copolímero de etileno/acetato de vinilo (EVA), cianoacrilato de polialquilo, poliuretano, un nailon o poli(dl-lactida-co-glicólido) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunos casos, el agente se dispersa en el material de la matriz o se dispersa entre la composición de monómero utilizada para preparar el material de la matriz antes de la polimerización. En algunas realizaciones, la cantidad de agente es desde
- 25 aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 50%, o desde aproximadamente el 2 hasta aproximadamente el 20%. La matriz polimérica biodegradable o bioerosionable puede usarse para que el inserto gastado no tenga que retirarse del ojo. A medida que el polímero biodegradable o bioerosionable se degrada o se disuelve, se libera el agente.
- 30 En realizaciones adicionales, el inserto oftálmico comprende un polímero, que incluye, pero no se limita a, los descritos en Wagh, *et al.*, "Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems", Asian J. Pharm., páginas 12-17 (enero de 2008). En algunas realizaciones, el inserto comprende un polímero seleccionado de polivinilpirrolidona (PVP), un polímero o copolímero de acrilato o metacrilato (por ejemplo, familia de polímeros Eudragit® de Rohm o Degussa), hidroximetilcelulosa, ácido poliacrílico, dendrímeros de poli(amidoamina),
- 35 poli(dimetilsiloxano), óxido de polietileno, poli(lactida-co-glicólido), poli(2-hidroxietilmetacrilato), poli(alcohol vinílico) o poli(fumarato de propileno). En algunas realizaciones, el inserto comprende Gelfoam®. En algunas realizaciones, el inserto es un ácido poliacrílico de conjugado de cisteína de 450 kDa.
- El inserto puede comprender un núcleo que contiene la composición de IL-6a y un tubo externo (por ejemplo, tal como se describe en la publicación de patente estadounidense n.º 20040009222). En algunos casos, el tubo externo puede ser permeable, semipermeable o impermeable al fármaco. En algunas realizaciones, el núcleo incluye una
- 40 matriz polimérica que no tiene un efecto significativo sobre la velocidad de liberación de la composición de IL-6a. En algunos casos, el tubo externo, la matriz polimérica del núcleo, o ambos son bioerosionables. El producto coextruido puede segmentarse en los dispositivos de administración de fármacos. En algunas realizaciones, el dispositivo se recubre de manera que los extremos respectivos son abiertos, o el dispositivo se recubre con, por ejemplo, una capa que es permeable a la composición de IL-6a, semipermeable a la composición de IL-6a o bioerosionable. En determinadas realizaciones, la composición de IL-6a y al menos un polímero se mezclan en forma de polvo.
- 45 En algunas realizaciones, la composición oftálmica es una película oftálmica. Los polímeros adecuados para tales películas incluyen, pero no se limitan a, los descritos en Wagh, *et al.* (citado anteriormente). En algunas realizaciones, la película es una lente de contacto blanda, por ejemplo, una lente que se compone de copolímeros de N,N-dietilacrilamida y ácido metacrílico reticulado con dimetacrilato de etilenglicol.
- 50 En determinadas realizaciones, el IL-6a está en un inserto que está en forma tubular, y puede segmentarse.
- 55 En algunas realizaciones, la composición de IL-6a se formula en una cantidad terapéuticamente eficaz, recubierta o dispersada en una matriz polimérica, de manera que la composición de IL-6a está en forma granular o particulada. En algunas realizaciones, la composición de IL-6a se libera de la formulación a medida que el fármaco de los
- 60 gránulos se disuelve en o dentro de la matriz, se difunde a través de la matriz y se libera en el fluido fisiológico circundante. En algunas realizaciones, la velocidad de liberación está limitada principalmente por la velocidad de disolución de la composición de IL-6a desde los gránulos/partículas en la matriz; los pasos de difusión a través de la matriz y la dispersión en el fluido circundante no limitan principalmente la velocidad de liberación. En determinadas realizaciones, la matriz polimérica no es bioerosionable, mientras que en otras realizaciones es bioerosionable. Las matrices poliméricas no bioerosionables a modo de ejemplo pueden formarse a partir de poliuretano, polisilicona,
- 65 poli(etileno-co-acetato de vinilo) (EVA), poli(alcohol vinílico) y derivados y copolímeros de los mismos. Las matrices poliméricas bioerosionables a modo de ejemplo pueden formarse a partir de polianhídrido, poli(ácido láctico),

poli(ácido glicólico), poliortoéster, polialquilcianoacrilato, y derivados y copolímeros de los mismos.

En algunos casos, la composición de IL-6a se formula en un material de colágeno. Por ejemplo, el inserto puede ser un inserto de fármaco oftálmico soluble (por ejemplo, una película ovalada polimérica que puede introducirse en el  
 5 saco conjuntival superior para la administración del fármaco; un inserto elíptico tal como OCUSERT® (sistema terapéutico ocular de pilocarpina, desarrollado por Alza Corporation) que está fabricado de etileno y acetato de vinilo; Lacrisert®, un inserto en forma de varilla fabricado de celulosa; nuevos sistemas de administración de fármacos oftálmicos (NODS), fabricados de poli(alcohol vinílico); o insertos tales como los descritos en Fabrizio (Adv Drug Deliv Rev 16: 95-106, 1998) En algunos casos, el inserto comprende colágeno, gelatina o un polímero, en el  
 10 que el polímero se selecciona de policaprolactona (PCL), un copolímero de etileno/acetato de vinilo (EVA), polialquilcianoacrilato, poliuretano, un nailon, poli(dl-lactida-co-glicólido) (PLGA), o un copolímero de cualquiera de estos. En algunos casos, el inserto se implanta debajo del párpado superior. En algunos casos, el inserto se implanta en el segmento posterior del ojo, en el espacio coroideo o en la esclerótica. En algunas realizaciones, el inserto se implanta por vía intravítrea o por vía subretiniana. En algunas realizaciones, el inserto se inyecta por vía subretiniana. Los métodos de administración y las técnicas para su preparación se exponen en Remington's: The  
 15 Practice of Science of Pharmacy, 20ª edición (Lippincott Williams & Wilkins, 2006).

En otras realizaciones, un inserto que contiene una composición de IL-6a proporciona una liberación sostenida del agente al vítreo del ojo. Tal como se usa en el presente documento, "liberación sostenida" significa que la  
 20 composición libera el agente durante un periodo de tiempo prolongado de forma controlada. En algunas realizaciones, el inserto libera el agente a una velocidad tal que la concentración del agente acuoso permanece menos que la concentración del agente vítreo durante la liberación. En algunas realizaciones, la concentración de agente acuoso es desde aproximadamente 0,002 µg/ml hasta aproximadamente 0,01 µg/ml o desde aproximadamente 0,01 µg/ml hasta aproximadamente 0,05 µg / ml, o menos de aproximadamente 0,05 µg/ml. En  
 25 algunas realizaciones, el agente se libera a una velocidad de aproximadamente 1 µg/día a aproximadamente 50 µg/día, o desde aproximadamente 1 µg/día hasta aproximadamente 10 µg/día. En algunas realizaciones, el inserto comprende además un agente terapéutico adicional, tal como se detalló anteriormente, por ejemplo, acetónido de fluocinolona (tal como el que se encuentra en el inserto oftálmico Retisert®).

En algunas realizaciones, la composición oftálmica comprende microesferas o nanopartículas. En alguna realización, las microesferas comprenden gelatina. En algunas realizaciones, las microesferas se inyectan en el segmento posterior del ojo, en el espacio coroideo, en la esclerótica, por vía intravítrea o por vía subretiniana. En algunas realizaciones, las microesferas o nanopartículas comprenden un polímero que incluye, pero no se limita a, los descritos en Wagh *et al.* (Asian J Pharm 2: 12-17, 2008) En algunas realizaciones, el polímero es quitosano, un  
 35 ácido policarboxílico tal como poli(ácido acrílico), partículas de albúmina, ésteres de ácido hialurónico, poli(ácido tacónico), poli(butil)cianoacrilato, policaprolactona, poli(isobutil)caprolactona, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) o poli(ácido láctico). En algunas realizaciones, las microesferas o nanopartículas comprenden partículas lipídicas sólidas.

En algunas realizaciones, una composición de IL-6a comprende una resina de intercambio iónico. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es una zeolita inorgánica o una resina orgánica sintética. En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico incluye, pero no se limita a, las descritas en Wagh *et al.*, citado anteriormente En algunas realizaciones, la resina de intercambio iónico es un poli(ácido acrílico) parcialmente  
 40 neutralizado.

Puede proporcionarse una composición de IL-6a en una suspensión polimérica acuosa. En algunas realizaciones, la composición de IL-6a o un agente de suspensión polimérico se suspende en un medio acuoso (por ejemplo, que tiene las propiedades tal como se describen anteriormente). Los ejemplos de agentes de suspensión poliméricos incluyen, pero no se limitan a, dextranos, polietilenglicoles, polivinilpirrolidona, geles de polisacáridos, Gelrite®,  
 50 polímeros celulósicos como hidroxipropilmetilcelulosa y polímeros que contienen carboxilo tales como polímeros o copolímeros de ácido acrílico, así como otros demulcentes poliméricos. En algunas realizaciones, el agente de suspensión polimérico es un polímero que puede hincharse en agua e insoluble en agua, especialmente un polímero reticulado que contiene carboxilo. En algunas realizaciones, el agente de suspensión polimérico comprende desde al menos aproximadamente el 90% hasta aproximadamente el 99,9%, o desde aproximadamente el 95% hasta  
 55 aproximadamente el 99,9%, en peso basándose en el peso total de monómeros presentes, de uno o más monómeros monoetilénicamente insaturados que contienen carboxilo. En algunas realizaciones, el monómero monoetilénicamente insaturado que contiene carboxilo incluye ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido etacrílico, ácido metilacrílico (ácido crotónico), ácido cis-alfa-metilcrotónico (ácido angélico), ácido trans-α-metilcrotónico (ácido tíglico), ácido α-butilcrotónico, ácido alfa-fenilacrílico, ácido α-bencilacrílico, ácido α-ciclohexilacrílico, ácido fenilacrílico (ácido cinámico), ácido cumárico (ácido o-hidroxicinámico) y ácido umbélico (ácido p-hidroxicumárico). En algunas realizaciones, el polímero se reticula mediante un agente de reticulación polifuncional (por ejemplo, un agente de reticulación difuncional). En algunas realizaciones, el agente de reticulación está contenido en una cantidad de desde aproximadamente el 0,01% hasta aproximadamente el 5%, o desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 5,0%, o desde aproximadamente el 0,2% hasta aproximadamente el 1%, basándose en  
 65 el peso total de los monómeros presentes. En algunas realizaciones, los agentes de reticulación son monómeros de

reticulación difuncionales no de polialqueniil poliéter tales como divinilglicol, 2,3-dihidroxihexa-1,5-dieno, 2,5-dimetil-1,5-hexadieno, divinilbenceno, N, N-dialilacrilamida, N, N-dialilmetacrilamida; agentes de reticulación de polialqueniil poliéter que contienen dos o más grupos alqueniil éter por molécula, por ejemplo, grupos alqueniil éter que contienen grupos  $\text{H}_2\text{C}=\text{C}$  terminales, preparados mediante eterificación de un alcohol polihidroxilado que contiene al menos cuatro átomos de carbono y al menos tres grupos hidroxilo con un haluro de alqueniilo tal como bromuro de alilo o similares, por ejemplo, polialilsacarosa, polialilpentaeritritol, o similares; agentes de reticulación macroméricos diolefinicos no hidrófilos que tienen pesos moleculares de desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 8.000, tales como diacrilatos y poliácridatos y metacrilatos insolubles de dioles y polioles, productos de reacción de hidroxialquil acrilato o metacrilato de diisocianato de prepolímeros terminados en isocianato derivados de dioles de poliéster o dioles de poliéter, dioles de polisiloxano con hidroxialquilmecacrilatos y similares.

En algunas realizaciones, los polímeros reticulados se fabrican a partir de un monómero o monómeros monoetilénicamente insaturados que contienen carboxilo como el único monómero monoetilénicamente insaturado presente, junto con un agente o agentes de reticulación. En algunas realizaciones, los polímeros son aquellos en los que hasta aproximadamente el 40%, y preferiblemente desde aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 20% en peso, del monómero o monómeros monoetilénicamente insaturados que contienen carboxilo se ha sustituido por uno o más monómero o monómeros monoetilénicamente insaturados que no contienen carboxilo que contienen sólo sustituyentes fisiológica y oftálmicamente inocuos, incluyendo los ésteres de ácido acrílico y metacrílico, tales como metacrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo, acrilato de 2-etilhexilo, metacrilato de octilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, acrilato de 3-hidroxipropilato, y similares, acetato de vinilo, N-vinilpirrolidona, y similares (por ejemplo, Mueller *et al.* Patente estadounidense n.º 4.548.990). En algunas realizaciones, los polímeros incluyen policarbófilo (Noveon AA-1), Carbopol® y DuraSite®. En algunas realizaciones, los polímeros reticulados se preparan polimerizando en suspensión o emulsión los monómeros, usando catalizadores de polimerización por radicales libres convencionales, hasta un tamaño de partícula seca de no más de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de diámetro esférico equivalente. En algunas realizaciones, el tamaño de partícula seca promedio es desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ , o desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de diámetro esférico equivalente. En algunas realizaciones, las partículas de polímero se obtienen moliendo mecánicamente partículas poliméricas más grandes. En realizaciones adicionales, tales polímeros tendrán un peso molecular desde aproximadamente 250.000 hasta aproximadamente 4.000.000, y desde 3.000.000.000 hasta 4.000.000.000. En otras realizaciones, las partículas de polímero reticulado son monodispersas, lo que significa que tienen una distribución de tamaño de partícula tal que al menos aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 95%, de las partículas están dentro de una banda de  $\mu\text{m}$  de distribución de tamaño de partícula principal. En realizaciones adicionales, el tamaño de partículas monodispersas significa que no hay más de aproximadamente el 20%, aproximadamente el 10% o aproximadamente el 5% de partículas de un tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$ . En algunas realizaciones, la suspensión polimérica acuosa comprende desde aproximadamente el 0,05 hasta aproximadamente el 1%, desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 0,5%, o desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 0,5% del agente, y desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 10%, desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 6,5%, desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 2,0%, desde aproximadamente el 0,5% hasta aproximadamente el 1,2%, desde aproximadamente el 0,6 hasta aproximadamente el 0,9%, o desde aproximadamente el 0,6 hasta aproximadamente el 0,8% de un agente de suspensión polimérico. Aunque se hace referencia en singular, debe entenderse que se pueden usar una o más especies de agentes de suspensión poliméricos con una cantidad total que está dentro de los intervalos establecidos. En una realización, la cantidad de partículas de polímero ligeramente reticuladas insolubles, el pH y la presión osmótica pueden correlacionarse entre sí y con el grado de reticulación para dar una composición que tenga una viscosidad en el intervalo de desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 100.000 centipoise, y preferiblemente desde aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 30.000 o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 10.000 centipoise, medido a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) usando un viscosímetro Brookfield Digital LVT equipado con un husillo número 25 y un adaptador de muestra pequeño 13R a 12 rpm. En algunas realizaciones, la viscosidad es desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 400 centipoise, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 200 centipoise o desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 25 centipoise.

En algunas realizaciones, las suspensiones poliméricas acuosas pueden formularse de modo que retengan la misma o sustancialmente la misma viscosidad en el ojo que tenían antes de la administración al ojo. En algunas realizaciones, pueden formularse de modo que haya un aumento de la gelificación tras entrar en contacto con el fluido lagrimal. Por ejemplo, cuando una formulación que contiene DuraSite® u otro polímero similar de tipo poli(ácido de acrílico) se administra al ojo a un pH de menos de aproximadamente 6,7, el polímero puede hincharse tras entrar en contacto con el fluido lagrimal ya que tiene un pH mayor (alrededor de 7). Esta gelificación o aumento en la gelificación puede conducir al atrapamiento de las partículas suspendidas, extendiendo así el tiempo de residencia de la composición en el ojo. En algunas realizaciones, el agente se libera lentamente a medida que las partículas suspendidas se disuelven a lo largo del tiempo. En algunas realizaciones, esta vía de administración aumenta la comodidad del paciente y el tiempo de contacto del agente con los tejidos oculares, aumentando así el grado de absorción del fármaco y la duración de la acción de la formulación en el ojo. Los agentes contenidos en estos sistemas de administración de fármacos se liberarán de los geles a velocidades que dependen de factores tales como el fármaco en sí mismo y su forma física, el grado de carga del fármaco y el pH del sistema, así como de cualquier adyuvante de administración de fármacos, tal como resinas de intercambio iónico compatibles con la

superficie ocular, que también pueden estar presentes.

En algunas realizaciones, un antagonista de IL-6 se proporciona a un sujeto usando administración genética, por ejemplo, administración genética local. Tal administración puede ser a través de un sistema de expresión transitorio, sistema de expresión estable (por ejemplo, integrado) tal como sistema de expresión lentiviral fabricado por Bluebird Bio (Cambridge, MA), o administración en una fábrica de células tal como las fabricadas por Neurotech (Cumberland, Rhode Island).

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

Las realizaciones anteriores deben considerarse en todos los aspectos ilustrativos en lugar de limitar la invención descrita en el presente documento.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran además las realizaciones de las invenciones descritas en el presente documento.

### Ejemplo 1: validación de bloqueo de IL-6 local en un modelo de neovascularización coroidea (NVC)

Para determinar si el bloqueo local de IL-6 puede ser eficaz para el tratamiento de enfermedades oculares, por ejemplo, edema macular diabético (EMD) o DMAE húmeda, se administró localmente un anticuerpo anti-IL-6 usando un sistema modelo para la neovascularización coroidea. Un modelo de NVC inducido por láser ([eyecro.com/in-vivo/laser-induced-choroidal-neovascularization-cnv/](http://eyecro.com/in-vivo/laser-induced-choroidal-neovascularization-cnv/)) reproduce muchos de los procesos patológicos subyacentes a la EMD, incluyendo la inflamación y la angiogénesis. Los estudios se realizaron en ratas en EyeCRO (Oklahoma City, OK). Seis animales en cada grupo se sometieron a un tratamiento con láser bilateral en el día 0 para producir tres lesiones por ojo. En los días 3 y 10, se administraron 3 µg de un anticuerpo policlonal anti-IL-6 de rata (R&D Systems AF506; Mineápolis, MN) al grupo de prueba mediante inyección intravítrea (IVT), mientras que se administró PBS o un anticuerpo policlonal anti-VEGF (R&D Systems AF564) al vehículo y a los grupos de control positivo, respectivamente. Se realizó la angiografía *in vivo* en los días 15 y 22 para medir el área de la lesión. En los días 15 y 22, el grupo tratado con anticuerpo anti-IL-6 había reducido significativamente la neovascularización en comparación con el control del vehículo. No hubo diferencias significativas en la respuesta entre el grupo tratado con anticuerpo anti-IL-6 y el control positivo con anticuerpo anti-VEGF. La figura 1 muestra los resultados de un experimento de este tipo. Estos datos demuestran que un IL-6a, por ejemplo, un anticuerpo anti-IL6, administrado por IVT, puede reducir la neovascularización en un modelo de NVC de rata a niveles similares a un control positivo con anticuerpo anti-VEGF ( $p = 0,0054$  en el día 15 y  $p = 0,0005$  en el día 22 para anticuerpo anti-IL-6 frente a control del vehículo).

Estos datos indican que el bloqueo local de IL-6 puede ser útiles para tratar una enfermedad ocular tal como enfermedades que implican derrame vascular, por ejemplo, edema macular.

### Ejemplo 2: antagonistas del anticuerpo contra IL-6 candidatos

Los antagonistas del anticuerpo contra IL-6 candidatos se desarrollaron usando un procedimiento que primero implicó inmunizaciones. Las inmunizaciones se realizaron bajo la dirección de los inventores por una organización de investigación por contrato (CRO). Se inyectaron cinco ratones BALB/C por vía subcutánea con 80 µg de IL-6 humana (R&D Systems, n.º de catálogo 206-IL/CF, Mineápolis, MN) en PBS que contenía NaCl 1 M con adyuvante de Freud. Se realizaron dos refuerzos con 80 µg y 50 µg de IL-6. Se recogieron células de bazo del ratón con el título más alto y se fusionaron con células de mieloma P3x763Ag8.653 para formar hibridomas.

Los sobrenadantes de hibridoma se seleccionaron para determinar la unión a IL-6 y el antagonismo. Para el ELISA de unión, se recubrieron placas Costar 9018 con 1 µg/ml de IL-6 humana en PBS durante la noche a 4°C. Los pocillos se bloquearon con PBS que contenía BSA al 2%, se lavaron y luego se incubaron con 50 µl de cada sobrenadante de hibridoma diluido 1: 2 con PBS que contenía BSA al 2%. Después de 60 minutos, los pocillos se lavaron tres veces con 300 µl de PBS que contenía Tween-20 al 0,1%. A continuación, se añadió anticuerpo anti-HRP de ratón diluido 1: 3000 en PBS-BSA a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron como anteriormente, luego se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se midió la señal a 450 y 550 nm. Para los estudios de antagonismo, se incubaron células indicadoras de IL6 HEK-Blue™ (InvivoGen, San Diego, CA) con concentraciones crecientes de IL-6 humana en presencia de sobrenadante de hibridoma diluido 1:10. Después de 20-24 horas, se mezclaron 20 µl de sobrenadante con 180 µl de QuantiBlue™ (InvivoGen) y se midió la absorbancia a 655 nm.

Según los estudios de unión y antagonismo, los solicitantes seleccionaron el hibridoma 64 como líder y se subclonó en el CRO. El hibridoma 64 (uno monoclonal murino) se sometió a prueba adicionalmente para determinar la

capacidad para inhibir la unión del complejo IL-6/IL-6R $\alpha$  a gp130 usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). El hibridoma 64 a una concentración de 1,5  $\mu$ g/ml redujo significativamente la unión de un complejo IL-6/IL-6R $\alpha$  a gp130 inmovilizada mediante ELISA (figura 2).

- 5 Se volvieron a seleccionar los subclones y se amplificaron los dominios variables del subclon 64,58 mediante 5' RACE PCR y se secuenciaron. Las secuencias de dominios variables de ratón (denominadas m64) son las siguientes:

VH de m64 (cadena pesada variable)

10 QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFSNYLIEWVKQRPGQGLEWIGVITPGSGTIN  
YNEKFKGKAVLTADKSSSTVYMQLSLTSDDSAVYFCAKSRWDPLYYYALEYWGQGT  
SVTVSS (SEQ ID NO:13)

VL de m64 (cadena ligera variable)

15 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQPPKLLIY AASNQGS  
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPLTFGAGTKLELK (SEQ ID  
NO:14)

20 Para crear secuencias humanizadas, las regiones determinantes de complementariedad m64 (CDR) se injertaron en una región de entramado de línea germinal humana seleccionada por similitud con la secuencia del ratón mediante un algoritmo computacional. Las secuencias humanizadas (denominadas h64) fueron las siguientes (los residuos alterados en comparación con las secuencias m64 están subrayados) y tienen aproximadamente el 79,5% de identidad (VH) y el 84,4% de identidad (VL) con las secuencias murinas:

VH de h64

25 QVQLYQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTI  
NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGT  
TVTVSS (SEQ ID NO:15)

VL de h64

30 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGISFMNWFYQQKPGQPPKLLIYAASNQG  
SGVPRFRSGSGSGTDFLTITSSLQAEDVAVYYCQQSKEVPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID  
NO:16)

35 Las secuencias humanizadas se sintetizaron mediante DNA2.0 (Menlo Park, CA), luego se clonaron en vectores de expresión derivados de pcDNA3.1 como fusiones en línea con los dominios constantes de IgG1 humana. Las IgG se expresaron mediante transfección transitoria en células 293 Freestyle™ (Invitrogen, Grand Island, NY) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. En los estudios de unión y antagonismo, el h64 IgG demostró una potencia considerablemente reducida en comparación con su predecesora m64. Por tanto, la exhibición de levadura se utilizó para restablecer la afinidad perdida.

40 Para llevar a cabo la maduración por afinidad diseñada para restablecer o mejorar la afinidad del h64IgG humanizado, las secuencias de anticuerpos h64 se volvieron a clonar para generar una molécula de Fab en vectores de levadura derivados de pYC2/CT en los que la cadena FabH se fusionó con el scFv anti-FITC 4m5.3 a través de un ligador (G4S) 3 (SEQ ID NO: 29). Luego se generó una genoteca de variantes de h64 por PCR propensa a error siguiendo el protocolo de Chao *et al.* (2006, Nature Protocols, 1: 755-768). Las variantes de H64 se expresaron y la superficie se capturó mediante levadura marcada con FITC-PEG-NHS y luego se incubó con IL-6 humana biotinilada. La IL-6 unida se detectó con estreptavidina-APC, y las células con la mayor cantidad de IL-6 unida en relación con la cantidad de Fab expresados se seleccionaron en un separador de células BD FACSAria™. Después de cuatro rondas de selección, se seleccionó y secuenció una población de variantes de mayor afinidad. La secuencia del clon seleccionado por maduración por afinidad (denominada h64-1.4) es la siguiente con las mutaciones seleccionadas (es decir, mutadas en comparación con las secuencias de VH y VL de h64) en negrita y las CDR están subrayadas. Estos son los dominios variables de 018 (así como las moléculas de IL-6a 020 y 029 descritas a continuación). Obsérvese que los Fab completos incluyen los dominios CK y CH1 de IgG1. En el

50

contexto de esta solicitud, la referencia a una secuencia de aminoácidos de cadena pesada o cadena ligera de "Fab" significa que la secuencia puede ser parte de un Fab funcional que consiste en una secuencia derivada de cadena ligera y una secuencia derivada de cadena pesada.

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

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTI  
NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGT  
TVTSS (SEQ ID NO:17)

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

10

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNRG  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV (SEQ  
ID NO:18)

15 Los dominios variables h64-1.4 se volvieron a clonar en el vector de IgG1 humana pcDNA3.1 y se expresaron como una IgG1 de longitud completa en células Freestyle™-HEK293 (Life Technologies). La IgG purificada resultante fue significativamente más potente que el anticuerpo h64 original tanto en los estudios de unión como de antagonismo celular. Al someter a prueba la afinidad usando el sistema de levadura, la afinidad aumentó desde 343 pM para la molécula humanizada original hasta 43 pM. La potencia del antagonista fue aproximadamente un aumento de diez veces según se evaluó usando el sistema celular HEK-Blue.

20 La IgG de h64-1.4 se reformateó como un Fab para su uso en indicaciones oculares y de otro tipo. Además, se realizó otra ronda de generación de genotecas y selecciones basadas en levaduras para mejorar adicionalmente la afinidad. Después de cuatro rondas de selección, hubo un enriquecimiento significativo para una variante VH con la mutación A79V. Los anticuerpos, variantes y fragmentos de los mismos que comprenden la variante A79V se denominan anticuerpos contra IL-6a 019, variantes y fragmentos de los mismos.

25

Ejemplo 3: selección de formato

30 Para investigar formatos adecuados para un antagonista de IL-6 basado en anticuerpos, los anticuerpos contra IL-6 seleccionados tal como se describe anteriormente, se sometieron a prueba para determinar la expresión transitoria, estabilidad, las propiedades de agregación, la afinidad de unión y la CI50 usando formas de Fab, scFv (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>) y scFv (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>) de las secuencias 018.

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

35

Tabla 1

Parámetro	Fab	scFv(V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> )	scFv(V <sub>L</sub> -V <sub>H</sub> )
Expresión transitoria	45 mg/ml	2 mg/l	4 mg/l
Estabilidad (T <sub>F</sub> )	73°C	43°C	46°C
Agregación (SEC, MALS)	No	Si	N/A
Afinidad de unión (K <sub>D</sub> )	240 pM	1 nM	720 pM
CI50 con IL-6 10 pM	255 pM	160 pM	125 pM

40 Estos datos demuestran un método de identificación de características clave de diversos formatos de un antagonista de IL-6 basado en anticuerpos e ilustran que para los antagonistas de IL-6 que contienen las regiones variables 018, el formato Fab 018 tiene las características más favorables en la mayoría de las categorías clave, es decir, expresión, estabilidad, agregación y afinidad de unión en comparación con una configuración scFv. La CI50 del Fab 018 está dentro de un intervalo razonable para su uso terapéutico.

45 Ejemplo 4: ejemplos de anticuerpos contra IL-6a, fragmentos y derivados

Los solicitantes han identificado las siguientes secuencias utilizando los métodos descritos en el presente documento. Las secuencias subrayadas representan las CDR de las cadenas pesadas y ligeras. Pueden encontrarse otras secuencias a lo largo de la memoria descriptiva.

ES 2 756 275 T9

Secuencia de polipéptido de la cadena pesada 018 (longitud completa; f1018HC) en una región de entramado de IgG1

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYALSNILIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTI  
NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPLYYYALEYWGQGT  
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHFTP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA  
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV  
YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
5 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19)

Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada 018 (longitud completa; f1018HC) en una región de entramado de IgG1

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAA  
10 GGTATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGCCCTTCAAACCTACCTGATCGAATGGGTGAG  
GCAGGCTCCCGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTATCACCCCTGGGAGCGGCA  
CCATTAATTACGCCAGAAATTCAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCC  
ACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTAC  
TACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCTCTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGC  
CAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTGCTAGCACAAAAGGACCATCAGTCTTCCC  
ACTTGCTCCTTCATCTAAGAGCACAAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGGCTGCCTGGT  
GAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTGGAACTCCGGTGCAGTGCATC  
CGGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCCTGTCTTC  
GGTGGTCACTGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATATTTGCAACGTCAA  
TCACAAGCCCTCCAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATCTTGTGACA  
AGACCCATACGTGTCCTCCCTGTCCCGCCCCTGAACTGCTGGGAGGCCCTTCTGTGT  
TCCTGTTCCACCTAAGCCAAAGGACACTCTGATGATCAGCCGGACTCCCGAGGTTA  
CCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAAGACCCTGAGGTTAAGTTCAATTGGTACG  
TGGATGGCGTCGAGGTGCATAACGCAAAAACCAAGCCGAGAGAGGAGCAGTACaata  
GCACCTATAGAGTAGTGAGCGTCTGACTGTCTTACATCAGGATTGGCTCAATGGTA  
AGAATATAAGTGCAAGGTAAGCAACAAGGCCCTACCCGCACCAATAGAGAAGAC  
CATCTCCAAGGCGAAAGGTCAGCCCAGGGAGCCCCAGGTTTATACTGCCTCCCTC  
ACGCGACGAATTAACAAAGAATCAGGTGTCTCTCACCTGTCTCGTCAAGGGCTTTTA  
CCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTATA  
AGACAACCCCCAGTCCCTGGATTCAGATGGGTCGTTCTTTCTATATAGTAAGTTGA  
CCGTGGATAAGTCTCGCTGGCAACAGGGGAACGTGTTCTCTTGCTCTGTTATGCATG  
AAGCGCTGCACAATCATTATACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGGAAG (SEQ  
ID NO:20)

15 Secuencia de polipéptido de la cadena pesada de Fab 018 (018FabHC) en una región de entramado de IgG1. Las CDR están subrayadas

ES 2 756 275 T9

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYALSNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVITPGSGTI  
NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSSRWDPLYYYALEYWGQGT  
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC (SEQ ID NO:1)

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

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCREASESVD NYGIPFMNWY QKPGQPPKL  
LIYAAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL  
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:2)

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

10 Secuencia de ácido nucleico cadena ligera de longitud completa 018 (018LC) en una región de entramado de IgG1

GACATAGTGA TGACTCAAAG TCCGGACAGC CTGGCGGTGT CACTCGGCGA  
ACGGGCAACT ATCAACTGCC GAGCCAGCGA GAGCGTCGAT AATTACGGCA  
TCCCCTTCAT GAACTGGTAT CAGCAGAAGC CAGGACAGCC GCCCAAGCTG  
CTTATCTACG CCGCTTCAA CCGGGGATCA GGGGTGCCCG ATCGATTTAG  
TGGAAGCGGT AGTGGGACCG ATTTACACT GACCATCAGC TCCCTTCAGG  
CCGAGGATGT GGCTGTCTAT TATTGTCAGC AATCCGAGGA AGTGCCGCTC  
ACGTTTGGTC AGGGAACCAA ACTGGAGATC AAGCGGACCG TAGCGGCGCC  
TAGTGTCTTC ATCTTCCCAC CCTCCGACGA ACAGCTGAAG TCTGGCACTG  
CTTCCGTCGT GTGCCTGCTC AACAACTTTT ACCCTAGAGA GGCAAAAGTT  
CAATGGAAAG TAGACAATGC CTTGCAGTCC GGGAACTCCC AGGAGTCTGT  
CACAGAGCAG GATAGTAAGG ACTCAACCTA CAGCCTGTCC AGCACACTGA  
CCCTCTCAA AGCCGACTAC GAGAAGCACA AAGTGTACGC TTGCGAAGTT  
ACGCATCAGG GGCTGTCCTC ACCCGTTACA AAAAGTTTTA ACAGAGGGGA GTGC  
(SEQ ID NO:26)

15 Cadena pesada de Fab 019 (019FabHC, misma secuencia que 018FabHC excepto por A79V (negrita/cursiva)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL  
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SGLYSLSSV VTPSSSLGT  
QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSC (SEQ ID NO:3)

VH de 019 (región variable/019HC)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
20 WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO:27)

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

- 5 CDR1 de 018HC (CDR1 de VH de 018): GYALSNILIE (SEQ ID NO: 4)  
 CDR2 de 018HC (CDR2 de VH de 018): VITPGSGTIN (SEQ ID NO: 5)  
 CDR3 de 018HC (CDR3 de VH de 018): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO: 6)  
 10 CDR1 de 018LC (CDR1 de VL): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO: 7)  
 CDR2 de 018LC (CDR2 de VL): AASNRGS (SEQ ID NO: 8)  
 15 CDR3 de 018LC (CDR3 de VL): QQSEEVPLT (SEQ ID NO: 9)  
 CDR1 de 019HC (CDR1 de VH de 019): GYALSNILIE (SEQ ID NO: 4)  
 CDR2 de 019HC (CDR2 de VH de 019): VITPGSGTIN (SEQ ID NO: 5)  
 20 CDR3 de 019HC (CDR3 de VH de 019): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO: 6)

Ejemplo 5: mapeo de epítipo y estructura

25 *Mapeo de epítipo*

El mapeo del epítipo funcional se realizó en antagonistas de IL-6 candidatos seleccionados. Se encontró que un anticuerpo candidato (anticuerpo murino 64) no redujo la unión de IL-6R $\alpha$  a IL-6 en un ELISA que indica que el anticuerpo candidato no se une al sitio I. Se realizaron experimentos adicionales que demuestran que el anticuerpo quimérico murino 64 redujo la unión del complejo IL-6/IL-6R $\alpha$  a gp130 en un ELISA que indica que el sitio II o el sitio III de IL-6 albergaban el sitio de unión para el anticuerpo. Se encontró también que el anticuerpo murino 64 no bloqueó significativamente la unión de un anticuerpo de unión al sitio III conocido AH-65 (Immunotech, Marsella, Francia) a IL-6, lo que indica que el anticuerpo candidato se une al sitio II de IL-6. Estos datos demuestran que se pueden generar anticuerpos contra el sitio II y demuestra un método de identificación de tales anticuerpos.

35 Para definir más el epítipo, se generaron mutaciones en IL-6 en levadura como fusiones a 4m5.3 (Boder *et al.*, 2000, Proc Natl Acad Sci USA 97, 10701-10705; Chao *et al.*, 2006, Nat Protocol 1, 755-768). Las mutaciones se expresaron en IL-6 humana con las siguientes mutaciones simples o dobles: R24E/D27E, R30E, Y31E, D34R, S118R/V121E, W157E, Q159E/T162P, K171E y R179E. Las moléculas de IL-6 mutadas expresadas se usaron en estudios de unión con 018 (Fab). Se observó una afinidad reducida por 018 (Fab) para R24E/K27E, Y31E, D34R y S118R/V121R, de los que todos se ubican en el sitio II de IL-6. Por consiguiente, la invención descrita en el presente documento incluye un anticuerpo que se une a al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis de los aminoácidos en las posiciones 24, 27, 31, 34, 118 y 121 de IL-6 humana o el sitio equivalente en una IL-6.

45 *Definición estructural de un epítipo del sitio II*

Se calcularon las siguientes distancias para definir estructuralmente el sitio II. Los cálculos se basan en la estructura cristalina hexamérica de IL-6/IL-6 $\alpha$ /gp130, PDB 1P9M (Boulangier *et al.*, 2003, Science 300: 2101-2104). La hélice 1 de IL-6 pasa entre el sitio I y el sitio II, lo que da como resultado determinados residuos que se encuentran cerca del sitio II pero que tienen cadenas laterales que apuntan hacia el sitio I, por ejemplo, R30. D2 y D3 se refieren a dominios extracelulares de IL-6R $\alpha$ .

Se determinó que los siguientes aminoácidos de IL-6 se encuentran dentro de 5 Å de gp130-D2-D3: L19, R24, K27, Q28, R30, Y31, D34, E110, Q111, R113, A114, M117, S118, V121, Q124, F125 y K128.

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

60 Por consiguiente, una molécula, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo que puede unirse a uno o más de los aminoácidos IL-6 que se encuentra dentro de 5 Å o 7 Å del sitio II puede ser un IL-6a.

La secuencia de IL-6 humana se proporciona a continuación como referencia (la secuencia subrayada es la secuencia líder). Los aminoácidos dentro de 7 Å de gp130-D2-D3 están en cursiva. La numeración de aminoácidos, por ejemplo, las mutaciones usadas para definir epítipos, es sin la secuencia líder:

65

IL-6 humana

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILD  
GISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFCQSGFNEETCLVKIITGLLEF  
EVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQ  
 5 NQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO:21)

Se realizaron experimentos para someter a prueba el fragmento Fab del anticuerpo humanizado h64-1.4 y se demostró que podía bloquear la señalización de IL-6 tanto en cis como en trans, lo que se debe al direccionamiento al sitio II. La potencia del fragmento Fab no cambió en presencia de un receptor soluble de IL-6 (sIL-6R). Esto contrasta con un anticuerpo IgG anti-IL-6R que había disminuido la potencia en presencia de sIL6R, y que bloquea solo la señalización en cis.

Estos experimentos demuestran que un anticuerpo o fragmento del anticuerpo tal como un fragmento Fab que selecciona como diana el sitio II puede usarse para inhibir tanto la señalización en cis como en trans de IL-6.

Ejemplo 6: estudios en primates

Debido a que las actividades de no primates pueden diferir mucho de las de los primates, los antagonistas de IL-6 candidatos se evalúan además generalmente para determinar la PK y otros parámetros usando primates no humanos. La IL-6 humana difiere de la IL-6 del macaco cangrejero y del macaco de la India en siete sitios, de los que uno está en el sitio II (aminoácido 28) y es el mismo en el sitio II en la IL-6 del mono verde africano. Esto parece disminuir la unión de un anticuerpo que comprende secuencias 018 en solo aproximadamente 3-4 veces. La capacidad para unirse a una IL-6 de primates no humanos es una característica útil de un antagonista de IL-6, que facilita el desarrollo del candidato como fármaco, por ejemplo, permitiendo pruebas como pruebas de toxicología en primates no humanos.

Como con la mayoría de los anticuerpos contra IL-6, los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento no reaccionaron de forma cruzada con IL-6 de roedores, conejos o caninas debido a la baja homología de secuencia. Sin embargo, en estudios de afinidad, se encontró que Fab 018 se une a la IL-6 del macaco cangrejero y del mono verde africano con aproximadamente afinidad humana (tabla 2).

Tabla 2: afinidad monovalente (Fab 018) para diversas IL-6 de diversas especies

Especie	K <sub>D</sub>
Humana	200 pM
Mono verde africano	280 pM
Macaco cangrejero	840 pM
Perro	> 1 μM
Ratón	> 1 μM
Conejo	> 1 μM
Rata	> 1 μM

Estos datos demostraron adicionalmente la capacidad de un IL-6a tal como se describe en el presente documento para unirse específicamente y la capacidad para desarrollar una molécula que tiene características que permiten someter a prueba, por ejemplo, para estudios de toxicología y reproductivos, en un animal adecuado.

Ejemplo 7: expresión creciente de un IL-6a

Para aumentar la expresión de los polipéptidos Fab 018 y Fab 019, se elaboraron constructos que introducen cinco aminoácidos adicionales (DKTHT (SEQ ID NO: 30)) a la cadena pesada en la región CH1/bisagra usando métodos conocidos en la técnica. La secuencia de la cadena pesada de Fab 018 alterada se muestra a continuación como SEQ ID NO: 24. La secuencia 018 alterada se denomina en el presente documento 020 y la secuencia 019 alterada se denomina en el presente documento 021. La molécula 020 (la cadena pesada de Fab 020 y la cadena ligera de Fab 018) tenía una expresión mejorada en comparación con el Fab original que tenía cadenas pesada de Fab 018 y ligera de Fab 018. La molécula 019 no mostró diferencia de afinidad significativa en comparación con la molécula 020. La expresión tanto de 020 como de 019 aumentó en aproximadamente dos veces, respectivamente, y las afinidades no se vieron afectadas por la alteración.

Cadena pesada de 020 (Fab con DKHTH (SEQ ID NO: 30) en el extremo carboxilo-terminal))

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTIVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT  
 QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:24)

- 5 Se midió el antagonismo de IL-6 usando el Fab 020 en células indicadoras de IL-6 HEK-Blue™ (InvivoGen, San Diego, CA). Las células se incubaron en una mezcla de IL-6 10 pM y concentraciones variables de o bien anticuerpo 020 o bien IL-6Rα (Cell Sciences, Canton, MA), con o sin IL-6Rα 50 nM. Después de 20-24 horas de incubación, se mezclaron 20 µl de sobrenadante de cultivo celular con 180 µl de sustrato QuantiBlue™ (InvivoGen) y se incubaron durante una hora; luego se midió la absorbancia a 655 nm. La figura 3A y la figura 3B muestran los datos de estos  
 10 experimentos, demostrando la capacidad de 020 para inhibir la actividad de IL-6 en presencia o ausencia de IL-6R.

#### Ejemplo 8: anticuerpos IgG2 contra IL-6

- 15 Se reformató 018 en una región de entramado de isotipo IgG2 humana para reducir la unión de FcγR y reducir la CCDA en comparación con el anticuerpo formateado IgG1 usando métodos conocidos en la técnica. Además, se espera que reformatar 018 a un formato de longitud completa, por ejemplo, una IgG2, disminuya la velocidad de aclaramiento del vítreo debido al mayor tamaño de la molécula.

#### Construcción/purificación de anticuerpos IgG2 anti-IL6

- 20 Para construir anticuerpos humanos IgG2 usando las secuencias anti-IL-6 descritas anteriormente, se amplificó por PCR un dominio constante de IgG2 humana a partir de ADNc con sitios de restricción NheI y MluI en los extremos N y C-terminales, respectivamente. El producto de PCR se purificó, se digirió con las enzimas de restricción NheI y MluI, y luego se ligó en el vector pTT5 que contenía el dominio variable anti-IL6, es decir, SEQ ID NO: 1 (véase  
 25 anteriormente). Esto produjo una secuencia de cadena pesada de IgG2 de longitud completa. Los plásmidos que contienen la cadena ligera de longitud completa que contiene la secuencia 018 se usaron para proporcionar la cadena ligera.

- 30 Para reducir adicionalmente la unión de FcRn y reducir de ese modo el reciclaje del IL-6a, se realizaron mutaciones puntuales en la cadena pesada. Las mutaciones se realizaron mediante mutagénesis QuikChange® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Los plásmidos de cadena pesada y ligera se transfectaron conjuntamente usando poli(etilenimina) (PEI) en cultivos transitorios de 100 ml de células HEK293-6E y se cultivaron para permitir la expresión durante aproximadamente cinco días. Esto generó anticuerpos que contenían un resto de unión al sitio II anti-IL-6 y estructura de IgG2. Dichas estructuras que contienen CDR 018 se denominan en el presente documento  
 35 018IgG2 o 029. Las mutaciones puntuales se realizaron en los residuos 1253.

La molécula de IgG2 se expresó bien y bloquea la IL-6 en ensayos celulares con una potencia ligeramente mejorada en comparación con el Fab 020.

- 40 Secuencias maduras de 029 (CDR subrayadas)

#### *Cadena pesada de 029*

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR

45

WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT  
 QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPCP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST  
 FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVY  
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPMLD  
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID  
 NO:11)

*Cadena ligera de 029*

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQOSEEVPL  
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
 QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV  
 5 THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:12)

Unión alterada a FcRn

- 10 La IL-6 puede tener determinados efectos sistémicos positivos. Por tanto, es una ventaja modificar por ingeniería un IL-6a que tenga una buena retención en el vítreo pero que tenga una semivida sistémica limitada. La reducción o eliminación de la unión a FcRn debe reducir la acumulación sistémica de cualquier fármaco que escape a la circulación, mejorando así la seguridad de un IL-6a.
- 15 Por consiguiente, debido a que el tráfico mediado por FcRn puede aumentar el flujo de salida de anticuerpos desde el ojo, la IgG2 020 se modificó adicionalmente para eliminar la unión a FcRn introduciendo mutaciones de Fc en los residuos 1254, H311 o H436 (véase SEQ ID NO: 23), numeración según Martin *et al.*, Molecular Cell, 7: 4, 867-877 (2001)). Los sitios mutados se muestran en negrita en SEQ ID NO: 23; 1254 se mutó a o R, H311 se mutó a o E, H311 se mutó a N con D 313 mutado a T, y H436 se mutó a (la numeración comienza después de la secuencia líder, que está subrayada en SEQ ID NO: 23. Los antagonistas de IL-6 que contienen tales secuencias se denominan 018IgG2m.
- 20

Cadena pesada de anticuerpo anti-IL-6 (IgG2) (fuente normal: VH; fuente en cursiva: CH) (sin secuencia líder) que muestra sitios de mutación (negrita)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
 ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
 WDPLYYYALE YWGQGTTVTV *SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL*  
*VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT QTYTCNVDHK*  
*PSNTKVDKTV ERKCCVECPCP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE*  
*DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV **HQDWLNGKEY***  
*KCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV*  
*EWESNGQPEN NYKTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH*  
 25 *EALHNHYTQK SLSLSPGK* (SEQ ID NO:23)

Cadena pesada de anticuerpo anti-IL-6 (IgG2) (fuente normal: VH; fuente en cursiva: CH) con secuencia líder (subrayada) que muestra sitios de mutación (negrita)

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYALS  
 NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV ITPGSGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY  
 MELSSLRSED TAVYYCARSR WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV  
*FPLAPCSRST SESTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV*  
*VTVPSSNFGT QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD*  
*TLMSRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV*  
*HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKTKGQPREPQVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV*  
*KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH*  
*EALHNHYTQK SLSLSPGK* (SEQ ID NO:28)

5 Por consiguiente, algunas realizaciones incluyen un anticuerpo que tiene la secuencia de cadena pesada representada en SEQ ID NO: 23 con mutaciones en 1254 (por ejemplo, A o R), H311 (mutado a A o E), H436 (mutado a A) o D313 (mutado a T) con H311 mutado a N.

10 Por tanto, SEQ ID NO: 25 proporciona una secuencia que cuando se muta en 1133 (por ejemplo, I133A o I133R), H190 (por ejemplo, H190A o H190E), H315 (por ejemplo, H315A) o D192 con H190 (por ejemplo, D192T con H190N) puede usarse en un anticuerpo, fragmento, o derivado del mismo para producir un polipéptido que tienen unión a Fc reducida a bajo pH, por ejemplo, pH 5,5 o pH lisosómico y/o un polipéptido que tiene una semivida sistémica reducida en comparación con una molécula original u otra de referencia que no incluye la secuencia.

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

15 Cadena ligera de anticuerpo anti-IL-6 (IgG2) (fuente normal: VK; fuente en cursiva: CK)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESDNYGIPFMNWFYQQKPGQPPKLLIYAASNRG  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF  
*IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYLSL*  
*STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC* (SEQ ID NO:22)

#### Ejemplo 9: estabilidad de la formulación

20 La estabilidad del fragmento Fab anti-IL-6/IgG1 (que contiene el dominio IgG1CH1) se sometió a prueba determinando la T<sub>f</sub> inicialmente en PBS luego en una gama de tampones y excipientes usando fluorimetría diferencial de barrido. Se encontró que el tampón de citrato, pH 5,5 aumentó la T<sub>f</sub> a más de 80°C. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporciona un IL-6a en tampón citrato y en algunos casos tiene una T<sub>f</sub> de al menos 80°C.

Se sometió a prueba la agregación usando SEC-MALS y no se observó agregación a 20 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

30 Ejemplo 10: anticuerpos sensibles al pH para PK potenciada

35 La IL-6 puede tener determinados efectos sistémicos positivos. Por tanto, es una ventaja diseñar un IL-6a que tenga una buena retención en el vítreo pero que tenga una semivida sistémica limitada. La reducción o eliminación de la unión a FcRn debe reducir la acumulación sistémica de cualquier fármaco que escape a la circulación, mejorando así la seguridad de un IL-6a. En consecuencia, debido a que el tráfico mediado por FcRn puede aumentar el flujo de salida de anticuerpos desde el ojo, se modificó adicionalmente IgG2 020 para eliminar la unión a FcRn mediante la

introducción de mutaciones de Fc en los residuos 1253, H310 o H435 (numeración según Martin *et al.* (Molecular Cell, 7: 4,867-877 (2001))). Tales anticuerpos se denominan en el presente documento anticuerpos IL-6pH o anti-IL-6pH y se describen adicionalmente a continuación.

##### 5 *Generación de anticuerpos con unión sensible al pH*

La pKa de histidina es de aproximadamente 6,0 y las histidinas insertadas en las superficies de contacto de unión pueden interrumpir la unión en la protonación de la cadena lateral a bajo pH. Usando un anticuerpo dirigido contra el sitio II de anti-IL-6 como se describe en el presente documento, se generó una genoteca que contenía variantes ricas en histidina de CDR de 018 y se seleccionó la genoteca para determinar la unión sensible al pH usando visualización de levaduras. La genoteca generada era una genoteca combinatoria con CDR codificadas por codones degenerados de manera que cada residuo sea o bien un residuo de tipo natural (es decir, el mismo que en el anticuerpo parental) o bien un residuo de histidina. La selección se realizó alternando la clasificación de alta unión a pH fisiológico (7,4) y baja unión a pH endosómico (5,5).

Se identificó un mutante seleccionado de levadura que tenía una unión relativamente alta a pH 7,4 (Kd monovalente de 407 pM para el mutante en comparación con 192 pM para la molécula original) y una unión relativamente baja a pH 5,5 (Kd monovalente de 2,362 nM para el mutante en comparación con 195 pM para el original). Esto constituye un cambio de aproximadamente 5,8 veces en la afinidad a pH 5,5. Este mutante contenía múltiples mutaciones de histidina en la cadena ligera de CDR1. Por tanto, el mutante demostró una unión similar a la molécula original a pH 7,4 y una pérdida significativa de afinidad a pH 5,5. Esta observación se verificó mediante análisis ELISA, FACS y SPR mediante métodos conocidos en la técnica.

Estos datos demuestran que puede crearse un IL-6a que se basa en un anticuerpo que tiene las características de un anticuerpo anti-IL-6 que selecciona como diana el sitio II de IL-6 que puede usarse para inhibir tanto la actividad en cis como en trans de IL-6, y han aumentado la PK en comparación con un anticuerpo original u otro anticuerpo que tiene un dominio Fc de tipo natural efectuado al menos en parte por la unión alterada a pH 5,5.

##### Ejemplo 11: eficacia del bloqueo local de IL-6 en un modelo de neovascularización coroidea de ratón (NVC) con láser

Para determinar si el bloqueo local de IL-6 puede ser eficaz para tratar la enfermedad ocular, por ejemplo, edema macular diabético (EMD) o DMAE húmeda, se administró localmente un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 en un sistema modelo para la neovascularización coroidea. El modelo de NVC inducido por láser como se describe en Saishin *et al.* Journal of Cellular Physiology, 195: 241-248 (2003) se empleó en este ejemplo. Un modelo de NVC inducido por láser reproduce muchos de los procesos patológicos subyacentes al edema macular diabético (EMD), incluida la inflamación y la angiogénesis.

Se administró un anticuerpo monoclonal anti-IL-6 de ratón (MP5-20F3, que es un anticuerpo del isotipo IgG1 de rata adquirido de Bio X Cell, número de catálogo BE0046) al grupo de prueba mediante inyección intravítrea (IVT). Los controles recibieron una inyección intravítrea de trampa de VEGF o una inyección intravítrea de un anticuerpo de control de isotipo anti-HRP (una IgG1 de rata contra peroxidasa de rábano picante, clon HRPN, adquirido de BioXCell; número de catálogo BE0088). Para todos los grupos de anticuerpos, se inyectaron 20 µg de proteína en un volumen de 1 µl en el ojo de prueba, mientras que el ojo contralateral se dejó sin tratar como control adicional.

Los ratones se sacrificaron el día 7 después del láser y los soportes planos coroides se tiñeron con lectina de *Griffonia simplicifolia* (GSA) para medir el área de la lesión. La figura 4 muestra los resultados. El grupo tratado con anticuerpo anti-IL-6 mostró una reducción estadísticamente significativa en la neovascularización en comparación con el grupo tratado con anticuerpo de control ( $p < 0,05$ ). En promedio, el grupo tratado con anticuerpo anti-IL-6 también mostró una neovascularización reducida en comparación con el control positivo anti-VEGF.

Estos datos demuestran que un IL-6a, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-IL-6, administrado IVT puede reducir significativamente la neovascularización en un modelo de NVC de ratón. Los resultados sugieren además que un anticuerpo anti-IL-6 puede producir una reducción en la neovascularización al menos tan grande, y posiblemente mayor, que un anticuerpo anti-VEGF. Estos datos indican que la inhibición local de IL-6 es útil para tratar enfermedades oculares tales como enfermedades que implican derrame vascular, por ejemplo, DMAE húmeda o edema macular, por ejemplo, edema macular diabético.

##### Ejemplo 12: desarrollo de un anticuerpo contra IL-6 mejorado

Se generaron variantes del anticuerpo EBI-029. Para caracterizar mejor la contribución de las mutaciones A28V, S30P, I51T y S55G, se introdujeron combinaciones específicas en el vector de visualización Fab EBI-029 de tipo natural y se midió la unión. Los resultados se muestran en la figura 5. Después de la competencia durante la noche con IL-6 2 µM, todos los mutantes tenían niveles significativamente más altos de IL-6 biotinilada que permanecían en su superficie celular con respecto a la visualización en comparación con el Fab EBI-029 de tipo natural. El orden de clasificación de la afinidad de mayor a menor fue A28V/S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G >

I51T/S55G> tipo natural. La mutación cuádruple A28V/S30P/I51T/S55G también se denomina en el presente documento EBI-030.

Las secuencias de EBI-030 se muestran a continuación.

- 5 Secuencias de CDR de 030:
- CDR1 de 030HC (CDR1 de VH de 030): GYLPNILIE (SEQ ID NO: 31)
- 10 CDR2 de 030HC (CDR2 de VH de 030): VTPGGTIN (SEQ ID NO: 32)
- CDR3 de 030HC (CDR3 de VH de 030): SRWDPLYYYALEY (SEQ ID NO: 33)
- CDR1 de 030LC (CDR1 de VL 030): RASESVDNYGIPFMN (SEQ ID NO: 34)
- 15 CDR2 de 030LC (CDR2 de VL de 030): AASNRGS (SEQ ID NO: 35)
- CDR3 de 030LC (CDR3 de VL de 030): QQSEEVPLT (SEQ ID NO: 36)
- 20 Secuencia de la región variable de cadena pesada de 030 (mutaciones en relación con 029 mostradas en negrita):
- QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO:37)
- Secuencia de región variable de cadena ligera de 030:
- 25 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVDNYGIPFMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNRG  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQSEEVPLTFGQGTKLEIKRTV (SEQ  
 ID NO:38)
- Secuencia de polipéptido de cadena pesada de Fab (IgG1) de 030 (CDR subrayadas, mutaciones en relación con 029 mostradas en negrita):
- 30 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSSLGT  
 QTYICNVNHK PSNTKVDKKV EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:39)
- 35 En realizaciones, la secuencia de DKTHT (SEQ ID NO: 30) en el extremo carboxilo-terminal de SEQ ID NO: 39 no se incluye en la secuencia de Fab.
- Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de Fab 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAA  
 GGTATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAG  
 GCAGGCTCCCGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCA  
 CCATTAATTACGCCAGAAATTTACAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCC  
 ACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTCTACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTAC  
 TACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCCTCTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGC  
 CAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTGCTAGCACAAAAGGACCATCAGTCTTCCC  
 ACTTGCTCCTTCATCTAAGAGCACAAAGTGGTGGCACTGCAGCCCTTGGCTGCCTGGT  
 GAAAGATTATTTCCCGAACCTGTTACAGTTTCTTGGAACTCCGGTGCAGTGCATC  
 CGGAGTACACACTTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTATAGCCTGTCTTC  
 GGTGGTCACTGTTCCATCGTCGAGTCTTGGCACACAGACATATATTTGCAACGTCAA  
 TCACAAGCCCTCCAACACAAAAGTGGATAAGAAGGTCGAGCCCAAATCTTGTGACA  
 AAACACACACA(SEQ ID NO:40)

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

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYVLPNYLIEWVRQAPGQGLEWMGVVTPGGGTI  
 NYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSRWDPYLYYALEYWGQGT  
 TTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
 AVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERK

5 (SEQ ID NO:54)

Ejemplo 13: expresión y purificación de fragmentos Fab variantes

10 Los insertos del dominio VH que contienen las siguientes combinaciones mutantes, A28V/I51T/S55G,  
 S30P/I51T/S55G y A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030), se generaron a partir de los vectores de visualización de  
 levaduras mediante doble digestión con BamHI-HF/NheI-HF. Los insertos se purificaron mediante electroforesis en  
 15 gel de agarosa al 1% y se ligaron en un vector de expresión de mamífero derivado de pTT5 que contenía una  
 secuencia líder, un dominio CH1 de IgG1 humano y una etiqueta His C-terminal. Los transformantes se  
 seleccionaron en LB-Amp, se sometieron a miniprep, y se confirmaron los insertos por secuenciación. Se realizaron  
 20 transfecciones transitorias en células HEK-6E (Canadian Research Council) para cada cadena pesada de Fab  
 mutante emparejada con la cadena ligera de EBI-029 de tipo natural (dada a conocer en el presente documento  
 como SEQ ID NO: 12) usando PEI como reactivo de transfección. El Fab de tipo natural de EBI-029 también se  
 expresó como un control (la cadena pesada de Fab de tipo natural se da a conocer en el presente documento como  
 SEQ ID NO: 24). Los sobrenadantes se recogieron después de 5 días y los Fab expresados se purificaron por  
 25 cromatografía de afinidad usando agarosa Ni-NTA (Life Technologies). La proteína purificada se intercambió con  
 tampón en PBS, pH 7,4 mediante varias rondas de concentración/dilución y la concentración y pureza de proteínas  
 se determinó mediante absorbancia 280 y SDS-PAGE.

25 Ejemplo 14: los anticuerpos variantes mostraron unión mejorada tal como se evaluó usando resonancia de plasmón  
 superficial

Las afinidades de las moléculas de Fab variantes 029 para IL-6 se midieron por resonancia de plasmón superficial  
 (RPS) en un espectrómetro Reichert SR7000Dc. Se inmovilizó IL-6 humana a 20 µg/ml en acetato de sodio 10 mM,  
 30 pH 4,5 en un chip de carboximetildextrano de 500 kDa a través de acoplamiento de amina convencional. Se  
 inyectaron diluciones en serie de cada molécula de Fab en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3 a 25°C con un  
 velocidad de flujo de 25 µl/min. Después de 4 minutos, se detuvo la carga y se midió la disociación haciendo fluir el  
 tampón de transferencia (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,3) durante 5 minutos. Las trazas del sensograma se  
 ajustan mal a un modelo de unión 1:1, posiblemente debido a orientaciones mixtas de IL-6 sobre el chip o unión de  
 35 anticuerpos no específica. En cambio, las curvas se ajustaron a 2 especies (especies de baja afinidad y alta afinidad,  
 etiquetadas como “baja afinidad” y “alta afinidad” en la tabla 3) usando el software TraceDrawer donde ka1, kd1 y  
 KD1 son la velocidad de asociación, la velocidad de disociación y la constante de unión de equilibrio para las  
 especies de baja afinidad, y ka2, kd2 y KD2 son la velocidad de asociación, la velocidad de disociación y la  
 constante de unión de equilibrio para las especies de alta afinidad. Todos los Fab mutantes tenían una disociación

significativamente más lenta en comparación con el Fab de EBI-029 de tipo natural con el siguiente orden de clasificación de mayor a menor afinidad: A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > S30P/I51T/S55G > A28V/I51T/S55G > tipo natural (EBI-029).

5 Tabla 3: resultados de RPS para anticuerpos mutantes

Fab	ka1 (*e <sup>4</sup> )	kd1 (*e <sup>-4</sup> )	KD1 (nM)	ka2 (*e <sup>5</sup> )	kd2 (*e <sup>-4</sup> )	KD2 (nM)
Tipo natural	5,48	6,08	11,1	2,94	4,27	1,45
A28V/I51T/S55G	8,06	2,91	3,6	3,65	1,45	0,40
S30P/I51T/S55G	7,18	2,18	3,04	3,29	0,95	0,29
A28V/S30P/I51T/S55G	7,95	2,70	3,39	3,25	0,66	0,20

Ejemplo 15: los anticuerpos variantes mostraron potencia antagonista mejorada en células indicadoras de IL6 HEK-Blue™

10 La línea celular indicadora de IL6 HEK-Blue™ (Invivogen) se usó para comparar la potencia de la inhibición de señalización de IL6 entre los diferentes fragmentos Fab de EBI-029 mutantes. Las células de IL6 HEK-Blue™ son una línea HEK293 modificada que expresa de manera estable el gen del IL-6R y que contiene un gen indicador de fosfatasa alcalina secretada bajo el control del promotor mínimo de IFNβ fusionado a cuatro sitios de unión STAT3.

15 Para medir el antagonismo de IL6, se mezclaron 10 µl de IL-6 humana 400 pM (R&D Systems 206-IL-010/CF) con 10 µl de cada variante Fab en un intervalo de concentraciones en una placa de 96 pocillos y se incubaron a TA durante 30 minutos. Las células de IL6 HEK-Blue™ en fase logarítmica se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de ensayo (DMEM, glucosa 4,5 g/l, FBS inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, Pen-Step) a 280.000 células/ml. Se añadieron 180 µl de suspensión celular a cada pocillo de mezclas de IL-6/Fab para llevar la concentración final de IL-6 a 20 pM. Las células se incubaron a 37°C/el 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas. Luego se mezclaron 20 µl de sobrenadante de cada pocillo con 180 µl de reactivo Quanti-Blue™ (Invivogen) y se incubaron a 37°C durante 40 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nM en un lector de placas SpectraMax M5. La señal de fondo de los pocillos sin IL-6 se resta y luego se divide entre las células tratadas con IL-6 sin inhibidor para obtener un valor de señalización fraccional. Todos los mutantes mostraron una potencia significativamente mayor en comparación con el Fab de EBI-029 de tipo natural con el orden de clasificación de potencia antagonista de la siguiente manera: A28V/S30P/I51T/S55G (EBI-030) > A28V/I51T/S55G > S30P/I51T/S55G > tipo natural (EBI-029). Estos resultados se muestran en la figura 6.

Ejemplo 16: los anticuerpos variantes mostraron potencia antagonista mejorada en el ensayo de proliferación de T1165

30 Las células T1165.85.2.1 (R&D Systems) son una línea celular de plasmacitoma murino que prolifera en respuesta a IL-6 de ratón, rata o humana. Para medir el antagonismo de los mutantes de Fab de EBI-029, se mezclaron 25 µl de IL-6 humana 2 ng/ml (R&D Systems 206-IL-010/CF) con 25 µl de cada variante de Fab en un intervalo de concentraciones en una placa de 96 pocillos y se incubó a TA durante 30 minutos. Las células T1165 en fase logarítmica se sedimentaron y se resuspendieron en medio de ensayo (90% de RPMI 1640, FBS al 10%, L-glutamina 2 mM, Pen-Strep) a 2x10<sup>5</sup> células/ml. Se añadieron 50 µl de suspensión celular a cada pocillo de mezclas de IL-6/Fab para llevar la concentración final de IL-6 a 0,5 ng/ml. Las células se incubaron a 37°C/el 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Se añadieron 100 µl de reactivo Cell-Titer Glo® (Promega) a cada pocillo y se incubaron a TA durante 10 minutos. La luminiscencia se midió en un lector de placas SpectraMax M5. Todos los mutantes mostraron una potencia significativamente mayor en comparación con el Fab de EBI-029 de tipo natural sin señalización medible de IL-6 en el intervalo de concentraciones de Fab sometidas a prueba (véase la figura 7).

Ejemplo 17: comparación de propiedades similares a fármacos de anticuerpos variantes

45 La estabilidad térmica de cada variante de Fab se determinó por fluorimetría diferencial de barrido (DSF). Se mezclaron 2 µl de proteína a 2,5 ó 5 mg/ml con 18 µl de PBS y 2 µl de Sypro Orange 50x en una placa de PCR de 96 pocillos BioRad. La placa se ejecutó en un sistema BioRad CFX96 RT-PCR con un aumento de temperatura lineal de 25°C y 95°C y se midió la fluorescencia con el tiempo. La T<sub>f</sub> se calculó como el punto más bajo de la primera derivada de la curva de fusión. Todas las variantes habían medido valores de T<sub>f</sub> de entre 76 y 78°C, consistentes con la T<sub>f</sub> medida del Fab de EBI-029 de tipo natural a 76°C.

50 Para medir la agregación, las muestras se evaluaron mediante SEC-MALS usando un HPLC Agilent 1260 combinado con un instrumento de dispersión de luz Wyatt miniDawn TREOS y un instrumento de índice de

refracción Wyatt Optilab rEX. Se inyectaron 20-100 µg de proteína y se ejecutaron a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Todas las variantes tenían pesos moleculares entre 45000 y 52000 Da, medidos por dispersión de luz, coherente con el Fab de EBI-029 de tipo natural.

- 5 Estos resultados indican que EBI-030 se comporta de manera similar bien en comparación con EBI-029 en cuanto a sus propiedades similares a los fármacos.

Ejemplo 18: producción de anticuerpos IgG2 EBI-029 y EBI-030 de longitud completa y anticuerpos IgG2 con dominios Fc mutantes

10

*Reformateo de EBI-029 y EBI-030 a IgG2 y Fc IgG2 mutante*

Los dominios variables de la cadena pesada de EBI-029 y EBI-030, incluyendo la secuencia líder (MDWTWRILFLVAAATGAHS; SEQ ID NO: 49) se amplificaron por PCR a partir de los vectores Fab usando cebadores que introdujeron un sitio EcoRI N-terminal y un sitio NheI C-terminal. Los productos de PCR se purificaron en un gel de agarosa al 1% y se digirieron doblemente con EcoRI-HF y NheI-HF. Los vectores de esqueleto basado en pTT5 que contienen la secuencia de cadena pesada de IgG2 de tipo natural o un dominio de IgG2 variante con una mutación H311A (H311 corresponde a la numeración en SEQ ID NO: 41; esto corresponde a H310 en la numeración proporcionada en Martin *et al.*, Molecular Cell, 7: 4, 867-877 (2001)) se digirieron de manera similar con EcoRI-FH/NheI-HF y se purificaron en un gel de agarosa al 1%. Los insertos se ligaron al esqueleto digerido usando la enzima Quikligase (New England Biolabs), se transformaron en células TOP10 (Life Technologies) y se seleccionaron en LB-Amp. Los clones se sometieron a miniprep y se secuenciaron para confirmar el inserto. La mutación H311A se seleccionó para reducir la afinidad de unión de Fc por FcRn con el fin de reducir la acumulación sistémica de moléculas que escapan del tejido ocular.

25

*Expresión y purificación de variantes de IgG2 mediante transfección transitoria*

Se expresaron IgG2 de EBI-029, IgG2 de EBI-029-H311A, IgG2 de EBI-030 e IgG2-H311A de EBI-030 mediante transfección transitoria en células HEK-6E. Los vectores pTT5 que contienen cada cadena pesada se transfectaron conjuntamente con el plásmido LC de EBI-029 usando PEI como reactivo de transfección. Los sobrenadantes se recogieron después de 5 días y las moléculas de IgG2 expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando agarosa-proteína-A. La proteína purificada se intercambió con tampón en PBS, pH 7,4 mediante varias rondas de concentración/dilución y la concentración y pureza de proteínas se determinó mediante absorbancia 280 y SDS-PAGE.

35

*Producción de reserva estable de CHO*

Las reservas de CHO estables que producen IgG2 de EBI-029, IgG2 de EBI-030 o IgG2-H311A de EBI-030 se generaron usando el kit Freedom CHO-S (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. En resumen, cada cadena pesada se clonó mediante digestión/ligamiento convencional en el vector pCHO 1.0 en combinación con el LC de EBI-029. Los constructos se transfectaron en células CHO-S usando reactivo Freestyle MAX y se seleccionaron reservas estables con concentraciones crecientes de puomicina y MTX. Después de dos rondas de selección, las reservas se seleccionaron para determinar la producción de anticuerpos mediante cromatografía analítica de proteína A y se seleccionaron los productores más altos para la ampliación de escala y la subclonación.

45

Las secuencias se presentan a continuación.

Secuencia de polipéptido de cadena pesada de 030 (en región de entramado de IgG2, CDR subrayadas):

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTITVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL  
 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT  
 QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD  
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST  
 FRVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKY KGQPREPQVY  
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD  
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID

50 NO:41)

## ES 2 756 275 T9

Secuencia de polipéptido de cadena ligera de 030 (en región de entramado de IgG2, CDR subrayadas):

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCRASESVD NYGIPFMNWY QQKPGQPPKL  
LIYAASNRGS GVPDRFSGSG SGTDFLTIS SLQAEDVAVY YCQQSEEVPL  
TFGQGTKLEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV  
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV  
THQGLSSPVT KSFNRGEC (SEQ ID NO:42)

5

Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de 030:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAA  
GGTATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAACTACCTGATCGAATGGGTGAG  
GCAGGCTCCCGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCA  
CCATTAATTACGCCAGAAATTCAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCC  
ACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTAC  
TACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCTCTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGC  
CAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT  
CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCA  
GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAG  
ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC  
GAGTGCCACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC  
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGT  
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTT  
CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA  
CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA  
AAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG  
GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAG  
CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC  
ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG  
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA SEQ ID  
NO:43

10 Secuencia de ácido nucleico de cadena ligera de 030:

GACATAGTGATGACTCAAAGTCCGGACAGCCTGGCGGTGTCACTCGGCGAACGGGC  
AACTATCAACTGCCGAGCCAGCGAGAGCGTCGATAATTACGGCATCCCCTTCATGA

## ES 2 756 275 T9

ACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGACAGCCGCCCAAGCTGCTTATCTACGCCGCTTCCA  
ACCGGGGATCAGGGGTGCCCGATCGATTTAGTGGAAGCGGTAGTGGGACCGATTTC  
ACACTGACCATCAGCTCCCTTCAGGCCGAGGATGTGGCTGTCTATTATTGTCAGCAA  
TCCGAGGAAGTGCCGCTCACGTTTGGTCAGGGAACCAAAGTGGAGATCAAGCGGAC  
CGTAGCGGCGCCTAGTGTCTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAACAGCTGAAGTCTGG  
CACTGCTTCCGTCGTGTGCCTGCTCAACAACCTTTTACCCTAGAGAGGCAAAAAGTTCA  
ATGGAAAGTAGACAATGCCTTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGTCTGTACAGAGC  
AGGATAGTAAGGACTCAACCTACAGCCTGTCCAGCACACTGACCCTCTCCAAAGCC  
GACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCTTGC GAAGTTACGCATCAGGGGCTGTCTCT  
ACCCGTTACAAAAGTTTTAACAGAGGGGAGTGCSEQ ID NO:44

Secuencia de polipéptido de cadena pesada de 030 con la mutación H311A (311A está en negrita y las CDR están subrayadas), también denominada en el presente documento secuencia de polipéptido de cadena pesada de 031:

5 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYVLP NYLIEWVRQA PGQGLEWMGV  
TPGGGTINY AQKFQGRVTI TADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARSR  
WDPLYYYALE YWGQGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPCSRST SESTAALGCL  
VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPSSNFGT  
QTYTCNVDHK PSNTKVDKTV ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD  
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST  
FRVSVLTVV AQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISKY KGQPREPQVY  
TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPMLD  
SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID  
NO:47)

Secuencia de ácido nucleico de cadena pesada de 031:

CAAGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGGGCCGAGGTTAAGAAGCCAGGGAGCAGCGTCAA  
GGTATCTTGTAAGCGTCTGGTTACGTCCTTCCAAACTACCTGATCGAATGGGTGAG  
GCAGGCTCCCGGCCAAGGCCTGGAATGGATGGGAGTTACCACCCCTGGGGGCGGCA  
CCATTAATTACGCCAGAAATTCAGGGACGAGTGACGATTACCGCCGACGAGTCC  
10 ACCAGTACTGCCTACATGGAGCTGTCTCACTCCGCAGCGAGGACACGGCAGTTTAC

TACTGCGCCCGGAGTCGATGGGACCCCTTTACTATTATGCTCTGGAATACTGGGGC  
 CAGGGAACGACCGTTACAGTGTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC  
 CTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT  
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCTCTGACCA  
 GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
 GCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAG  
 ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC  
 GAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCC  
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGT  
 GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG  
 TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTT  
 CGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCGTGGCCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTA  
 CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA  
 AAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAG  
 GAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAG  
 CGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC  
 ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG  
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC  
 TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAA (SEQ ID  
 NO:48)

Ejemplo 19: comparación de potencia de EBI-030 frente a IgG2 de EBI-029 en un ensayo de IL6 HEK-Blue

5 La línea celular indicadora de IL6 HEK-Blue™ (Invivogen) se usó para comparar la potencia de la inhibición de  
 señalización de IL6 entre los anticuerpos IgG2 de EBI-029 y EBI-030. Se compararon tres preparaciones de  
 proteínas purificadas a partir de células HEK-6E: IgG2 de EBI-029, IgG2 de EBI-030 y IgG2-H311A de EBI-030  
 10 (también denominado 031 o EBI-031), junto con una preparación de IgG2 de EBI-030 producido en una reserva  
 estable de CHO. Además, tocilizumab, un anticuerpo anti-IL6R aprobado, se incluyó como control. Para medir el  
 antagonismo de IL6, se mezcló IL-6 humana (R&D Systems 206-IL-010/CF) a 400 pM con concentraciones variables  
 de cada anticuerpo en una placa de 96 pocillos y se incubó a TA durante 30 minutos. Las células de IL6 HEK-Blue™  
 en fase logarítmica se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de ensayo (DMEM, glucosa 4,5 g/l, FBS  
 15 inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, Pen-Step) a 280.000 células/ml. Se añadieron 180 µl de suspensión  
 celular a cada pocillo de mezclas de IL-6/Fab para llevar la concentración final de IL-6 a 20 pM. Las células se  
 incubaron a 37°C/el 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas Luego se mezclaron 20 µl de sobrenadante de cada pocillo con  
 180 µl de reactivo Quanti-Blue™ (Invivogen) y se incubaron a 37°C durante 40 minutos antes de medir la  
 absorbancia a 650 nM en un lector de placas SpectraMax M5.

20 Los resultados se muestran en la figura 8 y en la tabla 5. EBI-030 (incluyendo EBI-030 producido en células HEK  
 con o sin la mutación H311A y EBI-030 producido en células CHO) mostró una potencia muy mejorada  
 (aproximadamente una disminución de 50 veces en la CI50 y una disminución de > 100 veces en la CI90) en  
 comparación con EBI-029. El aumento en la potencia fue mayor que el aumento en la afinidad medida por RPS.

Table 5: valores de CI50 y CI90

25

	CI50 (pM)	CI90 (pM)
EBI-029	47	4350
EBI-030	0,9	1,1
EBI-030 CHO	1,4	11
EBI-030-H311A	0,6	12,4

Tocilizumab	1490	23700
-------------	------	-------

El EBI-031 (también denominado en el presente documento IgG2-H311A de EBI-030) tenía una CI50 más de 75 veces menor que la de EBI-029 y una CI90 aproximadamente 350 veces menor que la de EBI-029. El EBI-030 producido en células HEK tenía una CI50 más de 50 veces menor que la de EBI-029 y una CI90 aproximadamente 4000 veces menor que la de EBI-029.

Ejemplo 20: análisis de modelado de potencia aumentada sobre la duración del bloqueo de IL-6 vítreo

El efecto de la potencia aumentada en la extensión y duración del bloqueo de IL-6 tras la administración intravítrea se simuló utilizando un modelo farmacocinético (figura 9). Las ecuaciones diferenciales que describen los cambios en el anticuerpo libre (A), la IL-6 libre (IL) y el complejo anticuerpo/IL-6 (AIL) se definieron de la siguiente manera:

$$d/dt(A) = -A*kae - A*IL*k1 + AIL*k2$$

$$d/dt(IL) = kpi - IL*kie - A*IL*k1 + AIL*k2$$

$$d/dt(AIL) = -AIL*kaie + A*IL*k1 - AIL*k2$$

donde kae es la velocidad de aclaramiento de anticuerpos libres del vítreo, k1 es la velocidad de asociación para la unión de anticuerpos/IL-6, k2 es la velocidad de disociación para el complejo anticuerpo/IL6, kpi es la velocidad de producción de IL-6, kie es la velocidad de aclaramiento libre de IL-6 del vítreo, y kaie es la velocidad de aclaramiento del complejo anticuerpo/IL-6 del vítreo. Los valores de los parámetros de partida y las velocidades se definieron como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6: valores de los parámetros de partida y velocidades

Parámetro	Valor
Concentración de anticuerpo inicial - A <sub>0</sub>	3000 nM
Concentración de IL-6 inicial - IL <sub>0</sub>	0,01 nM
Concentración de complejo inicial - AIL <sub>0</sub>	0
Velocidad de asociación - k1	8,64 nM <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
Velocidad de disociación - k2	Variado desde 0,0086 d <sup>-1</sup> hasta 0,86 d <sup>-1</sup>
Velocidad de aclaramiento de anticuerpos - kae	0,037 d <sup>-1</sup>
Velocidad de aclaramiento de IL6 – kie	0,69 d <sup>-1</sup>
Velocidad de producción de IL6 – kpi	0,0069 nM d <sup>-1</sup>
Velocidad de aclaramiento del complejo - kaie	0,037 d <sup>-1</sup>

A<sub>0</sub> se calculó basándose en los supuestos de una dosis de 50 µl de anticuerpo 50 mg/ml en un ojo humano con un volumen vítreo de 5 ml. IL<sub>0</sub> se estimó basándose en valores medidos clínicamente para IL-6 vítreo en pacientes con EMD de ~ 200 pg/ml. k1 se estimó basándose en las velocidades de asociación de anticuerpos típicas de 1E5 M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>, mientras que k2 se varió para simular valores de potencia que oscilan entre 100 pM y 1 pM. kae se derivó de los semitiempos de aclaramiento vítreo medidos en conejo de ~ 11 días escalado en 1,8 tal como se midió previamente para la PK humana. kie se estimó en semitiempo de aclaramiento de 24 horas, y kpi se calculó como IL<sub>0</sub>\* kie.

Las simulaciones de anticuerpo libre e IL-6 libre se realizaron usando el software Berkeley Madonna a lo largo de un transcurso de tiempo de 300 días (figura 10). Se seleccionó un límite de bloqueo de IL-6 del 95% para medir la duración de la inhibición. El modelo predice que el aumento de la potencia del anticuerpo extiende significativamente la duración de la inhibición de IL-6 en el ojo desde 130 días para k2/k1 = 100 pM hasta 200 días para k2/k1 = 10 pM hasta 225 días para k2/k1 = 1 pM.

Ejemplo 21: farmacocinética de IL-6a

PharmOptima (Portage, MI) realizó experimentos farmacocinéticos (PK) en conejos blancos de Nueva Zelanda machos. Todos los animales tenían entre 12 y 13 meses de edad y pesaban 2,61-3,42 kg. Se compararon las siguientes proteínas: EBI-029-IgG2 (SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12), EBI-029-IgG2-H311A (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 12), EBI-030 ( SEQ ID NO: 41 y SEQ ID NO: 42), EBI-030-IgG2-H311A (SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 42), Fab de EBI-029 (SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 12 ), Eylea® (trampa de VEGF) y tocilizumab (TCZ; anticuerpo anti-IL6R). Todas las proteínas se formularon a 13,8 mg/ml en PBS, pH 7,4. EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-

030, EBI-030-IgG2-H311A, Fab de EBI-029 y tocilizumab no se unen a sus antígenos diana en el conejo, mientras que Eylea® se une a VEGF de conejo.

5 Para la investigación de PK intravítrea, a 9 animales se les inyectó 50 µl de artículo de prueba en cada ojo. Antes de la inyección, se aplicó clorhidrato de lidocaína (inyectable al 2%), proparacaína al 0,5% o tetracaína al 0,5% a la superficie ocular. Las inyecciones se realizaron en el vítreo medio con una jeringa de insulina BD de 300 µl (aguja 31G x 5/16 pulgadas) insertada a través del cuadrante dorsotemporal del ojo. Para la investigación de PK sistémica, a 3 animales se les inyectó 100 µl de artículo de prueba a través de la vena de la oreja.

10 Se recogieron muestras de sangre en serie de 3 animales en ambos grupos de IVT e i.v. a las 0,083, 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 y 336 horas y se diluyeron 1:1 con disolución de citrato-fosfato-dextrosa y se colocaron en hielo. El plasma se recogió por centrifugación de las muestras de sangre enfriadas a 4000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se almacenaron congeladas a -80°C.

15 Se recogieron tejidos oculares de ambos ojos de todos los animales en el grupo de IVT a las 0,25, 24, 168 y 336 horas después de la dosis. Los animales se sacrificaron a través de una sobredosis de barbitúricos intravenosa. Para recoger el humor acuoso, inmediatamente después de la eutanasia, se insertó una jeringa con aguja debajo de la córnea y el humor acuoso se retiró lentamente. El humor acuoso se transfirió a un tubo previamente etiquetado y se colocó en hielo seco o se congeló a -80°C. Para recoger el humor vítreo, se realizó un pequeño corte en la esclerótica de un ojo enucleado usando un bisturí y se extrajo el vítreo a través de la abertura a través de una jeringa. La muestra se midió a través de las graduaciones en la jeringa, se transfirió a un tubo previamente etiquetado y se colocó en hielo seco o se congeló a -80°C.

25 Para recoger la retina y la coroides, se realizó un pequeño corte con un bisturí en la esclerótica de un ojo enucleado, paralelo y velocidad de flujo al limbo. Se usaron tijeras para continuar la abertura alrededor del globo ocular, separándolo en dos mitades. El globo posterior se colocó de modo que el interior mirara hacia arriba. Usando un cuchillo, la retina se recogió cuidadosamente del globo. Una vez que se recogió la retina del globo, la coroides se recogió de manera similar del globo restante. Ambas muestras, por separado, se transfirieron a tubos Precellys® pesados previamente y etiquetados previamente, se pesaron y se colocaron en hielo seco o se congelaron a -80°C.

30 Los tejidos de retina y coroides se diluyeron diez veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se homogeneizaron y se almacenaron a -80°C.

Las concentraciones de proteínas en cada tejido se evaluaron mediante ELISA. Para EBI-029-IgG2, EBI-029-IgG2-H311A, EBI-030, EBI-030-IgG2-H311A y Fab de EBI-029, se recubrieron placas de medio volumen Costar con IL-6 humana 1 µg/ml en PBS durante 1 hora a TA. Los pocillos se bloquearon con PBS que contenía BSA al 2%, se lavaron y luego se incubaron con un intervalo de diluciones para cada muestra usando PBS + plasma de conejo al 5% + Tween-20 al 0,05% como diluyente. Se incluyó también una curva de calibración usando proteína purificada en cada placa. Las muestras se incubaron a TA durante 60 minutos y luego se lavaron tres veces con 300 µl de PBS que contenía Tween-20 al 0,05%. Luego se añadió anticuerpo anti-kappa-HRP (Genway Inc.) diluido 1:10.000 en PBS, BSA al 1%, luego se añadió Tween-20 al 0,05% a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron como anteriormente, luego se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y la señal se midió a 450 y 550 nm en un lector de placas Spectramax. Las concentraciones de proteínas se calcularon basándose en la curva de calibración utilizando el software Softmax Pro 6. Cada ELISA se repitió en al menos 3 placas independientes y se notificó el semitiempo promedio.

45 Para tocilizumab, las concentraciones de proteína se determinaron mediante ELISA tal como se indicó anteriormente, excepto que se usó Fab anti-tocilizumab (BioRad HCA252) como reactivo de captura y se usó anticuerpo anti-IgG-Fc-HRP humano (Sigma A0170) como anticuerpo de detección. Se utilizaron dos ensayos ELISA diferentes para medir Eylea® libre y total. Para Eylea® libre, los pocillos se recubrieron con VEGF recombinante (R&D Systems) y la proteína unida se detectó con anticuerpo anti-IgG-Fc-HRP humano (Sigma A0170). Para medir el total de Eylea®, se usó el anticuerpo anti-Fc humano (Sigma 12136) para la captura y se usó anticuerpo anti-IgG-CH2-HRP humano (BioRad MCA647P) para la detección. Cada ELISA se repitió en al menos 3 placas independientes y se informó el semitiempo promedio.

## 55 *Resumen de los resultados*

En la mayoría de los animales, se observó una sólida formación de anticuerpos contra la proteína inyectada en los puntos de tiempo de 240 y 336 horas. Debido a que esta formación de anticuerpos puede afectar al aclaramiento de proteínas o interferir con el ELISA, el análisis de datos se limitó a los puntos de tiempo hasta 168 horas inclusive.

60 Para determinar la PK intravítrea, todas las proteínas IgG2 de EBI-029 y EBI-030 se aclararon significativamente más lentamente ( $T_{1/2} = 9,3, 9,0, 15,7$  y  $9,8$  días para EBI-029, EBI-029-H311A, EBI-030 y EBI-030-H311A, respectivamente) en comparación con Eylea® ( $T_{1/2} = 6,3$  días), tocilizumab ( $T_{1/2} = 4,8$  días), o el fragmento Fab de EBI-029 ( $T_{1/2} = 3,9$  días) (figura 11, tabla 7). Se observaron tendencias similares en la retina, la coroides y el humor acuoso donde EBI-030 y EBI-030-H311A se acumularon a niveles mayores en comparación con Eylea® y tocilizumab (véase la figura 12 y la figura 13). Todas las proteínas fueron detectables en el plasma después de la

65

administración de IVT con EBI-029, EBI-030 y tocilizumab acumulándose a niveles significativamente mayores que Eylea® o EBI-030-H311A (véase la figura 14). De manera similar, Eylea® y EBI-030-H311A se aclararon más rápidamente del plasma después de la administración i.v., con el semitiempo de EBI-030-H311A aproximadamente la mitad que el de IgG2 de tipo natural debido a la unión reducida a FcRn (tabla 7).

5

Tabla 7: resultados de farmacocinética

PK vítrea	
Molécula	T <sub>1/2</sub> (días)
EBI-029	9,3
EBI-029-H311A	9,0
EBI-030	15,7
EBI-030-H311A	9,8
Fab de EBI-029	3,9
Eylea®	6,1 (libre), 6,3 (total)
Tocilizumab	4,8
PK sistémica después de la administración i.v.	
Molécula	T <sub>1/2β</sub> (horas)
EBI-029	77
EBI-030	69
EBI-030-H311A	33
Eylea®	37 (libre), 42 (total)
TCZ	50

#### Ejemplo 22: solubilidad de EBI-031 a altas concentraciones

10

El EBI-031 purificado se concentró desde 3 mg/ml hasta 142 mg/ml en PBS, pH 7,4 usando un concentrador de rotación Amicon Ultra-15. Las preparaciones previas y posteriores a la concentración se evaluaron para determinar la agregación ejecutándose en una columna Tosoh G3000SWXL 7,8x30 SEC combinada con un instrumento de dispersión de luz Wyatt miniDawn TREOS y un instrumento de índice de refracción Wyatt Optilab rEX. Se inyectaron 20 µg de proteína y se ejecutaron a una velocidad de flujo de 1 ml/min en PBS. La fracción de masa para el pico al peso molecular esperado de ~150 kDa fue aproximadamente igual para las dos concentraciones (el 90,9% para la preparación de 3 mg/ml y el 91,3% para la preparación de 142 mg/ml) lo que indica que no hubo un aumento significativo en la agregación de proteínas durante la concentración. Estos resultados demuestran que EBI-031 puede concentrarse hasta 142 mg/ml con poca agregación medible (<10% de agregación).

15

20

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

La línea celular indicadora de IL6 HEK-Blue™ (Invivogen) se usó para comparar la potencia de EBI-031 y tocilizumab para bloquear la señalización de IL6 en cis y en trans. Para la señalización en cis, se mezcló IL-6 libre (concentración final = 20 pM) con EBI-031 o tocilizumab en un intervalo de concentraciones en una placa de 96 pocillos y se incubó a TA durante 30 minutos. Las células de IL6 HEK-Blue™ en fase logarítmica se tripsinizaron y se resuspendieron en medio de ensayo (DMEM, glucosa 4,5 g/l, FBS inactivado por calor al 10%, L-glutamina 2 mM, Pen-Step) y se añadieron 50.000 células a cada pocillo. en un volumen final de 200 µl. Las placas se incubaron a 37°C/el 5% de CO<sub>2</sub> durante 20 horas. Luego se mezclaron 50 µl de sobrenadante de cada pocillo con 150 µl de reactivo Quanti-Blue™ (Invivogen) y se incubaron a 37°C durante 40 minutos antes de medir la absorbancia a 650 nM en un lector de placas SpectraMax M5. La señal de fondo de los pocillos sin IL-6 se resta y luego se divide entre las células tratadas con IL-6 sin inhibidor para obtener un valor de señalización fraccional. EBI-031 (CI50 = 14,2 pM) bloquea la IL-6 libre con una potencia > 900 veces mayor en comparación con tocilizumab (CI50 = 12,9 nM) (figura 16A).

25

30

35

Para medir el bloqueo de la señalización en trans, los experimentos se realizaron tal como anteriormente excepto que se usó hiper IL-6 a una concentración final de 200 pM en lugar de IL-6 libre. Hiper IL-6 es una fusión genética entre IL-6 y el receptor soluble de IL-6 (Fischer *et al.*, Nature Biotechnology 15: 142-145 (1997) EBI-031 bloqueó la hiper IL-6 de manera potente (CI50 = 32 pM), mientras que tocilizumab no pudo inhibir significativamente la señalización a una concentración de 1 µM (figura 16B).

40

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

5

#### Ejemplo 24: simulaciones computacionales para la supresión de EBI-031 intravítrea de la señalización de IL-6

Se realizaron simulaciones computacionales tal como se describe en el ejemplo 20 para predecir el periodo de tiempo que una administración intravítrea de EBI-031 en seres humanos debería suprimir el 95% de la señalización de IL-6.  $k_2$  se ajustó a 0,12 d<sup>-1</sup> de modo que  $k_2/k_1 = 14$  pM según se midió en el ensayo de potencia. El aclaramiento T1/2 se estableció en 18 días basándose en el semitiempo de aclaramiento intravítrea medido en conejos escalados por 1,8 para seres humanos. Todos los demás parámetros se describen en la tabla 6. El modelo predice que EBI-031 debe bloquear el 95% de la señalización de IL-6 durante ~ 150 días después de la administración intravítrea (figura 17). Estos resultados de modelado indican que EBI-031 puede bloquear de manera sustancial la señalización de IL-6 en el ojo durante un largo periodo de tiempo, por ejemplo, hasta aproximadamente 6 meses.

10

15

#### Ejemplo 25: caracterización de isoformas de EBI-031

EBI-031 es un anticuerpo IgG2. Tal como se discutió previamente, los anticuerpos IgG2 existen en tres isoformas estructurales diferentes, las isoformas IgG2-A, IgG2-B e IgG2-A/B (figura 18). En este ejemplo, se realizaron experimentos para identificar las isoformas estructurales en muestras de EBI-031.

20

#### Análisis de RP-HPLC

25

Se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) para resolver las diversas isoformas estructurales de EBI-031. Un método analítico RP-HPLC mejorado que se ha utilizado previamente para resolver isoformas estructurales mediadas por disulfuro de IgG2 (véase, Dillon *et al.*, Journal of Chromatography A, 2006, 1120: 112-120) se optimizó para resolver el EBI-031.

30

35

Las muestras de EBI-031 que contenían aproximadamente 30  $\mu$ g se cargaron en una columna Zorbax 300SB-C8 (150 mm  $\times$  2,1 mm, 5,0  $\mu$ m, 300 Å). La temperatura de la columna se ajustó a 75°C. La fase móvil A era agua que contenía el 0,1% de TFA, y la fase móvil B era el 55% de IPA, el 40% de ACN, el 4,9% de agua y el 0,1% de TFA. La velocidad de flujo fue de 0,5 ml/min. La columna se equilibró inicialmente con el 90% de fase móvil A y el 10% de fase móvil B durante 2 minutos, seguido de un gradiente escalonado de 2 minutos desde el 10 hasta el 25% de B. La elución se logró con un gradiente lineal del 25-32% de B durante 21 minutos. La absorbancia UV se monitorizó a 214 nm y/o 280 nm.

40

45

Para determinar si la resolución estaba relacionada con el disulfuro, las muestras se trataron con DTT 5 mM y cisteína 10 mM a temperatura ambiente durante 2 minutos y luego se analizaron con el método de RP-HPLC (figura 19). El tratamiento con DTT, que es un potente agente reductor, provoca la reducción del anticuerpo IgG2, lo que da como resultado la elución en picos tempranos (pico 0 y pico 1) (figura 19, panel medio). El tratamiento con cisteína, que es un agente reductor más suave en comparación con la DTT, también desplaza la distribución de isoformas hacia los picos tempranos (pico 0 y pico 1), aunque no en la medida observada con la muestra tratada con DTT (figura 19, panel inferior).

50

Los datos demuestran que el método de RP-HPLC resolvió las isoformas estructurales con diferente conectividad de disulfuro. Las diferentes estructuras de unión a disulfuro se confirmaron mediante mapeo de péptidos no reducido y análisis de espectrometría de masas: el pico de elución temprana (pico 1) contiene la isoforma IgG2-A/B y el pico de elución tardía (pico 2) contiene la isoforma IgG2-A. Es importante destacar que no se detectó la isoforma B de IgG2-B (pico 0) en la muestra de EBI-031 (figura 19, panel superior).

55

#### Comparación de diferentes muestras de EBI-031

Usando el análisis de RP-HPLC descrito anteriormente, se analizaron muestras de EBI-031 recogidas de diferentes líneas celulares que expresan EBI-031 para comparar la distribución de isoformas de los anticuerpos producidos. Se recogieron muestras de EBI-031 de un cultivo a escala de 200 l de una línea celular clónica, un cultivo a escala de 10 l de una línea celular parental y un grupo de células transfectadas de manera estable. EBI-031 se purificó usando un método de cromatografía de tres pasos a partir de las líneas celulares clónicas y parentales que expresan EBI-031. EBI-031 se purificó del conjunto de células transfectadas de manera estable usando purificación de proteína A. Las muestras se analizaron por los métodos descritos anteriormente.

60

65

Los resultados mostrados en la figura 20 muestran que las tres muestras de EBI-031 contenían isoformas IgG2-A e IgG2-A/B, pero ninguna cantidad sustancial de IgG2-B. Estos datos demuestran que el anticuerpo IgG2 de EBI-031 se produce en una mezcla menos heterogénea que otros anticuerpos IgG2, ya sea que la producción sea a partir de una línea celular clónica que expresa EBI-031, una línea celular parental que expresa EBI-031 o una población

celular heterogénea que expresa de manera estable EBI-031. La figura 21 muestra la distribución de las isoformas de la muestra de EBI-031 del cultivo a escala de 200 l de una línea celular clónica que expresa EBI-031, por ejemplo, el panel superior de la figura 20. También se midieron las áreas bajo las curvas, y las distribuciones entre las isoformas se muestran en la tabla debajo de la figura.

5

Ejemplo 26: farmacocinética en estudios con primates

La farmacocinética de EBI-031 se investigó en estudios con primates. Se sometieron a prueba dos monos verdes africanos machos. Se inyectaron 50µl de 50 mg/ml de EBI-031 por vía intravítrea en el ojo. Se usó software Madonna para el ajuste de las curvas.

10

Los datos del estudio con primates se modelaron utilizando un ajuste de curva. Las ecuaciones diferenciales que describen los cambios en el anticuerpo en el vítreo (A) y el anticuerpo fuera del vítreo, por ejemplo, sistémico, (Ap) se definieron de la siguiente manera:

15

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

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

20 Los valores de los parámetros de partida y las velocidades se definen tal como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 8: valores de los parámetros de partida y velocidades

Parámetro	Valor
Dil - Dilución	100
k <sub>ae</sub> - Velocidad de eliminación vítrea	0,2
k <sub>ape</sub> - Velocidad de eliminación sistémica	1,4
A inic. – Anticuerpo inicial en el vítreo	1000000
A <sub>p</sub> inic. – Anticuerpo inicial fuera del vítreo	0

25 Otras consideraciones incluidas para el ajuste incluyen: la dilución y ambas constantes de velocidad se propusieron para el ajuste. La A inicial se mantuvo constante (2x50 ml de 50 mg/ml en un ojo de 5 ml). Los resultados del modelado tal como se muestra en las figuras 22A, 22B y 23 mostraron que las constantes de la velocidad de eliminación vítrea dieron como resultado semividas de 4,6 y 5,7 días, respectivamente para los dos monos. Se calculó que la constante de velocidad de eliminación vítrea promedio era de 5,2 días. La eliminación sistémica se modeló como 1,1 días y 0,63 días (promedio 0,85 días). Estos resultados demuestran que la semivida de EBI-031 en el vítreo fue significativamente mayor que la semivida sistémica en los primates.

30

Ejemplo 27: farmacocinética de EBI-031

35 Se realizó otro experimento farmacocinético (PK), en el que se inyectaron 50 µl de una disolución de 20 mg/ml de EBI-031 por vía intravítrea en los ojos de conejos. Los puntos de tiempo examinados fueron 1, 3, 7 y 14 días (por ejemplo, 24, 72, 168 y 336 horas). Se analizaron dos animales (cuatro ojos) para cada punto de tiempo. Los métodos para administrar la formulación de EBI-031, recoger el tejido ocular y determinar la concentración de proteínas se realizaron tal como se describe en el ejemplo 21.

40

Los resultados se muestran en las figuras 24A-24I. Al analizar la concentración de proteínas durante los días 1-14 en el humor vítreo, se determinó que la semivida de EBI-031 era de 8,95 días (figura 24A). Sin embargo, se detectó una fuerte respuesta de anticuerpos el día 14, lo que puede afectar estos resultados. Cuando se analizó la concentración de proteínas durante los días 1-7 en el humor vítreo, se determinó que la semivida de EBI-031 era de 18,88 días.

45

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

50

Otras realizaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

55

## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:37 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:38.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:41 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42; o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:41 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42 que comprende una mutación (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 mutaciones) en una o más posiciones correspondientes a H311, D313, I254 o H436 (numeración como en SEQ ID NO:41).
3. Fab que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:39 o SEQ ID NO:54 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42.
4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene retención mejorada en el ojo cuando se administra por vía intravítrea en comparación con tocilizumab y/o aflibercept.
5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una mutación (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 mutaciones) en una o más posiciones correspondientes a H311, D313, I254 o H436 (numeración como en SEQ ID NO:41).
6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 2 ó 5, en el que dicha mutación se selecciona de uno o más de H311A, H311E, H311N, D313T, I254A, I254R y H436A.
7. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5 a 6, en el que dicha mutación es una mutación H311A (numeración como en SEQ ID NO:41).
8. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5 a 7, en el que dicha mutación reduce la acumulación sistémica del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en comparación con la acumulación sistémica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que no comprende la mutación.
9. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 5 a 7, en el que dicha mutación reduce la acumulación sistémica del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en comparación con la acumulación sistémica de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que no comprende la mutación, en el que la acumulación sistémica se evalúa tras la administración intravítrea del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.
10. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una semivida sistémica más corta que la de tocilizumab y/o aflibercept.
11. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno es una isoforma IgG2-A o una isoforma IgG2-A/B, pero no una isoforma IgG2-B.
12. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende una secuencia de cadena pesada que comprende SEQ ID NO:47 y una secuencia de cadena ligera que comprende SEQ ID NO:42.
13. Composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Composición según la reivindicación 13, en la que la composición comprende al menos el 60, el 70, el 80, el 90, el 95 o el 99% de las isoformas IgG2-A o IgG2-A/B del anticuerpo, o una combinación de las mismas.
15. Composición según la reivindicación 13 ó 14, en la que la composición comprende menos del 10%, el 5%, el 2%, el 1% o el 0,5% de las isoformas IgG2-B del anticuerpo.
16. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL-6.
17. Composición para su uso según la reivindicación 16, o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su

uso según la reivindicación 16, para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular caracterizada por un nivel elevado de IL-6.

- 5 18. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento de edema macular diabético (EMD), retinopatía diabética, sequedad ocular (por ejemplo, enfermedad de sequedad ocular o síndrome de sequedad ocular), conjuntivitis alérgica, uveítis, degeneración macular asociada a la edad (DMAE), retinopatía diabética proliferativa (RDP), desprendimiento de retina regmatógeno (DRR), oclusión venosa retiniana (OVR), neuromielitis óptica (NMO), trasplante de córnea, abrasión corneal o lesión física en el ojo.
- 10 19. Ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica para un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 15 20. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 19.
21. Célula que comprende el vector según la reivindicación 20.

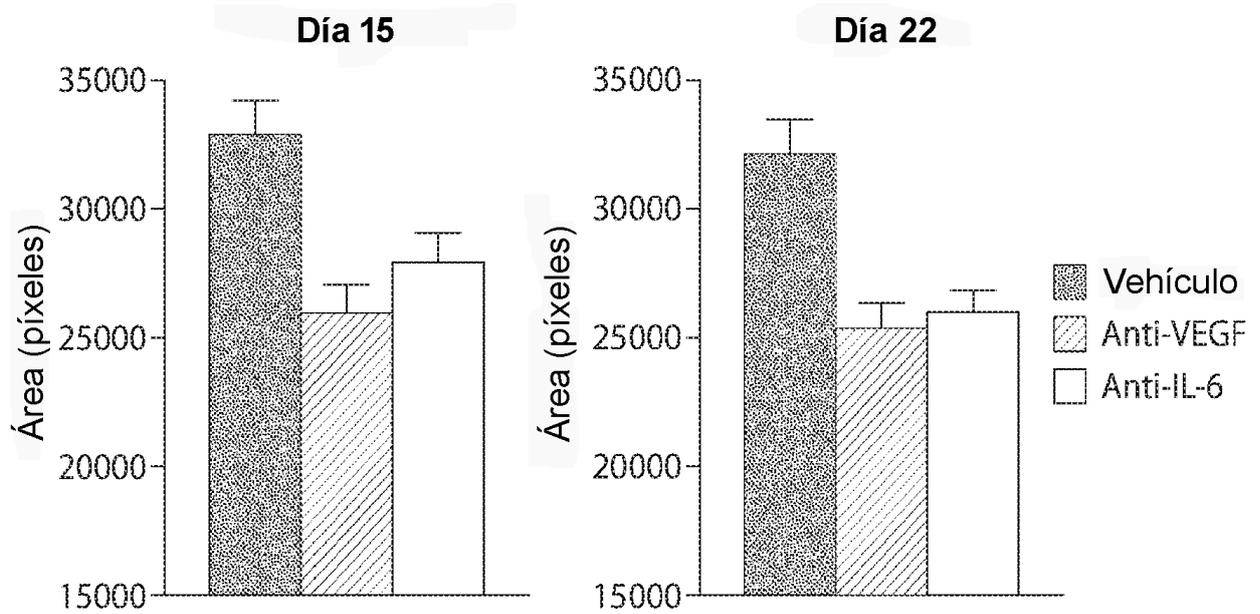


Fig. 1

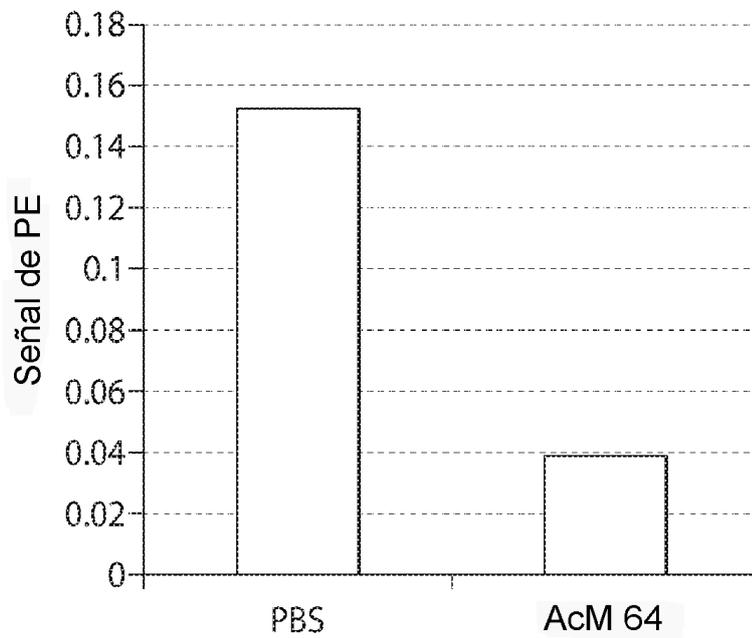


Fig. 2

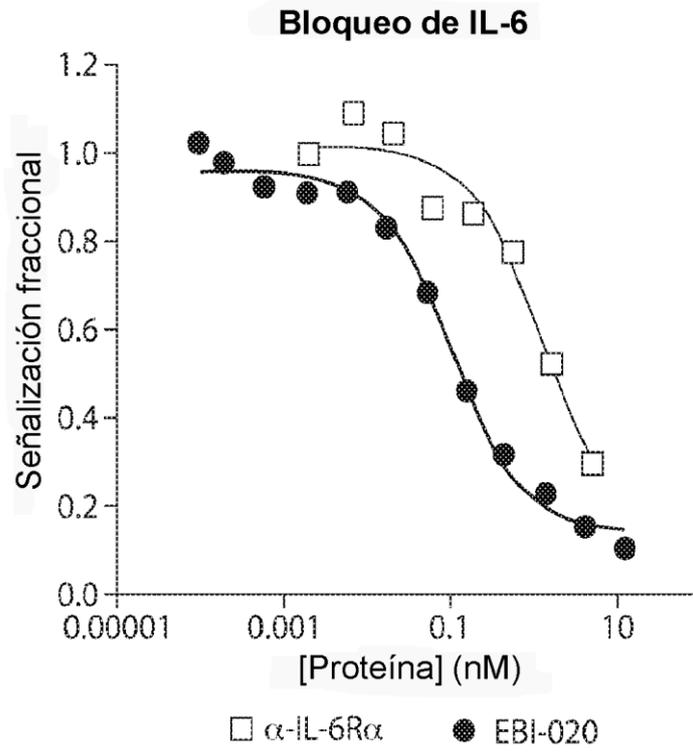


Fig. 3A

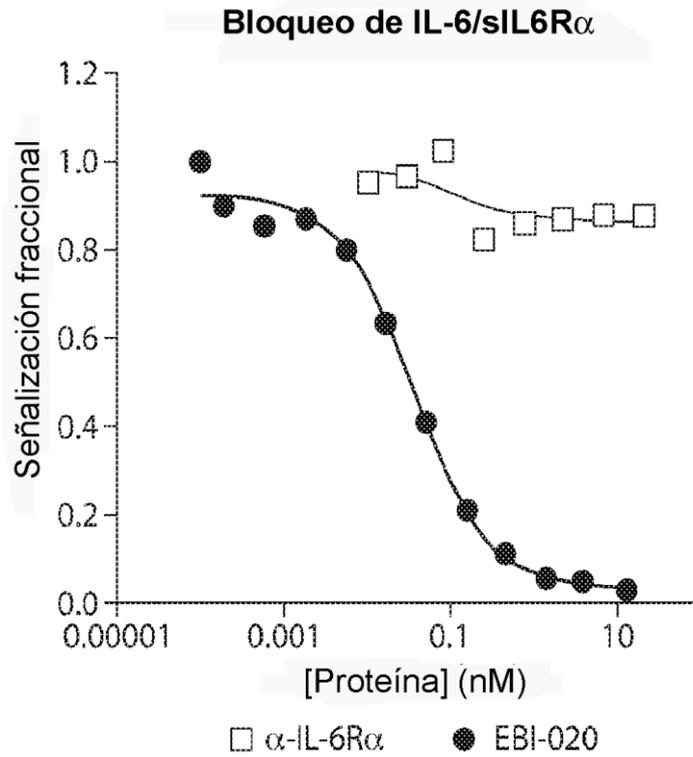


Fig. 3B

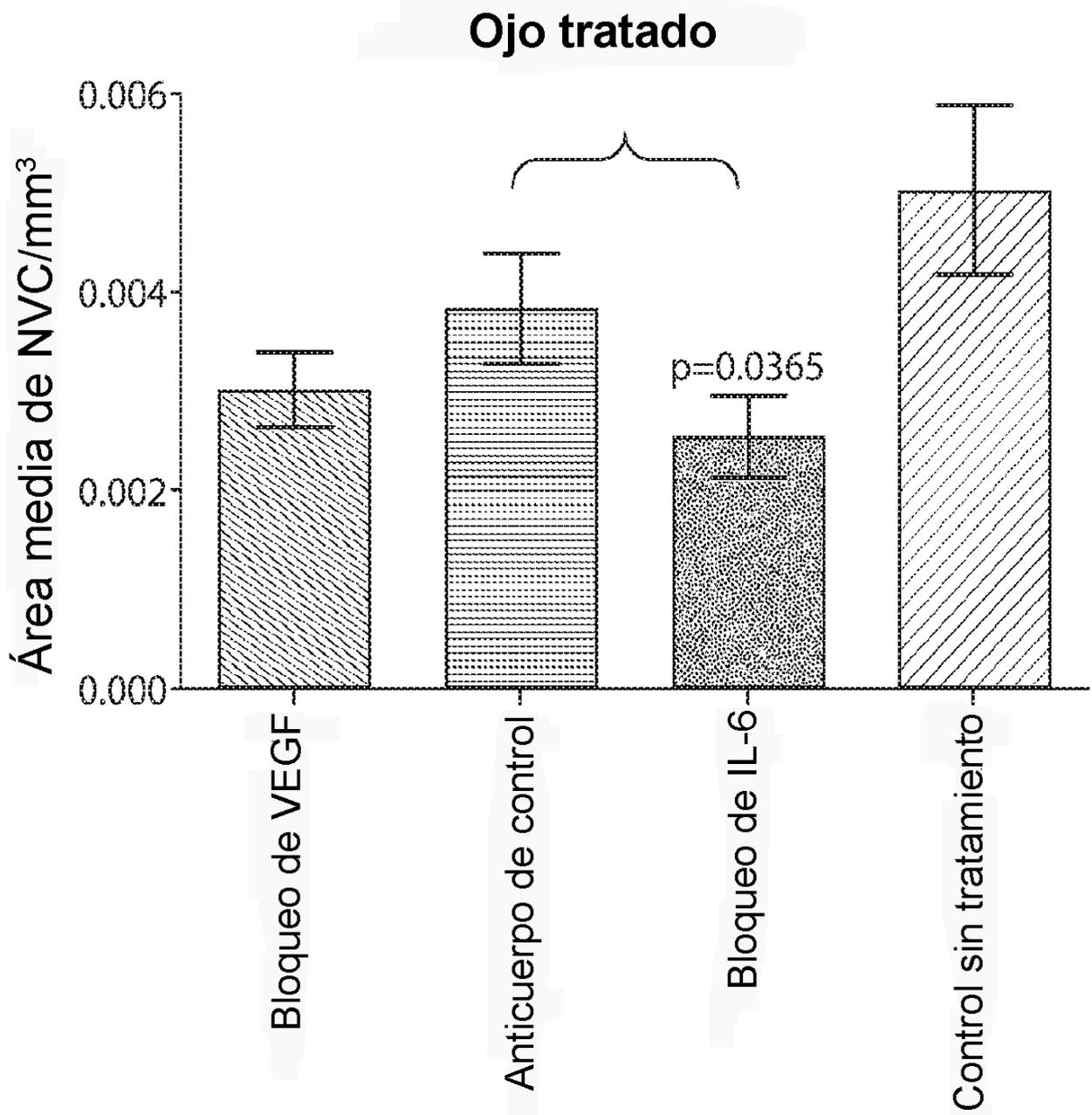
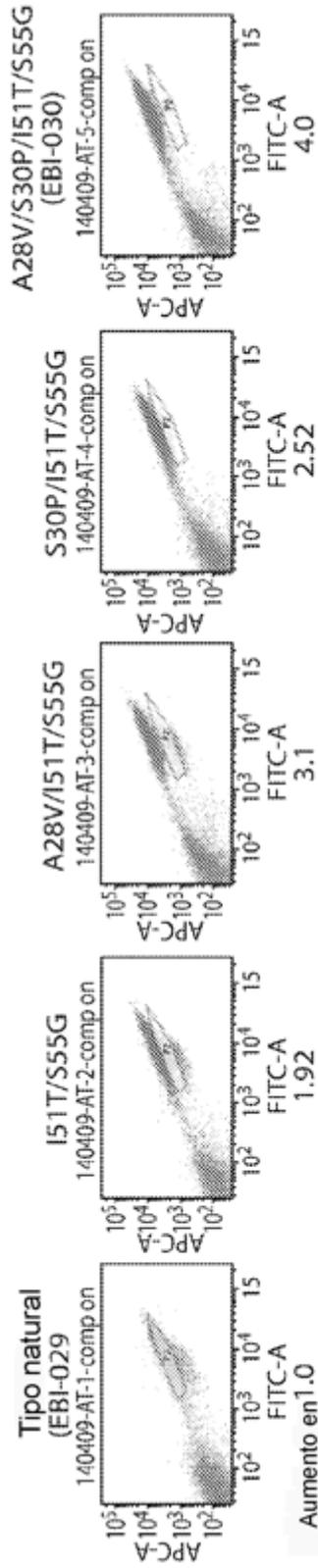


Fig. 4



Aumento en 1.0 veces en la unión/visualización con respecto al tipo natural

Fig. 5

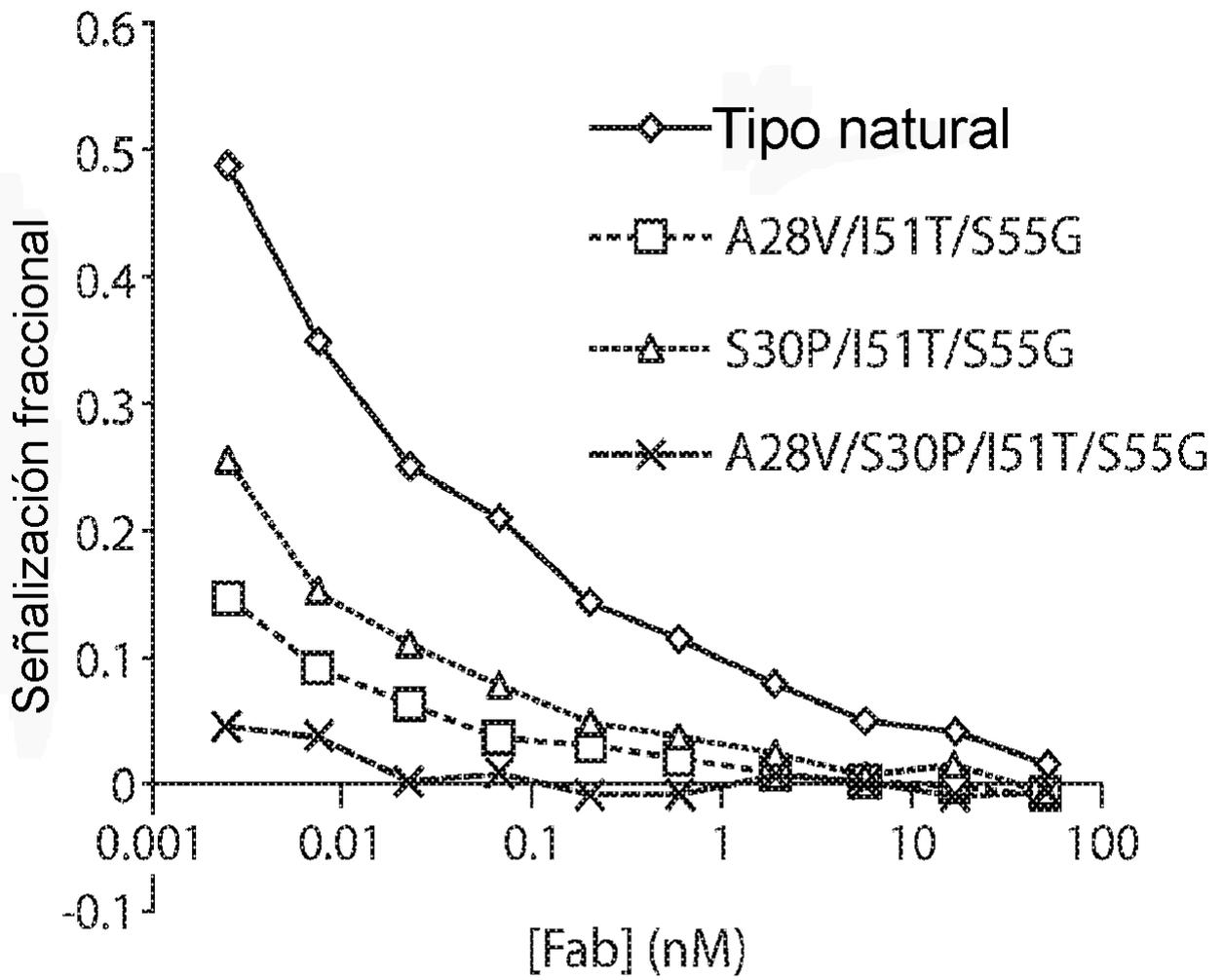


Fig. 6

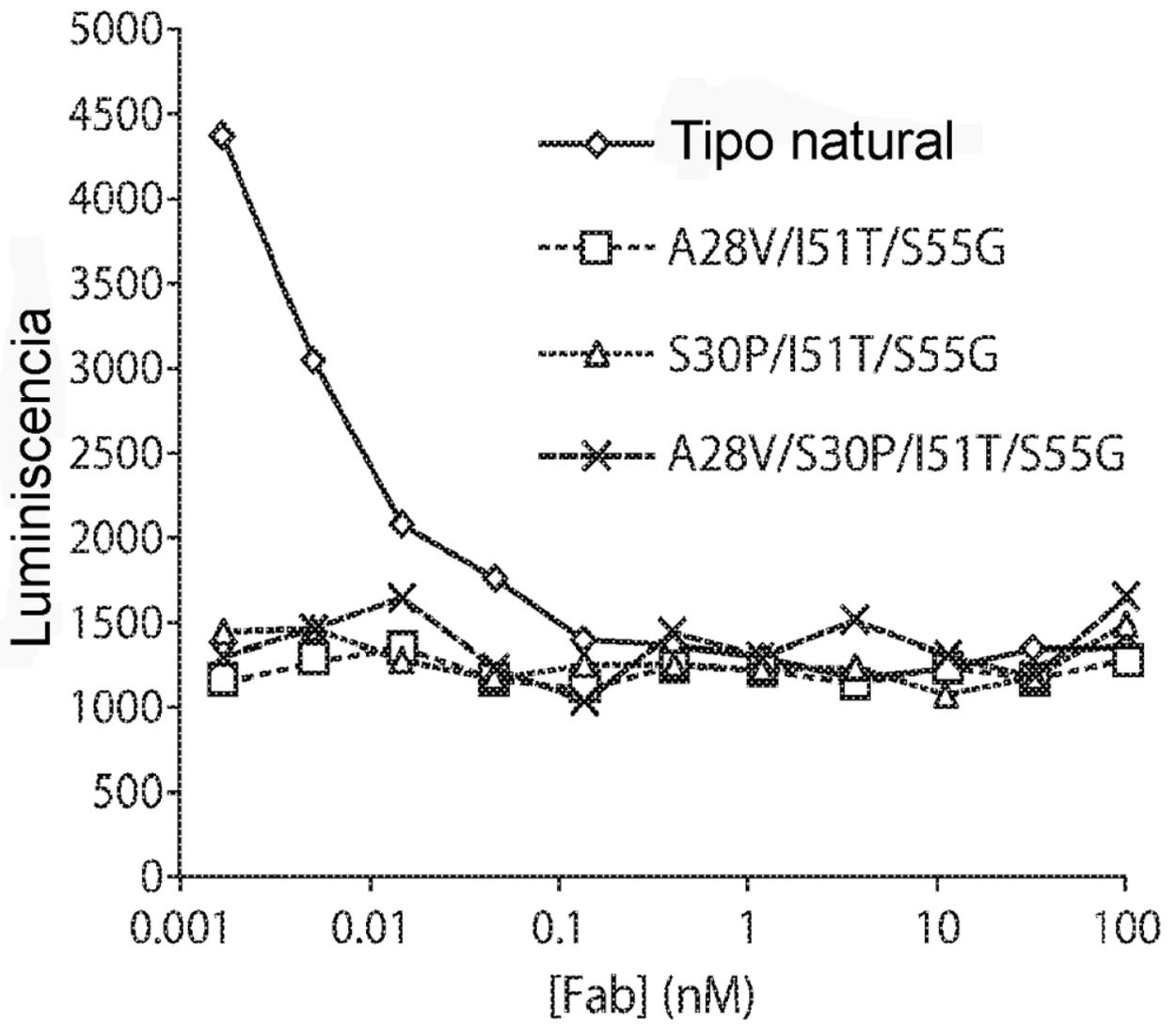


Fig. 7

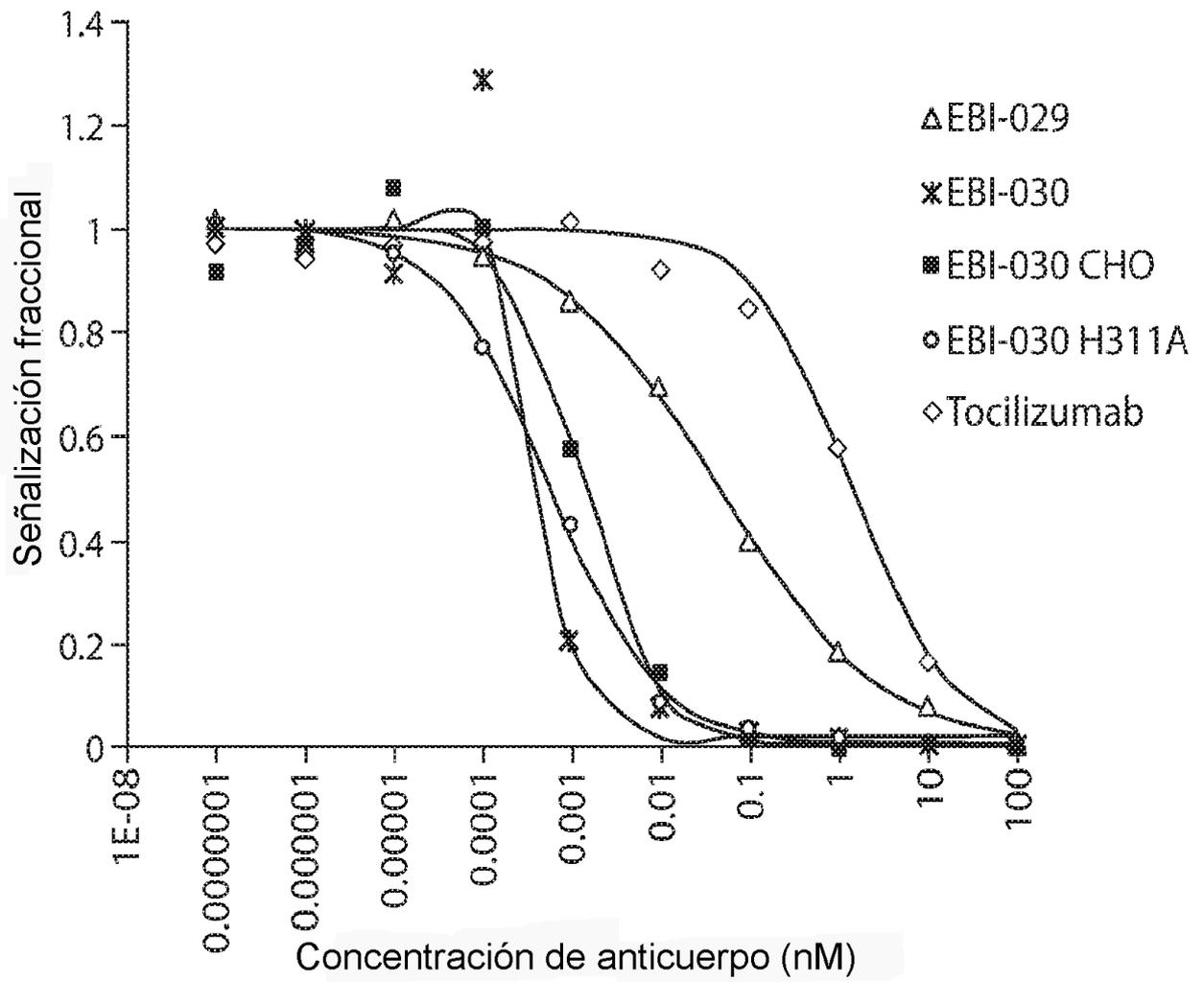


Fig. 8

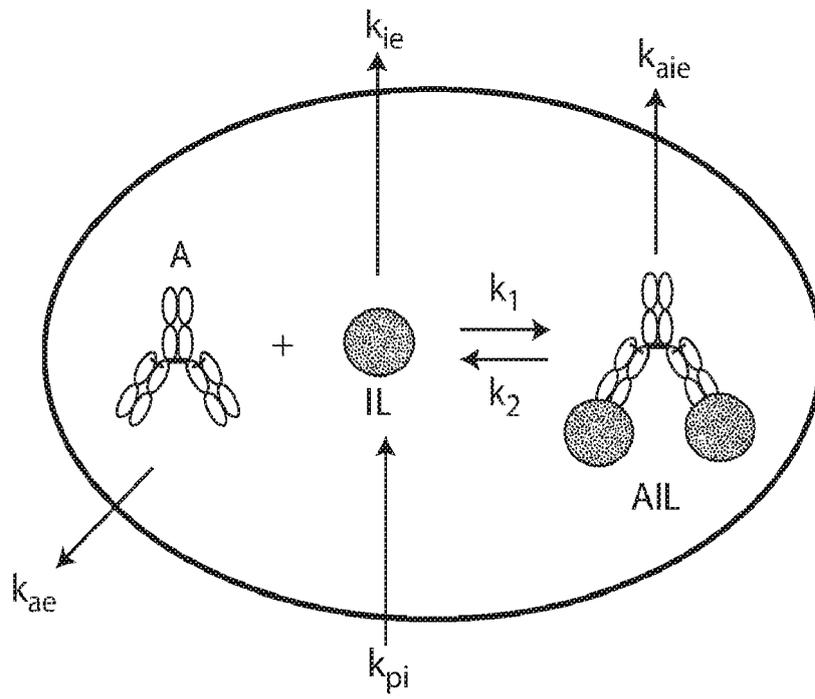


Fig. 9

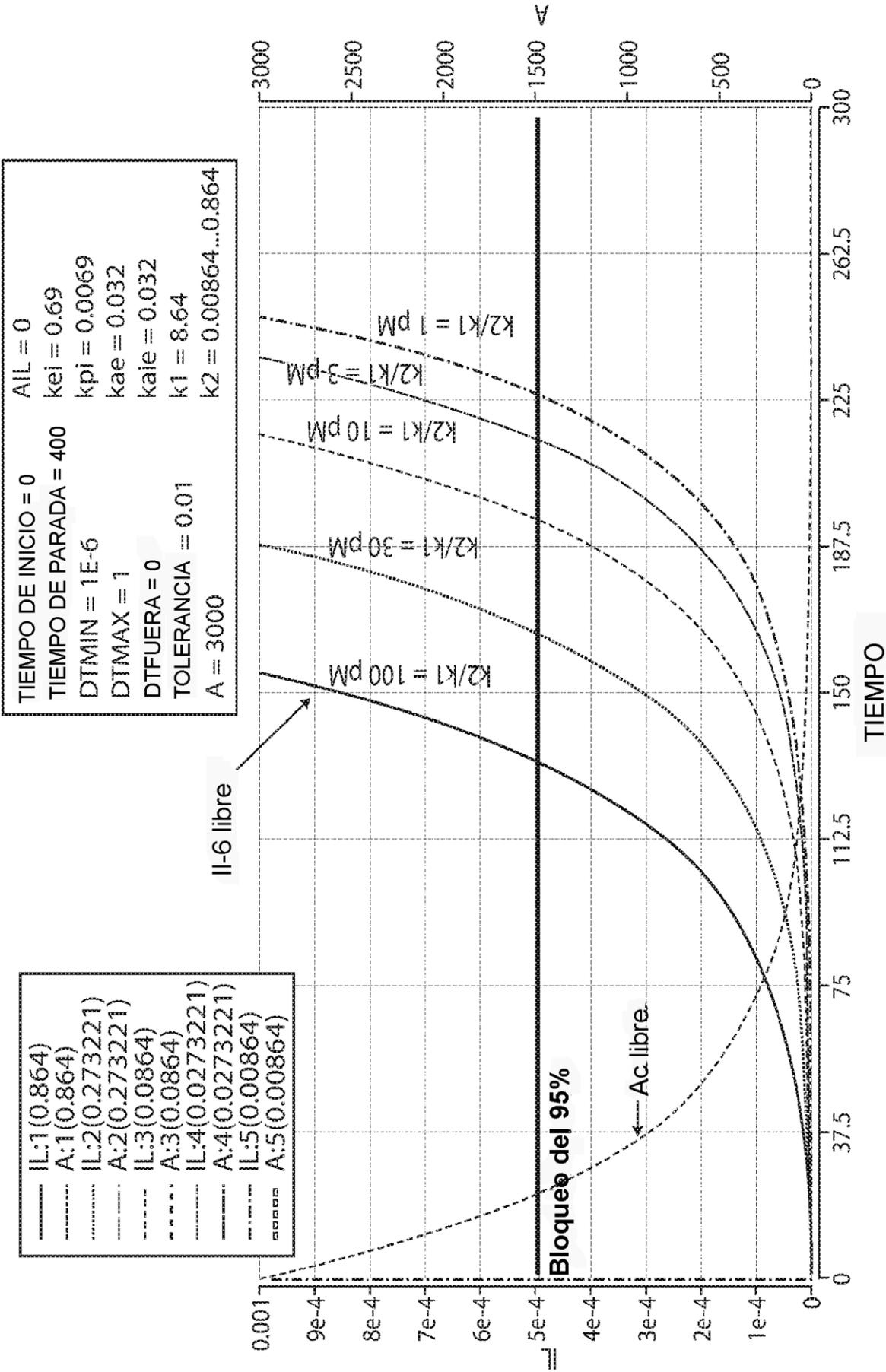


Fig. 10

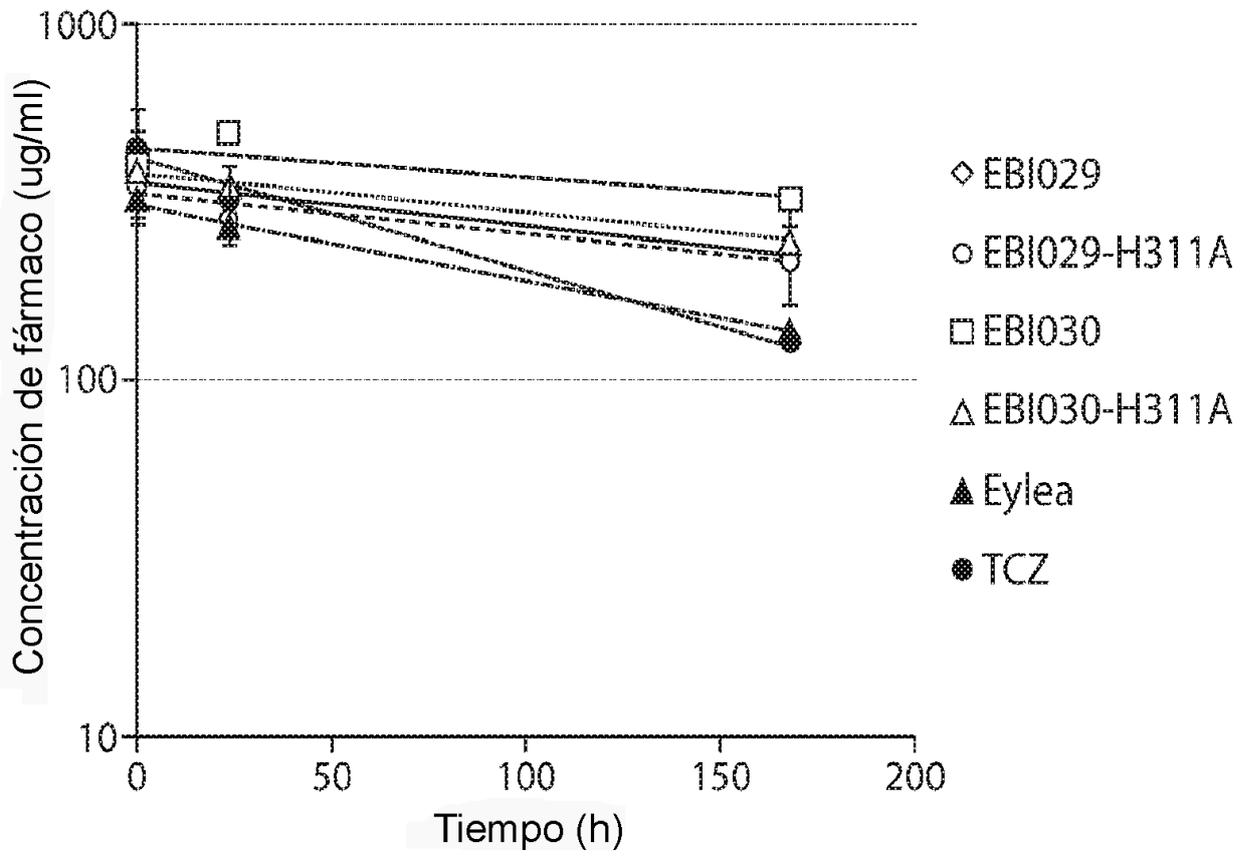
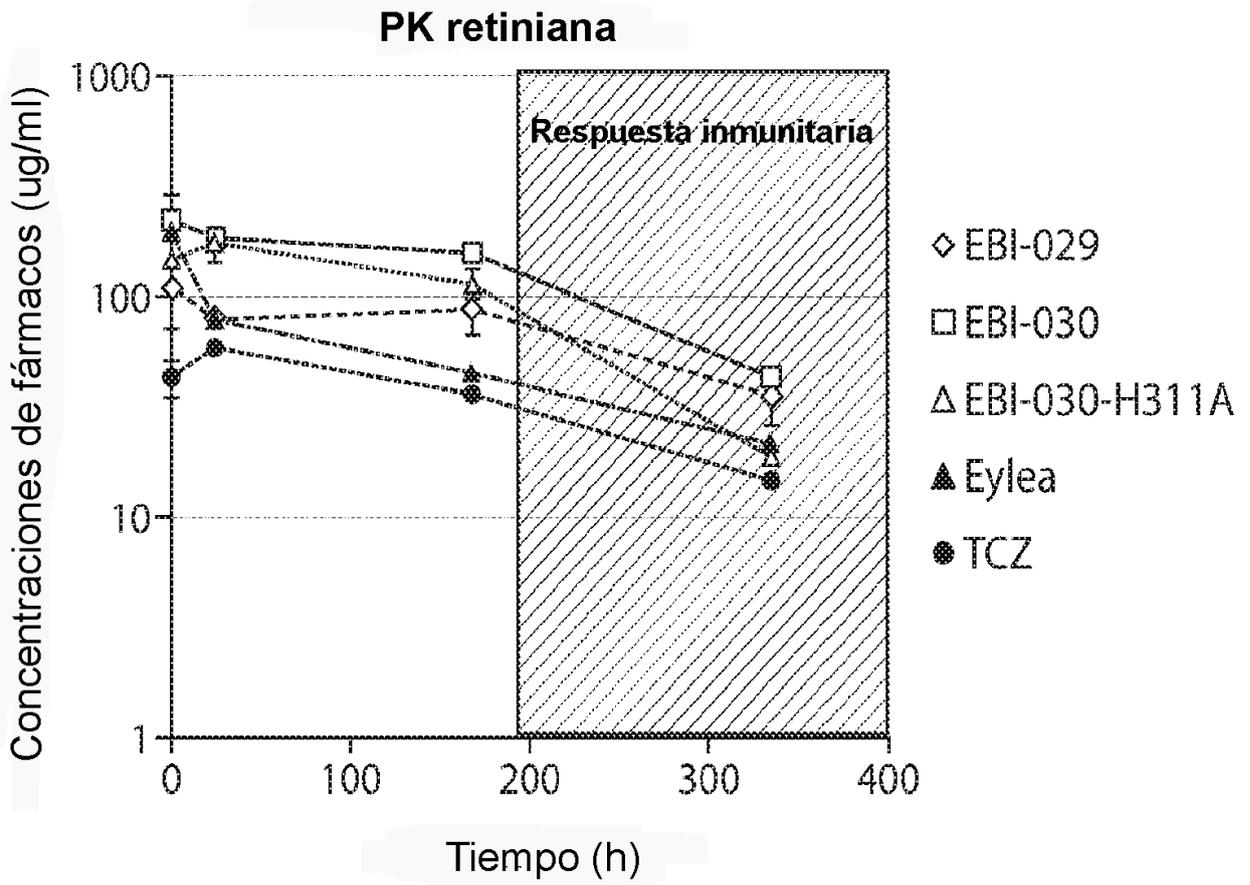


Fig. 11



**Fig. 12**

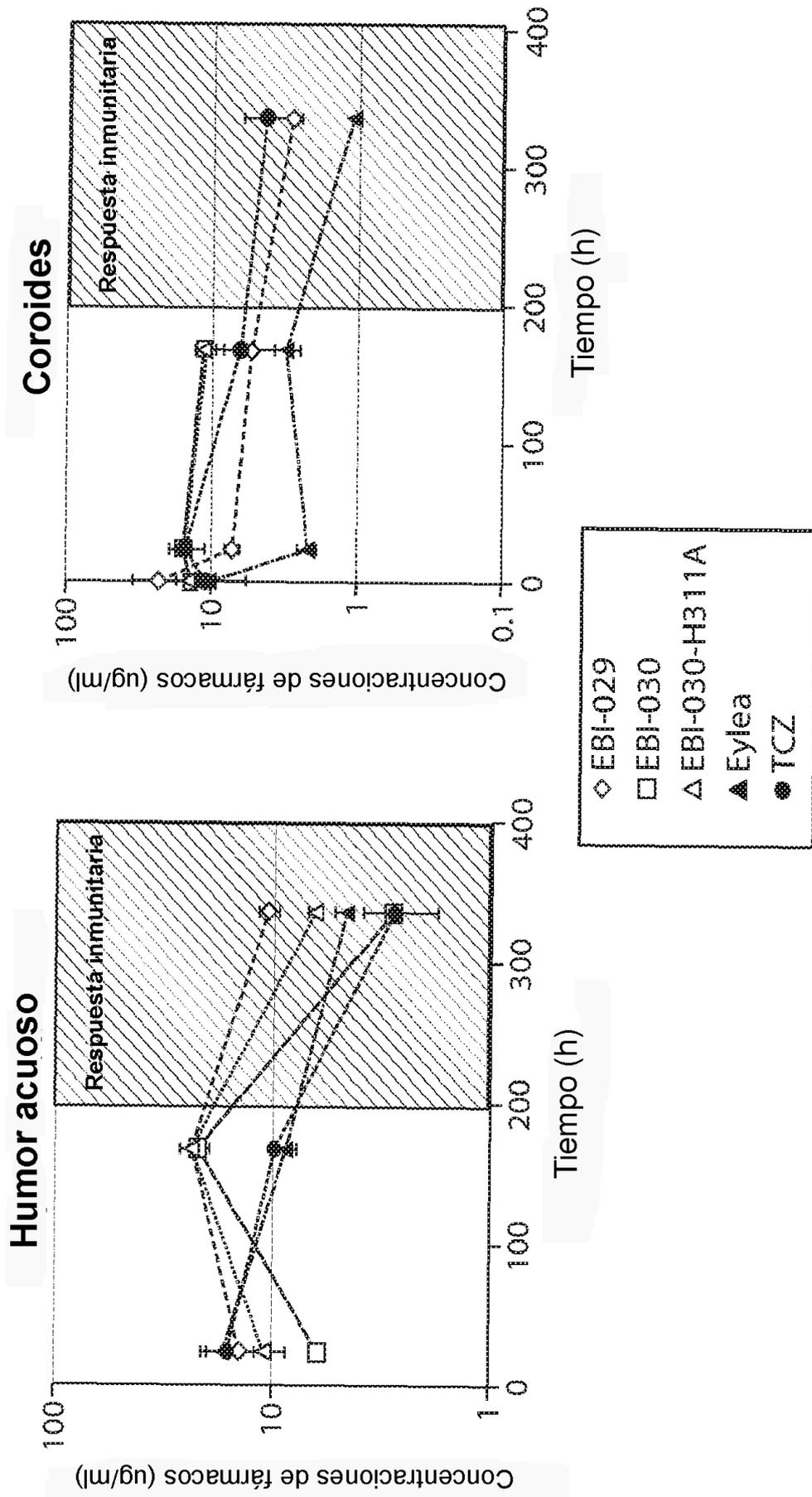
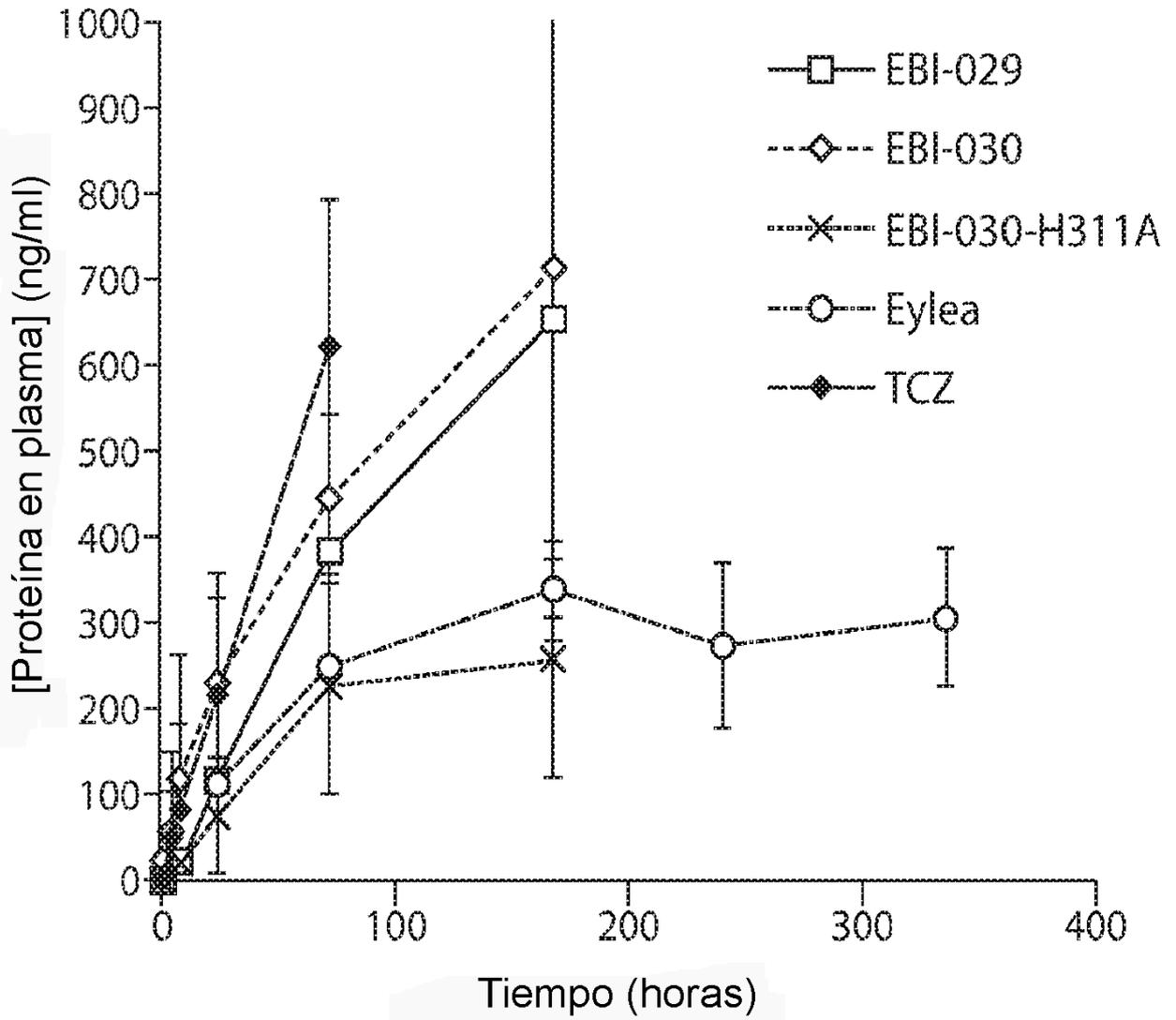


Fig. 13

**Acumulación sistémica después de la administración IVT**



**Fig. 14**

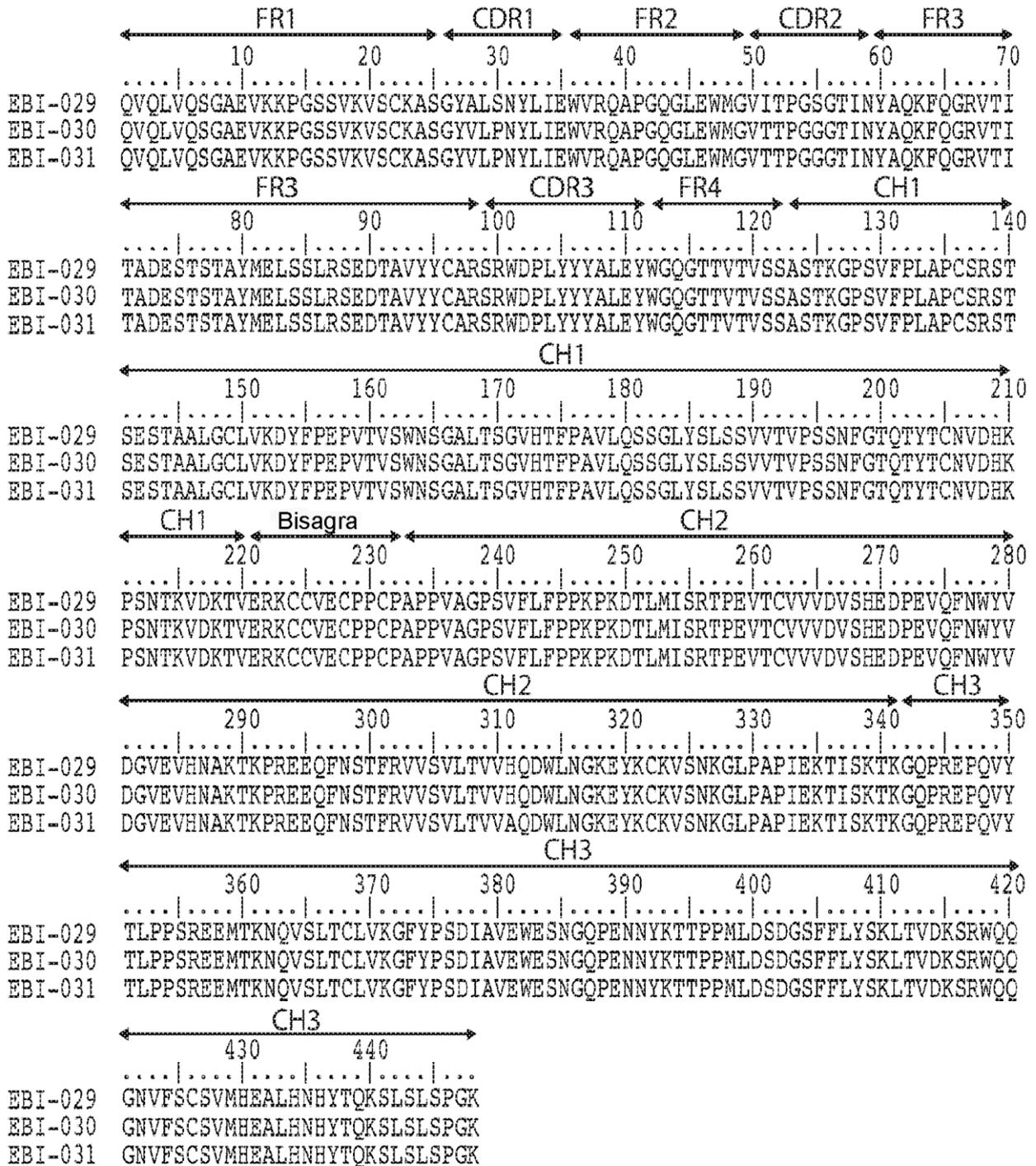


Fig. 15A



**Señalización en cis (IL-6 humana)**

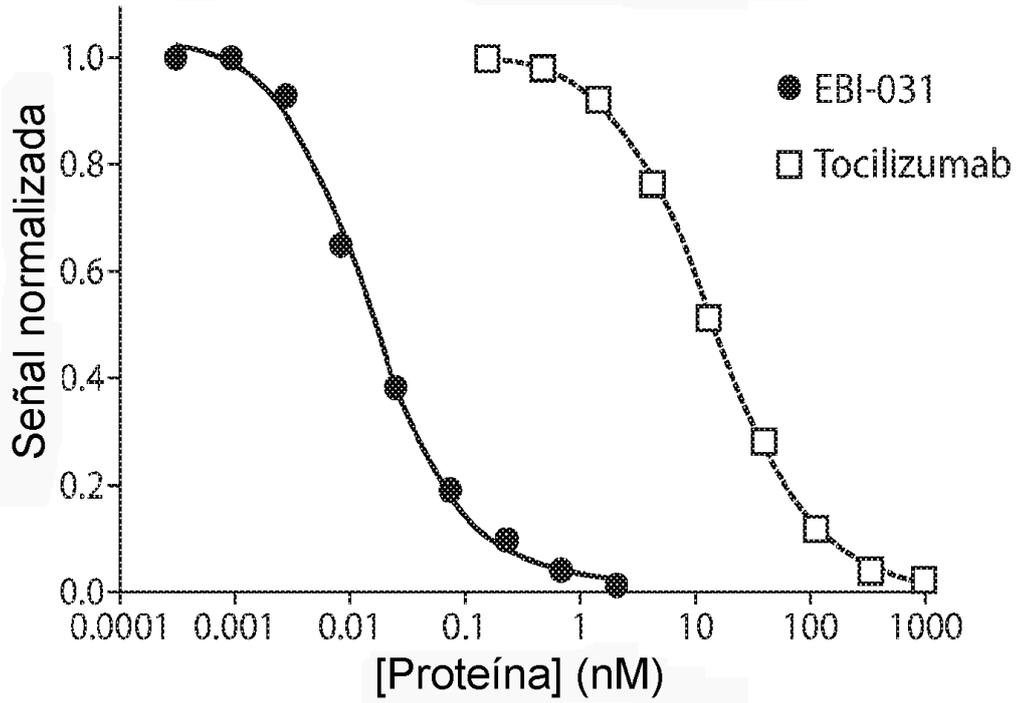


Fig. 16A

**Señalización en trans (IL-6 humana)**

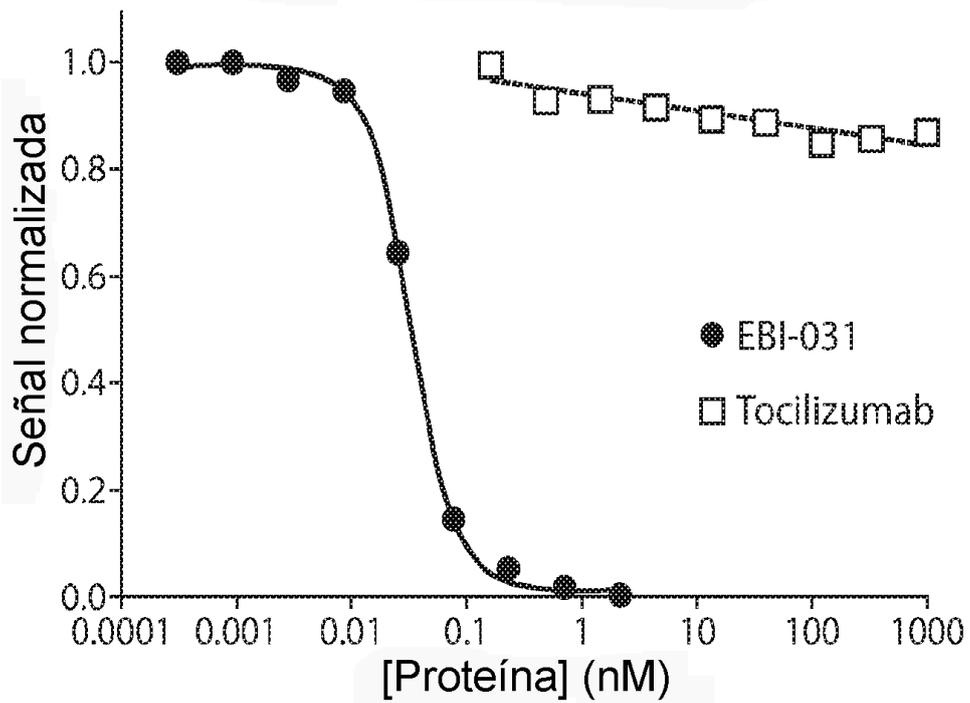


Fig. 16B

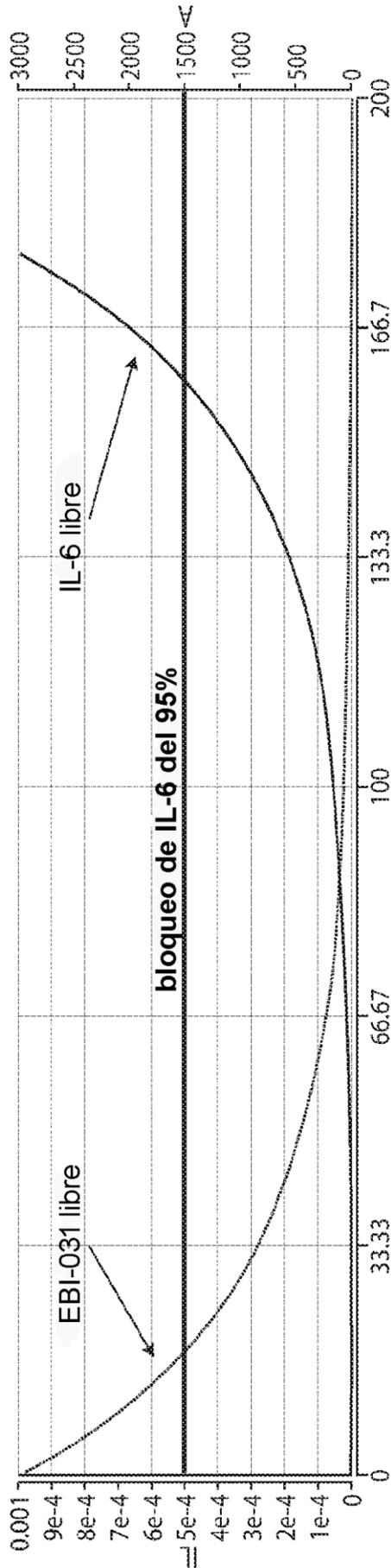


Fig. 17

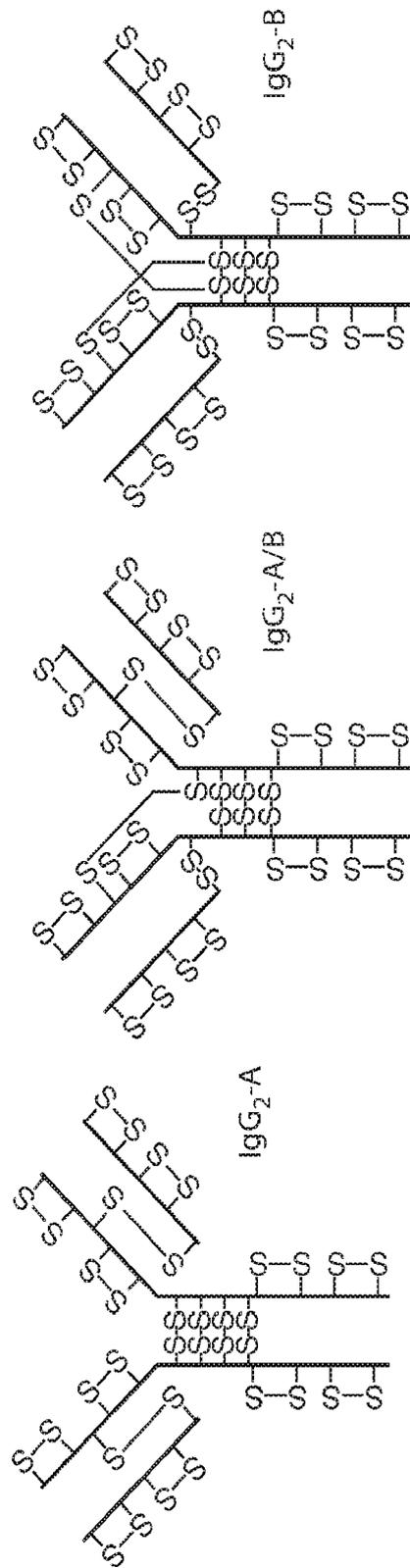


Fig. 18

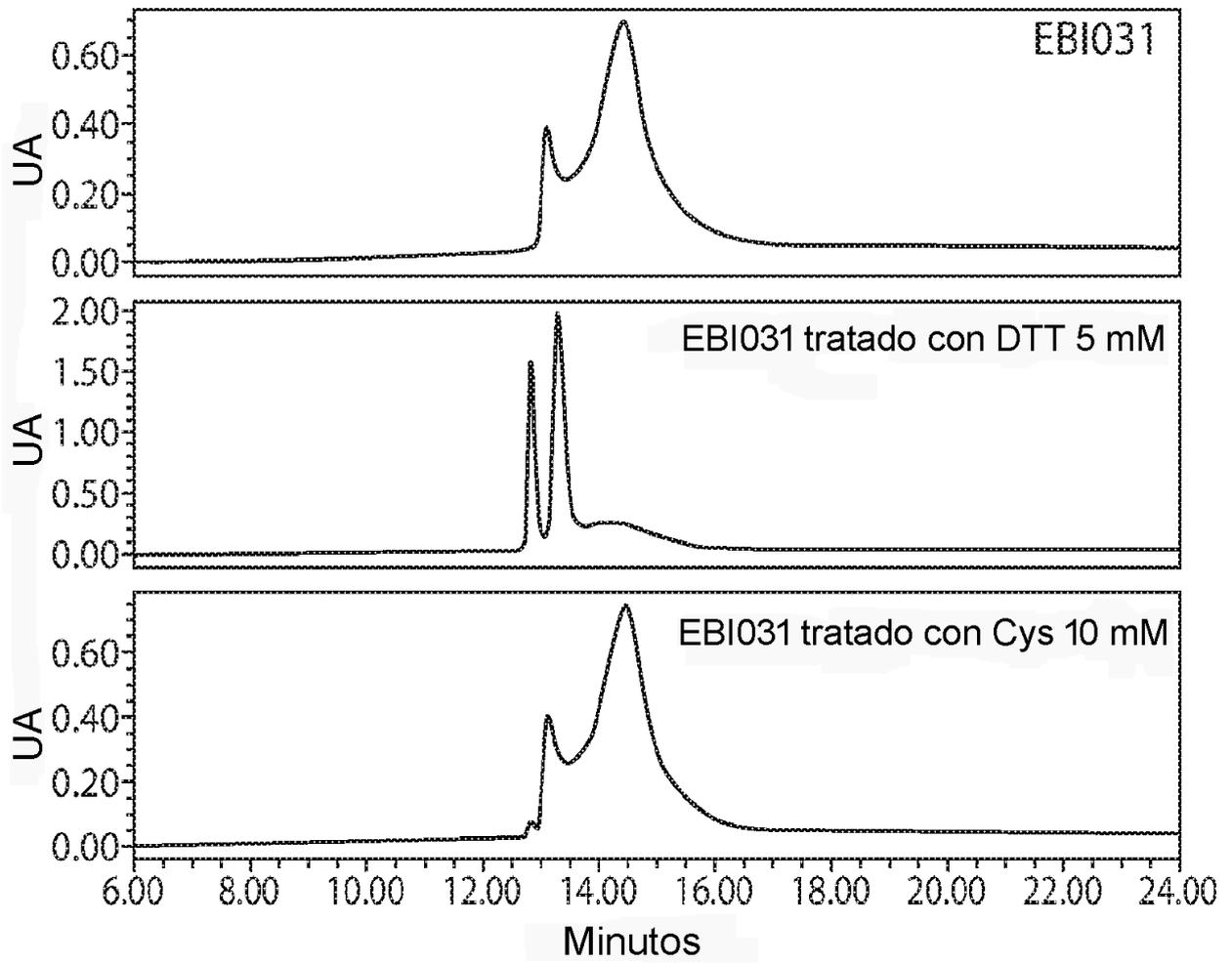


Fig. 19

### RP-HPLC de isoformas de enlaces disulfuro - Comparación de muestras de EBI-031

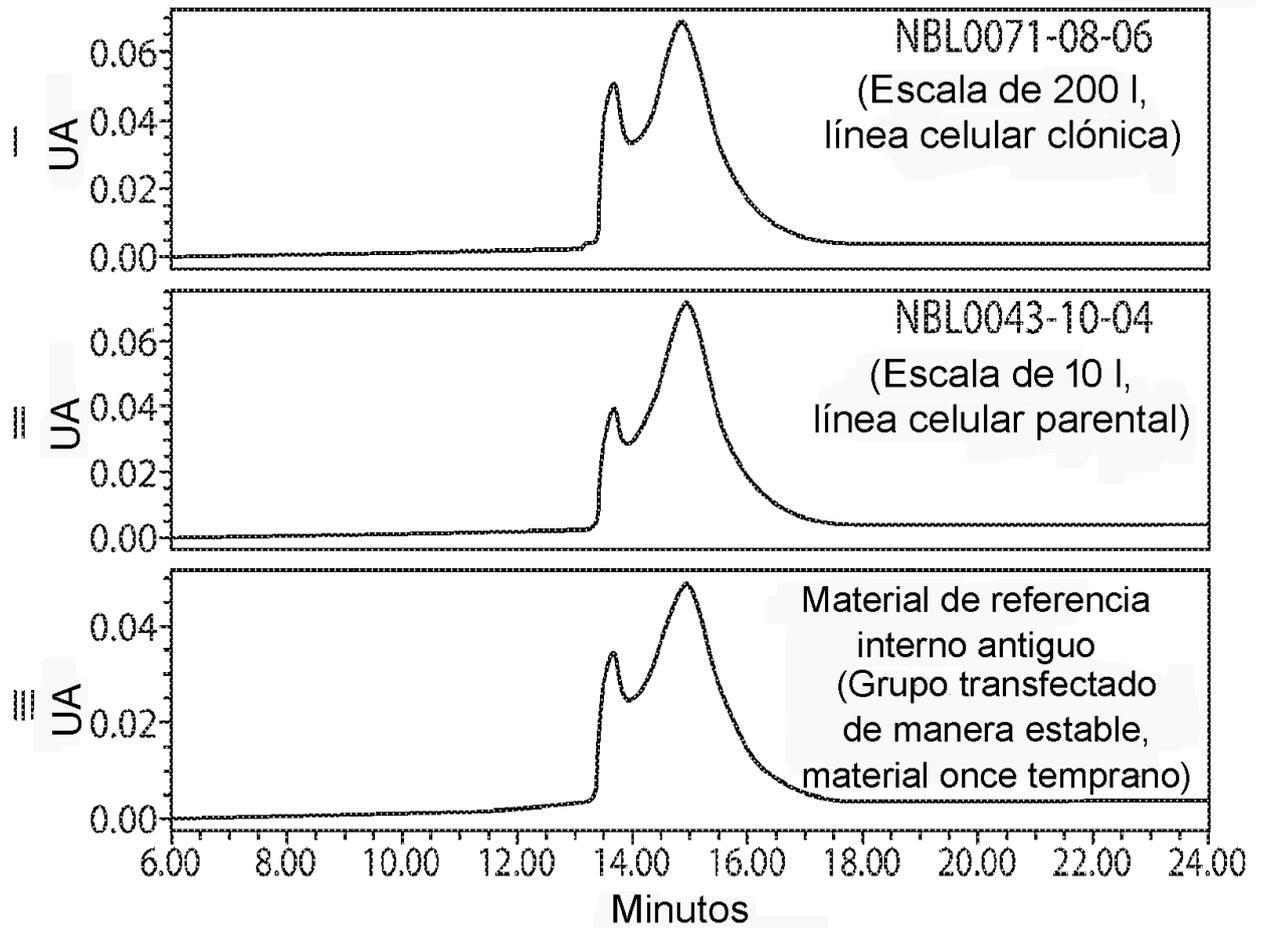
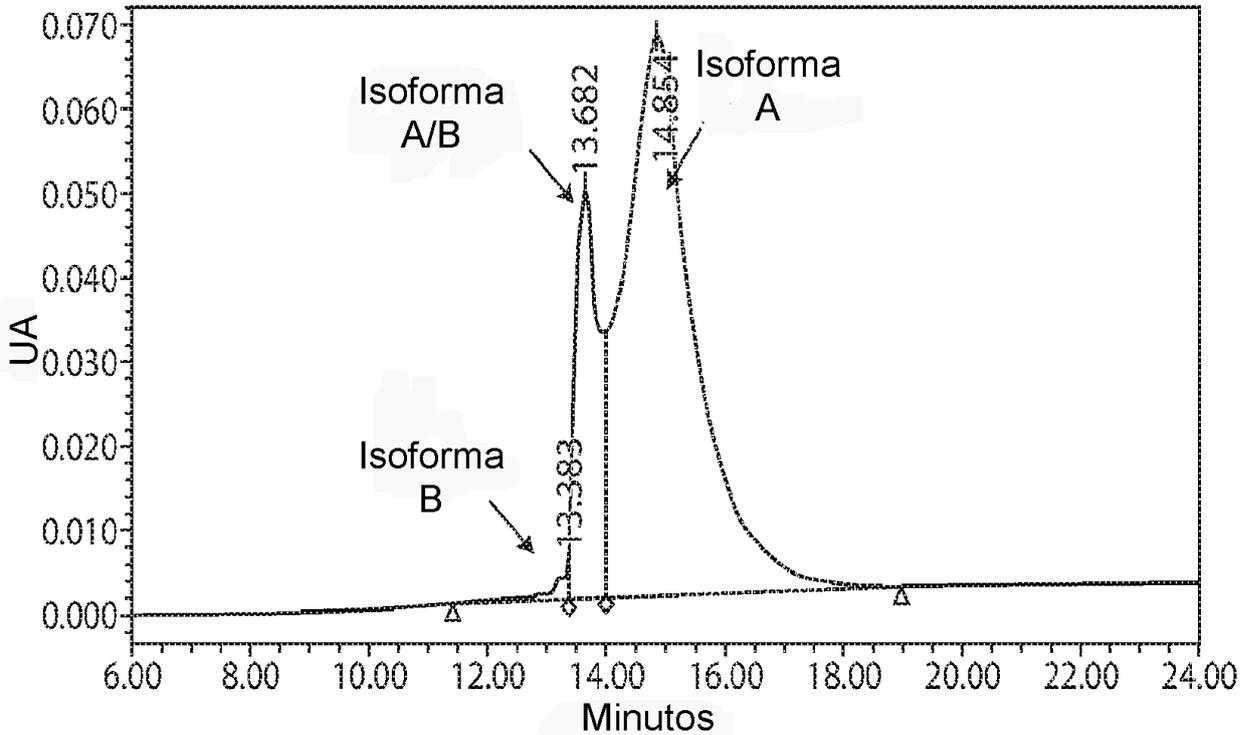


Fig. 20

**RP-HPLC de isoformas de enlaces disulfuro  
de EBI-031 (NBL0071-08-06, BDS de biorreactor  
de 200 l, línea celular clónica)**

NBL0071-08-06



Nombre	TR	Área	% de Área
Isoforma B	13.383	58509	0.85
Isoforma A/B	13.682	1349980	19.67
Isoforma A	14.854	5453505	79.47

Fig. 21

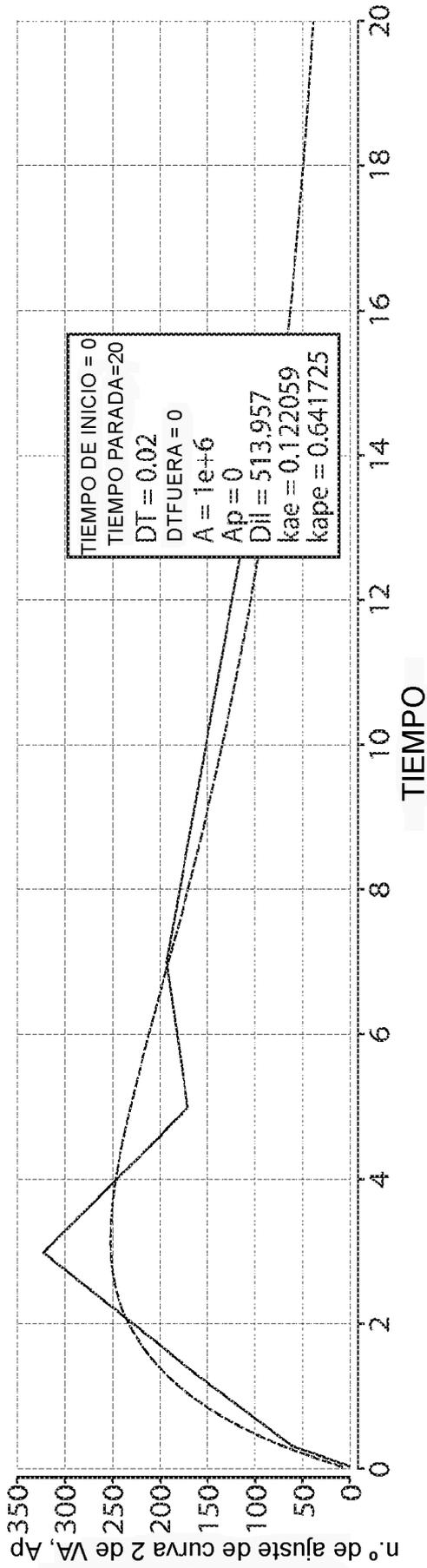


Fig. 22A

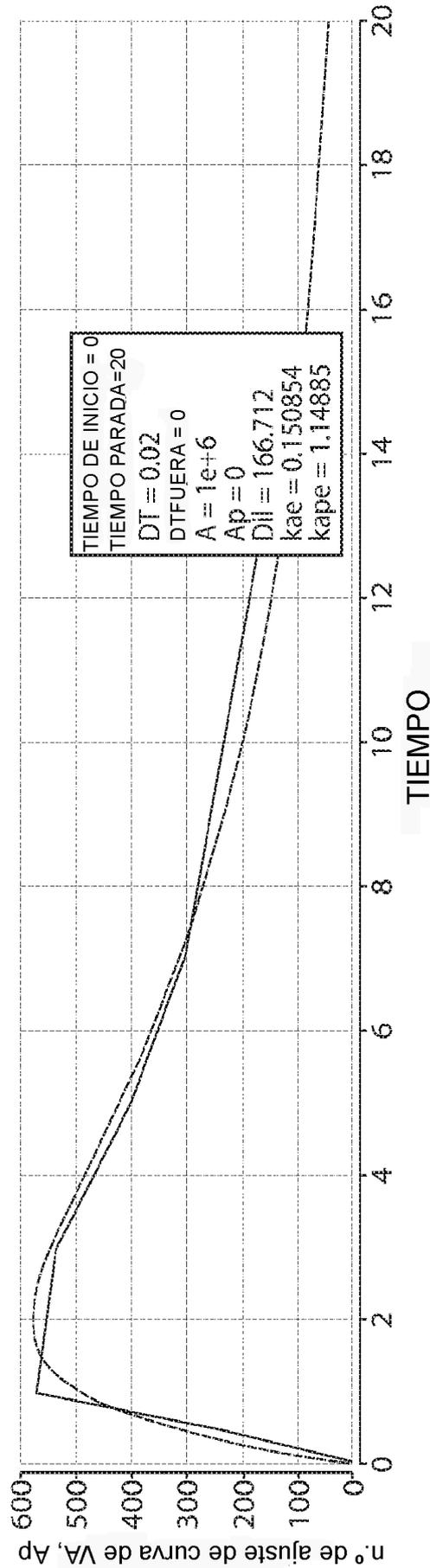


Fig. 22B

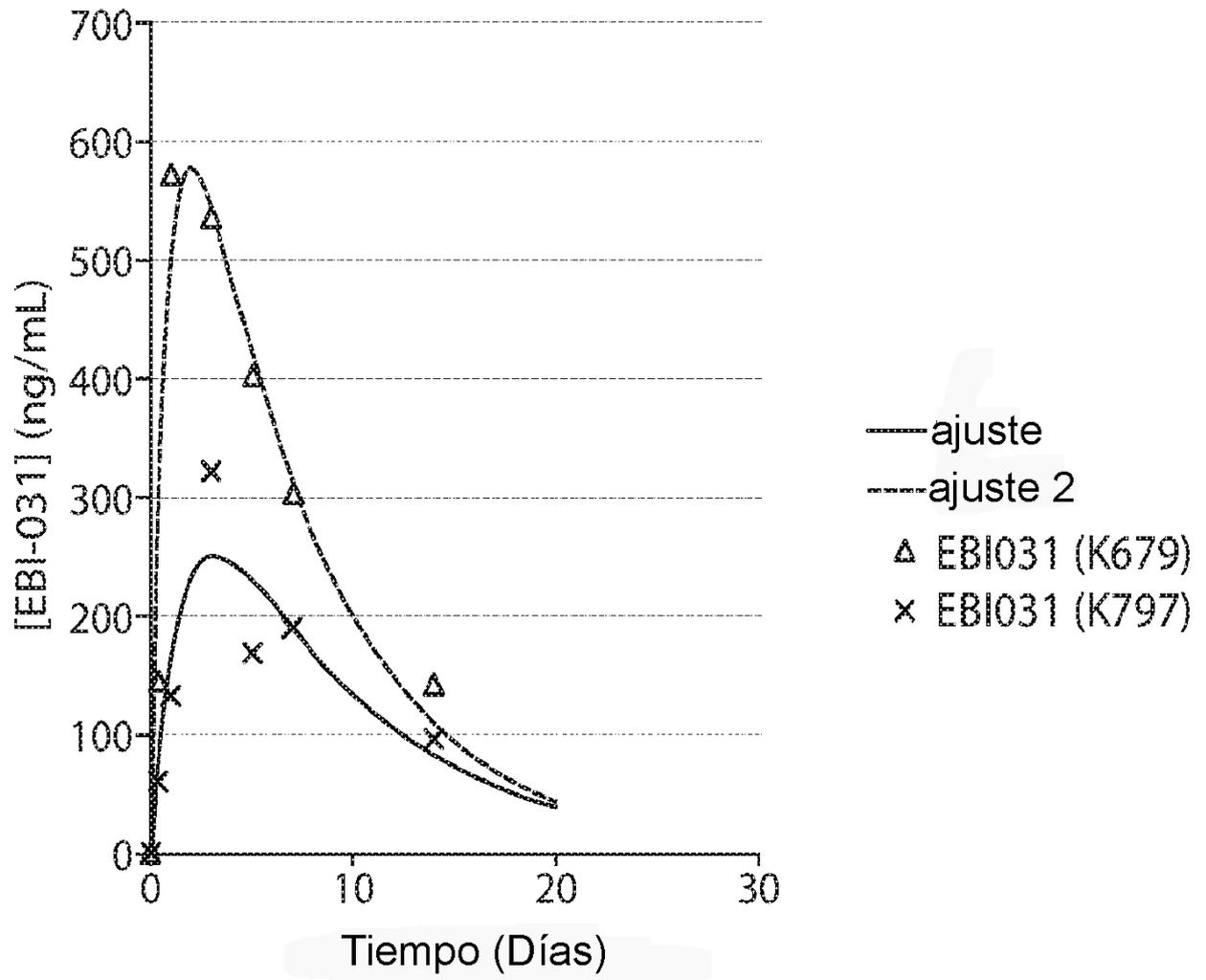


Fig. 23

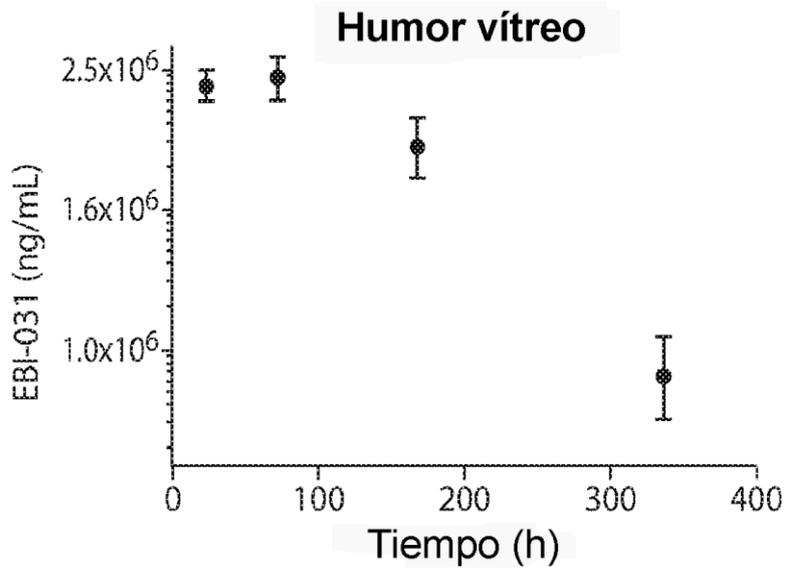


Fig. 24A

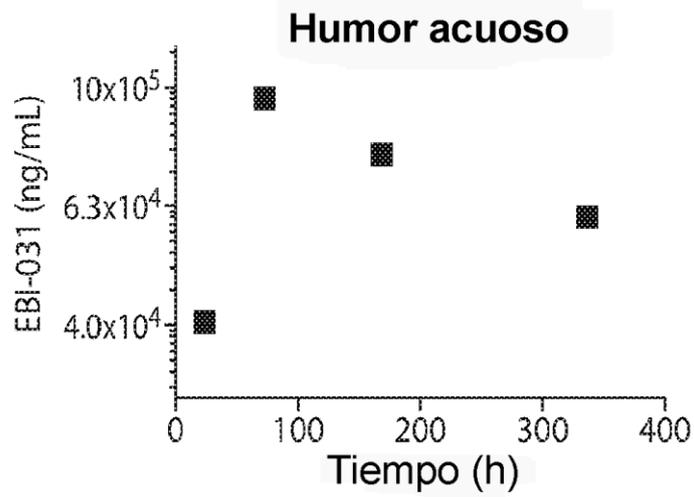


Fig. 24B

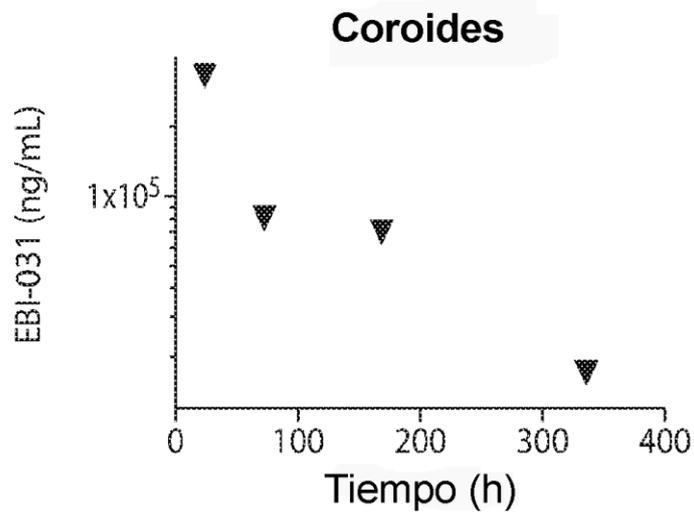


Fig. 24C

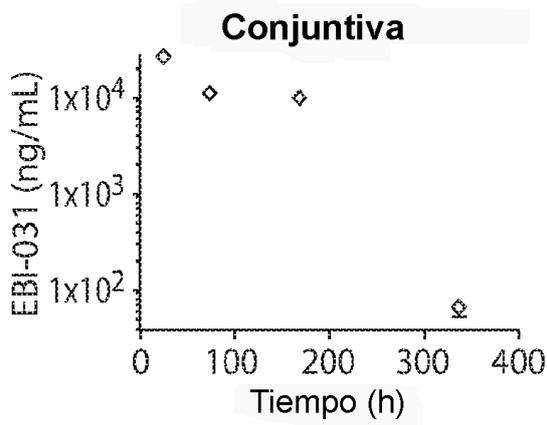


Fig. 24D

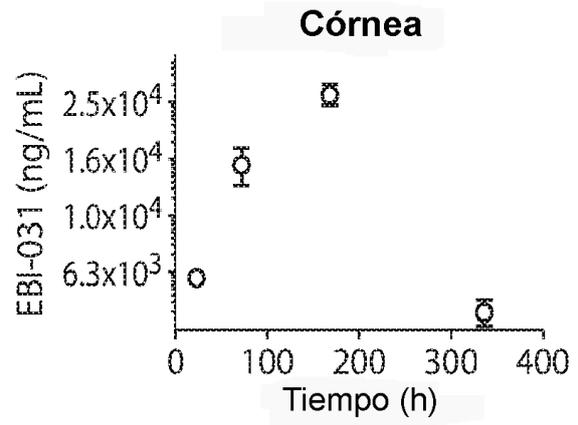


Fig. 24E

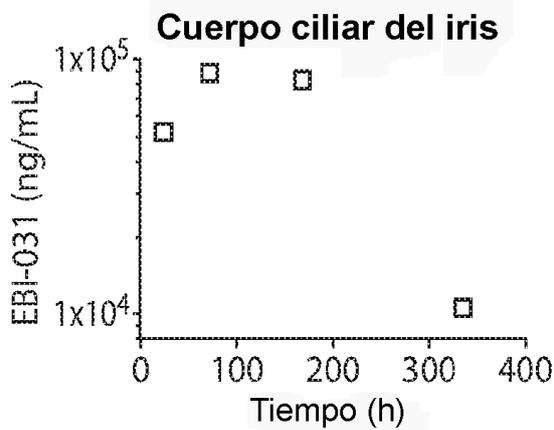


Fig. 24F

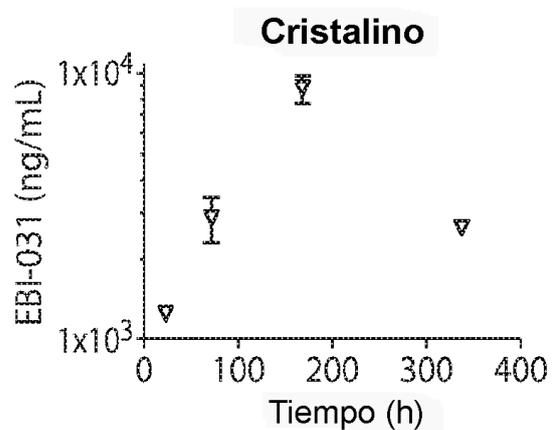


Fig. 24G

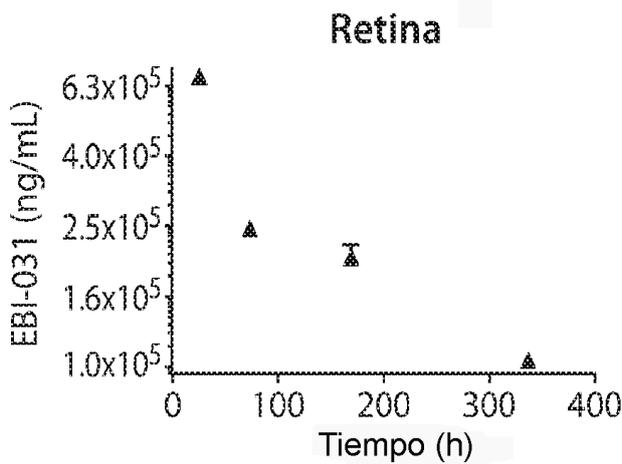


Fig. 24H

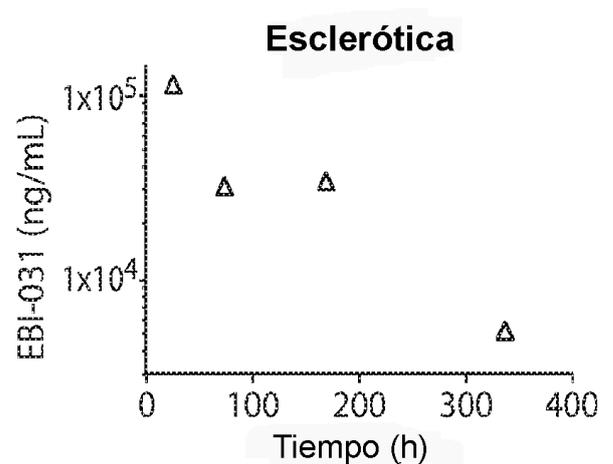


Fig. 24I