

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 241**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/715** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04739182 .6**  
96 Fecha de presentación: **11.05.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1622939**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2006**

54 Título: **Variantes activas de la proteína que fija IL-18 y usos médicos de las mismas**

30 Prioridad:  
**13.05.2003 EP 03101326**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.07.2012**

73 Titular/es:  
**MERCK SERONO SA  
CENTRE INDUSTRIEL  
1267 COINSINS, VAUD, CH**

72 Inventor/es:  
**ALTAROCCA, Valter y  
PEZZOTTI, Anna R.**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 384 241 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

Variantes activas de la proteína que fija IL-18 y usos médicos de las mismas

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a nuevas proteínas que fijan la interleuquina 18 (IL-18BPs). La invención se refiere, adicionalmente, a composiciones farmacéuticas que comprenden estas IL-18BPs, a ácidos nucleicos que codifican tales IL-18BPs, y a usos médicos de dichas IL-18BPs.

**Antecedentes de la invención**

10 En 1989, se describió un factor sérico inducido por una endotoxina, capaz de inducir el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) obtenido de células del bazo de ratón (Nakamura et al., 1989). Este factor sérico no funcionaba como inductor directo de IFN- $\gamma$ , sino más bien como co-estimulante junto con IL-2 o mitógenos. Un intento de purificar este factor a partir de suero murino post-endotoxina reveló una proteína de 50-55 kDa aparentemente homogénea. Puesto que otras citoquinas pueden actuar como co-estimulantes de la producción de IFN- $\gamma$ , la incapacidad para neutralizar anticuerpos contra IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 o TNF para neutralizar la actividad sérica indicó que se trataba de un factor diferente. En 1995, los mismos investigadores demostraron que el co-estimulante inducido por endotoxinas para la producción de IFN- $\gamma$  se hallaba presente en extractos de hígados procedentes de ratones pre-tratados con *P. acnes* (Okamura et al., 1995). En este modelo, se expande la población de macrófagos hepáticos (células de Kupffer) y en estos ratones una dosis baja de lipopolisacárido (LPS) bacteriano, que en los ratones no pre-tratados no es letal, se convierte en letal. El factor, denominado factor inductor de IFN- $\gamma$  (IGIF) y designado, posteriormente, interleuquina-18 (IL-18), se purificó hasta homogeneidad a partir de 1.200 gramos de hígado de ratones tratados con *P. acnes*. Se utilizaron oligonucleótidos degenerados, derivados de secuencias de aminoácidos de IL-18 purificada para clonar un ADNc de IL-18 murina. IL-18 es una proteína de 18-19 kDa de 157 aminoácidos, que carece de similitudes evidentes con cualquier péptido en las bases de datos. Se detectan fácilmente ARN mensajeros para IL-18 e interleuquina-12 (IL-12) en las células de Kupffer y en macrófagos activados. La IL-18 recombinante induce IFN-gamma de manera más potente que la IL-12, aparentemente a través de una vía diferente (Micallef et al., 1996). De forma similar a la actividad sérica inducida por endotoxinas, IL-18 no induce INF- $\gamma$  por sí misma, sino que actúa principalmente como un co-estimulante con mitógenos o IL-2. IL-18 potencia la proliferación de células T, aparentemente a través de una vía dependiente de IL-2, y refuerza *in vitro* la producción de la citoquina Th1, exhibiendo una acción sinérgica cuando se combina con IL-12 en términos de producción reforzada de IFN- $\gamma$  (Micallef et al., 1996).

15 Después de haber clonado la forma murina, en 1996 se dio a conocer la secuencia del ADNc humano para IL-18 (Okamura et al., 1995).

20 Por medio de la clonación de IL-18 a partir de tejidos afectados y del estudio de la expresión génica de IL-18, se encontró una estrecha asociación de esta citoquina con una enfermedad autoinmune. El ratón diabético no obeso (NOD) desarrolla espontáneamente insulinitis autoinmune y diabetes, que se pueden acelerar y sincronizar por una única inyección de ciclofosfamida. Por PCR de transcriptasa inversa se demostró la presencia de ARNm de IL-18 en el páncreas de ratones NOD durante las etapas precoces de la insulinitis. Los niveles de ARNm de IL-18 aumentaron rápidamente después del tratamiento con ciclofosfamida y precedieron a un incremento de ARNm de IFN- $\gamma$  y, subsiguientemente, diabetes. Es interesante comprobar que estas condiciones cinéticas imitan las del ARNm de IL-12-p40, dando como resultado una estrecha correlación de los niveles individuales de ARNm. La clonación del ADNc de IL-18 a partir del ARN pancreático, seguida de una secuenciación, reveló una identidad con la secuencia de IL-18 clonada a partir de las células de Kupffer y macrófagos pre-activados *in vivo*. Igualmente, los macrófagos de ratones NOD respondieron a la ciclofosfamida con expresión génica de IL-18, en tanto que los macrófagos de ratones Balb/c, tratados en paralelo, no lo hicieron. Por lo tanto, la expresión de IL-18 está regulada de manera anormal en ratones NOD autoinmunes, y se relaciona estrechamente con el desarrollo de diabetes (Rothe et al., 1997).

25 La IL-18 juega potencialmente un papel en la inmuno-regulación o en la inflamación al incrementar la actividad funcional del ligando Fas en células Th1 (Conti et al., 1997). La IL-18 se expresa también en la corteza suprarrenal y, por consiguiente, podría ser un neuro-inmunomodulador secretado, desempeñando un papel importante en la orquestación del sistema inmune tras una experiencia estresante (Chater, 1986).

30 *In vivo*, la IL-18 se forma por escisión de la pro-IL-18 y su actividad endógena parece explicar la producción de IFN- $\gamma$  en la letalidad de *P. acnes* y mediada por LPS. La IL-18 madura se produce a partir de su precursor mediante la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (enzima convertidora de IL-1 beta, ICE, caspasa-1).

35 El receptor de IL-18 consiste en al menos dos componentes que cooperan en la fijación del ligando. Se han encontrado sitios de fijación de alta y baja afinidad para IL-18 en células T murinas estimuladas con IL-12 (Yoshimoto et al., 1998), que indican la existencia de un complejo receptor de múltiples cadenas. Hasta la fecha, se han identificado dos subunidades receptoras, pertenecientes ambas a la familia de receptores de IL-1 (Parnet et al., 1996). La transducción de señal de IL-18 implica la activación de NF- $\kappa$ B (DiDonato, 1997).

Recientemente, se ha aislado de la orina humana una proteína soluble que exhibe una gran afinidad por IL-18, y se han descrito los ADNc humano y de ratón (Novick et al., 1999; documento WO 99/09063). La proteína se ha designado proteína fijadora de IL-18 (IL-18BP).

5 IL-18BP no es el dominio extracelular de algunos de los receptores de IL-18 conocidos, sino que se trata de una proteína secretada que circula de forma natural. Pertenece a una nueva familia de proteínas secretadas. La familia incluye, adicionalmente, varias proteínas codificadas por *Poxvirus* que exhiben una elevada homología con IL-18BP (Novick et al., 1999). IL-18BP se expresa de forma constitutiva en el bazo, pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y presenta una homología limitada con el receptor de IL-1 de tipo II. Su gen está localizado en el cromosoma humano 11q13 y en una secuencia genómica de 8,3 kb no se ha encontrado ningún exón que codifique un dominio transmembrana (Novick et al., 1999).

10 Cuatro isoformas humanas y dos murinas de IL-18BP han sido expresadas y purificadas, resultantes de la escisión y halladas en diversas bibliotecas de ADNc, y se ha evaluado la fijación y neutralización de las actividades biológicas de IL-18 (Kim et al., 2000). La *isoforma a* humana de IL-18BP (IL-18BP<sub>a</sub>) mostró la máxima afinidad por IL-18, con una constante de afinidad rápida y una constante de disociación lenta, y una constante de disociación (K(d)) de 399 pM. IL-18BP<sub>c</sub> comparte el dominio Ig de IL-18BP<sub>a</sub>, excepto los 29 aminoácidos C-terminales; la K(d) de IL-18BP<sub>c</sub> es 10 veces menor (2,94 nM). No obstante, las IL-18BP<sub>a</sub> e IL-18BP<sub>c</sub> neutralizan la IL-18 >95% hasta un exceso molar de dos. Las isoformas IL-BP<sub>b</sub> e IL-BP<sub>d</sub> carecen de un dominio Ig completo, así como de la capacidad para unirse o neutralizar la IL-18. Las isoformas murinas IL-18BP<sub>c</sub> e IL-18BP<sub>d</sub>, que poseen un dominio Ig idéntico, neutralizan también >95% de la IL-18 de ratón hasta un exceso molar de dos. Sin embargo, IL-18BP<sub>d</sub> murina, que comparte un resto C-terminal común con la IL-18BP<sub>a</sub> humana, también neutraliza la IL-18 humana. La modelización molecular identificó un extenso sitio de fijación mixto, electrostático e hidrófobo, en el dominio Ig de IL-18BP que podría explicar su fijación de alta afinidad al ligando (Kim et al., 2000).

15 Se ha descrito un efecto beneficioso de IL-18BP en diversas enfermedades. Ejemplos de tales enfermedades susceptibles de tratamiento con IL-18BP son: metástasis tumorales (documento WO 01/07480), artritis, enfermedad intestinal inflamatoria y lesión hepática (documento WO 01/62285), enfermedad cardíaca (documento WO 02/060479), lesión cerebral traumática (documento WO 02/096456), sepsis (documento WO 02/092008), aterosclerosis (documento WO 01/85201), y trastorno de hipersensibilidad (documento WO 03/033015).

20 En la bibliografía se ha descrito un dominio fijador de IL-18 de un homólogo viral de la IL-18BP humana (Xiang y Moss, 2003), que demuestra que una forma escindida por furina de la proteína fijadora de IL-18 del virus *Molluscum contagiosum* tiene propiedades de fijación de IL-18. Adicionalmente, se introdujeron varias mutaciones puntuales en el homólogo viral de IL-18BP y se analizó su fijación a IL-18 *in vitro* para definir las porciones biológicamente activas de la proteína (Xiang y Moss, 2001).

25 Sin embargo, hasta la fecha no se han identificado ni caracterizado fragmentos biológicamente activos de la *isoforma a* de IL-18BP humana.

### 35 **Resumen de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo de que durante la producción de la *isoforma a* de IL-18BP humana, se pueden encontrar formas variantes que retienen la actividad biológica de IL-18BP, tal como se miden en un bioensayo *in vitro*. Por lo tanto, la invención se refiere a variantes de IL-18BP según se definen en las reivindicaciones adjuntas, en las que se ha producido un "clipping" (recorte) interno de IL-18BP.

40 Estas variantes representan variantes activas de la IL-18BP madura.

Asimismo, se describen moléculas de ácido nucleico que codifican tales variantes de IL-18BP hasta composiciones farmacéuticas que comprenden estas variantes. La invención se refiere al uso de estos ácidos nucleicos para preparar medicamentos dirigidos al tratamiento y/o la prevención de trastornos mediados por IL-18.

45 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia de codificación de una variante de IL-18BP para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades mediadas por IL-18.

La invención se refiere, además, a procedimientos de producción de las variantes de IL-18BP de la invención.

### **Breve descripción de los dibujos**

50 Figura 1 muestra la secuencia de la *isoforma a* de IL-18BP de longitud completa. Los sitios putativos de N-glicosilación están marcados N\*. Las flechas señalan los extremos N-terminales de las seis variantes de IL-18BP de la invención.

Figura 2 muestra una preparación de IL-18BP teñida con gel SDS-PAGE con tinción de plata (A) y la correspondiente transferencia de western (B), que contiene las variantes de IL-18BP de la invención. Las pistas se cargaron de la forma siguiente:

Fig. 2A:

1. Marcador MW (PM)
2. r-hIL-18BP CT20 (2 µg)
3. r-hIL-18BP CT20 (2 µg)
4. r-hIL-18BP CT20 (2 µg)
5. ST1PO1/r-hIL-18BP

Fig. 2B:

1. Marcador MW
2. r-hIL-18BP CT20 (200 ng)
3. ST1PO1/r-hIL-18BP (200 ng)
4. Marcador MW

5 Figura 3 muestra el perfil SE-HPLC, así como las imágenes obtenidas con gel SDS-PAGE con tinción de plata (A) y la correspondiente transferencia de western (B) de los dos picos obtenidos en HPLC, comparados con una preparación estándar de la *isoforma a* de IL-18BP de longitud total pura.

### Descripción de la invención

10 La presente invención se basa en el hallazgo de que fue posible identificar variantes de IL-18BP durante la producción recombinante de la *isoforma a* de la IL-18BP recombinante humana. Estas variantes fueron caracterizadas y se encontró que representan fragmentos definidos truncados en los extremos N- y C-terminales de la *isoforma a* de IL-18BP de longitud total. En el marco de la presente invención, fue posible obtener la definición del patrón de N-glicosilación de IL-18BP recombinante, que conduce a una nueva variante de la IL-18BP de longitud total.

Sorprendentemente, todas las variantes de IL-18BP exhibieron una actividad biológica comparable con la de IL-18BP de longitud total en un bioensayo *in vitro*.

15 En estas variantes de IL-18BP se ha producido un "clipping" interno de IL-18BP.

De esta forma, la invención se refiere a una IL-18BP que comprende un primer polipéptido, consistente en los aminoácidos 1 a 30 de la SEC ID NO:1, y un segundo polipéptido consistente en los aminoácidos 31 a 164, o los aminoácidos 31 a 163, en donde el primer y segundo polipéptidos están unidos por un puente de disulfuro.

20 En un segundo aspecto, la IL-18BP comprende un primer polipéptido consistente en los aminoácidos 15 a 30 de la SEC ID NO:1, y un segundo polipéptido consistente en los aminoácidos 31 a 164, o los aminoácidos 31 a 163, en donde el primer y segundo polipéptidos están unidos por un puente de disulfuro.

La IL-18BP puede estar no glicosilada o glicosilada. Preferentemente, las IL-18BPs de la invención están N-glicosiladas en los residuos de asparagina Asn 49, Asn 73 y Asn 117 (numeración según la Figura 1).

25 Durante los experimentos que condujeron a la presente invención, se ha encontrado por primera vez que la *isoforma a* de la proteína fijadora de IL-18 de longitud completa, producida de forma recombinante, está no glicosilada en todos los sitios putativos de N-glicosilación, sino solamente en tres residuos de asparagina definidos, que son Asn 49, 73 y 117. Por lo tanto, se describe una IL-18BP que posee las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO:1, en donde la proteína está N-glicosilada en Asn 49, Asn 73 y Asn 117.

30 La secuencia de la IL-18BP humana de longitud total y sus variantes/isoformas alternativas de corte y empalme aparecen descritas, por ejemplo, en el documento WO 99/09063, o en Novick et al., 1999, así como en Kim et al., 2000. La SEC ID NO:1 representa la secuencia de aminoácidos de la *isoforma a* de la IL-18BP madura de longitud total.

35 En lo sucesivo, las proteínas de la invención se pueden designar en general como "IL-18BP", "IL-18BPs", o "IL-18BP(s) de la invención". Estas expresiones, tal como se usan en este documento, abarcan todas las variantes de IL-BP descritas en el marco de la presente invención.

40 Las proteínas según la presente invención pueden derivar de fuentes naturales tales como orina o, preferentemente, pueden ser producidas de forma recombinante. La expresión recombinante se puede llevar a cabo en sistemas de expresión procarióticos tales como *E. coli*, o en sistemas de expresión eucarióticos y, preferentemente, de mamíferos. Asimismo, preferentemente, se pueden producir en sistemas de expresión humanos. Líneas celulares establecidas, tales como la línea celular del ovario de hámster chino (CHO) o la línea celular de riñón embrionario humano 293, pueden ser especialmente útiles para la producción de las variantes de IL-18BP de la presente invención.

Variantes adicionales dentro del alcance de la presente invención pueden ser proteínas con sustituciones conservadoras de aminoácidos de las secuencias representadas en la Fig. 1, o del listado anexo de secuencias. Estas variantes se pueden preparar por síntesis conocidas y/o por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, o cualquiera de las técnicas conocidas apropiadas para ello.

- 5 Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de los polipéptidos de IL-18BP pueden incluir aminoácidos sinónimos dentro de un grupo que posee propiedades físico-químicas suficientemente similares para que la sustitución entre miembros del grupo mantenga la función biológica de la molécula (Grantham, 1974). Es evidente que las inserciones y deleciones de aminoácidos se pueden llevar a cabo también en las secuencias anteriormente definidas sin alterar su función, en especial si las inserciones o deleciones afectan sólo a unos pocos aminoácidos, por ejemplo menos de treinta y, preferentemente, menos de diez, o no eliminan o desplazan aminoácidos que son críticos para una conformación funcional, por ejemplo residuos de cisteína. Las proteínas y muteínas producidas por tales deleciones y/o inserciones se encuentran dentro del ámbito de la presente invención.

- 10 Preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 1. Más preferentemente, los grupos de aminoácidos sinónimos son los que se definen en la Tabla 2; y, de forma especialmente preferida, los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla 3.

**TABLA 1**

Grupos Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

**TABLA 2**

## Grupos Más Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

**TABLA 3**

## 5 Grupos Especialmente Preferidos de Aminoácidos Sinónimos

Aminoácido	Grupo Sinónimo
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly

Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

5 Se entiende que los cambios menores en la secuencia de aminoácidos de las variantes de IL-18BP se encuentran dentro del alcance de la invención, al tener una secuencia de aminoácidos suficientemente duplicativa de una variante de IL-18BP descrita en este documento, de forma que exhibe una actividad comparable a la de IL-18BP. Una actividad de IL-18BP es su capacidad de fijar IL-18. De esta manera, se puede determinar si cualquier variante dada tiene sustancialmente la misma actividad que IL-18BP por medio de experimentación convencional, que comprende someter una muteína de este tipo, por ejemplo, a un ensayo de competición simple de tipo sándwich para determinar si se une o no a una IL-18 marcada apropiadamente, tal como un radioinmunoensayo o un ensayo ELISA. Otro ensayo adecuado adicional que describe la actividad de IL-18BP es el bioensayo descrito en el ejemplo siguiente.

10 Ejemplos de producción de sustituciones de aminoácidos en proteínas que se pueden usar para obtener variantes de polipéptidos o proteínas de IL-18BP para usar en la presente invención incluyen cualquier etapa de método conocido tales como las que se describen en las patentes de EE.UU. 4.959.314, 4.588.585 y 4.737.462, concedidas a Mark et al., 5.116.943, concedida a Koths et al.; 4.965.195, concedida a Namen et al.; 4.879.111, concedida a Chong et al; y 5.017.691, concedida a Lee et al; y las proteínas sustituidas con lisina que se presentan en la patente de EE.UU. No. 4.904.584 (Shaw et al.).

15 En una forma de realización de la invención, las variantes de IL-18BP son proteínas fusionadas.

La expresión "proteínas fusionadas" hace referencia a un polipéptido que comprende una IL-18BP de la invención, fusionado con otra proteína que, por ejemplo, exhibe un periodo de permanencia extenso en los líquidos corporales. De esta forma, una IL-18BP puede estar fusionada con otra proteína, polipéptido o similar, por ejemplo, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma.

20 En una forma de realización preferida de la invención, la IL-18BP de la invención comprende una fusión con inmunoglobulina, es decir, es una proteína fusionada que comprende toda o una parte de una IL-18BP de la invención, que está fusionada con toda o una parte de una inmunoglobulina. Los métodos para producir proteínas de fusión con inmunoglobulinas son bien conocidos en la técnica tales como los que se describen, por ejemplo, en el documento  
 25 WO 01/03737. El experto en la técnica entenderá que la proteína de fusión resultante de la invención conserva la actividad biológica de la IL-18BP, en particular la unión a IL-18. La fusión puede ser directa, o a través de un péptido de enlace corto que puede tener entre 1 a 3 residuos de aminoácidos de longitud, o mayor, por ejemplo, 13 residuos de aminoácidos de longitud. Dicho enlazador puede ser un tripéptido de la secuencia E-F-M (Glu-Phe-Met) o, por ejemplo, una secuencia enlazadora de 13 aminoácidos que comprende Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-  
 30 Gln-Phe-Met, introducida entre la secuencia de la IL-18BP y la secuencia de la inmunoglobulina. La proteína de fusión resultante tiene propiedades optimizadas tales como un periodo de permanencia extendido en los líquidos corporales (semivida), una actividad específica incrementada, un mayor nivel de expresión, o se puede facilitar la purificación de la proteína de fusión.

35 En una forma de realización preferida, IL-18BP está fusionada con la región constante de una molécula de Ig. Preferentemente, está fusionada, por ejemplo, con regiones de cadena pesada tales como los dominios CH2 y CH3 de IgG1 o IgG3 humanas. La generación de proteínas de fusión específicas que comprenden IL-18BP y una porción de una inmunoglobulina se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 11 del documento WO 99/09063. Otras isoformas de

moléculas de Ig resultan también adecuadas para la generación de proteínas de fusión según la presente invención, tales como las isoformas IgG<sub>2</sub> o IgG<sub>4</sub>, u otras clases de Ig tales como, por ejemplo, IgM e IgA. Las proteínas de fusión pueden ser monómeras o multímeras, hetero- u homomultímeras.

5 La invención se refiere, adicionalmente, a un procedimiento para producir una proteína fusionada con IL-18BP que comprende preparar una construcción de ADN que codifica una IL-18BP de la invención ligada a un ácido nucleico que codifica un segundo polipéptido, en donde, tras su expresión, esta construcción de ADN codifica una proteína de fusión que comprende la IL-18BP de la invención fusionada con el segundo polipéptido.

Preferentemente, el segundo polipéptido es una porción de una inmunoglobulina, más preferentemente la porción Fc de una inmunoglobulina.

10 En una forma de realización adicional, las variantes de IL-18BP son derivados funcionales, en donde el derivado funcional comprende al menos un resto unido a uno o múltiples grupos funcionales, que se presentan como una o múltiples cadenas laterales en los residuos de aminoácidos.

15 La expresión "derivado funcional" como se usa en este documento abarca derivados de variantes de IL-18BP o sus proteínas fusionadas, que se pueden preparar a partir de los grupos funcionales presentes como cadenas laterales en los residuos o en los grupos N- o C-terminales, por medios conocidos en la técnica, y se incluyen en la invención con la condición de que sigan siendo farmacéuticamente aceptables, es decir, no destruyan la actividad de la proteína que es sustancialmente similar a la actividad de IL-18BP, o IL-18BPs virales, y no impartan propiedades tóxicas a las composiciones que las contienen. Los derivados funcionales de IL-18BP pueden estar conjugados con polímeros con el fin de mejorar las propiedades de la proteína tales como estabilidad, semivida, biodisponibilidad, tolerancia por parte del organismo humano, o inmunogenicidad. Para alcanzar este objetivo, la IL-18BP puede estar unida, por ejemplo, a polietilenglicol (PEG). La PEGilación se puede llevar a cabo por métodos conocidos, descritos, por ejemplo, en el documento WO 92/13095.

25 Asimismo, los derivados pueden incluir, por ejemplo, ésteres alifáticos de los grupos carboxílicos, amidas de los grupos carboxílicos por reacción con amoniaco o con aminas primarias o secundarias, derivados N-acilados de grupos amino libres de los residuos aminoácidos formados con restos acilo (por ejemplo, grupos alcanóilo o aroilo carbocíclicos), o derivados N-acilados de grupos hidroxilo libres (por ejemplo, los de los residuos de serilo o treonilo) formados con restos acilo.

30 La invención se refiere, adicionalmente, a un procedimiento para la producción de un derivado de IL-18BP de la invención, que comprende modificar químicamente una IL-18BP de la invención para incluir al menos un resto derivado. Preferentemente, el resto es un resto de polietilenglicol.

Una forma de realización todavía adicional de la invención se refiere a sales de variantes de IL-18BP.

35 El término "sales" en este documento se refiere tanto a sales de grupos carboxílicos como a sales por adición de ácido de grupos amino de una molécula variante de IL-18BP, o análogos de las mismas. Las sales de un grupo carboxílico se pueden formar por medios conocidos en la técnica, e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o cinc, y similares, y sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales por adición de ácidos incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cada una de estas sales debe conservar la actividad biológica de la IL-18BP importante para la presente invención, tales como la inhibición de la inducción del IFN-gamma en el bioensayo descrito en los ejemplos que se citan más adelante.

40 Adicionalmente, se describe un ácido nucleico que codifica una IL-18BP de la invención. Una secuencia de codificación de este tipo se puede deducir fácilmente de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 1 o en el listado de secuencias anexo. El experto en la técnica podrá ver que son concebibles muchas más secuencias de ácidos nucleicos para las IL-18BP de la invención debido a la degeneración del código genético.

45 Adicionalmente, se describe una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la invención. La célula hospedadora de este tipo puede ser procariótica o eucariótica, preferentemente de mamífero, más preferentemente una célula hospedadora apropiada para la expresión recombinante de proteínas terapéuticas, tales como células del ovario del hámster chino (CHO) o células humanas.

50 La invención se refiere, además, a un procedimiento para la producción de una IL-18BP de la invención que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora, como se ha descrito anteriormente, bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha IL-18BP.

El procedimiento para la producción de una IL-18BP puede comprender también la etapa de aislar la IL-18BP del sobrenadante del cultivo celular de una célula hospedadora de la invención.



En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una IL-18BP según la presente invención. Preferentemente, se trata de una composición farmacéutica. Opcionalmente, la composición farmacéutica comprende, adicionalmente, tensioactivos, excipientes, portadores, diluyentes y vehículos.

5 La definición de la expresión "farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo, y que no sea tóxico para el hospedador al que se administra. Por ejemplo, para la administración parenteral la o las proteínas activas se pueden formular en una forma de dosificación unitaria para inyección en vehículos tales como solución salina, solución de dextrosa, albúmina sérica y solución de Ringer.

10 Los ingredientes activos de la composición farmacéutica según la invención pueden administrarse a un individuo en una variedad de formas. Las vías de administración incluyen intradérmica, transdérmica (por ejemplo, en formulaciones de liberación lenta), intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, oral, intracraneal, epidural, tópica, rectal e intranasal.

Las vías de administración preferidas de la invención son las vías subcutánea e intramuscular.

15 Es posible utilizar cualquier otra vía de administración terapéuticamente eficaz, por ejemplo, absorción a través de tejidos epiteliales o endoteliales, o por terapia génica, en la que la molécula de ADN que codifica el agente activo se administra al paciente (por ejemplo, por medio de un vector), determinando la expresión y secreción del agente activo *in vivo*. Si se debe administrar un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de la o las IL-18BP de la invención, se puede inyectar, por ejemplo, por vía intramuscular en forma de ADN desnudo.

20 Para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular), la o las proteínas activas se pueden formular como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado asociado con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua, solución salina, solución de dextrosa) y aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, manitol) o la estabilidad química (por ejemplo, conservantes y soluciones tampón). La formulación se esteriliza por técnicas usadas habitualmente.

25 La biodisponibilidad de la o las proteínas activas según la invención se puede mejorar también empleando procedimientos de conjugación que incrementan la semivida de la molécula en el organismo humano, por ejemplo, enlazando la molécula a polietilenglicol, tal como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO 92/13095.

30 Las cantidades terapéuticamente efectivas de la o las proteínas activas serán función de numerosas variables, incluido el tipo de IL-18BP usada, su afinidad por la IL-18, cualquier actividad citotóxica residual exhibida por la o las IL-18BP, la vía de administración, el estado clínico del paciente (incluida la aspiración de mantener un nivel no tóxico de actividad endógena de IL-18BP).

35 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" es aquella que, cuando se administra la variante de IL-18BP, se produce la inhibición de la actividad biológica de la IL-18. La dosificación administrada, como dosis únicas o múltiples a un individuo variará dependiendo de una serie de factores, incluidas las propiedades farmacocinéticas de la variante de IL-18BP, la vía de administración, el estado y las características del paciente (sexo, edad, peso corporal, estado de salud, tamaño), intensidad de los síntomas, tratamientos concurrentes, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos se encuentran dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, así como de los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la inhibición de IL-18 en un individuo.

40 En una forma de realización preferida de la presente invención, la variante de IL-18BP se usa en una cantidad de aproximadamente 0,001 hasta 1000 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,001 hasta 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,01 hasta 10 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,1 hasta 5 mg/kg, o aproximadamente 1 a 3 mg/kg de peso corporal.

La frecuencia de administración puede ser diaria o en días alternos. También puede ser de tres veces a la semana o una vez a la semana.

45 Las dosis administradas pueden ser siempre idénticas o variar en función de las necesidades del paciente. Las dosis se administran habitualmente en dosis divididas o en formas de liberación sostenida, efectivas para obtener los resultados deseados. Se pueden llevar a cabo administraciones adicionales o subsiguientes a una dosificación igual, menor o mayor que la dosis inicial o previa administrada al individuo. La administración adicional o subsiguiente se puede efectuar durante o con anterioridad a la aparición de la enfermedad.

50 De acuerdo con la invención, la variante de IL-18BP se puede administrar de forma profiláctica o terapéutica a un individuo antes, simultánea o secuencialmente con otros regímenes o agentes terapéuticos (por ejemplo, regímenes multifarmacológicos) en una cantidad terapéuticamente efectiva, en particular con un interferón y/o un inhibidor de TNF. Los agentes activos que se administran simultáneamente con otros agentes terapéuticos se pueden suministrar en la misma o en diferentes composiciones.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de una IL-18BP de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o trastorno mediado por IL-18. Las enfermedades mediadas por IL-18 son conocidas en la técnica (reseñadas, por ejemplo, por Gracie et al., 2003).

5 En una forma de realización preferida, la enfermedad que se debe tratar o prevenir por medio de la variante de IL-18BP de la invención se selecciona de psoriasis, artritis, en particular artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, en particular enfermedad de Crohn, lesión hepática, aterosclerosis, sepsis, infarto de miocardio, lesión cerebral traumática, alergia, enfermedad vascular periférica, esclerosis múltiple, metástasis tumorales.

Para una descripción y definición detalladas de estas enfermedades se hace referencia especial a las siguientes solicitudes de patente publicadas:

10 WO 99/09063, WO 01/07480, WO 02/060479, WO 02/096456, WO 02/092008, WO 03/013577.

Los interferones son conocidos principalmente por sus efectos inhibitorios sobre la replicación viral y la proliferación celular. Por ejemplo, el interferón  $\gamma$  desempeña un papel importante en la promoción de respuestas inmunes e inflamatorias. Se afirma que el interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ , un interferón de tipo I) tiene una función antiinflamatoria.

15 Por lo tanto, la invención se refiere también al uso de una combinación de una IL-18BP de la invención y un interferón en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por IL-18.

Los interferones también se pueden conjugar con polímeros para mejorar la estabilidad de las proteínas. Por ejemplo, en el documento WO 99/55377 se describe un conjugado entre interferón  $\beta$  y el poliol polietilenglicol (PEG).

En otra forma de realización preferida de la invención, el interferón es interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) y, más preferentemente, IFN- $\beta$  1a.

20 La IL-18BP de la invención se utiliza preferentemente de forma simultánea, secuencial o separada con el interferón.

En todavía una forma de realización adicional de la invención, se usa una IL-18BP de la invención en combinación con un antagonista de TNF. Los antagonistas de TNF desarrollan su actividad de diversas maneras. En primer lugar, los antagonistas pueden unirse o secuestrar la propia molécula de TNF, con afinidad y especificidad suficientes para neutralizar parcial o sustancialmente el o los epítopos de TNF responsables de la fijación del receptor de TNF (denominados en lo sucesivo "antagonistas secuestrantes"). Un antagonista secuestrante puede ser, por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra TNF.

25 De manera alternativa, los antagonistas de TNF pueden inhibir la vía de señalización de TNF activada por el receptor de la superficie celular tras la fijación de TNF (designados en lo sucesivo como "antagonistas de señalización"). Los dos grupos de antagonistas son útiles, ya sean solos o unidos, en combinación con una variante de IL-18BP, en la terapia de los trastornos de hipersensibilidad.

30 Los antagonistas de TNF se identifican fácilmente y se evalúan por el análisis convencional del efecto de los candidatos sobre la actividad del TNF nativo en líneas celulares susceptibles *in vitro*, por ejemplo células B humanas, en las que TNF provoca la proliferación y secreción de inmunoglobulina. El ensayo contiene una formulación de TNF en diluciones variables del antagonista candidato, por ejemplo desde 0,1 hasta 100 veces la cantidad molar de TNF usada en el ensayo, y controles exentos de TNF o solamente antagonista (Tucci et al., 1992).

35 Según la presente invención, se prefiere el uso de antagonistas secuestrantes como antagonistas de TNF. Entre los antagonistas secuestrantes, se prefieren los polipéptidos que fijan TNF con alta afinidad y que poseen baja inmunogenicidad. Son especialmente preferidas las moléculas solubles de receptor de TNF y anticuerpos neutralizantes contra TNF. Por ejemplo, en la presente invención son útiles TNF-RI (denominado también p55) y TNF-RII (llamado también p75) solubles. Según la presente invención, los antagonistas más particularmente preferidos son las formas truncadas de estos receptores, que comprenden los dominios extracelulares de los receptores o porciones funcionales de los mismos. Los receptores solubles de tipo I y tipo II de TNF se describen, por ejemplo, en las Patentes Europeas EP 308 378, EP 398 327 y EP 433 900.

40 Estos receptores truncados y solubles de TNF son solubles y han sido detectados en orina y suero como proteínas fijadoras inhibitorias de TNF, denominadas TBPI y TBPII, respectivamente (Engelmann et al., 1990). Según la invención, se prefiere el uso simultáneo, secuencial o separado de la variante de IL-18BP con el antagonista de TNF y/o un interferón.

45 Según la invención, TBPI y TBPII son los antagonistas de TNF preferidos para utilizar en combinación con una variante de IL-18BP de la invención. Los derivados, fragmentos, regiones y porciones biológicamente activas de las moléculas receptoras se asemejan funcionalmente a las moléculas receptoras que se pueden usar también en la presente invención. Este equivalente o derivado biológicamente activo de la molécula receptora hace referencia a la porción del polipéptido, o a la secuencia que codifica la molécula receptora, con un tamaño suficiente y con capaci-

dad para fijar el TNF con una afinidad tal que inhibe o bloquea la interacción con el receptor de TNF unido a la membrana.

5 La invención se refiere, adicionalmente, al uso de un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de una IL-18BP de la invención, en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de trastornos mediados por IL-18. De este modo, se considera un método de terapia génica para suministrar la variante de IL-18BP en el sitio donde es requerido. Con el fin de tratar y/o prevenir un trastorno de hipersensibilidad, el vector de terapia génica, que comprende la producción y/o acción de la secuencia de una variante de IL-18BP, se puede inyectar directamente en el tejido afectado, evitando de esta forma los problemas asociados con la administración sistémica de vectores de terapia génica, tales como la dilución de los vectores, alcanzar y objetivar las células o tejidos diana, y los efectos secundarios.

10 La invención se refiere, además, al uso de una célula modificada genéticamente para producir una IL-18BP de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad mediada por IL-18.

15 Adicionalmente, la invención se refiere a un método para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar una cantidad efectiva de una variante de IL-18BP y/o un interferón y/o un antagonista de TNF, con un portador farmacéuticamente aceptable.

La invención se refiere, además, a un método de tratamiento de enfermedades mediadas por IL-18, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de una variante de IL-18BP a un paciente que la necesita.

20 Una vez descrita en su totalidad esta invención, los expertos en la técnica observarán que la misma se puede llevar a la práctica con una amplia gama de parámetros, concentraciones y condiciones equivalentes, sin apartarse del espíritu y alcance de la invención, y sin necesidad de experimentación indebida.

25 Mientras que la presente invención ha sido descrita en conexión con formas de realización específicas de la misma, se entenderá que es susceptible de experimentar modificaciones adicionales. Esta solicitud aspira a abarcar cualquier variación, uso o adaptación de la invención, siguiendo en general los principios de la invención e incluyendo desviaciones de la presente descripción que se entienden como prácticas conocidas o habituales en la técnica a la que pertenece la invención, y que pueden ser aplicadas a las características esenciales expuestas anteriormente, tal como se desprende del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 La referencia a etapas de método conocidas, etapas de métodos convencionales, métodos conocidos o métodos convencionales no supone admitir, en ningún caso, que ningún aspecto, descripción o forma de realización de la presente invención hayan sido descritos, enseñados o indicados en la técnica pertinente.

35 La anterior descripción de las formas de realización específicas revelará la naturaleza general de la invención de manera tan completa que otras personas, aplicando los conocimientos asociados con la experiencia en la técnica (incluido el contenido de las citas bibliográficas mencionadas en este documento), podrán modificar y/o adaptar fácilmente dichas formas de realización a diversas aplicaciones sin experimentación indebida y sin apartarse del concepto general de la presente invención. Por lo tanto, se pretende que tales adaptaciones y modificaciones se encuentren dentro del significado y gama de equivalentes de las formas de realización descritas, basados en las enseñanzas y directrices expuestas en este documento. Se debe entender que la redacción o terminología usadas en este documento tienen como finalidad la descripción, y no la limitación, de manera que la terminología o redacción de la presente especificación deben ser interpretadas por el experto en la técnica a la luz de las enseñanzas y directrices presentadas en esta memoria, junto con los conocimientos propios de un experto en la técnica.

40

EJEMPLO

IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES DE IL-18BP

MATERIALES Y MÉTODOS

**Materiales y equipos**

Fotómetro MCC 349 o EX para placas de microtitulación de 96 pocillos	Labsystem
Balanza analítica modelo AG145	Mettler-Toledo
Cartucho Aquapore RP300 30 x 4,6 mm, código 0711-0055	Brownlee
Secuenciador automatizado modelo Proclise 494	Applied Biosystem
Pipetas automáticas (P1000, P200, P100, P20)	Gilson

## ES 2 384 241 T3

Contador "Coulter" de células	Counter-Z1
Incubadora CO <sub>2</sub>	Heraeus
Software Excel	
Congelador -20°C ± 5°C	Angelantoni
Congelador -80°C ± 10°C	Angelantoni
Software GraphPad Prism	
HPLC modelo Alliance 2690	Waters
Bomba de HPLC, modelo 600 S, con calentador de columna	Waters
Integrador D2500	Merck
Campana de Flujo Laminar	Flow Laboratories
MALDI-ToF, modelo Voyager DE-Pro	Perseptive Biosystem
Espectrofotómetro de masa modelo ZQ	Waters Micromass
Multiphor II	Pharmacia
Multitemp II	Pharmacia o equivalente
Ordenador personal	CompaQ
pH-metro MA235	Mettler o equivalente
pH-metro modelo MP225	Mettler-Toledo
Fuente de energía EPS 3501 XL	Pharmacia o equivalente
Refrigerador +5°C ± 3°C	Angelantoni
Escáner AGFA Arcus II	Agfa o equivalente
Módulo de separación 2690 Alliance	Waters
Software Agfa Fotolook v. 3.0	Agfa o equivalente
Software Millenium <sup>32</sup> versión 3.20	Waters
Software Phoretix 1D	Phoretix o equivalente
Software Picture Publisher v.8	Micrografx o equivalente
Spectrolinker XL 1000 Cross Linker (fuente UV)	Spectronics Corporation
Statgraphics Plus Symmetry, columna C18 3,5 µm 75x4,6 mm, código WAT066224	Waters
Balanza técnica modelo PEG2002	Mettler-Toledo
Detector UV 2487	Waters
Detector UV modelo 2487	Waters
Detector UV modelo 996	Waters
<u>Sustancias químicas</u>	
Ditiotreitól (DTT) código D5545	Sigma
Tris, código 1.08382	Merck

## ES 2 384 241 T3

EDTA, código 1.08418	Merck
Acetonitrilo (ACN) código 1.00030	Merck
Bicarbonato de amonio, código 1.01131	Merck
Amoniaco 25%, código 1.05432	Merck
Cloruro de calcio 2 H <sub>2</sub> O, código I3381	Sigma
Endoproteinasa Tripsina Bovina, Modificada, grado de secuenciación, código 1418-025	Roche
Neuraminidasa (Sialidasa), código 1080-725	Roche
Agua (H <sub>2</sub> O) Grado MilliQ	Millipore
Ácido trifluoroacético (TFA), código 9470	Baker
Ácido acético glacial, código 00063	Merck
Hidróxido sódico, código 7067	Baker
Ácido Yodoacético, código I2512	Sigma
Acetato sódico 3M, pH 5,5, código 400471	Applied Biosystem
Ácido clorhídrico al 37%, código 1.000314	Merck
β-mercaptoetanol, código M 6250	Sigma
Éter dietílico, código 447521	Carlo Erba
Guanidina, código N24115	Pierce
NaCsl, código 700000889-2	ULTRA Scientific
Nitrógeno UPP	Caracciolo
Metanol grado gradiente, código 1.06007	Merck
Eppendorf 1,5 ml	Eppendorf
Agua (H <sub>2</sub> O) purificada por Modulab 2020®	Continental
Acetonitrilo (grado HPLC), código 1.00030	Merck
Ácido o-fosfórico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) al 85%, código 1.00573	Merck
Sulfato sódico (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), código 1.06649	Merck
Columna TSK G2000 SW <sub>XL</sub> 7,8x300, código 08540	Toso Haas
Conjugado de peroxidasa de rábano picante-IgG anti-ratón de cabra, código 170-6516	BioRad
Anticuerpo monoclonal anti-r-hIL-18BP, clon 582.10	IPL
Tiras tampón ExcelGel SDS, código 17-1342-01	Pharmacia
ExcelGel SDS Homogeneous al 12,5%, código 80-1261-01	Pharmacia
Hyperfilm ECL 18x24 cm, código RPN2103	Pharmacia-Biotech
Kit ECL, código RPN2106	Pharmacia-Biotech
Kit Silver PlusOne, código 17-1150-01	Pharmacia
Membrana de nitrocelulosa 0,2 mm, código BA-83	Schleicher & Schuell

I-Block, código AI300	Tropix
Material de Referencia Provisional ST1PO1/r-hIL-18BP	IFS
Marcador de peso molecular (97-14 kDa), código 17-0446-01	Pharmacia
Tween 20	Merck
Solución salina tamponada con fosfato (PBS), con iones de calcio y magnesio	Sigma
Placa de 96 pocillos	Falcon
Placa de microtitulación de 96 pocillos	Maxi Sorp Nunc
IMDM	GIBCO
2-mercaptoetanol	Sigma
Penicilina/Estreptomina	Gibco
Suero fetal bovino (FBS)	GIBCO
Kit de Inmunoensayo de IFN- $\gamma$ humana – Set DUO Sistema de Revelado de ELISA	R&D Systems
Albúmina de Suero Bovino (BSA)	Sigma
Solución de sustrato	R&D Systems
Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck
<i><u>Materiales biológicos</u></i>	
Línea celular de leucemia mielógena aguda humana KG-1	Interna
Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) humano recombinante	R&D Systems
Interleuquina-18 (r-hIL-18) humana recombinante	Producción interna
Proteína Fijadora de Interleuquina-18 (r-hIL-18BP) humana recombinante (46,39 mg/ml por Análisis de Aminoácidos)	Producción interna

## MÉTODOS

### MAPEO DE PÉPTIDOS POR TRIPSINA

El mapeo se llevó a cabo de acuerdo con protocolos convencionales, esbozados más adelante.

#### 5 TRATAMIENTO CON NEURAMINIDASA

Se disolvieron aproximadamente 150  $\mu$ g de r-hIL-18BP deshidratada con 200  $\mu$ l de Acetato de Amonio 0,2 M, Cloruro de Calcio 16 mM, solución tampón a pH 5,5 y 100 mUI de Sialidasa. La reacción se llevó a cabo a 37°C  $\pm$  1°C durante 1 hora. Seguidamente, la proteína se secó en un sistema Speed-Vacuum. Tras la desecación, la proteína se redujo y se alquiló de la forma descrita más adelante.

#### 10 REDUCCIÓN Y ALQUILACIÓN

Disolución con 200  $\mu$ l de Tris-Cl 0,5 M, EDTA 2 mM a pH 8,5  $\pm$  0,05, Guanidina 6 M, 11 mg/ml de ditiotreitól, bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se efectuó a temperatura ambiente durante 1 hora. A continuación, se agregaron 25  $\mu$ l de 250 mg/ml de ácido yodoacético bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se incubó en la oscuridad a 37  $\pm$  1°C durante 45 min y se interrumpió agregando 200  $\mu$ l de TFA acuoso al 0,1% y 20  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 15 min.

#### 15 PROCEDIMIENTO DE PURIFICACIÓN

Tras la reducción y alquilación, la proteína se purificó en RP-HPLC de la forma descrita más adelante.

## ES 2 384 241 T3

Columna: Aquapore RP 300 (4,6 x 30 mm), código 0711-0055 Brownlee

Eluyente A: TFA acuoso al 0,1%

Eluyente B: TFA al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN

Temperatura de Columna: +40°C

5 Detector UV fijado a 214 nm.

<b>Gradiente</b>				
Tiempo (minutos)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B	Curva
0	1	95	5	
5	1	95	5	6
6	1	80	20	6
41	1	35	65	6
46	1	20	80	1
47	1	95	5	6
57	1	95	5	6

El material purificado se secó en un sistema speed-vac, se disolvió en 250 µl de bicarbonato de amonio 0,1 M a pH 9,0 ± 0,05 y se incubó con 5 µl de tripsina bovina modificada a 37 ± 1°C durante 4 horas, con agitación intermitente. La reacción se detuvo por la adición de 60 µl de TFA acuoso al 5%.

10 ANALÍTICA DE RP-HPLC DEL MAPEO CON PÉPTIDO TRÍPTICO

La mitad del volumen de la mezcla de péptidos de r-hIL-18BP se purificó en RP-HPLC de la forma descrita a continuación:

Columna: Waters Simmetry C18 3,5 µm (4,6x75 mm)

Eluyente A: TFA acuoso al 0,1%

15 Eluyente B: TFA al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN

Temperatura: +45°C

Detector UV fijado a 214 nm

<b>Gradiente</b>				
Tiempo (minutos)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B	Curva
0	1,0	98	2	
2	1,0	98	2	6
61	1,0	98	2	6
63	1,0	57	43	6
65	1,0	98	2	6

ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN EDMAN

Se llevó a cabo una secuenciación automatizada de Edman en un secuenciador de proteínas Procise, siguiendo las instrucciones del fabricante.

MALDI-TOF

5 Se llevaron a cabo los espectros MALDI-ToF en un sistema PE-Pro Voyager, siguiendo las instrucciones del fabricante.

MAPEO DE PÉPTIDOS DE TRIPSINA POR LC-ES/MS

La r-hIL-18BP se sometió al procedimiento de mapeo de péptidos según el procedimiento mencionado anteriormente. Tras la digestión, se analizó una parte alícuota de la mezcla de péptidos de cada muestra según se describe a continuación:

10 Columna: Waters Simmetry C18 3,5 µm (4,6x75 mm)

Eluyente A: TFA acuoso al 0,1%

Eluyente B: TFA al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN

Temperatura: +45°C

Detector UV fijado a 214 nm

Gradiente				
Tiempo (minutos)	Caudal (ml/min)	% de A	% de B	Curva
0	0,7	98	2	
12	0,7	98	2	6
71	0,7	57	43	6
73	0,7	10	90	1
75	0,7	98	2	6

15 Después del detector UV, se dividió el caudal con el fin de introducir en la fuente del espectrómetro 50 µl/min. El espectrómetro de masa se fijó con los parámetros siguientes:

Voltaje capilar: 3,5 KV

Voltaje de cono: 35 V

20 Lentes HV: 0,45 KV

Temperatura fuente: 80°C

Resolución: 14 HM; 14 LM

MÉTODO SELECCIONADO DE SEC ( *cromatografía de exclusión por tamaño*) PARA DETERMINAR EL CONTENIDO EN DÍMEROS/AGREGADOS

25 El análisis de SE-HPLC se llevó a cabo de la forma siguiente:

Eluyente	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 M, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,3 M, pH 7,3 con NaOH, CAN 3%
Tipo de columna	TSK G2000 SW <sub>XL</sub> 7,8x300, código 08540
Temperatura del cargador automático de muestras	+4°C ± 2°C
Temperatura de columna	Temperatura ambiente



Longitud de onda de detección	214 nm
Caudal de la fase móvil	0,5 ml/min
Tiempo de análisis	30 minutos
Retraso para inyección siguiente	No menor de 5 minutos

#### TINCIÓN DE SDS-PAGE Y PLATA

5 Bajo condiciones no reductoras, se cargaron 2 µg de r-hIL-18BP sobre gel preformado ExcelGel® SDS Homogeneous al 12,5% (de Amersham Biosciences), y se sometieron a voltaje constante (600 V) a 15°C. También se cargaron en el gel marcadores de peso molecular y los Materiales de Referencia Provisionales ST1P01/r-hIL-18BP.

10 Después del ciclo electroforético, el gel se tiñó con el Kit de Tinción de Plata-Proteína (PlusOne), según las instrucciones contenidas en el prospecto del kit. En pocas palabras, el gel se fijó durante 30 minutos en una solución compuesta por ácido acético y etanol. Después de una etapa de lavado, se agregó la solución de sensibilización, que se retiró después de 30 minutos. El gel se lavó nuevamente y, a continuación, se hizo reaccionar con la solución de plata durante 20 minutos. Después de un ciclo de lavado, se reveló la tinción en solución reveladora y, subsiguientemente, se detuvo. Seguidamente, el gel se lavó exhaustivamente en agua y se mantuvo en solución de conservación antes de su almacenamiento final en Láminas de Celofán.

Los geles se escanearon y los datos se elaboraron usando el software Phoretix 1-D Full.

#### SDS-PAGE Y TRANSFERENCIA DE WESTERN

15 Bajo condiciones no reductoras, se cargaron 200 ng de r-hIL-18BP sobre gel preformado ExcelGel® SDS Homogeneous al 12,5% (de Amersham Biosciences), y se sometieron a voltaje constante (600 V) a 15°C. También se cargaron en el gel marcadores de peso molecular y los Materiales de Referencia Provisionales ST1P01/r-hIL-18BP.

20 Después del ciclo electroforético, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa por contacto pasivo durante 60 minutos a temperatura ambiente, y se sondaron con 0,1 µg/ml del anticuerpo monoclonal contra el clon 582,10 de r-hIL-18BP (IPL). La reacción se reveló por medio de un sustrato quimioluminiscente (kit ECL de Amersham Biosciences) tras la reacción con conjugado HRP-IgG anti-ratón de cabra diluido a 1:2000. La emisión de luz se detectó por 10 segundos o 1 minuto de exposición sobre una película de autorradiografía sensible.

Se utilizaron métodos de tinción con azul Coomassie o plata para detectar por medio de marcadores de PM.

25 Después de la inmunodetección, se escaneó la película y se derivaron automáticamente los valores de peso molecular (MW/PM) de las bandas a partir de la curva de calibración de PM usando el software Phoretix 1-D Full.

#### BIOENSAYO *IN VITRO* DE CÉLULAS KG-1

30 La actividad biológica de las muestras se cuantificó utilizando un bioensayo *in vitro*. Este bioensayo se basó en la capacidad de la línea celular de la leucemia mielógena aguda humana KG-1 para producir IFN-γ en respuesta a la IL-18 humana más TNF-α humano de manera dependiente de la dosis. La r-hIL-18BP fija específicamente la IL-18, neutralizando su actividad biológica y suprimiendo, de este modo, la producción de IFN-γ.

35 En pocas palabras, se agregaron células KG-1 en una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo a una placa de 96 pocillos que contenían ya concentraciones diferentes de r-hIL-18BP, en presencia de una concentración fija de r-hIL-18 (40 ng/ml en el pocillo), más una concentración fija de r-hTNF-α (10 ng/ml en el pocillo). La concentración de cada una de estas dos sustancias combinadas entre sí pudo indicar la inducción sub-máxima de IFN-γ en células KG-1. Después de 24 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, la placa se expuso a -20°C para someter las células tratadas a un ciclo de congelación/descongelación, antes de llevar a cabo el inmunoensayo para determinar la cantidad de IFN-γ presente en el sobrenadante celular. Se recogieron los sobrenadantes celulares y se midió el IFN-γ humano por medio de un inmunoensayo específico (ELISA h-IFN-γ, kit Duo Set, R&D Systems). La cantidad de IFN-γ producida por las células tratadas (con la curva estándar o la muestra de IL-18BP) se calculó interpolando los valores *y* (D.O.) en la curva estándar de IFN-γ, se le agregó el kit, se ajustó por una respuesta a la dosis Sigmoidal (4PL), se transformó Log/Log *y*, de esta forma, se obtuvieron los valores *x* (concentraciones de IFN-γ) (GraphPad Prism).

45 La actividad biológica de la muestra de IL-18BP se determinó con respecto a la preparación de referencia, analizando la muestra a dos concentraciones incluidas en la parte lineal de la curva de respuesta a la dosis de referencia. Se llevaron a cabo al menos dos experimentos independientes. En cada ensayo independiente, cada concentración se analizó en duplicados dependientes en una placa.

El título de la muestra de IL-18BP para cada concentración ensayada se calculó interpolando los valores y promediados (dos replicados) (D.O.) de la cantidad de IFN- $\gamma$  producida en la parte lineal de la curva de respuesta a la dosis de referencia (transformada Log/Log), obteniendo de esta forma los valores x (actividad de IL-18BP).

5 El valor obtenido de cada concentración se promedió y se determinó la actividad final de la muestra de la sustancia farmacológica IL-18BP por la media aritmética de las potencias obtenidas de cada uno de los ensayos independientes realizados.

El título de las diferentes sustancias farmacológicas IL-18BP se calculó con respecto al Material de Referencia Provisional ST1P01/r-hIL-18BP.

Se llevaron a cabo dos experimentos independientes.

## 10 RESULTADOS

### Antecedentes

15 En la Fig. 1 se muestra la estructura primaria de la r-hIL-18BP de longitud total. La proteína tiene una heterogeneidad C-terminal, con moléculas que terminan en el residuo 164 (longitud total) y el residuo 163 (C-1aa), siendo esta última la forma principal. El análisis de espectrometría de masa de péptidos tripticos ha demostrado además que la molécula está altamente glicosilada y porta oligosacáridos enlazados tanto a N como a O.

La molécula contiene cuatro sitios de N-glicosilación potenciales, en Asn 49, Asn 64, Asn 73 y Asn 117. Solamente tres de los cuatro sitios se han encontrado glicosilados, a saber Asn 49, Asn 73 y Asn 117, en tanto que Asn 64 se ha encontrado glicosilado sólo en cantidades indiciarias.

20 El peso molecular promedio de la molécula completa, determinado por SDS-PAGE y SE-HPLC, es de aproximadamente 50 kDa.

En la Tabla 4 se indica la composición de aminoácidos.

**TABLA 4.** Composición de aminoácidos.

Aminoácido	Código de tres letras	Código de una letra	No	%
Alanina	Ala	A	13	7,9%
Arginina	Arg	R	7	4,3%
Asparagina	Asn	N	4	2,4%
Ácido aspártico	Asp	D	2	1,2%
Cisteína	Cys	C	6	3,7%
Glutamina	Gln	Q	12	7,3%
Ácido glutámico	Glu	E	9	5,5%
Glicina	Gly	G	9	5,5%
Histidina	His	H	4	2,4%
Isoleucina	Ile	I	2	1,2%
Leucina	Leu	L	19	11,6%
Lisina	Lys	K	3	1,8%
Metionina	Met	M	0	0,0%
Fenilalanina	Phe	F	5	3,0%
Prolina	Pro	P	17	10,4%
Serina	Ser	S	18	11,0%
Treonina	Thr	T	15	9,1%

Triptófano	Trp	W	4	2,4%
Tirosina	Tyr	Y	1	0,6%
Valina	Val	V	14	8,5%

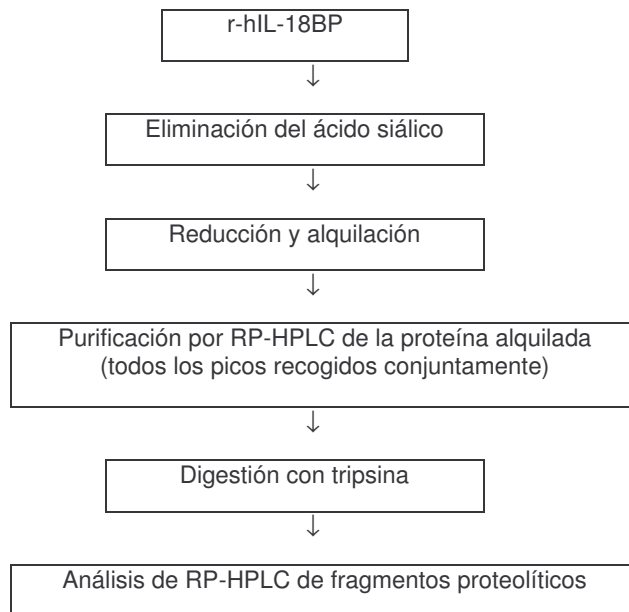
Los ensayos convencionales de QC (Control de Calidad) de lotes de producción exentos de suero revelaron que:

- Hubo un perfil de mapeo de péptidos no conforme (un importante pico adicional ya durante la purificación de proteína reducida y alquilada);
- 5
- Se obtuvo un perfil anormal de SE-HPLC;
  - En SDS-PAGE se detectó una banda doble;
  - En RP-HPLC se obtuvo un perfil similar;
  - La actividad específica frente a IL-18BP homogénea producida en medio que contuvo suero (el “estándar de referencia”) fue comparable.

10 PROCEDIMIENTO DE MAPEO DE PÉPTIDOS

Dado que r-hIL-18BP es una molécula altamente glicosilada, que presenta una elevada heterogeneidad en términos de glicosilación, la proteína se sometió a tratamiento con Neuraminidasa con el fin de reducir la heterogeneidad de oligosacáridos debida al ácido siálico. A continuación, la proteína se sometió a reducción, carboxi-metilación y purificación para que los sitios de escisión de tripsina fueran accesibles a la enzima.

15 El procedimiento peptídico se llevó a cabo con las siguientes etapas:



Durante la purificación de los lotes reducidos y alquilados de r-hIL-18BP de la producción libre de suero se detectó ya un perfil cromatográfico diferente del obtenido con la r-hIL-18BP producida en un medio que contuvo suero (no se muestra).

20 Adicionalmente, el perfil de mapeo de péptidos de una forma truncada de r-hIL-18BP, comparado con la r-hIL-18BP del actual estándar de referencia, mostró tanto un pico extra como una intensidad relativa diferente de péptidos glicosilados (no se muestra).

ANÁLISIS N-TERMINAL

El análisis de secuencias de la molécula intacta exhibió diferentes fragmentos correspondientes a la molécula que se inicia en los residuos 1, 16, 31 y, en cantidades menores, en los residuos 69, 70, 107 y 125. El análisis N-terminal se representa en la Figura 1.

MALDI-TOF

5 Los espectros obtenidos de MALDI-ToF mostraron un pico adicional a menor peso molecular (no se muestra).

Análisis de SDS-PAGE (Figura 2)

10 La r-hIL-18BP tiene un peso molecular relativo de aproximadamente 50 kDa, según se determina por SDS-PAGE al 12,5%. La r-hIL-18BP producida en ausencia de suero mostró una banda adicional de aproximadamente 40 kDa, detectada por la tinción de plata. Las dos bandas reaccionaron con un anticuerpo específico para IL-18BP (clon 582.10) en el análisis de Transferencia de Western. El gel SDS-PAGE teñido con plata se muestra en la Figura 2A, y la Transferencia de Western, en la Figura 2B.

La ocupación de las pistas fue la siguiente:

- 15
- |                           |                               |
|---------------------------|-------------------------------|
| 6. Marcador de PM         | 5. Marcador de PM             |
| 7. r-hIL-18BP CT20 (2 µg) | 6. R-hIL-18BP CT20 (200 ng)   |
| 8. r-hIL-18BP CT20 (2 µg) | 7. ST1P01/r-hIL-18BP (200 ng) |
| 9. r-hIL-18BP CT20 (2 µg) | 8. Marcador de PM             |
| 10. ST1P01/ r-hIL-18BP    |                               |

20 CT20 es un lote de IL-18BP truncada, en tanto que ST1P01 es la IL-18BP de longitud total estándar, sin formas truncadas.

BIOENSAYO

25 Se evaluó si. Los resultados de actividad específica de los diferentes lotes de sustancia farmacológica IL-18BP se muestran en la Tabla 5, en la que se representan la forma no truncada (ILNCT16-18 y ST1P01) y truncada (destacada, ILNCT 19-22).

**TABLA 5**

Sustancias IL-18BP	Actividad biológica U/ml	Contenido en proteínas por D.O. mg/ml	Actividad específica U/mg
ILNCT16	1.005.906	60,3	10.682
ILNCT17	1.167.546	56,8	20.555
ILNCT18	1.1590.841	55,3	20.811
ILNCT19	949.440	61,6	15.413
ILNCT20	1.225.693	57,2	21.428
ILNCT21	1.278.583	62,8	20.360
ILNCT22	1.347.902	59,8	22.540
ILNCT23	1.200.463	60,7	19.777
ILNCT24	1.013.834	56,65	17.896
ST1PO1	895,69	46,39 (AAA)	19.312

Este experimento demuestra que la IL-18BP truncada tiene una actividad biológica comparable a la de IL-18BP no truncada.

R-HIL-18BP TRUNCADA

5 Con el fin de caracterizar el pico extra detectado por diferentes técnicas, se empleó el análisis de SE-HPLC para separar los picos de interés, al objeto de someterlos a etapas de caracterización adicionales. Para este propósito, los dos picos se recogieron por separado.

Para identificar inequívocamente los picos recogidos, los picos 1 y 2 se inyectaron nuevamente en la columna de HPLC.

Ambos picos se sometieron a mapeo de péptidos según el protocolo descrito anteriormente.

10 Los perfiles cromatográficos de las muestras reducidas y alquiladas aparecen en la Figura 3.

Solamente los picos principales de cada fracción se sometieron a mapeo de péptidos y se analizaron por LC-ES/MS:

El pico extra (péptido 31-61) que aparece en los perfiles de mapeo de péptidos se debe a escisiones internas de la molécula, tal como se confirma por el análisis de secuencias de los picos y de la molécula intacta.

15 Adicionalmente, las intensidades diferentes de los péptidos glicosilados (Pep. 1-15, Pep. 1-32 y Pep. 16-32) muestran un patrón de glicosilación diferente.

El análisis N-terminal llevado a cabo sobre el pico 1 y el pico 2 recogidos directamente del análisis de SE-HPLC dio los resultados siguientes:

**Análisis N-terminal del Pico 1 aislado por SE-HPLC**

Extremo N-terminal	T	P	V	S	Q	X	X	aproximadamente 54%
Desde 31	A	K	Q	X	P	A	L	aproximadamente 46%
Desde 16	S	T	K	D	P	C	P	trazas

20 **Análisis N-terminal del Pico 2 aislado por SE-HPLC**

Desde 16	S	T	K	D	P	C	P	aproximadamente 63%
Desde 31	A	K	Q	X	P	A	L	aproximadamente 37%
Extremo N-terminal	T	P	V	S	Q	X	X	trazas

El peso molecular aparente asignado por SDS-PAGE (Fig. 3) se confirmó por los espectros de MALDI-ToF (no se muestra).

**CONCLUSIONES**

25 Los resultados obtenidos con el uso de diferentes técnicas analíticas demostraron que es posible identificar los siguientes sitios principales de escisión:

- Proteína truncada en el residuo 15, es decir, la secuencia que se inicia en el residuo 16 y finaliza en el residuo 163/164;
  - Proteína escindida en el residuo 30, es decir, la secuencia de longitud total, desde el residuo 1 hasta el residuo 163/164, con un "clipping" interno entre los residuos 30 y 31, unidos entre sí por disulfuros;
  - Proteína truncada tanto en el residuo 15 como escindida en el residuo 30, es decir, la secuencia que se inicia en el residuo 16 y finaliza en el residuo 163/164, con un "clipping" interno entre los residuos 30 y 31, unidos entre sí por disulfuros.
- 30

Cuando se encuentra presente una forma truncada de r-HIL-18BP, los resultados anteriores demuestran lo siguiente:

- 5
- Se detecta una banda doble por SDS-PAGE de las muestras. Las dos bandas se detectan tanto por tinción de plata como por transferencia de Western.
  - El análisis de SE-HPLC muestra un perfil anómalo.
  - Los perfiles cromatográficos de RP-HPLC de las muestras reducidas y alquiladas son diferentes, en comparación con los de las muestras intactas.
  - Los perfiles de mapeo de péptidos mostraron un pico extra.
  - El análisis de la secuencia N-terminal confirma la presencia de formas truncadas de la molécula.
  - A pesar de la presencia de la forma truncada, la actividad específica es comparable a la de la r-hIL-18BP intacta.

10

## BIBLIOGRAFÍA

1. Conti, B., J.W. Jahng, C. Tinti, J.H. Son, y T.H. Joh, 1997. Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.* 272:2035-2037.
2. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. y Karin, M. (1997), *Nature* 388, 16514-16517.
- 5 3. Engelmann, H., D. Novick, y D. Wallach. 1990. Two tumor necrosis factor-binding proteins purified from human urine. Evidence for Immunological cross-reactivity with cell surface tumor necrosis factor receptors. *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536.
4. Gracie, J.A., Robertson, S.E., McInnes, I.B., *J. Leukoc. Biol.* 2003 Feb; 73(2):213-24.
- 10 5. Kim, S.H., Eisenstein, M., Reznikov, L., Fantuzzi, G., Novick, D., Rubinstein, M., Dinarello, C.A. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97:1190-1195.
- 15 6. Micallef, M.J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda, y M. Kurimoto. 1996. Interferon-gamma- inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur. J-Immunol* 26;1647-51 ISSN: 0014-2980.
7. Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K., Tamura, T. *Infect Immun* 1989 Feb;57(2):590-5
8. Novick, D., Kim, S-H, Fantuzzi, G., Reznikov, L., Dinarello, C., y Rubinstein, M. (1999). *Immunity* 10, 127-136.
- 20 9. Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., Tanimoto, T., Nukata, Y., Tanabe, F., Akita, K., Torigoe, K., Okura, T., Fukuda, S. et al. *Infect Immun* 1995 Oct;63(10):3966-72.
10. Rothe, H., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kolb, H. *J. Clin. Invest.* 1997 Feb 1;99(3):469-74.
11. Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S. y Nakanishi, K (1998), *J. Immunol.* 161, 3400-3407.
12. Xiang y Moss, *J. Biol. Chem.* 2001; 276:17380-6.
- 25 13. Xiang y Moss, *J. Virol.* 2001; 75(20), 9947-54.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.;

5 <120> Fragmentos activos de la proteína fijadora de IL-18

<130> 818 WO

<160> 7

10

<170> Patentin versión 3.1

<210> 1

<211> 164

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

Thr Pro Val Ser Gln Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ala Ser Val Arg Ser  
1 5 10 15

Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala Lys  
20 25 30

Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro Leu  
35 40 45

Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro Asn  
50 55 60



Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu  
 65                    70                    75                    80

Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr  
                   85                    90                    95

Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro Ala  
                   100                    105                    110

Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val  
                   115                    120                    125

Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala  
                   130                    135                    140

Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro  
 145                    150                    155                    160

Gln Gln Gln Gly

<210> 2

<211> 149

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Ser Thr Lys Asp Pro Cys Pro Ser Gln Pro Pro Val Phe Pro Ala Ala  
 1                    5                    10                    15

Lys Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val Pro  
                   20                    25                    30

Leu Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe Pro  
                   35                    40                    45

Asn Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His  
50 55 60

Leu Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser  
65 70 75 80

Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr Pro  
85 90 95

Ala Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln  
100 105 110

Val Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg  
115 120 125

Ala Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser  
130 135 140

Pro Gln Gln Gln Gly  
145

<210> 3

<211> 134

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 3

Ala Lys Gln Cys Pro Ala Leu Glu Val Thr Trp Pro Glu Val Glu Val  
1 5 10 15

Pro Leu Asn Gly Thr Leu Ser Leu Ser Cys Val Ala Cys Ser Arg Phe  
20 25 30

Pro Asn Phe Ser Ile Leu Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu

35            40            45

His Leu Pro Gly Arg Leu Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly  
50            55            60

Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys Lys Ala Leu Val Leu Glu Gln Leu Thr  
65            70            75            80

Pro Ala Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu  
85            90            95

Gln Val Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu  
100            105            110

Arg Ala Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser  
115            120            125

Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
130

<210> 4

<211> 96

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

Tyr Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu  
1            5            10            15

Trp Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu  
20            25            30

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

Asn Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His  
50 55 60

Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro  
65 70 75 80

Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
85 90 95

<210> 5

<211> 95

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 5

Trp Leu Gly Asn Gly Ser Phe Ile Glu His Leu Pro Gly Arg Leu Trp  
1 5 10 15

Glu Gly Ser Thr Ser Arg Glu Arg Gly Ser Thr Gly Thr Gln Leu Cys  
20 25 30

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

Phe Ser Cys Val Leu Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His Val  
50 55 60

Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro Thr  
65 70 75 80

Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
85 90 95

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 6

Glu Gln Leu Thr Pro Ala Leu His Ser Thr Asn Phe Ser Cys Val Leu  
1 5 10 15

Val Asp Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu  
20 25 30

Trp Ala Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro  
35 40 45

Ser Ser His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
50 55

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 7

Pro Glu Gln Val Val Gln Arg His Val Val Leu Ala Gln Leu Trp Ala  
1 5 10 15

Gly Leu Arg Ala Thr Leu Pro Pro Thr Gln Glu Ala Leu Pro Ser Ser  
20 25 30

His Ser Ser Pro Gln Gln Gln Gly  
35 40

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una IL-18BP que comprende un primer polipéptido consistente en los aminoácidos 1 a 30, o en los aminoácidos 15 a 30 de la SEC ID NO:1, y un segundo polipéptido consistente en los aminoácidos 31 a 164, o en los aminoácidos 31 a 163 de la SEC ID NO:1, en donde el primer y el segundo polipéptidos están unidos por un enlace disulfuro; o un derivado funcional, proteína de fusión o sal de la misma, en donde el derivado funcional comprende al menos un resto unido a uno o múltiples grupos funcionales, que se presentan en forma de una o múltiples cadenas laterales en los residuos de aminoácidos.
- 10 2. La IL-18BP según la reivindicación 1, en la que la proteína fusionada comprende la fusión con una inmunoglobulina.
- 10 3. La IL-18BP según la reivindicación 3, en la que el resto es un resto de polietilenglicol (PEG).
- 15 4. Procedimiento para la producción de una IL-18BP según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica una IL-18BP según las reivindicaciones 1 o 2, bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha IL-18BP.
- 15 5. Procedimiento para la producción de una IL-18BP según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende la etapa de aislar la IL-18BP a partir del sobrenadante del cultivo celular de una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica una IL-18BP, según las reivindicaciones 1 o 2.
- 20 6. Composición que comprende una IL-18BP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 7. Uso de IL-18BP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento dirigido al tratamiento y/o la prevención de una enfermedad seleccionada de: metástasis tumoral, psoriasis, artritis, en particular artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, lesión hepática, aterosclerosis, sepsis, infarto de miocardio, lesión cerebral traumática, alergia, enfermedad vascular periférica, esclerosis múltiple.
- 25 8. El uso según la reivindicación 7, en donde el medicamento comprende adicionalmente un interferón para uso simultáneo, secuencial o separado.
- 25 9. El uso según la reivindicación 8, en el que el interferón es interferón- $\beta$ .
- 25 10. El uso según la reivindicación 7, en el que el medicamento comprende, adicionalmente, un inhibidor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) para uso simultáneo, secuencial o separado.
- 25 11. El uso según la reivindicación 10, en el que el inhibidor de TNF es un receptor de TNF soluble.
- 30 12. El uso según las reivindicaciones 7 a 11, en donde la IL-18BP se utiliza en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.
- 30 13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde el medicamento es para administración subcutánea.
- 35 14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde el medicamento es para administración intramuscular.
- 40 15. Uso de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica una IL-18BP según las reivindicaciones 1 o 2, para la fabricación de un medicamento dirigido al tratamiento y/o a la prevención de una enfermedad seleccionada de: metástasis tumoral, psoriasis, artritis, en particular artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, lesión hepática, aterosclerosis, sepsis, infarto de miocardio, lesión cerebral traumática, alergia, enfermedad vascular periférica, esclerosis múltiple.
- 45 16. Uso de una célula modificada genéticamente para producir una IL-18BP según las reivindicaciones 1 o 2, para la fabricación de un medicamento dirigido al tratamiento y/o a la prevención de una enfermedad seleccionada de: metástasis tumoral, psoriasis, artritis, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, lesión hepática, aterosclerosis, sepsis, infarto de miocardio, lesión cerebral traumática, alergia, enfermedad vascular periférica, esclerosis múltiple.

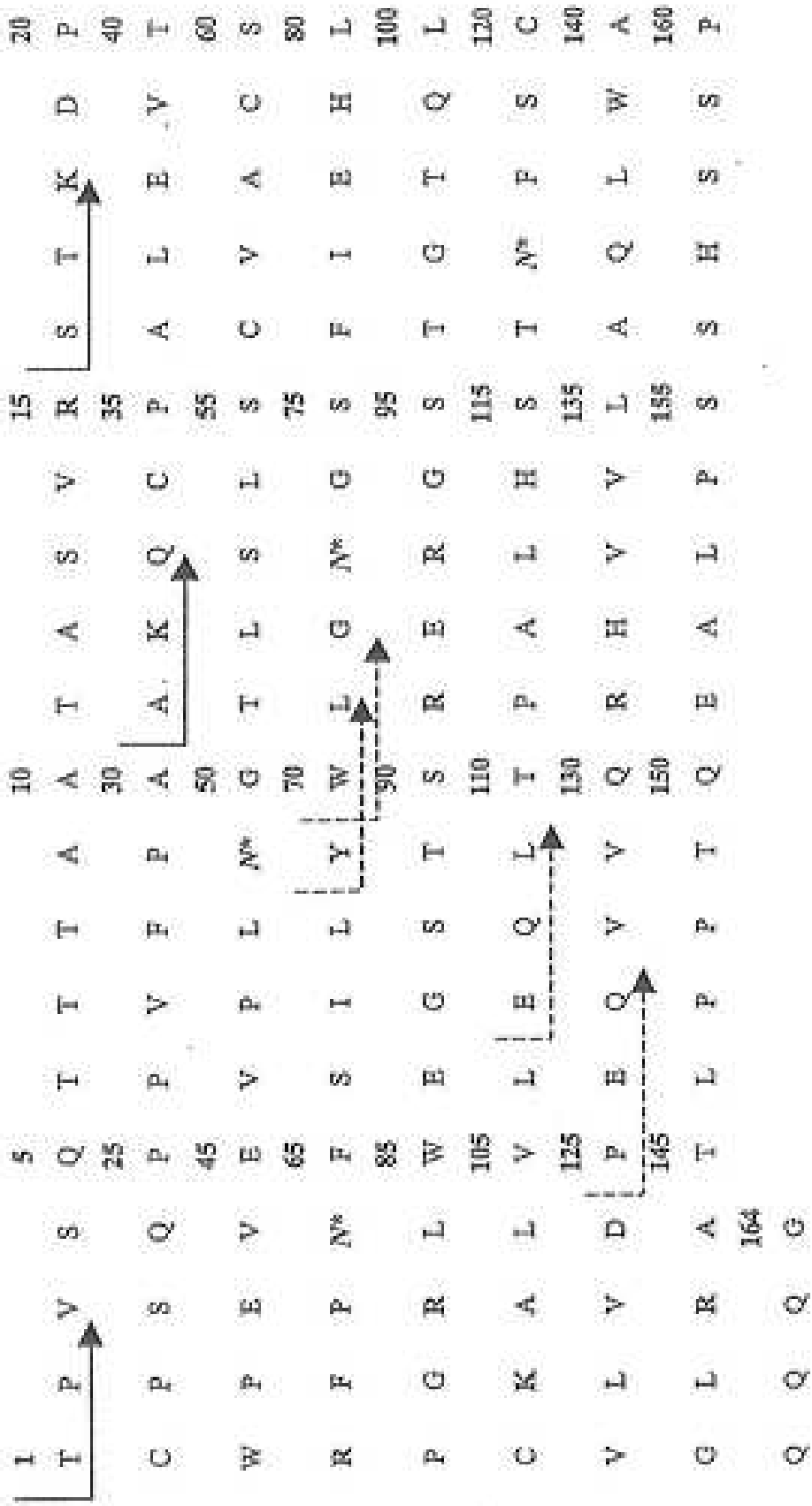
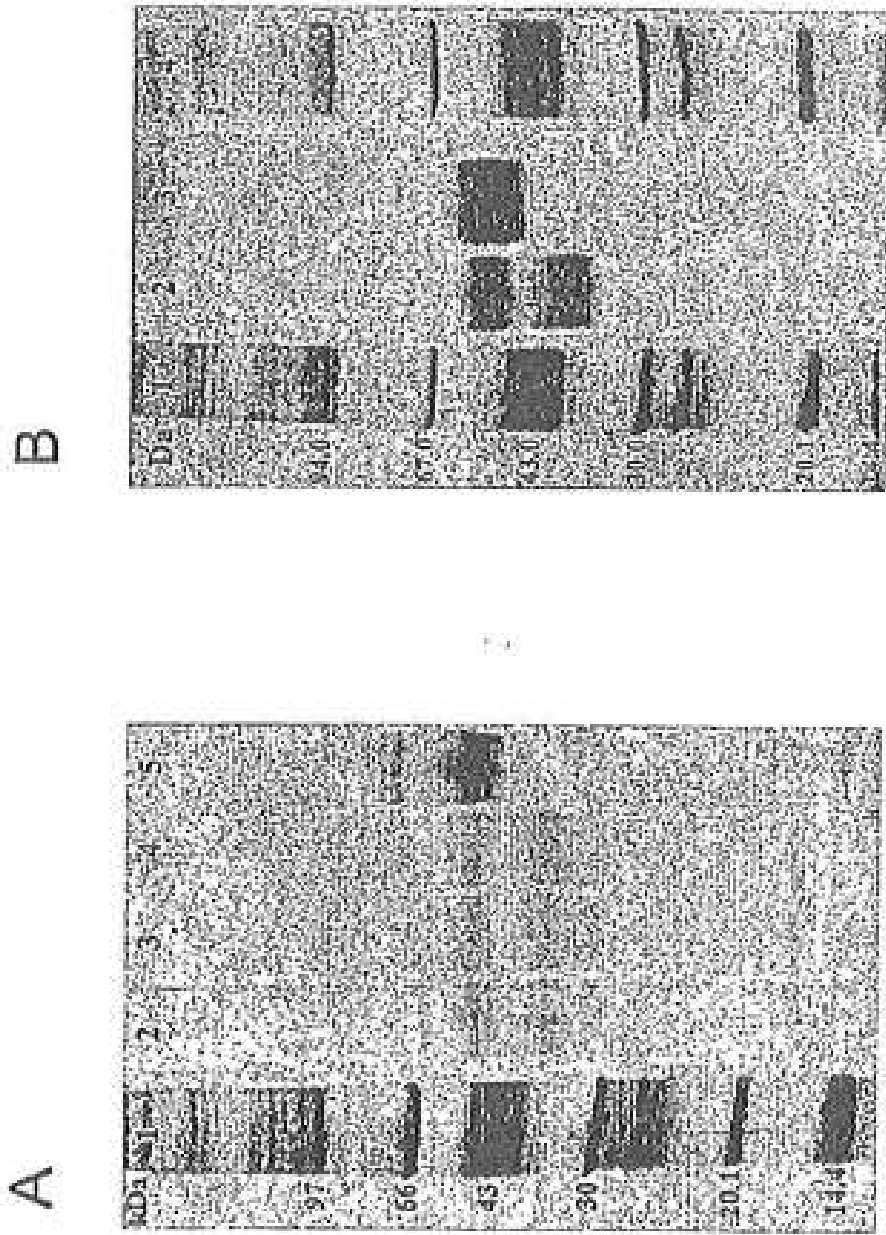
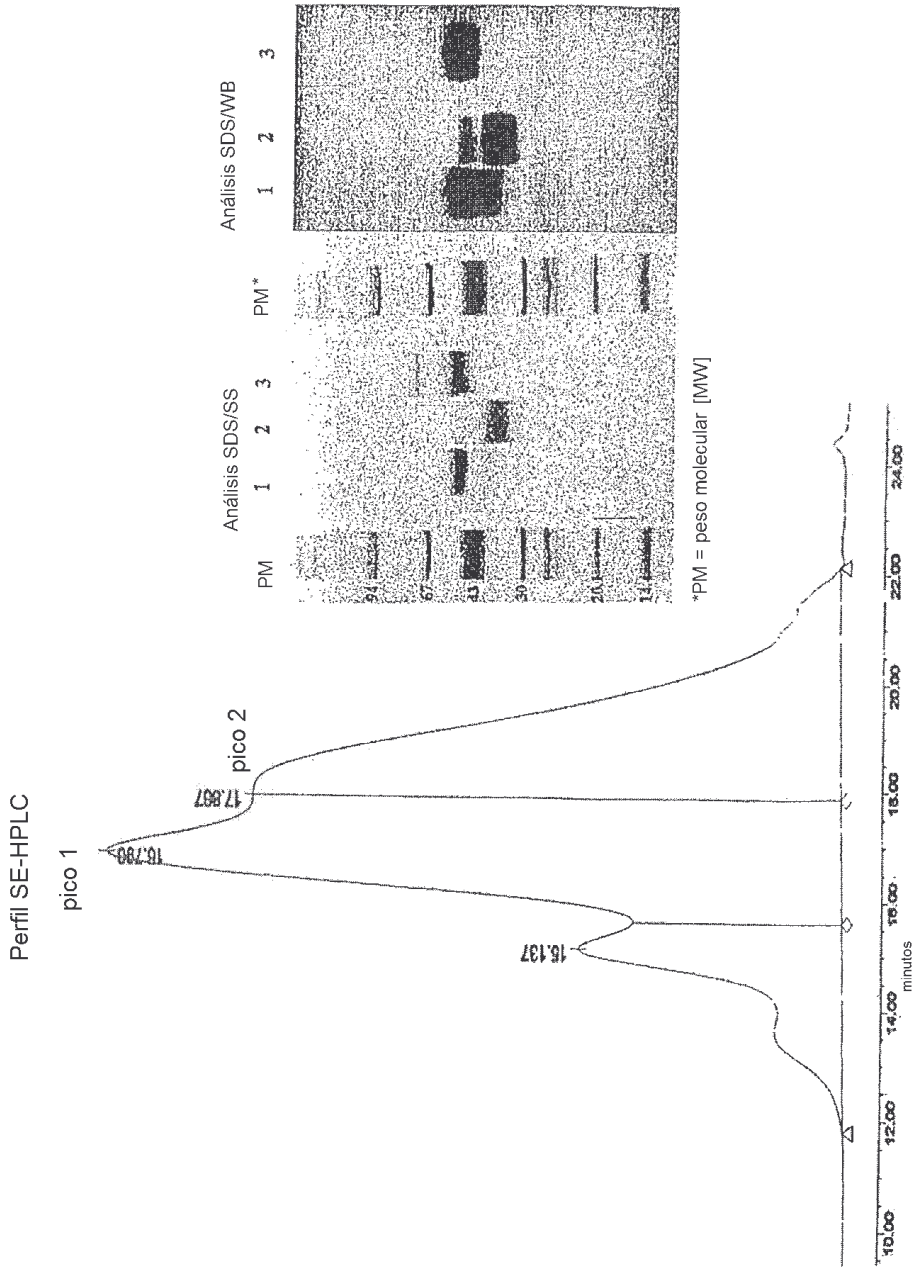


FIG. 1



**Fig. 2**





1. CT20 pico 1 (aproximadamente 200 ng)  
2. CT20 pico 2 (aproximadamente 200 ng)  
3. ST1P01/r-hIL-18BP

**Fig. 3**