(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 369 991**

(51) Int. Cl.:
***C07K 14/435*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **08840471 .0**
(96) Fecha de presentación: **15.10.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2212347**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2010**

(54) Título: **MUTEÍNAS GP130 SOLUBLES CON ACTIVIDAD DE UNIÓN MEJORADA.**

(30) Prioridad:
**19.10.2007 EP 07020512**
**27.05.2008 EP 08009648**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
**09.12.2011**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
**09.12.2011**

(73) Titular/es:
**CONARIS RESEARCH INSTITUTE AG**
**SCHAUENBURGERSTRASSE 116**
**24118 KIEL, DE**

(72) Inventor/es:
**GRÖTZINGER, Joachim;**
**SCHELLER, Jürgen;**
**TENHUMBERG, Stephanie;**
**ROSE-JOHN, Stefan y**
**WÄTZIG, Georg, H.**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 369 991 T3**

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

Muteínas GP130 solubles con actividad de unión mejorada

La presente invención se refiere a muteínas de polipéptidos de glucoproteína gp130 con actividad de unión mejorada para el complejo de ligando que consiste en interleucina 6 (IL-6) y su receptor soluble (sIL-6R). En particular, un dímero polipeptídico que comprende dos muteínas idénticas del dominio extracelular de gp130 (gp130 soluble, sgp130) estando fusionada cada una con un dominio Fc de una proteína IgG (sgp130Fc) muestra bioactividad mejorada. La presente invención también se refiere a un composición farmacéutica que contiene polipéptidos de sgp130 mutados (muteínas de sgp130) o dímeros de los mismos y diversos usos médicos.

La citocina pleiotrópica interleucina-6 (IL-6) muestra un amplio espectro de funciones biológicas entre las que la estimulación de linfocitos B e inducción de síntesis proteica de fase aguda en el hígado son más notables. IL-6 pertenece a la familia de citocinas de paquete de cuatro hélices. La estructura de la citocina consiste en cuatro hélices (A, B, C y D) conectadas por un bucle largo (AB), un bucle corto (BC) y de nuevo un bucle largo (CD). IL-6 señaliza mediante un complejo de IL-6, receptor de IL-6 (IL-6R) y dos moléculas gp130 en la superficie celular (Kishimoto y col. (1995) Blood 86:1243-54). La activación inducida por ligando del complejo conduce a la activación de quinasas Janus (JAK) que se fosforilan a sí mismas y la parte citoplasmática de gp130 (Darnell (1997) Science 277: 1630-5). Las formas solubles de IL-6R (sIL-6R), que se generan por corte y empalme alternativo o supresión también son capaces de desencadenar dimerización de gp130 y señalización cuando forman complejo con IL-6.

Puesto que la parte citoplasmática del IL-6R no contribuye a transducción de señal, la señalización por un homodímero de gp130 puede inducirse por IL-6 en complejo con IL-6R soluble o unido a membrana. La presencia de sIL-6R, sin embargo, conduce a la sensibilización de células sensibles a IL-6 hacia el ligando. Además, las células de hibridoma estrictamente dependientes de IL-6 no proliferan en respuesta a cantidades muy bajas de IL-6 cuando sIL-6R presente en medio de cultivo se retira continuamente.

Además de IL-6, gp130 también se usa por otros miembros de la familia de citocinas de paquete de cuatro hélices tales como IL-11, factor inhibidor de leucemia (LIF), citocina de tipo cardiotropina (CLC), oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotropina-1 (CT-1) y neuropoyetina (NPN) o la citocina recientemente descrita IL-27. Todas estas citocinas actúan mediante un complejo receptor bi o tripartito en el que la señalización se desencadena por homodimerización (para IL-6 e IL-11) o heterodimerización de gp130, por ejemplo con LIF-R (para LIF, CT-1, OSM, CLC y CNTF). Estas citocinas pueden por lo tanto mediar actividades biológicas similares en diversos tejidos.

Aunque gp130 puede hallarse en casi todos los tipos celulares, el IL-6R muestra una expresión mucho más restringida. La liberación de sIL-6R por un tipo celular hace a otras células, que solamente expresan gp130, sensibles a IL-6. Este proceso se denomina trans-señalización. De hecho se han descrito varias actividades celulares que requieren el complejo de sIL-6R e IL-6 y no se observan con IL-6 solamente. En la citocina de diseño Hyper-IL-6 (H-IL-6), el extremo C terminal de sIL-6R se fusiona covalentemente con el extremo N terminal de IL-6 madura por un engarce peptídico flexible (Fischer y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 142-5). Como se ha visto con el complejo de IL-6/sIL-6R, H-IL-6 también actúa en células que solamente expresan gp130. A diferencia de los componentes separados IL-6 y sIL-6R, una concentración de 100- a 1000- veces menor de esta molécula de fusión es suficiente para inducir señales biológicas comparables. IL-11, la otra citocina que señaliza a través de un homodímero de gp130, no muestra trans-señalización, puesto que el receptor de IL-11 no aparece en una forma soluble. Se halla proteína gp130 soluble constitutivamente en concentraciones altas en plasma humano y actúa como un tampón natural e inhibidor de trans-señalización de IL-6.

Para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos, el bloqueo específico de respuestas de IL-6 dependientes de IL-6R soluble puede ser deseable. Tales enfermedades incluyen reabsorción de hueso, hipercalcemia, caquexia, tumores u otros tipos de cáncer (por ejemplo, cáncer de colon, mieloma múltiple, linfoma, leucemia, enfermedad de Hodgkin o enfermedad de Castleman), enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple (MS), diabetes de tipo 1 o lupus eritematoso), enfermedades atópicas o inflamatorias (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, asma, soriasis, sarcoidosis, uveítis o conjuntivitis alérgica), infecciones (por ejemplo, bacterias, virus, hongos u otros patógenos), sepsis, así como trastornos endocrinológicos y enfermedades metabólicas o catabólicas (por ejemplo, diabetes de tipo 2, obesidad, hiperglucemia o hipercolesterinemia). Se ha descubierto que, por ejemplo, los dímeros de sgp130 o dímeros de sgp130Fc son útiles para aplicaciones terapéuticas diseñadas para inhibir las acciones del complejo agonista de IL-6/sIL-6R.

Las regiones de IL-6 que están en contacto con el IL-6R (soluble o unido a membrana) y gp130 se denominan sitio I, II e ITI. IL-6R está unido al sitio I de IL-6. El co-receptor gp130 pertenece a la clase de receptores de citocina altos, que muestran tres dominios de fibronectina (D4-D6) entre los dominios de unión a ligando y la región transmembrana de los receptores (Sprang y Bazan (1993) Curr. Opin. Struct. Biol. 3: 815-27). El domino de unión a ligando de gp130 también consiste en tres dominios (D1-D3): un domino de tipo inmunoglobulina (Ig) N terminal (D1) y dos dominios de tipo fibronectina tipo III (D2 y D3), de los cuales el segundo se denomina el módulo de unión a citocina (Grötzinger y col. (1999) Biol. Chem. 380: 803-13). Mientras que el dominio de tipo Ig N terminal de gp130 está en contacto con el sitio II de IL-6, el módulo de unión a citocina de gp130 se une al sitio II. La estructura

tridimensional del complejo hexamérico $(IL\text{-}6/IL\text{-}6R/gp130)_2$ se ha resuelto (Boulanger y col. (2003) Science 300: 2101-4). Resulta interesante, sin embargo, que el sitio III de IL-6 no se ha resuelto completamente. La parte C terminal de la hélice A y la parte N terminal del bucle AB no se han resuelto, aunque esta región es parte del sitio de interacción entre IL-6 y gp130. Hasta el momento, no se han descrito variantes de gp130 que muestren actividad de unión mejorada.

Por lo tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención es proporcionar muteínas de sgp130 con actividad de unión mejorada, que puede usarse para construir polipéptidos o dímeros de sgp130 terapéuticos, por ejemplo sgp130Fc, con mayor actividad biológica y, por lo tanto, una mayor eficacia terapéutica, dosis terapéuticas menores eficaces y menor coste de productos en la producción farmacéutica.

La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Se seleccionaron tres restos aminoacídicos ($Thr_{102}$, $Gln_{113}$ y $Asn_{114}$) del domino de tipo Ig N terminal de gp130, que apuntan al área de interacción desconocida descrito anteriormente, para mutagénesis para detectar interacciones potencialmente más fuertes (véase esquema de mutación en la Figura 1). Sorprendentemente, se descubrió un aumento aditivo significativo en la actividad de unión y afinidad con tres intercambios de aminoácidos decididamente no conservativos ($Thr_{102}$ mutado a $Tyr_{102}$, abreviado Thr102Tyr o T102Y; $Gln_{113}$ mutado a $Phe_{113}$, abreviado Gln113Phe o Q113F; o $Asn_{114}$ mutado a $Leu_{114}$, abreviado Asn114Leu o N114L), lo que indica que el sitio de interacción de tipo silvestre sólo había evolucionado hasta un nivel de afinidad muy subóptimo para el complejo $IL\text{-}6/(s)IL\text{-}6_R$. Como gp130 se une a múltiples y diversos ligandos, esto puede ser el resultado de un compromiso estructural evolucionado para acomodar todos los ligandos. Además, se demuestra que el efecto de las mutaciones descritas en la presente invención es específico para las estructuras IL-6/(s)IL-6R/gp130 humanas.

**Breve descripción de los dibujos**

Figuras 1: Muteínas de dominio N terminal de gp130

Los restos aminoacídicos $Thr_{102}$, $Gln_{113}$ y $Asn_{114}$ del dominio de tipo inmunoglobulina (Ig) N terminal de gp130 se mutaron. Los cambios no conservativos de $Thr_{102}$ a $Tyr_{102}$ (mutación T102Y), $Gln_{113}$ a $Phe_{113}$ (mutación Q113F) y $Asn_{114}$ a $Leu_{114}$ (mutación N114L) tanto solos como en combinación mejoraron la actividad de unión de los dímeros de sgp130Fc (véase Figura 3).

Figura 2: Gel de poliacrilamida nativo teñido con plata con preparaciones de proteína de tipo silvestre y dímeros de sgp130Fc de muteína

En comparación con sgp130Fc de tipo silvestre, ninguna de las mutaciones que muestra actividad de unión mejorada aumentó la formación de agregados (producto secundario). Se muestran datos representativos para las tres muteínas sencillas (denominadas Thr102Tyr o T102Y; Gln113Phe o Q113F; Asn114Leu o N114L), una muteína doble (Thr102Tyr/Gln113Phe o T102Y/Q113F) y la muteína triple (Thr102Tyr/Gln113Phe/Asn114Leu o T102Y/Q113F/N114L).

Figura 3: Inhibición de proliferación inducida por IL-6/sIL-6R de células BAF3/gp130 por dímeros de sgp130Fc de muteína y tipo silvestre

Las muteínas de sgp130Fc son significativamente más activas biológicamente que sgp130Fc de tipo silvestre en el bloqueo de proliferación de células BAF3/gp130 desencadenada por IL-6 100 ng/ml más sIL-6R 50 ng/ml (A) o Hyper-IL-6 1 ng/ml (B). La $CI_{50}$ de la muteína triple Thr102Tyr/Gln113Phe/Asn114Leu (T102Y/Q113F/N114L) es al menos 3 veces menor que la $CI_{50}$ de tipo silvestre en todos los ensayos.

**(A)** Ensayo MTS colorimétrico.
**(B)** Ensayo de Azul de Titulación Celular Fluorométrica con mayor sensibilidad para ilustrar la coherencia de la actividad diferencial entre muteínas de sgp130Fc a lo largo de casi tres órdenes de magnitud. Abreviaturas y símbolos: Azul de Titulación Celular, resorufina fluorescente (excitación a 530 nm, emisión a 590 nm) como el producto de conversión metabólica del sustrato Azul de Titulación Celular resazurina; $CI_{50}$, concentración con eficacia inhibidora de 50 %; IL-6, interleucina-6; I/R, IL-6 más sIL-6R; MTS, sustrato que se convierte por células metabólicamente activas a un producto de formazán soluble que absorbe a 490 nm; DO, densidad óptica a 490 nm; sIL-6R, receptor de interleucina soluble 6.

Figura 4: Inhibición de la respuesta de fase aguda en un ensayo celular por sgp130Fc de tipo silvestre y muteína T102Y/Q113F/N114L

La respuesta de fase aguda a IL-6/sIL-6R se midió por ELISA de haptoglobina usando sobrenadantes de células de hepatoma HepG2 humano estimuladas con Hyper-IL-6 5 ng/ml. La secreción de haptoglobina se inhibió de forma dependiente de dosis aumentando las cantidades de sgp130Fc de tipo silvestre (sombreado) o la muteína triple T102Y/Q113F/N114L (relleno), que mostraron actividad inhibidora significativamente más fuerte (***, $p<0{,}001$; **, $p<0{,}01$; *, $p<0{,}05$). Abs. [U.A.], absorción a 450 nm.

Figura 5: Constantes cinéticas y afinidades de unión de Hyper-IL-6 con sgp130Fc de tipo silvestre y con la muteína triple T102Y/Q113F/N114L

Las constantes cinéticas se determinaron usando resonancia de plasmón superficial en un sistema de serie de interacción proteica XPR36 ProteOn (Bio-Rad).

Figura 6: Formación de modelo molecular del sitio de interacción de gp130, IL-6 y sIL-6R en un complejo completamente humano o de ratón/humano

En los paneles izquierdos ("humano"), se muestra la interacción entre gp130 de tipo silvestre (wt) humano y Q113F mutante con IL-6 humana y sIL-6R humano. Los paneles derechos ("ratón") muestran las interacciones respectivas con IL-6 y sIL-6R murinos. En el complejo completamente humano, se forma un grupo aromático del que se plantea la hipótesis de que es responsable de la afinidad aumentada de las muteínas que contienen Q113F.

Figura 7: Inhibición de proliferación inducida por IL-6/sIL-6R de células BAF3/gp130: comparación de sgp130Fc de tipo silvestre y la muteína triple T102Y/Q113F/N114L así como IL-6/sIL-6R humano y murino

Proliferación de células BAF3/gp130 y su inhibición por sgp130Fc o muteína T102Y/Q113F/N114L se midió en respuesta al complejo IL-6/sIL-6R murino o humano (ensayo MTS). DO, densidad óptica a 490 nm.

Figura 8: Comparación de sgp130Fc de tipo silvestre y la muteína triple T102Y/Q113F/N114L en el modelo de bolsa de aire murina de inflamación aguda

Se inyectó a ratones C57B1/6 por vía intraperitoneal 10 μg de sgp130Fc de tipo silvestre, 10 μg de muteína T102Y/Q113F/N114L o PBS como un control de vehículo 6 horas antes de la inyección de carragenina. Setenta y dos horas después de la inyección de carragenina, se determinaron los números totales de células (A) y números de neutrófilos y fagocitos mononucleares (B) mediante citometría de flujo. Los niveles de proteínas sgp130Fc recombinantes (C) y la quimiocina MCP-1 (D) en las bolsas de aire inflamadas se midieron mediante ELISA. Todos los valores representan valores medios ± DT de 5-9 animales. MCP-1, proteína quimioatrayente monocítica 1.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende (a) la parte extracelular completa de glucoproteína gp130 o (b) variantes o fragmentos de dicha parte extracelular, en la que dicho polipéptido, variantes o fragmentos son capaces de inhibir la actividad del complejo agonista IL-6/sIL-6R y en la que

- $Thr_{102}$ se sustituye por un resto aminoacídico neutro grande seleccionado de Tyr, Trp, Leu, Ile, Phe o Met, y/o
- $Gln_{113}$ se sustituye por un resto aminoacídico hidrófobo y no polar seleccionado de Phe, Trp, Ile, Leu, Met, Val o Ala, y/o
- $Asn_{114}$ se sustituye por un resto aminoacídico hidrófobo y no polar seleccionado de Phe, Trp, Ile, Leu, Met, Val o Ala.

Estas muteínas del dominio extracelular completo de gp130 o variantes o fragmentos de las mismas están presentes como monómeros o dímeros solubles capaces de inhibir el complejo agonista IL-6/sIL-6R con actividad de unión superior en comparación con gp130 soluble de tipo silvestre y pueden fusionarse directamente o mediante engarces polipeptídicos con un dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina u otros marcadores.

En una realización preferida, la muteína de gp130 soluble de la presente invención comprende al menos una de las siguientes mutaciones en el dominio de tipo Ig N terminal de gp130: $Thr_{102}$ mutado a $Tyr_{102}$ (abreviado Thr102Tyr o T102Y), $Gln_{113}$ mutado a $Phe_{113}$ (abreviado Gln113Phe o Q113F) o $Asn_{114}$ mutado a $Leu_{114}$ (abreviado Asn114Leu o N114L).

El término "soluble" como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido de gp130 que carece del domino intracelular y, preferentemente, el domino transmembrana.

Los monómeros o dímeros de gp130 solubles (sgp130) de la presente invención pueden obtenerse por ingeniería genética usando procedimientos conocidos. Los dominios utilizados pueden consistir en el dominio extracelular completo de gp130 o pueden consistir en variantes o fragmentos adicionales del mismo que mantienen la capacidad para inhibir la actividad del complejo agonista IL-6/sIL-6R. Los fragmentos preferidos son fragmentos que consisten en al menos los dominios extracelulares D1 a D3.

Las realizaciones más preferidas de la muteína de sgp130 de la presente invención comprenden una de las dos mutaciones Gln113Phe (Q113F) o Asn114Leu (N114L).

En una realización particularmente preferida de la muteína de la presente invención, dos de las tres mutaciones Thr102Tyr (T102Y), Gln113Phe (Q113F) o Asn114Leu (N114L) se combinan, dando como resultado las muteínas dobles Thr102Tyr/Gln113Phe (T102Y/Q113F), Thr102Tyr/Asn114Leu (T102Y/N114L) o Gln113Phe/Asn114Leu (Q123F/N114L).

En la realización más preferida de la muteína de la presente invención, las tres mutaciones Thr102Tyr (T102Y),

Gln113Phe (Q113F) y Asn114Leu (N114L) se combinan, dando como resultado la muteína triple Thr102Tyr/Gln113Phe/Asn114Leu (T102Y/Q113F/N114L).

Además, se prefieren polipéptidos de sgp130 mutados, en los que el polipéptido se fusiona directamente o mediante un engarce polipeptídico a un marcador. El término “marcador” significa cualquier polipéptido de origen natural o artificial u otra estructura molecular, que permite la purificación y/o detección del polipéptido de sgp130 mutado y/o mejora adicionalmente las propiedades farmacodinámicas y/o farmacocinéticas del polipéptido de sgp130 mutado. Los engarces polipeptídicos pueden ser completamente artificiales (por ejemplo, que comprenden 2-50 restos aminoacídicos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en glicina, serina, asparagina, treonina y alanina) o adoptarse de proteínas de origen natural.

En una realización preferida adicional de las muteínas de sgp130 de la presente invención, se insertan uno o más sitios de N-glucosilación entre la muteína sgp130, variante o fragmento de la misma y un marcador (por ejemplo, un dominio Fc de inmunoglobulina), entre la muteína de sgp130 y un engarce y/o entre el engarce y el marcador. Los motivos de aminoácidos de los sitios de N-glucosilación con la secuencia principal Asn-X-Ser o Asn-X-Thr dependen del contexto del motivo en la proteína y pueden predecirse y diseñarse por el experto en la materia, por ejemplo usando software libre tal como NetNGlyc (Centro para el Análisis de Secuencia Biológica, Universidad Técnica de Dinamarca). Un elemento de engarce de N-glucosilación preferido para muteínas de la invención es His-Asn-Leu-Ser-Val-Ile.

Otro objeto de la presente invención son formas pegiladas o modificadas químicamente de otro modo de la muteína de sgp130, variante, fragmento o construcción de fusión de la misma. La PEGilación de las moléculas de sgp130 puede llevarse a cabo, por ejemplo, de acuerdo con los procedimientos descritos para IFN-α, IFN-β, IL-15 o IL-2 humanas (Youngster y col. (2002) Curr. Pharm. Des. 8: 2139-57; Grace y col. (2001) J. Interferon Cytokine Res. 21: 1103-15; Pepinsky y col. (2001) J. Pharmacol. Exp. Ther. 297: 1059-66; Pettit y col. (1997) J. Biol. Chem. 272: 2312-8; Goodson y col. (1990) Biotechnology 8: 343-6; Katre (1990) J. Immunol. 144: 209-13).

Cualquier tipo de polietilenglicol es adecuado para la presente invención siempre que el PEG-polipéptido o dímero de PEG-polipéptido aún sea capaz de bloquear respuestas de IL-6 dependientes de sIL-6R que se pueden ensayar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Preferentemente, el polietilenglicol del polipéptido o dímero de polipéptidos de la presente invención es PEG 1000, 2000, 3000, 5000, 10000, 15000, 20000 ó 40000 prefiriéndose particularmente PEG 20000 o 40000.

Para formar un dímero, se enlazan entre sí dos muteínas de sgp130, variantes, fragmentos o construcciones de fusión de las mismas a través de un enlace covalente sencillo, un engarce peptídico flexible o, preferentemente, mediante uno o más enlaces disulfuro. Los engarces peptídicos pueden ser completamente artificiales (por ejemplo, que comprenden 2

- 50 restos aminoacídicos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en glicina, serina, asparagina, treonina y alanina) o adoptarse de proteínas de origen natural. La formación de puentes disulfuro puede conseguirse, por ejemplo, por expresión recombinante como una proteína de fusión de Fc de inmunoglobulina, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica el monómero sgp130Fc contiene uno o más codones que codifican cisteína, preferentemente en la región bisagra del dominio Fc.

La presente invención también se refiere a dímeros polipeptídicos como se ha descrito anteriormente, en los que el polipéptido está fusionado con un dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. La expresión “fusionado (…) con un dominio Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina” comprende todas las clases y subclases de inmunoglobulina. Preferentemente, el compañero de fusión de la muteína de sgp130 consiste en el dominio Fc de una proteína IgG y más preferentemente, de una proteína IgG1. Sin embargo, cualquier parte Fc también puede comprender secuencias de más de una clase o subclase de inmunoglobulina y la selección de motivos de secuencia particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia habitual de la técnica.

Además de o en lugar de una fusión con una parte de Fc de inmunoglobulina, las muteínas de dominio extracelular de gp130 (gp130 soluble) de la presente invención pueden fusionarse con otros polipéptidos de origen natural o artificiales y/o marcadores tales como poli(His), Myc, Strep, poliarginina, Flag, proteína verde fluorescente (GFP) o derivados obtenidos por ingeniería genética de los mismos, TAP, glutatión S-transferasa (GST), HA, péptido de unión a calmodulina (CBP), proteína de unión a maltosa (MBP), V5, VHS, S, virus de la estomatitis vesicular (VSV), Proteína C, Luciferasa, Glu-Glu, E, beta-GAL, T7 u otros epítopos para los que están disponibles anticuerpos u otras moléculas de unión para permitir purificación rápida, detección, por ejemplo en transferencia de Western o ELISA, inmunoprecipitación o agotamiento/bloqueo de la actividad en bioensayos.

Las fusiones de las muteínas de sgp130, preferentemente en el extremo C terminal, o las variantes o fragmentos de las mismas con la región bisagra de una parte Fc de inmunoglobulina o con otros marcadores pueden ser directas o pueden emplear un dominio de engarce polipeptídico flexible de diversas longitudes y combinaciones de aminoácidos. Estos engarces pueden ser completamente artificiales (por ejemplo, que comprenden 2-50 restos aminoacídicos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en glicina, serina, asparagina, treonina y alanina) o adoptarse de proteínas de origen natural. Tales engarces pueden mejorar la flexibilidad y las

propiedades de unión de los monómeros o dímeros de muteína.

Los monómeros y dímeros de muteína de sgp130 de la presente invención se producen preferentemente de forma recombinante mediante el uso de un polinucleótido que codifica dicha muteína, variante, fragmento o construcción de fusión de la misma.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica los polipéptidos de la invención así como vectores, preferentemente vectores de expresión que contienen dichos polinucleótidos y células huésped o sistemas de expresión sin células que contienen tales vectores.

Para la producción de los monómeros y dímeros de muteína de la invención, los polinucleótidos se obtienen de clones existentes, es decir, preferentemente codifican el polipéptido de origen natural o una parte del mismo (para gp130/IL6ST humano: secuencia de GenBank NM_002184 y clones de soporte; para la región constante de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo, IgG1/IGHG1, secuencia de GenBank AK057754). Los polipéptidos codificados por cualquier polinucleótido que hibrida con el complemento del ADN o ARN nativo en condiciones altamente rigurosas o rigurosas moderadas (para las definiciones, véase Sambrook (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory N. Y.) siempre que ese polipéptido mantenga la actividad biológica de la secuencia nativa, también son útiles para producir los monómeros y dímeros de muteína de la presente invención.

Los vectores recombinantes pueden construirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos para el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook (1989), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory N. Y. Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión/huésped para contener y expresar secuencias que codifican la muteína de sgp130, variante, fragmento o construcción de fusión de la misma de la presente invención. Estas incluyen, pero sin limitación, sistema de expresión sin células, tales como el sistema de expresión de germen de trigo *in vitro*; microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido; hongos (por ejemplo levadura) transformados con vectores de expresión fúngicos (por ejemplo, levadura); sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, baculovirus); sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión de virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322); o sistemas de células animales.

En los sistemas bacterianos pueden seleccionarse varios vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para los monómeros y dímeros de muteína de la presente invención. Los vectores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación el vector de expresión pSKK para expresión en bacterias.

En especies de levadura de tipo silvestre o modificadas (por ejemplo, modificadas por glucoingeniería), tales como *Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe* o *Pichia pastoris,* pueden usarse varios vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles o sistemas promotores tales como factor alfa, alcohol oxidasa, PGH, glucosa de tetraciclina, etc; para revisiones, véase Grant y col. (1987) Methods Enzymol. 153: 516-44; Siam y col. (2004) Methods 33: 189-98; Macauley-Patrick y col. (2005) Yeast 22: 249-70, Gellissen y col. (2005) FEMS Yeast Res. 5: 1079-96; Wildt y Gerngross (2005) Nat. Rev. Microbiol. 3: 119-28.

En casos en los que se usan sistemas de expresión vegetales (para revisión, véase, por ejemplo Stoger y col. (2005) Curr. Opin. Biotechnol. 16: 167-73; Gomord y col. (2005) Trends Biotechnol. 23: 559-65), la expresión de secuencias que codifican las muteínas, variantes, fragmentos o construcciones de fusión de las mismas de la presente invención pueden dirigirse por cualquiera de varios promotores. Por ejemplo, pueden usarse promotores virales tales como los promotores 35S y 19S de CaMV solos o en combinación con la secuencia líder omega de TMV (Takamatsu (1987) EMBO J. 6: 307-11). Como alternativa, pueden usarse promotores vegetales tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico (Coruzzi y col. (1984) EMBO J. 3: 1671-80; Broglie y col. (1984) Science 224: 838-43; Winter y col. (1991) Results Probl. Cell Differ. 17: 85-105). Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales por transformación de ADN directa o transfección mediada por patógeno. Tales técnicas se describen en varias revisiones disponibles de forma general (véase, por ejemplo, Hobbs y Murry en McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nueva York, N. Y.; pág. 191-6).

También puede usarse un sistema de células de insecto para expresar los monómeros y dímeros de muteína de la presente invención. Por ejemplo, en un sistema tal, se usa el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes ajenos en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Las secuencias pueden clonarse en una región no esencial del virus, tal como el gen de polihedrina y colocarse bajo el control del promotor de polihedrina. La extracción exitosa de la secuencia de ADN que codifica las muteínas de sgp130, fragmentos, variantes o construcciones de fusión de las mismas, por ejemplo para una proteína de fusión de sgp130Fc, harán al gen de polihedrina inactivo y producirán virus recombinante sin proteína de cubierta. Los virus recombinantes pueden después usarse para infectar, por ejemplo, células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que pueden expresarse los monómeros y dímeros de muteína de sgp130 de la presente invención (Engelhard y col. (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3224-7).

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados, por ejemplo, en

transfección basada en lípidos o transducción viral de las células. En casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, las secuencias que codifican las muteínas de sgp130, fragmentos, variantes o construcciones de fusión de las mismas de la presente invención pueden ligarse a un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que es capaz de expresar los monómeros y dímeros de muteína de la presente invención en células huésped infectadas (Logan y Shenk (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 3655-9). Además, pueden usarse potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador de virus de sarcoma de Rous (VSR) para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

Después de la introducción del vector o vectores recombinantes, las células huésped se cultivan en un medio selectivo que selecciona el crecimiento de células que contienen vector. Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estos incluyen, pero sin limitación, los genes de timidina quinasa del virus de herpes simple (Wigler y col. (1977) Cell 11: 223-32) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col. (1980) Cell 22: 817-23) que pueden emplearse en células tk.sup.o aprt.sup., respectivamente. También pueden usarse resistencia a antimetabolitos, antibióticos o herbicida como la base para la selección; por ejemplo, *dhfr* que confieren resistencia a metotrexato (Wigler y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3567-70); *npt*, que confieren resistencia a los aminoglucósidos neomicina y G-418 (Colbere-Garapin y col. (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14); y *als* o *pat*, que confieren resistencia a clorsulfurón y fosfinotricina acetiltransferasa, respectivamente. Se han descritos genes seleccionables adicionales, por ejemplo, *trpB*, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano o *hisD,* que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina (Hartman y Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 8047-51). El uso de marcadores visibles ha obtenido popularidad con tales marcadores como antocianinas, betaglucuronidasa y su sustrato GUS y luciferasa y su sustrato luciferina, usándose ampliamente no solamente para identificar transformantes, sino también para cuantificar la cantidad de expresión proteica transitoria o estable atribuible a un sistema de vector específico (Rhodes y col. (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-31).

La purificación de los polipéptidos recombinantes se lleva a cabo por uno cualquiera de los procedimientos conocidos para este fin, es decir, cualquier procedimiento convencional que implique extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis o similares. Un procedimiento de purificación adicional que puede usarse es cromatografía de afinidad usando, por ejemplo, Proteína A, Proteína G o anticuerpos monoclonales, que se unen al polipéptido o polipéptidos diana y que se producen e inmovilizan en una matriz de gel contenida dentro de una columna. Se pasan preparaciones impuras que contienen el polipéptido recombinante a través de la columna. El polipéptido se unirá a la columna por la interacción específica con la matriz de gel de afinidad mientras que las impurezas la atravesarán. Después de lavar, el polipéptido se eluye del gel por un cambio en pH o fuerza iónica y después, si se produce como el monómero, se dimeriza y, si se desea, se PEGila.

En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento para producir los monómeros de muteína de sgp130 y dímeros de la presente invención, que comprende un sistema de expresión sin células o cultivar una célula huésped transformada con una secuencia de ADN que codifica una muteína de gp130, fragmento, variante o construcción de fusión de la misma y que recupera el monómero o dímero de muteína de dicho sistema, célula huésped o el cultivo.

Los monómeros y dímeros de muteína de sgp130 de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o prevención de todas las patologías, en las que la actividad del complejo agonista IL-6/slL-6R debería inhibirse. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de monómeros o dímeros de muteína de sgp130 de la presente invención, preferentemente combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. “Farmacéuticamente aceptable” pretende abarcar cualquier vehículo, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no sea tóxico para el huésped al que se administra. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden formularse por procedimientos convencionales y pueden administrarse al sujeto en una dosis eficaz.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad del principio activo que es suficiente para afectar al transcurso y la gravedad de la enfermedad, lo que conduce a la prevención, reducción o remisión de dicha patología.

Una dosis eficaz útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos puede determinarse usando procedimientos conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo Fungl y col., The Pharmocological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, pág. 1-46 (1975)).

La administración de las composiciones puede efectuarse por diferentes vías, por ejemplo por administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intraarticular, peroral, pulmonar, inhalante, nasal, rectal, vaginal, tópica o intradérmica. El régimen de dosificación se determinará por el médico a cargo y otros factores clínicos. Como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, área de superficie corporal, edad, sexo, el compuesto particular a administrar, el momento y vía de administración, el tipo de terapia, salud general y otros

fármacos que se administren simultáneamente.

La presente invención también se refiere al uso de monómeros y dímeros de muteína de sgp130 como se han definido anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno en la que el bloqueo del complejo agonista IL-6/sIL-6R tiene un efecto beneficioso.

Los usos médicos preferidos de los monómeros y dímeros de muteína de la presente invención son el tratamiento/prevención de reabsorción de hueso, hipercalcemia, caquexia, tumores u otros tipos de cáncer (por ejemplo, cáncer de colon, mieloma múltiple, linfoma, leucemia, enfermedad de Hodgkin o enfermedad de Castleman), enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, diabetes de tipo 1 o lupus eritematoso), enfermedades inflamatorias o atópicas (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, asma, soriasis, sarcoidosis, lupus eritematoso, uveítis o conjuntivitis alérgica), infecciones (por ejemplo, por bacterias, virus, hongos u otros patógenos), sepsis, así como trastornos endocrinológicos y enfermedades metabólicas o catabólicas (por ejemplo, diabetes de tipo 2, obesidad, hiperglucemia o hipercolesterinemia).

Finalmente, la presente invención proporciona un anticuerpo que es capaz de unirse a un polipéptido de la presente invención y que es específico para el motivo o los motivos peptídicos mutados o la región de engarce específica de dicho polipéptido. El término “anticuerpo” usado en este contexto, preferentemente, se refiere a preparaciones de anticuerpo monoclonal distintas. Se preparan anticuerpos monoclonales contra (a) motivo o motivos peptídicos mutados o la región de engarce específica de dicho polipéptido usando fragmentos apropiados de estos péptidos/polipéptidos como un antígeno por procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Köhler y col. (1975) Nature 256: 495-7). Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” (Ab) o “anticuerpo monoclonal” (Mab) pretende incluir moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpos (tales como, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab’)2) que son capaces de unirse específicamente a proteínas. Los fragmentos Fab y F(ab’)2 carecen del fragmento Fc de anticuerpos intactos, se eliminan más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica de tejido que un anticuerpo intacto (Wahl y col. (1983) J. Nucl. Med. 24: 316-25). Por lo tanto, se prefieren estos fragmentos, así como los productos de una biblioteca de expresión de Fab u otra inmunoglobulina. Además, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados. Tales anticuerpos podrían ser útiles para diferentes fines, por ejemplo, permitir la purificación rápida, detección, por ejemplo en transferencia de Western o ELISA, inmunoprecipitación o agotamiento/bloqueo de actividad en bioensayos.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un procedimiento de diagnóstico *in vitro* que se basa en la detección de la unión específica de un anticuerpo de la invención con un polipéptido de la invención.

Los ejemplos a continuación explican la invención en más detalle.

**Ejemplo 1**

**Construcción y producción de muteínas de sgp130Fc**

(A) Material

Los componentes del sistema de clonación Gateway (Pfx ADN Polimerasa AccuPrime, el vector donador pDONR221, el vector de expresión controlada de promotor de CMV pcDNA-DEST40, BP y LR recombinasa para transferencia de inserto y células *E. coli* competentes) se obtuvieron de Invitrogen (Karlsruhe, Alemania). Se obtuvieron kits de mutagénesis dirigida QuikChange II y QuikChange Multi de Stratagene (Ámsterdam, Países Bajos). Los cebadores de mutagénesis purificados PAGE fueron de Microsynth (Balgach, Suiza). Las células CHO-K1 se obtuvieron de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (Braunschweig, Alemania). Los componentes del medio de cultivo se obtuvieron como sigue: medio F12 de Ham, FBS de IgG bajo y PBS de Dulbecco (PAA Laboratories; Cölbe, Alemania), FBS (Biochrom; Berlín, Alemania), solución de Tripsina/EDTA (Invitrogen) y solución G418 (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Alemania). El reactivo de transfección Lipofectamine 2000 fue de Invitrogen. Santa Cruz (Heidelberg, Alemania) proporcionó Proteína A/G Más Agarosa para inmunoprecipitación. Para la detección primaria en transferencias de Western, se usó un anticuerpo monoclonal anti-IgG humano (Fc) de ratón (CBL102; Chemicon; Hofheim, Alemania). Se realizó detección secundaria por transferencia de Western con un anticuerpo ligado a HRP anti-IgG de ratón, sustrato de transferencia de Western ECL-Plus e Hyperfilm ECL (todos de GE Healthcare; Múnich, Alemania). Se obtuvieron frascos rotatorios (2,1 l, superficie 2,5 X) de Greiner Bio-One (Frickenhausen, Alemania). Se obtuvieron filtros de acetato de celulosa (0,45 µm) para una unidad de filtro al vacío de Sartorius (Göttingen, Alemania). La matriz de afinidad de proteína Mab-Select (código de producto 17-5199-01) en una columna XK16/20 y se obtuvieron columnas de desalación PD-10 de GE Healthcare (Múnich, Alemania). Las unidades de concentración de membrana Ultracel-PL de 50 kDa Amicon Ultra-15 se obtuvieron de Millipore (Eschborn, Alemania). La solución de acrilamida-bis preparada (19:1, 30 %) para PAGE se proporcionó por Bio-Rad (Múnich, Alemania).

(B) Construcción de muteínas de sgp130Fc

Se sintetizó un ADNc para sgp130Fc de longitud completa que comprendía el domino extracelular completo de

gp130 y el Fc IgG1 humano de tipo silvestre (fuentes: para gp130/IL6ST: secuencia de GenBank NM_002184 y clones de soporte; para la región constante de IgG1/IGHG1 humano: por ejemplo, secuencia de GenBank AK057754) y se optimizaron sus codones para expresión en células CHO-K1 y se subclonaron en pDONR221 usando cebadores Gateway, Pfx ADN Polimerasa AccuPrime y BP recombinasa en un procedimiento de clonación Gateway convencional. El inserto subclonado se verificó con respecto a su secuencia completamente usando cebadores de secuenciación directos e inversos apilados cada 250 - 300 pb. En mutagénesis dirigida múltiple usando los kits QuikChange Multi y QuikChange II, los tres restos aminoacídicos de gp130 $Thr_{102}$, $Gln_{113}$ y $Asn_{114}$ se mutaron de acuerdo con el esquema de mutación representado en la Figura 1. Los clones mutados se verificaron por secuenciación completa como se ha descrito anteriormente. Posteriormente, el inserto se transfirió al vector de expresión pcDNA-DEST40 por recombinación LR Gateway. Como el inserto codifica dos codones de parada después de la parte Fc, los marcadores codificados en pcDNA-DEST40 (V5 y epítopos 6xHis) no están presentes en las muteínas. Los clones positivos se identificaron por digestión de restricción con *Alw*NI y la secuencia se verificó de nuevo.

(C) Cultivo celular y transfección

Se cultivaron células CHO-K1 en medio F12 de Ham complementado con FBS 10 % a 37 ºC y $CO_2$ 5 % en una atmósfera saturada de agua. Los cultivos de mantenimiento se separaron cada 3-4 días y se usaron solamente hasta 20 pases. Las células se transfectaron con las construcciones de expresión usando Lipofectamine 2000 y condiciones convencionales para CHO-K1 proporcionadas por Invitrogen. Para un primer ensayo de expresión transitorio, las células CHO-K1 se transfectaron en placas de 6 pocillos y se recogieron tanto células como sobrenadantes 24 horas después de la transfección. sgp130Fc o las muteínas de sgp130Fc se inmunoprecipitaron a partir de los sobrenadantes usando Proteína A/G Más Agarosa de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se extrajo proteína celular completa y se realizaron transferencias de Western con anticuerpo anti-IgG humano (Fc) con los lisados celulares e inmunoprecipitados como se describe en Waetzig y col. (2002) J. Immunol. 168: 5342-51.

(D) Producción de sgp130Fc y muteínas de sgp130Fc en células CHO-K1

Después de expresión transitoria exitosa, las células CHO-K1 se transfectaron y se seleccionaron clones positivos usando G418 400 μg/ml en placas de cultivo celular de 10 cm. Para determinar la cualidad y propiedades del producto, se transfirió un conjunto de CHO-K1 policlonales preseleccionadas a frascos rotatorios y se cultivaron con FBS de IgG bajo. Se recogieron los sobrenadantes de las células confluyentes 3 veces por semana, se centrifugaron durante 20 minutos a 500 x *g* y 4 ºC para retirar las células y 40 min a 3.500 x *g* y 4 ºC para retirar los residuos y se procesaron inmediatamente o se congelaron a -80 ºC. En paralelo, se seleccionaron clones celulares estables del grupo preseleccionado usando un procedimiento de dilución limitada y se caracterizaron por análisis de expresión de transferencia de Western como se ha descrito anteriormente. Los clones con la expresión más alta y más estable se transfirieron a frascos rotatorios y se usaron para producción permanente.

(E) Purificación de cromatografía de afinidad y control de calidad

Se purificaron sobrenadantes que contenían sgp130Fc- o muteína sgp130Fc a partir de cultivos de frascos rotatorios a 4 ºC usando una goma peristáltica P-1 y un Sistema ÄKTA Purifier 100 (ambos de GE Healthcare; Múnich, Alemania). El protocolo se basó en las recomendaciones del fabricante para la purificación de anticuerpos monoclonales. Después de la centrifugación, el pH del sobrenadante fresco o descongelado (en hielo) se ajustó a 6,7 – 7,0. Después de dos ciclos de filtración en vacío (0,45 μm) el sobrenadante se desgasificó y, si fuera necesario, el pH se ajustó de nuevo a un valor de 6,7 – 7,0. Posteriormente, la columna de cromatografía de afinidad equilibrada con PBS (10 ml de MabSelect en una columna XK16/20) se cargó con 2 – 4 l de sobrenadante a un caudal de 3 - 10 ml/min usando la bomba P-1. Después de lavar con PBS, la columna se transfirió al purificador AKTA y se lavó de nuevo con PBS hasta que la $A_{280}$ se estabilizó después de retirada cuantitativa de proteína no unida. Para la elución, el sistema AKTA se equipó con dos tampones de citrato sódico 50 mM a pH 3,25 y 5,5, respectivamente, que se mezclaron para producir las condiciones de pH deseadas (pH 3,7 para elución de sgp130Fc y las muteínas de sgp130Fc). Se recogieron fracciones de 10 ml en tubos de 15 ml que contenían 2 ml de Tris-HCl 1 M (pH 11). Las fracciones pico se agruparon y el pH se midió y se ajustó a 7,5, si fue necesario. La concentración de proteína en el grupo se midió por $A_{280}$ y el grupo se concentró a 2 - 5 mg/ml usando unidades de concentración de membrana PL Ultracel de 50 kDa Amicon Ultra-15. Se usaron columnas de desalación PD-10 equilibradas con PBS para reemplazar el tampón de citrato con PBS, seguido de otra medición de concentración de proteínas a 280 nm. Se obtuvieron muestras para control de calidad y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida nativo o desnaturalizante (7,5 %) y tinción con plata posterior (Figura 2). Se midieron concentraciones de proteína en el grupo finales y se ajustaron a 2 - 3 mg/ml en PBS y se congelaron alícuotas de uso sencillo a -80 ºC para almacenamiento a largo plazo.

(F) Resultados

La posibilidad de purificación de dímeros de muteína de sgp130Fc no difirió de sgp130Fc de tipo silvestre. Como se muestra en la Figura 2, la calidad y cantidad de agregados no se vio influida de forma significativa por las mutaciones puntuales (sólo se muestran muteínas representativas de la presente invención, consúltese Figura 1).

**Ejemplo 2**

**Bioactividad de muteínas de sgp130Fc en un ensayo de proliferación celular normalizado**

(A) Material

La línea celular precursora de linfocitos B transfectada de forma estable BAF3/gp130 se mantuvo usando Hyper-IL-6 (una citocina de diseño que consiste en IL-6 y sIL-6R enlazados de forma covalente; Fischer y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 142-5). Se obtuvieron medios de cultivo celular DMEM y PBS de Dulbecco de PAA Laboratories (Cölbe, Alemania), FBS fue de Biochrom (Berlín, Alemania). La interleucina-6 (IL-6) y receptor de interleucina-6 soluble (sIL-6R) se obtuvieron de BioSource (Solingen, Alemania) y R&D Systems (Wiesbaden, Alemania), respectivamente. El ensayo de proliferación celular no radiactivo acuoso de Titulación Celular colorimétrica 96 (MTS) y el Ensayo de Viabilidad Celular de Azul de Titulación Celular fluorométrico se obtuvieron ambos de Promega (Mannheim, Alemania) y se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(B) Bloqueo de proliferación de células BAF37gp130 inducida por IL-6/sIL-6R mediante sgp130Fc o muteínas de sgp130Fc

Las células BAF3/gp130 dependen de la presencia del complejo IL-6/sIL-6R o Hyper-IL-6 en el medio de cultivo para su proliferación y viabilidad. Para el mantenimiento, las células BAF3/gp130 se cultivaron a una densidad de menos de 5 x $10^5$ células/ml en DMEM con FBS 10 % y Hyper-IL-6 10 ng/ml. La Hyper-IL-6 10 ng/ml podría reemplazarse por IL-6 100 ng/ml más sIL-6R 50 ng/ml. Las células se pasaron dos veces por semana. Para los ensayos, las células se lavaron dos veces en medio sin Hyper-IL-6 (o IL-6/sIL-6R) y se sembraron después a 5.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadieron sgp130Fc de tipo silvestre o muteínas de sgp130Fc a diversas concentraciones que variaban de 900 a 10 ng/ml (serie de dilución 1:3 ó 1:10; Figura 3). Posteriormente, las células se incubaron durante 3 días en presencia de IL-6 100 ng/ml y sIL-6R 50 ng/ml o Hyper-IL-6 1 ng/ml. Los controles incluían células no estimuladas sin y con la concentración máxima de sgp130Fc o muteínas de sgp130Fc así como células que solamente se incubaron con IL-6 y sIL-6R (Figura 3).

(C) Resultados

La actividad biológica de sgp130Fc de tipo silvestre o muteínas de sgp130Fc en el cultivo celular se midió por la reducción del número de células BAF3/gp130 viables después de 3 días (según se determinó por conversión del sustrato MTS o Reactivo Azul de Titulación Celular por células metabólicamente activas de acuerdo con la información del fabricante). El sustrato MTS (Figura 3A) y Reactivo Azul de Titulación Celular (Figura 3B) abarcan intervalos distintos pero solapantes de sensibilidad, siendo la fluorescencia de Azul de Titulación Celular (longitud de onda de excitación 530 nm, emisión 590 nm) un orden de magnitud más sensible. Los resultados de ambos sistemas de ensayo mostraron (1) que la actividad de unión de una muteína que contenía la mutación sencilla Thr102Tyr (T102Y) era superior al tipo silvestre, pero inferior a muteínas que contenían una mutación sencilla de Gln113Phe (Q113F) o Asn114Leu (N114L), (2) que una combinación de dos mutaciones del grupo de Thr102Tyr (T102Y), Gln113Phe (Q113F) o Asn114Leu (N114L) fue superior a cualquier mutación sencilla (como ejemplo, la muteína doble Thr102Tyr/Gln113Phe (T102Y/Q113F) se muestra en la Figura 3) y (3) que la combinación de las tres mutaciones en la muteína triple Thr102Tyr/Gln113Phe/Asn114Leu (T102Y/Q113F/N114L) conduce a actividad de unión óptima (Figura 3). La $CI_{50}$ de la muteína triple es al menos 3 veces inferior a la $CI_{50}$ de tipo silvestre en todos los ensayos. Esto indica que la muteína T102Y/Q113F/N114L podría usarse a menos de un tercio de la concentración terapéutica del compuesto de tipo silvestre.

**Ejemplo 3**

**Comparación de sgp130Fc de tipo silvestre y la muteína triple T102Y/Q113F/N114L en un ensayo celular de respuesta a fase aguda**

(A) Material

Las células HepG2 se obtuvieron de DSMZ (Braunschweig, Alemania). Hyper-IL-6 (una citocina de diseño que consiste en IL-6 y sIL-6R enlazadas de forma covalente; Fischer y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 142-5) se produjo como se ha descrito previamente. Se obtuvieron medio de cultivo alto en glucosa DMEM y PBS de Dulbecco de PAA Laboratories (Cölbe, Alemania), FBS fue de Biochrom (Berlín, Alemania). Las placas de ELISA Maxisorp se obtuvieron de Nunc (Wiesbaden, Alemania). Los anticuerpos anti-haptoglobina fueron de Lee Biosolutions (St. Louis, MO, Estados Unidos), El anticuerpo de cabra anti-POD de conejo fue de Pierce (Rockford, IL, Estados Unidos) y el sustrato POD de azul de BM fue de Roche (Mannheim, Alemania). Todos los demás agentes químicos se obtuvieron de VWR/Merck (Darmstadt, Alemania).

(B) Cultivo celular y ELISA de haptoglobina

La línea celular de hepatoma humano HepG2 se cultivó en medio de cultivo alto en glucosa DMEM complementado con FBS 10 %. Se realizó un ELISA para la proteína haptoglobina de fase aguda humana como se ha descrito previamente (Oppmann y col. (1996) J. Immunol. Methods 195: 153-9). Brevemente, se sembraron $10^5$ células

HepG2 por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante una noche. Las células se lavaron dos veces con PBS (37 ºC) y se sometieron a inanición en DMEM sin FBS durante 2 h. Mientras tanto, se diluyeron sgp130Fc de tipo silvestre o muteína T102Y/Q113F/N114L, se mezclaron con Hyper-IL-6 5 ng/ml en DMEM sin FBS y se colocaron en el incubador durante al menos 30 minutos. Posteriormente, las células HepG2 se incubaron con 200 µl de esta mezcla durante 20 horas y la cantidad relativa de haptoglobina en el sobrenadante celular se midió mediante ELISA. Las placas de ELISA se revistieron con el anticuerpo anti-haptoglobina de cabra en tampón carbonato pH 9,0 a 1:1.000 durante una noche y se bloquearon en FBS 5 % en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron 1:10 en solución de bloqueo y se incubaron a 100 µl/pocillo durante 1 h a temperatura ambiente. Después de 4 lavados con PBS con Tween 20 0,05 % (PBST), se añadieron 100 µl de anticuerpo de conejo anti-haptoglobina diluido 1:1.000 en solución de bloqueo y se incubaron a 37 ºC durante 30 minutos. Después de 4 lavados con PBST, se añadieron 100 µL de anticuerpo de cabra anti-POD de conejo a 1:30.000 en solución de bloqueo y se incubaron a 37 ºC durante 30 min. Después de 4 lavados con TBST, se añadieron 100 µl de sustrato POD de azul de BM y el desarrollo del color se detuvo finalmente con $H_2SO_4$ 1 M. Las placas se leyeron a 450 nm y cada valor se determinó por cuadruplicado.

(C) Resultados

Para verificar los resultados obtenidos con el ensayo de purificación de células BAF3/gp130 (Ejemplo 2), se usaron células de hepatoma HepG2 humano como un segundo sistema modelo. Tras estimulación con IL-6 (Rose-John y col. (1990) Eur. J. Biochem. 190: 79-83) o estimulación con el complejo IL-6/sIL-6R o Hyper-IL-6 (Peters y col. (1998) J. Immunol. 161: 3575-81), las células HepG2 muestran una inducción de proteínas de fase aguda y pueden usarse como un sistema modelo para la respuesta a procesos inflamatorios del hígado. La proteína haptoglobina de fase aguda secretada por estas células en respuesta a Hyper-IL-6 se cuantificó mediante ELISA (Oppmann y col. (1996) J. Immunol. Methods 195: 153-9). La Figura 4 muestra que la triple muteína T102Y/Q113F/N114L inhibe la respuesta a Hyper-IL-6 de una manera dependiente de dosis y significativamente más fuerte que la sgp130Fc de tipo silvestre.

**Ejemplo 4**

**Constantes cinéticas y afinidades de sgp130Fc de tipo silvestre y la muteína triple T102Y/Q113F/N114L**

(A) Material

Hyper-IL-6 (una citocina de diseño que consiste en IL-6 y sIL-6R enlazadas de forma covalente; Fischer y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 142-5) se produjo como se ha descrito previamente. PBS de Dulbecco se obtuvo de PAA Laboratories (Cölbe, Alemania). Todos los demás agentes químicos se obtuvieron de VWR/Merck (Darmstadt, Alemania).

(B) Mediciones por resonancia de plasmón superficial

Se realizaron experimentos de resonancia de plasmón superficial con un sistema de serie de interacción de proteínas ProteOn XPR36 (BioRad, Hercules, CA, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de ejecución fue PBS con Tween 20 0,005 % pH 7,4 (PBST) y los experimentos se llevaron a cabo a 25 ºC. La superficie se activó (EDAC 4 mM/sulfo-NHS 1 mM) y las proteínas se acoplaron de forma covalente a 10 µg/ml en tampón acetato 10 mM pH 4,5. Los niveles respectivos de inmovilización fueron 1,330 UR (unidades de resonancia) para sgp130Fc de tipo silvestre y 1,120 UR para la muteína T102Y/Q113F/N114L. Las concentraciones de Hyper-IL-6 variaron de 80 a 2,5 nM en PBST (caudal: 100 µl/min). La asociación y disociación se controló durante 60 s o 600 s, respectivamente. Cada conjunto de sensogramas se referenció usando el canal de referencia y se alineó con la línea basal. Los sensogramas se analizaron usando el software ProteOn Manager 2.0.

(C) Resultados

Para examinar si la actividad biológica mejorada (véase Ejemplos 2 y 3) de las muteínas ejemplificadas por la muteína triple T102Y/Q113F/N114L se refleja en la cinética de unión, se realizó resonancia de plasmón superficial para cuantificar las tasas $k_{on}$ y $k_{off}$. Se inmovilizaron proteínas sgp130Fc de tipo silvestre o muteína T102Y/Q113F/N114L en la microplaca sensora de afinidad y se midió la unión de Hyper-IL-6 (que representa el complejo IL-6/sIL-6R). A partir de los sensogramas, se calcularon las constantes $k_{on}$ y $k_{off}$ y las constantes de afinidad $K_D$. La mayor capacidad inhibidora de la muteína T102Y/Q113F/N114L se refleja en una $k_{on}$ similar y $k_{off}$ inferior y, en consecuencia, en una constante de afinidad $K_D$ aumentada 4 veces. El cambio en la $k_{off}$ resulta de un complejo energéticamente más estable, mientras que la formación de complejo sólo se ve afectada ligeramente en comparación con sgp130Fc de tipo silvestre.

**Ejemplo 5**

**Formación de modelo molecular de un complejo de IL-6/sIL-6R murino y gp130 humano y ensayo de hipótesis en un ensayo celular**

(A) Formación de modelo

Se construyó un modelo del complejo IL-6 murina/IL-6R murino/gp130 humano usando la estructura del complejo IL-6/IL-6R/gp130 humano como un molde (Boulanger y col. (2003) Science 300: 2101-4). De acuerdo con el alineamiento publicado, los restos aminoacídicos de IL-6 e IL-6R se intercambiaron en el molde (Grötzinger y col. (1997) Protein Struct. Funct. Genet. 27: 96-109). Las inserciones y deleciones en las moléculas se modelaron usando un enfoque de búsqueda en base de datos (Vriend (1990) J. Mol. Graph. 8: 52-6).

(B) Material y procedimiento del ensayo celular

El ensayo de proliferación de células BAF/gp130 normalizado se describe en el Ejemplo 2. IL-6 y sIL-6R murinos se obtuvieron de R&D Systems (Wiesbaden, Alemania) y se añadieron a las células a 300 ng/ml (IL-6) y 150 ng/ml (sIL-6R).

(C) Resultados

En todos los experimentos descritos en los Ejemplos 2-4, se usaron IL-6 humana más receptor de IL-6 humano o Hyper-IL-6 basándose en las secuencias de IL-6 y sIL-6R humanos. Una formación de modelo detallada del sitio de interacción de Q113/N114 en gp130 humano sugirió un grupo de aminoácidos hidrófobos y no polares como una explicación plausible de los efectos beneficiosos observados con las mutaciones Q113F y N114L (Figura 6). Como un prerrequisito para estudios *in vivo* de ratones, se usó la estructura tridimensional del complejo IL-6/IL-6R/gp130 humano para generar un complejo modelo de IL-6 murina/IL-6R murino/gp130 humano para comparación. La inspección de este complejo de ratón/humano reveló que el IL-6R murino carece de uno de los restos aromáticos (F155) (Figura 6), lo que sugiere que la afinidad de unión mejorada de las muteínas Q113F halladas en una situación completamente humana no deberían observarse en el sistema de ratón/humano. Para ensayar esta hipótesis, los inventores usaron el ensayo de proliferación celular normalizado de BAF3/gp130 (con gp130 humano en la superficie de las células BAF3) para investigar la actividad inhibidora de sgp130Fc de tipo silvestre y la muteína triple T102Y/Q113F/N114L usando el complejo IL-6/sIL-6R de ratón para estimulación. Como se ha predicho, la muteína T102Y/Q113F/N114L no es más eficaz que sgp130Fc de tipo silvestre con IL-6/sIL-6R murino (Figura 7). Lo mismo resulta cierto para la muteína N114L (datos no mostrados). La hidrofobicidad aumentada de las mutaciones N114L en el sistema humano se compensa por el intercambio de aminoácidos (R117/M116) en IL-6 murino en comparación con IL-6 humana (datos no mostrados). Por lo tanto, la actividad potenciada de la muteína sgp130Fc T102Y/Q113F/N114L se restringe a complejos IL6/sIL6R humanos. Resulta interesante que se necesitan aproximadamente 3 veces más IL-6/sIL-6R murinos para inducir la misma señal de proliferación en células BAF3/gp130 que con IL-6/sIL-6R humano, lo que indica que el complejo de ratón/humano de IL-6/sIL-6R murino y gp130 humano en la superficie de células BAF, así como el gp130 humano contenido en sgp130Fc de tipo silvestre y muteínas es menos eficaz que su homólogo completamente humano.

**Ejemplo 6**

**Ensayos *in vivo* de la hipótesis de especificidad de especie usando el modelo de bolsa de aire murina de inflamación aguda**

(A) Tratamiento animal

Todos los procedimientos que implican animales y su cuidado se realizaron de acuerdo con las leyes y normas nacionales e internacionales así como las directrices para el cuidado animal de la Universidad de Kiel (nº de aceptación: V 742-72241.121-3 (20-2/04) y (76-7/00)). Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h en condiciones convencionales y se les proporcionó alimento y agua a voluntad. Se extrajo sangre por sangrado de la cola o por perforación cardiaca con anestesia general.

(B) Material

La carragenina se obtuvo de Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Alemania). Se obtuvo PBS de Dulbecco de PAA Laboratories (Cölbe, Alemania). Los kits de ELISA DuoSet para proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y sgp130 fueron de R&D Systems (Wiesbaden, Alemania). Los anticuerpos monoclonales Ly-6G y F4/80 fueron de BD Biosciences (Heidelberg, Alemania) e Invitrogen (Karlsruhe, Alemania), respectivamente.

(C) Modelo de bolsa de aire

El modelo de bolsa de aire de la inflamación local se realizó con ratones C57B1/6 (Edwards y col. (1981) J. Pathol. 134: 147-56). En breve, los ratones se anestesiaron y se crearon bolsas dorsales subcutáneas mediante inyección de 6 ml de aire estéril. Después de 3 días, las bolsas se reinyectaron con 4 ml de aire. El día 6, se inyectó 1 ml de carragenina 1 % en PBS estéril en las bolsas. Se administró proteína sgp130Fc de tipo silvestre o la muteína triple T102Y/Q113F/N114L (50 μg/ratón) o PBS como control por vía intraperitoneal 6 h antes de la inyección de carragenina. Setenta y dos horas después del tratamiento, los animales se sacrificaron y las bolsas se lavaron con 3 ml de PBS. El fluido de lavado se enfrió inmediatamente en hielo y se centrifugó a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4 ºC. El sobrenadante se analizó mediante ELISA por MCP-1 y sgp130Fc. Se usaron alícuotas del fluido de lavado de bolsa de aire que contenía 2 x $10^5$ células para análisis de FACS (FACS-Canto, Becton-Dickinson, Heidelberg, Alemania). Los anticuerpos monoclonales Ly-6G y F4/80 se usaron para contar neutrófilos y monocitos,

respectivamente. Los datos se adquirieron a partir de 10.000 acontecimientos seleccionados.

(D) Resultados

El modelo de bolsa de aire se usó (1) para investigar la actividad *in vivo* de la muteína triple T102Y/Q113F/N114L y (2) para comparar sgp130Fc de tipo silvestre con la muteína para ensayar la hipótesis de especificidad de especie y para verificar los datos *in vitro* descritos en el Ejemplo 5 *in vivo.* Los inventores han mostrado recientemente que en el modelo de bolsa de aire de ratón, el complejo IL-6/sIL-6R es importante para dirigir el proceso inflamatorio del estado neutrófilo agudo al estado más crónico gobernado por las células mononucleares (Chalaris y col. (2007) Blood 110: 1748-55; Rabe y col. (2008) Blood 111: 1021-8). En este modelo, la infiltración de células mononucleares está mediada por la quimiocina MCP-1, que se induce en las células de recubrimiento por el complejo IL-6/sIL-6R, pero no por IL-6 solamente. Por lo tanto, este modelo se usó para estudiar si en ratones la infiltración de células y la secreción de MCP-1 podrían modularse por sgp130Fc de tipo silvestre y la muteína T102Y/Q113F/N114L. La inyección de ambas proteínas sgp130Fc claramente redujo el número de células que se infiltraban en el mismo grado (Figura 8A). Además, la relación de neutrófilos y monocitos que se infiltraban era similar (Figura 8B). Aunque la concentración de la muteína T102Y/Q113F/N114L en el área inflamada era ligeramente mayor en comparación con sgp130Fc de tipo silvestre (Figura 8C), la muteína T102Y/Q113F/N114L muestra el mismo efecto inhibidor en la concentración de MCP-1 (Figura 8D). Por lo tanto, la conclusión derivada del modelo estructural de los inventores (Figura 6) y de los datos *in vitro* (Figura 7) concuerda bien con la situación *in vivo*, lo que demuestra que la actividad potenciada de la muteína de sgp130Fc T102Y/Q113F/N114L se restringe a los complejos de IL-6/sIL-6R humanos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> conaris Research Institute AG

<120> muteínas de gp130 solubles con actividad de unión mejorada

<130> C 1104EP

<140> EP08009648

<141> 27-05-2008

<150> EP07020512.5

<151> 19-10-2007

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

<223> engarce de glucosilación

<400> 1

```
His Asn Leu Ser Val Ile
1               5
```

<210> 2
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly

115

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> muteína T102Y

<400> 4

Ile Gln Leu Tyr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Asn
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

<223> muteína Q113F

<400> 5

Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Phe Asn
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 6
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> muteína N114L

<400> 6

Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 7
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> muteína T102Y/Q113F

<400> 7

Ile Gln Leu Tyr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Phe Asn
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> muteína T102Y/N114L

<400> 8

Ile Gln Leu Tyr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> muteína Q113F/N114L

<400> 9

Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Phe Leu
1 5 10 15

Val Tyr Gly

<210> 10
<211> 19
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> muteína T102Y/Q113F/N114L

<400> 10

Ile Gln Leu Tyr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu Phe Leu
1 5 10 15

Val Tyr Gly

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que comprende (a) la parte extracelular completa de la glucoproteína gp130 o (b) variantes o fragmentos de dicha parte extracelular, siendo dicho polipéptido, variantes o fragmentos capaces de inhibir la actividad del complejo agonista IL-6/sIL-6R y en el que en dicha parte extracelular o variantes o fragmentos de la misma

- $Thr_{102}$ se sustituye por un resto aminoacídico neutro grande seleccionado de Tyr, Trp, Leu, Ile, Phe o Met, y/o
- $Gln_{113}$ se sustituye por un resto aminoacídico hidrófobo y no polar seleccionado de Phe, Trp, Ile, Leu, Met, Val o Ala, y/o
- $Asn_{114}$ se sustituye por un resto aminoacídico hidrófobo y no polar seleccionado de Phe, Trp, Ile, Leu, Met, Val o Ala.

2. El polipéptido de la reivindicación 1, **caracterizado por** al menos una de las siguientes substituciones: Thr102Tyr (T102Y), Gln113Phe (Q113F) y Asn114Leu (N114L).

3. El polipéptido de la reivindicación 2, en el que dos cualquiera de las mutaciones Thr102Tyr (T102Y), Gln113Phe (Q113F) o Asn114Leu (N114L) se combinan, dando como resultado las muteínas dobles Thr102Tyr/Gln113Phe (T102Y/Q113F), Thr102Tyr/Asn114Leu (T102Y/N114L) y Gln113Phe/Asn114Leu (Q113F/N114L).

4. El polipéptido de la reivindicación 2, en el que las tres mutaciones Thr102Tyr (T102Y), Gln113Phe (Q113F) y Asn114Leu (N114L) se combinan, dando como resultado la muteína triple Thr102Tyr/Gln113Phe/Asn114Leu (T102Y/Q113F/N114L).

5. El polipéptido gp130 mutado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido está fusionado directamente o mediante un engarce polipeptídico con un marcador.

6. El polipéptido de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 5, en el que el engarce polipeptídico que conecta el polipéptido gp130 mutado y su compañero de fusión es flexible y comprende de 2 a 50 restos aminoacídicos seleccionados de forma independiente del grupo que consiste en glicina, serina, asparagina, treonina y alanina.

7. El polipéptido de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 6, en el que se insertan uno o más sitios de N-glucosilación entre el polipéptido gp130 mutado y el marcador, entre el polipéptido gp130 mutado y el engarce y/o entre el engarce y el marcador.

8. El polipéptido de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho polipéptido está PEGilado.

9. El polipéptido de una cualquiera de la reivindicaciones 1 a 8, que el polipéptido es un dímero con los dos monómeros enlazados entre sí a través de un engarce químico o físico.

10. El dímero polipeptídico de la reivindicación 9, en el que los dos monómeros son idénticos.

11. El dímero polipeptídico de la reivindicación 9 ó 10, en el que los dos monómeros se enlazan entre sí mediante un enlace covalente sencillo, un engarce polipeptídico flexible o uno o más puentes disulfuro.

12. El dímero polipeptídico de la reivindicación 11, en el que los monómeros están conectados por a un puente o puentes disulfuro, que se generan fusionando el monómero con un polipéptido de origen natural o artificial que comprende uno o más restos de cisteína libres y accesibles.

13. El dímero polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el polipéptido se fusiona con un dominio Fc de una proteína de inmunoglobulina, preferentemente en el que la inmunoglobulina es IgG, preferentemente en el que la proteína IgG es IgG1.

14. El polinucleótido que codifica un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. El polinucleótido de la reivindicación 14, en el que la secuencia polinucleotídica se optimiza con respecto a sus codones para la producción del polipéptido codificado en células huésped procariotas o eucariotas o en un sistema de expresión sin células.

16. Un vector de expresión que contiene un polinucleótido de la reivindicación 14 ó 15.

17. Una célula huésped o sistema de expresión sin células que contiene el vector de expresión de la reivindicación 16.

18. Un procedimiento para producir el monómero o dímero polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende cultivar una célula huésped o usar un sistema de expresión sin células de la reivindicación 17 y recuperar y purificar el monómero o dímero polipeptídico de dicha célula huésped, el medio de cultivo o el sistema de expresión sin células.

19. Una composición farmacéutica que contiene un monómero o dímero polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un polinucleótido de la reivindicación 14 ó 15 o un vector de expresión de la reivindicación 16.

20. Una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad o trastorno en el que el bloqueo del complejo agonista IL-6/sIL6R tiene un efecto beneficioso, comprendiendo dicha composición un monómero o dímero polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, un polinucleótido de la reivindicación 14 ó 15 o un vector de expresión de la reivindicación 16 y en el que dicha enfermedad es reabsorción de hueso, hipercalcemia, caquexia, un tumor u otro tipo de cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria o atópica, una infección, sepsis, un trastorno endocrinológico o una enfermedad metabólica o catabólica.

21. Un anticuerpo que se une a un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es específico para el motivo o los motivos peptídicos mutados o la región de engarce específica de dicho polipéptido.

22. Un procedimiento de diagnóstico *in vitro* que está basado en la detección de la unión de un anticuerpo de la reivindicación 21 con un polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

## Fig. 1

**Dominio N-terminal de gp130**

*MLTLQTWLVQALFIFLTTESTG*ELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTA
VCVLKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFT
DIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYG...

*cursiva* = péptido señal
subrayado = dominio de tipo inmunoglobulina (Ig)
T, Q, N = $Thr_{102}$ (T), $Gln_{113}$ (Q) y $Asn_{114}$ (N)

**Alineamiento de secuencia de tipo silvestre y muteínas**

...IQLTCNILTFGQLEQNVYG... tipo silvestre

...IQL1CNILTFGQLE23VYG... esquema de mutación

...IQLYCNILTFGQLEQNVYG... T102Y ($Thr_{102} \rightarrow Tyr_{102}$)
...IQLTCNILTFGQLEFNVYG... Q113F ($Gln_{113} \rightarrow Phe_{113}$)
...IQLTCNILTFGQLEQLVYG... N114L ($Asn_{114} \rightarrow Leu_{114}$)

...IQLYCNILTFGQLEFNVYG... T102Y/Q113F
...IQLYCNILTFGQLEQLVYG... T102Y/N114L
...IQLTCNILTFGQLEFLVYG... Q113F/N114L

...IQLYCNILTFGQLEFLVYG... T102Y/Q113F/N114L

**Fig. 2**

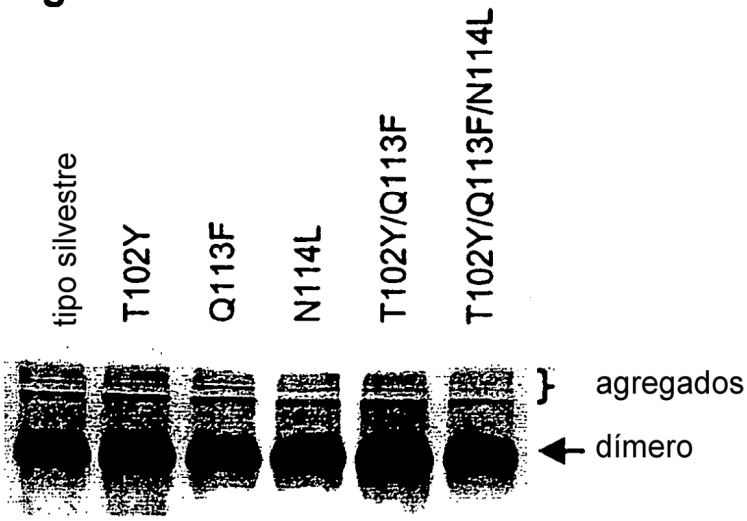

tipo silvestre
T102Y
Q113F
N114L
T102Y/Q113F
T102Y/Q113F/N114L
agregados
dímero

**Fig. 3A**

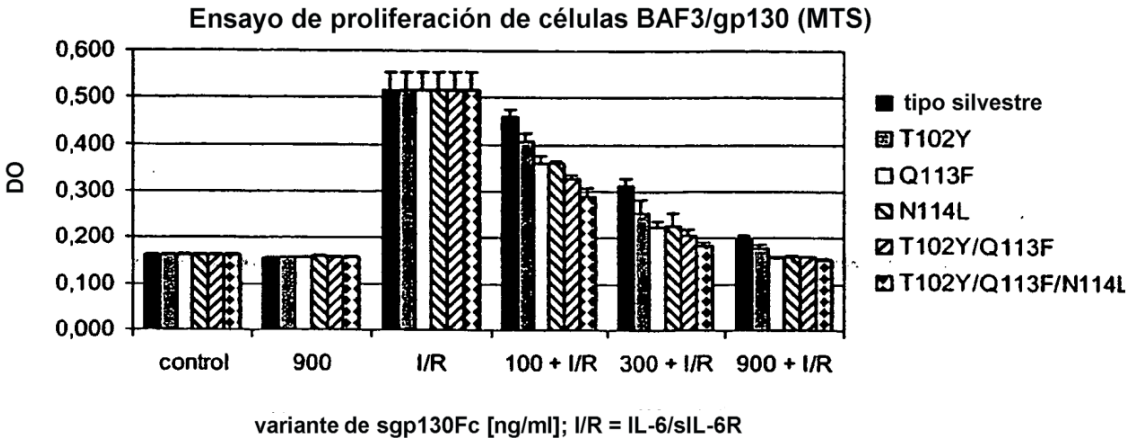

Ensayo de proliferación de células BAF3/gp130 (MTS)
DO
0,600
0,500
0,400
0,300
0,200
0,100
0,000
control
900
I/R
100 + I/R
300 + I/R
900 + I/R
tipo silvestre
T102Y
Q113F
N114L
T102Y/Q113F
T102Y/Q113F/N114L
variante de sgp130Fc [ng/ml]; I/R = IL-6/sIL-6R

**Fig. 3B**

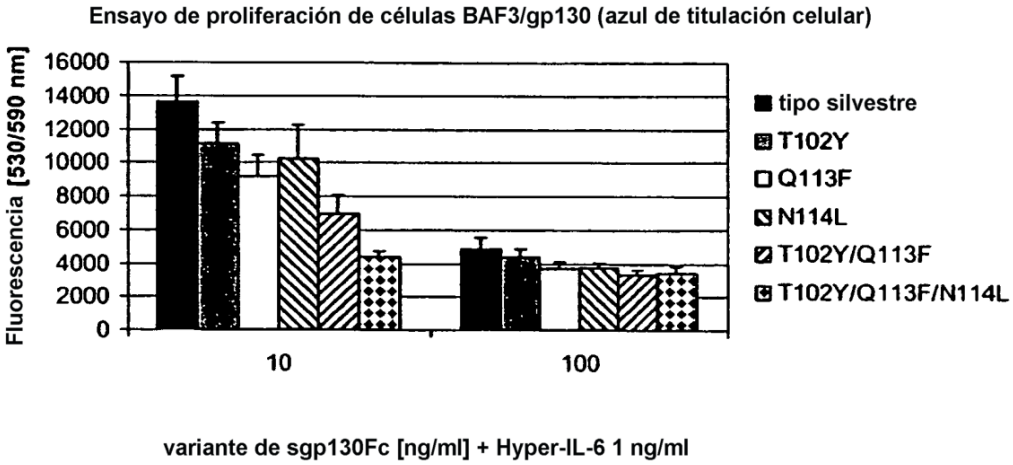

Ensayo de proliferación de células BAF3/gp130 (azul de titulación celular)
Fluorescencia [530/590 nm]
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
10
100
tipo silvestre
T102Y
Q113F
N114L
T102Y/Q113F
T102Y/Q113F/N114L
variante de sgp130Fc [ng/ml] + Hyper-IL-6 1 ng/ml

**Fig. 4**

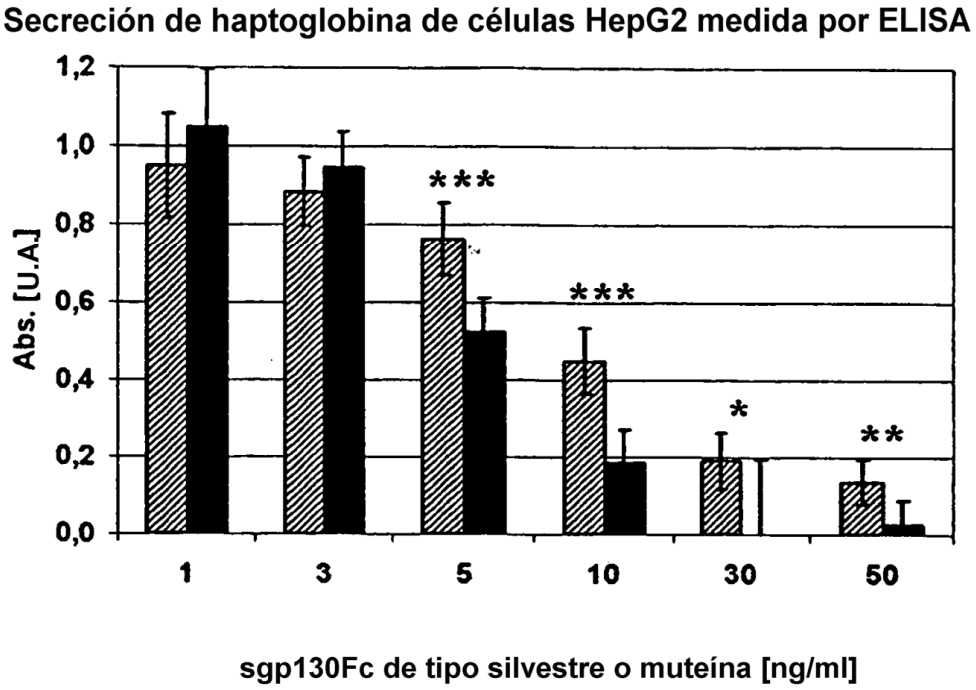

Secreción de haptoglobina de células HepG2 medida por ELISA
Abs. [U.A.]
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
***
***
*
**
1
3
5
10
30
50
sgp130Fc de tipo silvestre o muteína [ng/ml]

**Fig. 5**

| | $k_{on}$ [1/Ms] | $k_{off}$ [1/s] | $K_D$ [M] |
|---|---|---|---|
| spg130Fc de tipo silvestre | $5{,}00 \times 10^{5} \pm 893{,}9$ | $2{,}50 \times 10^{-4} \pm 2{,}00 \times 10^{-6}$ | $4{,}99 \times 10^{-10}$ |
| **T102Y/Q113F/N114L** | $5{,}42 \times 10^{5} \pm 620{,}8$ | $6{,}63 \times 10^{-5} \pm 1{,}33 \times 10^{-6}$ | $1{,}22 \times 10^{-10}$ |

**Fig. 6**

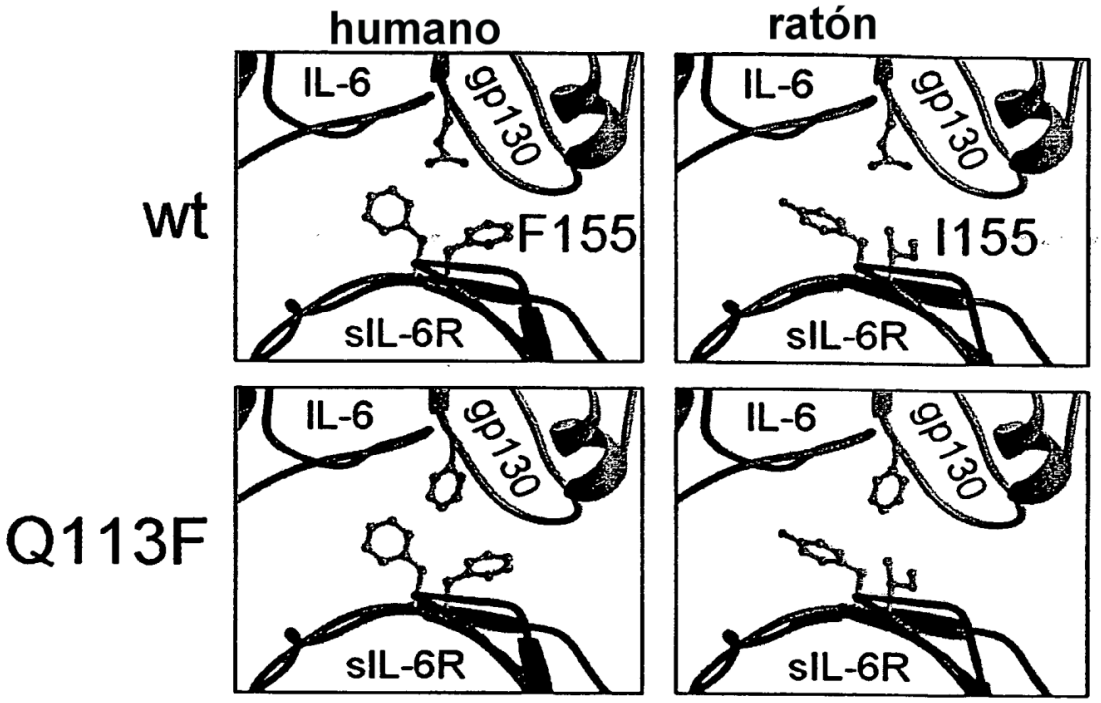


**Fig. 7**

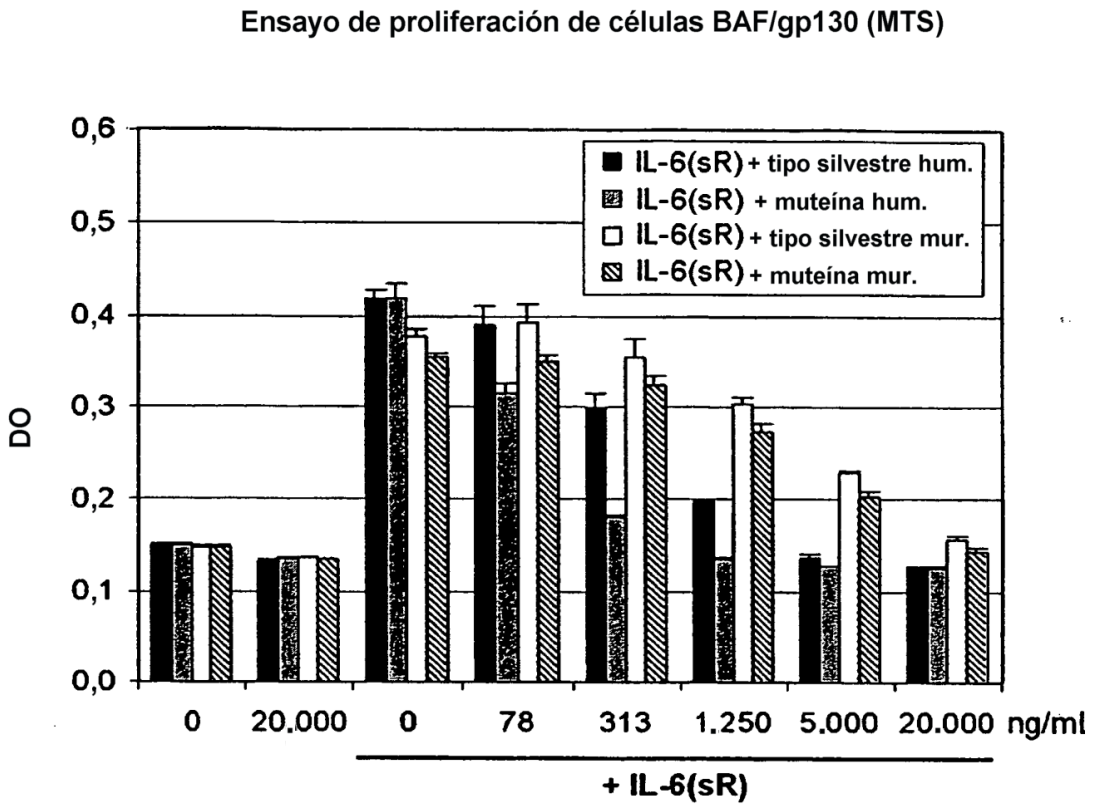
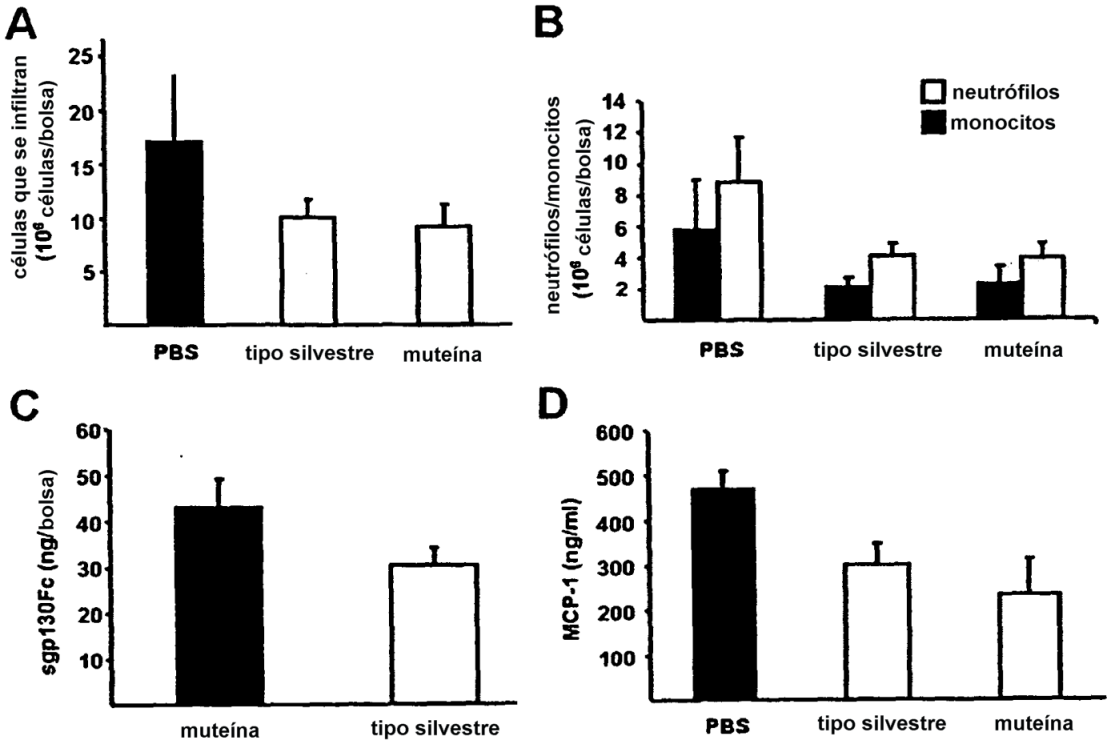

Ensayo de proliferación de células BAF/gp130 (MTS)
IL-6(sR) + tipo silvestre hum.
IL-6(sR) + muteína hum.
IL-6(sR) + tipo silvestre mur.
IL-6(sR) + muteína mur.
DO
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0,0
0
20.000
0
78
313
1.250
5.000
20.000
ng/ml
+ IL-6(sR)

Fig. 8


A
células que se infiltran ($10^6$ células/bolsa)
25
20
15
10
5
PBS
tipo silvestre
muteína
B
neutrófilos/monocitos ($10^6$ células/bolsa)
14
12
10
8
6
4
2
neutrófilos
monocitos
PBS
tipo silvestre
muteína
C
sgp130Fc (ng/bolsa)
60
50
40
30
20
10
muteína
tipo silvestre
D
MCP-1 (ng/ml)
600
500
400
300
200
100
PBS
tipo silvestre
muteína