

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 877**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/54** (2006.01)  
**A61P 15/16** (2006.01)  
**A61P 19/08** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61P 15/18** (2006.01)  
**A61P 19/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2008 E 08842066 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2215113**

54 Título: **Muteínas de citocina**

30 Prioridad:

**26.10.2007 US 576 P**

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

**29.05.2015**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 POPLAR ROAD  
PARKVILLE VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**BACA, MANUEL**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 536 877 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 de citocina

## DATOS DE LA SOLICITUD

5 Esta solicitud está asociada con y reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional U.S. nº 61/000.576, presentada el 26 de octubre de 2007.

## CAMPO

La presente invención se refiere generalmente al tratamiento de una afección mediada por interleucina-11 (IL-11). Más particularmente, la presente invención proporciona el uso de formas modificadas de IL-11 que modulan la señalización de IL-11 en el tratamiento de afecciones mediadas por IL-11.

## 10 ANTECEDENTES

Los detalles bibliográficos de referencias proporcionadas en la presente memoria descriptiva se dan al final de la memoria descriptiva.

La referencia a cualquier técnica anterior no se toma, y no se debería de tomar como reconocimiento o ninguna forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en ningún país.

15 La interleucina-11 (IL-11) es un miembro de la familia de citocinas IL-6, que incluye IL-6, IL-6 viral (vIL-6), factor inhibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), cardiotrofina-1 (CT-1), citosina similar a cardiotrofina/factor 1 similar a citocina (CLC/CLF), IL-27 y neuropoyetina (NP). IL-11 es capaz de estimular el crecimiento y diferenciación de diversas estirpes de células hematopoyéticas, ya sea sola o sinérgicamente con otras citocinas. IL-11 es también capaz de estimular la megacariopoyesis y la producción de plaquetas, y se usa  
20 clínicamente para prevenir trombocitopenia inducida por quimioterapia (Tepler et al, Blood 87(9):3607-3614, 1996), y está siendo actualmente evaluada como un nuevo enfoque para el tratamiento de mucositis gastrointestinal inducida por quimioterapia (Herrlinger et al, Am J Gastroenterol 101(4):793-797, 2006). También se ha sugerido que IL-11 es beneficiosa en artritis y enfermedad inflamatoria del intestino.

25 IL-11 también ejerce una variedad de actividades biológicas fuera del sistema hematopoyético. Es un regulador del desarrollo de osteoclastos, y se cree que es un regulador del metabolismo óseo (Girasole et al, J clin Invest 93:1516-1524, 1994; Hughes et al, Calcif tissue Int 53:362-364, 1993; Heymann y Rousselle, Cytokine 12(10):1455-1468, 2000). IL-11 se expresa en niveles elevados en células del SNC (Du et al, J Cell Physiol 168:362-372, 1996), y estimula la supervivencia y proliferación de células progenitoras neuronales (Mehler et al, nature 362:62-65, 1993). En ratones hembra, IL-11 es esencial para la implantación con éxito del embrión (Dimitriadeis et al, Mol Hum  
30 Reprod. 6(10):907-914, 2000; Robb et al, Nat Med 4:303-308, 1998; Bilinski et al, Genes Dev 12:2234-2243, 1998), y el patrón de expresión de IL-11 y sus receptores durante el ciclo menstrual sugiere un papel similar en seres humanos. Otras actividades no hematopoyéticas de IL-11 incluyen la inhibición de adipogénesis (Ohsumi et al, FEBS Lett 288:13-16, 1991; Ohsumi et al, Biochem Mol Biol Int 32:705-712, 1994), inducción de una respuesta febril (Lopez-Valpuesta et al, Neuropharmacology 33:989-994, 1994), modulación del metabolismo de la matriz extracelular (Maier et al, J Biol chem. 268:21527-21532, 1993), la estimulación de agentes reaccionantes de fase aguda (Baumann y Schendel, J Biol Chem 266:20424020427 1991), y papeles pro- y antiinflamatorios propuestos (Trepicchio et al, J Clin Invest 104:1527-1537, 1999; Redlich et al, J Immunol 157:1705-1710, 1996).

35 También se ha sugerido a IL-11 como un agente terapéutico potencial en otros diversos trastornos inflamatorios, incluyendo daño pulmonar inducido por radiación (Redlich et al, más arriba, 1996), septicemia (Chang et al, Blood Cells Mol Dis 22(1):57-67, 1996) y psoriasis (Trepicchio et al, más arriba, 1999). La patente US nº 6.270.759 sugiere que IL-11 puede ser terapéuticamente útil para una variedad de afecciones inflamatorias, incluyendo asma y rinitis.

Indicativa del interés terapéutico en IL-11, la Solicitud de Patente US nº 2007/0190024 describe formas modificadas de IL-11 con mutaciones en His 182 (H182) y Asp 186 (D186), que actúan como agonistas e hiperagonistas de IL-11.

45 IL-11 ejerce sus efectos vía asociación con un receptor específico de la superficie celular (IL-11R $\alpha$ ) así como la subunidad receptora compartida gp130. Mientras todas las citocinas de la familia IL-6 señalan a través de complejos receptores que implican una o más moléculas de gp130, el complejo de señalización de IL-11 es muy similar al de IL-6 por cuanto comprende dos moléculas de cada citocina, el receptor de la cadena  $\alpha$  específico y gp130 (Barton et al, J Biol Chem (2000) 275:36197-36203, 2000).

50 Mientras que los anticuerpos neutralizantes y las proteínas receptoras solubles son estrategia habitual para inhibir citocinas, una tercera clase de moléculas antagonistas se denomina como "muteínas de citocina", que previenen la señalización mediante la unión a solamente una de las dos cadenas receptoras. Se ha descrito previamente un número de estas muteínas, y una, una variante antagonista de la hormona del crecimiento, se usa clínicamente para tratar acromegala (Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085, 1989). Dentro de la familia de citocinas IL-6, se

han descrito muteínas de citocina para IL-6, CNTF, LIF e IL-11 (Ehlers et al, J Biol Chem 270:8158-8163, 1995; Brakenhoff et al, J Biol Chem 269:86-93, 1994; Savino et al, Embo J 13:5863-5870, 1994; Hudson et al, J Biol Chem 271:11971-11978, 1996; Saggio et al, Embo J 14: 3045-3054, 1995; Underhill-Day et al, Endocrinology 144: 3406-3414, 2003). En cada caso, estas muteínas de citocina contienen mutaciones específicas que previenen la unión de citocina a gp130. En el caso de IL-11, una única mutación de punto, W147A (una sustitución de triptófano por alanina en el resto de aminoácido 147), es suficiente para convertir IL-11 de un agonista a un antagonista de la señalización de IL-11 con la afinidad por IL-11R $\alpha$  sin cambiar (Underhill-Day et al, más arriba 2003).

Además, estudios de estructura y función han identificado diversas regiones de IL-11 murina y humana que son importantes para la unión a IL-11R $\alpha$  (Czupryn et al, J. Biol. Chem. 270 (2): 978-985, 1995; Miyadai et al, Biosci. Biotechnol. Biochem. 60.3:541-542, 1996; Czupryn et al, Ann. N.Y. Acad. Sci. 762:152-164, 1995; Tacken et al, Eur. J. Biochem. 265.2:645-655, 1999; Harmegnies et al, Biochem J. 375(1):23-32, 2003). En particular, se encontró que los restos D165, W166, R169, L172 y L173 en el extremo C-terminal de la hélice D, y M58, L64 y L67 en el bucle A-B contribuyen a la unión a IL-11R $\alpha$ .

La Solicitud de Patente US nº 2007/0190024 describe muteínas de IL-11 con mutaciones en His 182 (H182) y Asp 186 (D186) de IL-11 como agonistas e hiperagonistas de IL-11, pero no sugiere antagonistas. La muteína de IL-11, W147A IL-11, es una variante antagonista de IL-11 que previene el reclutamiento de gp130 al complejo receptor de IL-11 (Underhill-Day et al, más arriba 2003), previniendo de ese modo la señalización de IL-11. Sin embargo, W147A IL-11 tiene la misma afinidad por IL-11R $\alpha$  que IL-11 de tipo salvaje.

Hay un papel para los moduladores de IL-11 en terapia. Es necesaria la identificación de moduladores adicionales de IL-11.

#### SUMARIO

A lo largo de esta memoria descriptiva, excepto que el contexto lo requiera de otro modo, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos se citan mediante un número identificador de secuencia (SEC ID NO:). Los SEC ID NOs: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencias <400>1 (SEC ID NO:1), <400>2 (SEC ID NO:2), etc. En la Tabla 1 se proporciona un resumen de los identificadores de secuencias. Después de las reivindicaciones se proporciona un listado de secuencias.

La presente invención se refiere generalmente a formas modificadas de interleucina-11 de mamífero (en lo sucesivo denominadas aquí "muteínas de IL-11") que muestran unión potenciada a la cadena alfa del receptor de IL-11 (IL-11R $\alpha$ ). Más particularmente, las muteínas de IL-11 de la presente invención modulan la señalización de IL-11, y por lo tanto son útiles como sustancias terapéuticas en el tratamiento o profilaxis de afecciones mediadas por IL-11. Por "modular" se quiere decir aumentar ("agonizar") o disminuir ("antagonizar").

En consecuencia, la presente invención proporciona una muteína de IL-11 que comprende una secuencia de aminoácidos en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG (usando el código de aminoácidos de una sola letra) [SEC ID NO:23] en la posición 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje se sustituye por la secuencia de aminoácidos PAIDY (SEC ID NO:24) o FMQIQ (SEC ID NO:25). En una realización, la muteína de IL-11 está en forma aislada, aunque la presente invención no está limitada a esto.

En otro aspecto, la muteína de IL-11 tiene, además de la mutación en la posición de aminoácido 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje, una mutación que inhibe su unión a gp130.

En otro aspecto, la muteína de IL-11 tiene mutado, además de la mutación en la posición de aminoácido 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje un triptófano en la posición de aminoácido 147 de IL-11 de tipo salvaje para inhibir su unión a gp130. La referencia a "mutado", en este contexto, incluye una sustitución, adición y/o supresión de aminoácido.

Las muteínas de IL-11 específicas de la presente invención incluyen una muteína de IL-11 que comprende SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:8, SEC ID NO:13, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:13 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:13.

Otras muteínas de IL-11 específicas de la presente invención incluyen una muteína de IL-11 que comprende SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:12, SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a

175 de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:17, SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:18, SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:20, SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:21 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:21.

La presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una muteína de IL-11 descrita aquí.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una muteína de IL-11 que está PEGilada.

En otro aspecto, la presente invención contempla una composición farmacéutica para uso en un método para el tratamiento de una afección mediada por IL-11.

La presente invención se refiere además al uso de una muteína de IL-11 de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección mediada por IL-11.

15 Una afección mediada por IL-11 incluye (a) cualquier afección que se beneficie o se pueda beneficiar de incrementar el tratamiento con IL-11 exógena o un antagonista de IL-11, por ejemplo trombocitopenia, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, infertilidad, y daño mucosal por quimioterapia y/o terapia de radiación; y (b) cualquier afección que se beneficie o se pueda beneficiar del tratamiento de un antagonista de IL-11 para reducir o bloquear la actividad de IL-11 endógena, por ejemplo afecciones que pueden dar como resultado masa ósea total disminuida, incluyendo cáncer de huesos metastásico, mieloma, enfermedad de Paget del hueso y osteoporosis, y fertilidad (es decir, se puede usar un antagonista de IL-11 como anticonceptivo). En una realización, el antagonista de muteína de IL-11 comprende una sustitución de AMSAG en la posición de aminoácido 58 a 62 junto con una mutación que interrumpe la unión a gp130. Un ejemplo de esto último es una mutación en el aminoácido 147 (por ejemplo, una mutación W147 o una sustitución W147A o W147C).

25 La presente invención se extiende a composiciones que comprenden muteínas de IL-11 de la presente invención y uno o más vehículos y/o diluyentes y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

TABLA 1

Sumario de identificadores de secuencia

SECUENCIA N°	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia de aminoácidos de IL-11 madura humana
2	Secuencia de aminoácidos de IL-11 madura murina
3	Secuencia de aminoácidos de IL-11 madura de macaco
4	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY de macaco
5	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY humana
6	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY murina
7	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 FMQIQ humana
8	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 FMQIQ murina
9	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY y W147A humana
10	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY y W147A murina
11	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY y W147C humana
12	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY y W147C murina
13	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 FMQIQ de macaco
14	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY y W147A de macaco
15	Secuencia de aminoácidos de muteína de IL-11 PAIDY y W147C de macaco

16	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 FMQIQ y W147A humana
17	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 FMQIQ y W147A murina
18	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 FMQIQ y W147A de macaco
19	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 FMQIQ y W147C humana
20	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 FMQIQ y W147C murina
21	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 FMQIQ y W147C de macaco
22	Secuencia de aminoácidos de mteína de IL-11 PAIDY y W147C humana etiquetada N-terminalmente
23	Aminoácidos en la posición 58 a 62 de IL-11 de tipo salvaje
24	Aminoácidos de sustitución en la posición 58 a 62 de IL-11 de tipo salvaje
25	Aminoácidos de sustitución en la posición 58 a 62 de IL-11 de tipo salvaje

En la Tabla 2 se proporciona un resumen de los códigos de aminoácidos de una sola letra y de tres letras.

TABLA 2  
Abreviaturas de aminoácidos

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una sola letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalamina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1a a 1g describen las secuencias de aminoácidos de muteínas de IL-11 humanas, murinas y de mono de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 Como se usa aquí, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen aspectos plurales excepto que el contexto dicte claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a “una muteína” incluye una muteína individual, así como dos o más muteínas; la referencia a “un agente” incluye un solo agente, así como dos o más agentes; la referencia a “la invención” incluye aspectos individuales y múltiples de la invención; etc.

10 El término “IL-11” o su nombre completo “interleucina-11”, como se usa aquí, incluye todas las formas maduras de IL-11 de mamífero de tipo salvaje, incluyendo murina, de macaco y humana, y todas las formas truncadas de tal IL-11 que retienen actividad de IL-11, es decir, la capacidad para unirse con IL-11R $\alpha$  y formar un complejo receptor funcional con gp130. IL-11 humana madura (SEC ID NO:1) es una proteína de 178 aminoácidos (es decir, que carece de la secuencia líder de 21 aminoácidos de NP\_000632, número de acceso de la base de datos de proteínas de NCBI), la IL-11 murina madura (SEC ID NO:2) es una proteína de 178 aminoácidos (es decir, que carece de la secuencia líder de 21 aminoácidos de NP\_032376, número de acceso de la base de datos de proteínas de NCBI), y la IL-11 de macaco madura (SEC ID NO:3) es una proteína de 178 aminoácidos (es decir, que carece de la secuencia líder de 21 aminoácidos de P20808,, número de acceso de la base de datos de proteínas de NCBI).

20 La expresión “muteína de IL-11”, como se usa aquí, se refiere a una IL-11 en la que la secuencia de aminoácidos de la proteína de tipo salvaje se ha alterado por sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos para proporcionar unión potenciada a la cadena de IL-11R $\alpha$  para generar un agonista de muteína de IL-11, o, en el caso de un antagonista de muteína de IL-11, la secuencia de aminoácidos se ha alterado adicionalmente mediante sustituciones, adiciones y/o supresiones de aminoácidos para antagonizar la señalización de IL-11 al inhibir la formación de un complejo receptor de IL-11 con gp130 mientras retiene la unión potenciada a la cadena de IL-11R $\alpha$ . Particularmente, la muteína de IL-11 se basa en una IL-11 humana, de macaco o murina, y más particularmente IL-11 humana. Las muteínas de IL-11 se pueden modificar adicionalmente, por ejemplo para incrementar su semivida *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, la unión de otros elementos tales como un grupo PEG. Los métodos para la PEGilación de péptidos son bien conocidos en la técnica. Las muteínas de IL-11 se pueden denominar algunas veces como proteínas mutantes de IL-11 o como mutantes de IL-11.

30 La expresión “unión potenciada a la cadena del receptor alfa de IL-11 (IL-11R $\alpha$ )”, cuando se usa en relación con las muteínas de IL-11 de la presente invención, significa que la muteína de IL-11 exhibe una mayor afinidad por la cadena de IL-11R $\alpha$  que la que exhibe la IL-11 de tipo salvaje correspondiente, según se determina mediante ELISA de competición.

35 Los términos “antagonista”, “agonista” y “compuesto” se pueden usar cada uno aquí para referirse a las muteínas de IL-11 descritas en toda la memoria descriptiva. Los términos también engloban formas farmacéuticamente aceptables y farmacológicamente activas de las mismas, incluyendo sales.

40 La expresión “cantidad eficaz”, como se usa aquí, significa una cantidad suficiente de una muteína de IL-11 para proporcionar el efecto fisiológico y/o terapéutico deseado, tal como para antagonizar la señalización de IL-11. Además, el efecto puede ser una mejora de los síntomas de una afección mediada por IL-11. Los efectos indeseables, por ejemplo efectos secundarios, se manifiestan algunas veces junto con el efecto fisiológico y/o terapéutico deseado; por tanto, un profesional armoniza los beneficios potenciales frente a los riesgos potenciales a la hora de determinar qué es una “cantidad eficaz” apropiada. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad y estado general del sujeto, modo de administración, y similar. De este modo, puede no ser posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, una “cantidad eficaz” apropiada en cualquier caso individual se puede determinar por alguien de pericia normal en la técnica usando experimentación habitual. Alguien de pericia normal en la técnica sería capaz de determinar las cantidades requeridas basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o vía de administración seleccionada.

50 En tanto que una realización de la presente invención se refiere al uso de una muteína de IL-11, la cantidad eficaz incluye de alrededor de 10  $\mu$ g/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal de muteína de IL-11, tal como 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100  $\mu$ g/kg de peso corporal, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000  $\mu$ g/kg de peso corporal, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 mg/kg de peso corporal. Para la terapia individual o de combinación se proporcionan cantidades similares.

55 La referencia a “una afección mediada por IL-11” o una “afección mediada por IL-11” incluye (a) una afección que se beneficia o se puede beneficiar de incrementar el tratamiento con IL-11 exógena o un agonista de IL-11, por ejemplo trombocitopenia, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, infertilidad, y daño mucosal debido a quimioterapia y/o terapia de radiación; y (b) cualquier afección que se beneficie o se pueda beneficiar del tratamiento con un antagonista de IL-11 para reducir o bloquear la actividad de IL-11 endógena, por ejemplo afecciones que dan

como resultado masa ósea total disminuida, incluyendo cáncer de huesos metastásico, mieloma, enfermedad de Paget del hueso y osteoporosis, y fertilidad (es decir, se puede usar un antagonista de IL-11 como anticonceptivo).

5 Un vehículo y/o diluyente “farmacéuticamente aceptable” es un vehículo farmacéutico compuesto de un material que no es biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto junto con la muteína seleccionada sin provocar ninguna reacción adversa o una reacción adversa sustancial. Los vehículos o diluyentes pueden incluir cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes usados para ajustar la tonicidad, tampones, agentes quelantes, y agentes que retrasan la absorción, y similares.

10 De forma similar, una sal “farmacológicamente aceptable” de un compuesto como se proporciona aquí es una sal que no es biológicamente o de otro modo indeseable.

15 Los términos “tratar” y “tratamiento”, como se usan aquí, se refieren a tratamiento terapéutico. Por ejemplo, el tratamiento puede dar como resultado una reducción en la gravedad y/o la frecuencia de síntomas de la afección, la eliminación de síntomas y/o causa subyacente de la afección, la prevención de la aparición de síntomas de la afección y/o su causa subyacente, y la mejora o el remedio o mejoría del daño. Por tanto, el tratamiento puede no dar como resultado una “cura” sino más bien una mejoría de los síntomas. Además, el tratamiento puede no comenzar hasta que se produce un suceso exacerbado. En este contexto, el término “profilaxis” también se aplica a la prevención o tratamiento de una probabilidad de que ocurra un suceso asociado con la afección.

Los términos “tratar” y “tratamiento”, como se usan aquí, también se refieren a la reducción de uno o más síntomas o características asociadas con las afecciones.

20 Un “sujeto”, como se usa aquí, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ser humano, que se puede beneficiar de las composiciones farmacéuticas y métodos de la presente invención. Otros mamíferos preferidos son animales de ensayo de laboratorio, cuyos ejemplos incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas, hámsters, gatos y perros. No hay limitación en el tipo de animal que se podría beneficiar de las composiciones farmacéuticas y métodos actualmente descritos. Un sujeto, independientemente de si es un ser humano o animal no humano, se puede citar como un individuo, paciente, animal o receptor, así como sujeto. Los métodos de la presente invención tienen aplicaciones en medicina humana y medicina veterinaria.

30 Se muestra aquí que las muteínas de IL-11 con unión potenciada a la cadena de IL-11R $\alpha$  se producen cuando la secuencia de aminoácidos AMSAG (usando el código de aminoácidos de una sola letra) [SEC ID NO:23] en las posiciones 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje se sustituye por la secuencia de aminoácidos PAIDY (SEC ID NO:24) o FMQIQ (SEC ID NO:25).

En consecuencia, la presente invención proporciona una muteína de IL-11 en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG (SEC ID NO:23) en las posiciones 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje se sustituye por la secuencia de aminoácidos PAIDY (SEC ID NO:24) o FMQIQ (SEC ID NO:25).

35 Un aspecto de la presente invención proporciona una muteína de IL-11 en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG en las posiciones 58 a 62 de IL-11 humana de tipo salvaje (SEC ID NO:1), IL-11 murina (SEC ID NO:2) o IL-11 de macaco (SEC ID NO:3) se sustituye por la secuencia de aminoácidos PAIDY (SEC ID NO:24).

Otro aspecto de la presente invención proporciona una muteína de IL-11 en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG en las posiciones 58 a 62 de IL-11 humana de tipo salvaje (SEC ID NO:1), IL-11 murina (SEC ID NO:2) o IL-11 de macaco (SEC ID NO:3) se sustituye por la secuencia de aminoácidos FMQIQ (SEC ID NO:25).

40 En un aspecto, una muteína de IL-11 de la presente invención tiene una afinidad de unión por la cadena IL-11R $\alpha$  10 veces, más particularmente 15 veces, e incluso más particularmente 20 veces mayor que la afinidad de unión de la IL-11 de tipo salvaje correspondiente.

45 La inclusión de mutaciones adicionales que retienen la unión potenciada a la cadena de IL-11R $\alpha$  pero inhiben la unión a gp130 proporciona antagonistas de muteínas de IL-11 que compiten con IL-11 por la unión a la cadena de IL-11R $\alpha$  pero no forman un complejo receptor de IL-11 con gp130.

En consecuencia, en otro aspecto, la muteína de IL-11 puede tener, además de las mutaciones en las posiciones de aminoácido 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje, una mutación adicional que inhibe la unión a gp130.

50 Se sabe que una mutación del resto de triptófano (W) en la posición de aminoácido 147 de IL-11 murina de tipo salvaje a alanina (A) inhibe la unión del mutante de IL-11 resultante a gp130. Se muestra aquí que una mutación de sustitución del resto de triptófano en la posición de aminoácido 147 de IL-11 murina de tipo salvaje a cisteína inhibe la unión del mutante de IL-11 resultante a gp130. La referencia a “mutación” incluye cualquier sustitución, adición y/o supresión de aminoácidos. Una mutación de sustitución se describe aquí convenientemente como W147A o W147C para representar un cambio de un triptófano (W) a una alanina (A) o cisteína (C).

En consecuencia, en otro aspecto, la muteína de IL-11 puede tener mutado, además de la mutación en las

posiciones de aminoácido 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje, el triptófano en la posición de aminoácido 147 de IL-11 de tipo salvaje para inhibir su unión a gp130.

En otro aspecto, el triptófano en la posición de aminoácido 147 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje está mutado a una alanina o una cisteína.

- 5 En otro aspecto, la muteína de IL-11 puede tener, además de la mutación en las posiciones de aminoácido 58 a 62 de IL-11 humana de tipo salvaje (SEC ID NO:1), IL-11 murina (SEC ID NO:2) o IL-11 de macaco (SEC ID NO:3), una mutación adicional que inhibe su unión a gp130.

10 En otro aspecto, la muteína de IL-11 puede tener mutado, además de la mutación en las posiciones de aminoácido 58 a 62 de IL-11 humana de tipo salvaje (SEC ID NO:1), IL-11 murina (SEC ID NO:2) o IL-11 de macaco (SEC ID NO:3), el resto de triptófano en la posición de aminoácido 147 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje para inhibir la unión a gp130. En otro aspecto, el resto de triptófano en la posición de aminoácido 147 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje está mutado a una alanina o una cisteína.

15 Se ha observado que se pueden eliminar hasta nueve restos de aminoácidos N-terminales de IL-11 murina sin pérdida de actividad. Wang et al, Eur J Biochem. 269(1):61-68, 2002, eliminaron diez restos de aminoácidos N-terminales de IL-11 humana. Barton et al, J Biol Chem. 274(9):5755-61, 1999, dan a conocer que el resto de aminoácido trece de IL-11 murina forma parte del sitio de unión a gp130 sitio II, y que la sustitución provoca una pérdida de actividad, sugiriendo que se pueden eliminar hasta los primeros doce restos de aminoácidos N-terminales sin pérdida significativa de actividad. La Solicitud de Patente US nº 20070190024, que describe muteínas de IL-11 que son agonistas de IL-11, sugiere que se pueden eliminar los primeros trece restos de aminoácidos N-terminales sin pérdida de actividad.

20 También se ha dado a conocer que se pueden eliminar hasta los últimos tres, pero no cuatro, restos de aminoácidos del término C de IL-11 humana sin pérdida de actividad (Czupryn et al, más arriba 1995).

25 En otro aspecto, las muteínas de IL-11 de la presente invención pueden tener suprimidos, además de las mutaciones en las posiciones de aminoácido 58 a 62 de IL-11 de tipo salvaje, hasta los primeros trece, preferiblemente solo hasta los primeros doce, restos de aminoácidos N-terminales de la IL-11 de tipo salvaje correspondiente, y/o pueden tener suprimidos hasta los últimos tres restos de aminoácidos C-terminales de la IL-11 de tipo salvaje correspondiente.

30 Las muteínas de IL-11 específicas de la presente invención incluyen una muteína de IL-11 que comprende SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:8, SEC ID NO:13, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:13 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:13.

35 Otras muteínas de IL-11 específicas de la invención incluyen una muteína de IL-11 que comprende SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:12, SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:17, SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:18, SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:20, SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:21 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:21.

45 IL-11 de mono (SEC ID NO:3) y de ratón (SEC ID NO:2) demuestran identidad considerable con la secuencia humana (SEC ID NO:1, ~94% y ~87% de identidad respectivamente). Todas estas proteínas tienen total reactividad entre especies, indicando que sus estructuras terciarias son similares, y que otros restos funcionalmente críticos están probablemente conservados (Czupryn et al, más arriba 1995). A la vista de la reactividad cruzada de IL-11 de diferentes especies, está claro que IL-11 puede tolerar cierto nivel de variación de aminoácidos y retener la actividad de IL-11. En consecuencia, las muteínas de IL-11 de la presente invención incluyen muteínas de IL-11 que comprenden secuencias que son al menos 85% idénticas, preferiblemente al menos 90% idénticas, y más preferiblemente al menos 94% idénticas a una cualquiera de aquellas de SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a

178 de SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:12, SEC ID NO:13, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:13, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:13, SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:17, SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:18, SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:20, SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:21 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:21.

La presente invención también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican las muteínas de IL-11 descritas aquí. Una secuencia de ácido nucleico o un ácido nucleico incluye un polinucleótido o molécula de ácido nucleico.

La presente invención emplea técnicas de biología molecular, microbiología, y ADN recombinante convencionales para modificar las secuencias de ácido nucleico de IL-11 de tipo salvaje para producir las muteínas de IL-11 de la presente invención. Las técnicas son bien conocidas en la técnica, y se describen en diversas publicaciones, tales como Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.; *DNA Cloning: A Practical Approach*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed. 1985), Ausubel, et al. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1994, Sidhu et al, *Methods Enzymol* 328:333-363, 2000) y Kunkel et al, *Methods Enzymol* 204: 1991.

Los términos “polinucleótido”, “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refiere a la forma polimérica de éster de fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; “moléculas de ARN”) o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina, o desoxicitidina; “moléculas de ADN”), o cualesquiera análogos de fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma monocatenaria, en forma bicatenaria, o de otro modo.

Las expresiones “secuencia polinucleotídica”, “secuencia de ácido nucleico” o “secuencia nucleotídica” se refieren a una serie de bases nucleotídicas (también denominadas como “nucleótidos”) en un ácido nucleico, tal como ADN o ARN, y significa cualquier cadena de dos o más nucleótidos.

Las expresiones “secuencia codificante” o una secuencia “que codifica” un producto de expresión, tal como un ARN, polipéptido, proteína, o enzima, es una secuencia nucleotídica que, cuando se expresa, da como resultado la producción del producto.

El término “gen” significa una secuencia de ADN que codifica o corresponde a una secuencia particular de ribonucleótidos o aminoácidos que comprenden toda o parte de una o más moléculas de ARN, proteínas o enzimas, y puede incluir o no secuencias de ADN reguladoras, tales como secuencias promotoras, que determinan, por ejemplo, las condiciones en las que se expresa el gen. Los genes se pueden transcribir a partir de ADN a ARN, que se puede traducir o no en una secuencia de aminoácidos.

La expresión “amplificación” de secuencia nucleotídica, como se usa aquí, puede significar el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para incrementar la concentración de una secuencia nucleotídica particular en una mezcla de secuencias nucleotídicas. Saiki, et al, *Science* 239:487, 1988 proporcionan una descripción de la PCR.

El término “oligonucleótido” se refiere a un ácido nucleico, generalmente de al menos 10, particularmente al menos 15, y más particularmente al menos 20 nucleótidos, particularmente no más de 100 nucleótidos, que se puede hibridar a una molécula de ADN genómico, a una molécula de ADNc, o a una molécula de ARNm que codifica un gen, ARNm, ADNc, u otro ácido nucleico de interés. Los oligonucleótidos se pueden marcar, por ejemplo, mediante incorporación de  $^{32}\text{P}$ -nucleótidos,  $^3\text{H}$ -nucleótidos,  $^{14}\text{C}$ -nucleótidos,  $^{35}\text{S}$ -nucleótidos, o nucleótidos a los que se ha conjugado covalentemente un marcador, tal como biotina. En una realización, un oligonucleótido marcado se puede usar como sonda para detectar la presencia de un ácido nucleico. En otra realización, se pueden usar oligonucleótidos (de los cuales uno o ambos pueden estar marcados) como cebadores de la PCR, ya sea para clonar la longitud completa o un fragmento del gen, o para detectar la presencia de ácidos nucleicos. Generalmente, los oligonucleótidos se preparan sintéticamente, de forma preferible en un sintetizador de ácidos nucleicos.

La secuencia de cualquier ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica una proteína de IL-11 de tipo salvaje o una muteína de IL-11) se puede secuenciar mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como mediante secuenciación química o secuenciación enzimática. La “secuenciación química” del ADN se puede realizar mediante el método de Maxam y Gilbert (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(2): 560-564, 1977), en el que el ADN se escinde aleatoriamente usando reacciones específicas de bases individuales. La “secuenciación enzimática” del ADN se puede realizar mediante el método de Sanger (Sanger et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12):5463-5467, 1977).

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden flanquear por secuencias reguladoras (de control de la

expresión) naturales, o se pueden asociar con secuencias heterólogas, incluyendo promotores, sitios de entrada al ribosoma internos (IRES) y otras secuencias de sitio de unión al ribosoma, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones no codificantes de 5' y de 3', y similares.

5 Un "promotor" o "secuencia promotora" es una región reguladora del ADN capaz de unirse a un ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante. Una secuencia promotora está unida generalmente en su término 3' mediante el sitio de iniciación de la transcripción, y se extiende en dirección 5' para incluir el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en cualquier nivel. En la secuencia promotora se puede encontrar un sitio de iniciación de la transcripción así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de ARN polimerasa. El promotor puede estar operablemente asociado con otras secuencias de control de la expresión, incluyendo secuencias potenciadoras y represoras, o con un ácido nucleico de la invención. Los promotores que se pueden usar para controlar la expresión génica incluyen, pero no se limitan a, el promotor del citomegalovirus (CMV) (patentes US n<sup>os</sup> 5.385.839 y 5.168.062) y la región del promotor temprano de SV40 (Benoist, et al, Nature 290:304-310, 1981).

15 Una secuencia codificante está "bajo el control de", "funcionalmente asociada con" u "operablemente asociada con" secuencias de control transcripcionales y traduccionales en una célula cuando las secuencias dirigen la transcripción de la secuencia codificante mediada por ARN polimerasa en ARN, preferiblemente ARNm, que entonces puede sufrir ajuste del ARN de tipo trans (si contiene intrones) y, opcionalmente, se traduce en una proteína codificada por la secuencia codificante.

20 Los términos "expresar" y "expresión" significan permitir o provocar que la información en una secuencia génica, de ARN o de ADN se convierta en un producto; por ejemplo, producir una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de la secuencia nucleotídica. Una secuencia de ADN se expresa en o mediante una célula para formar un "producto de expresión" tal como ARN (tal como ARNm) o una proteína (tal como una muteína de IL-11). También se puede afirmar que el propio producto de expresión está "expresado" por la célula.

Las expresiones "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo (tal como un plásmido) mediante el cual se puede introducir una secuencia de ARN o de ADN en una célula hospedante, para transformar el hospedante y, opcionalmente, promover la expresión y/o replicación de la secuencia introducida.

30 El término "transfección" o "transformación" significa la introducción de un ácido nucleico en una célula. Estos términos se pueden referir a la introducción en una célula de un ácido nucleico que codifica una muteína de IL-11. El gen o secuencia introducida se puede denominar "clon". Una célula hospedante que recibe el ADN o ARN introducido se ha "transformado", y es un "transformante" o un "clon". El ADN o ARN introducido en una célula hospedante puede proceder de cualquier fuente, incluyendo células del mismo género o especie que la célula hospedante, o células de diferente género o especie.

35 La expresión "célula hospedante" significa cualquier célula de cualquier organismo que se selecciona, modifica, transfecta, transforma, se hace crecer, o se usa o manipula de cualquier forma para la producción de una sustancia por la célula, por ejemplo la expresión o replicación, por la célula, de un gen, de una secuencia de ADN o de ARN, una proteína o una enzima.

40 La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedante y vector compatible que, en condiciones adecuadas, puede expresar una proteína o ácido nucleico que es portado por el vector e introducido en la célula hospedante. Los sistemas de expresión habituales incluyen células hospedantes de *E. coli* y vectores plasmídicos, células hospedantes de insectos y vectores de baculovirus, y células hospedantes y vectores de mamíferos.

45 La presente invención contempla cualesquiera modificaciones ligeras de las secuencias de aminoácidos o nucleotídicas que corresponden a o codifican las muteínas de IL-11 de las secuencias descritas aquí, excluyendo modificaciones que cambiarían el segmento de aminoácidos correspondiente a los aminoácidos 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje, segmento el cual tendrá la secuencia PAIDY (SEC ID NO:24) o FMQIQ (SEC ID NO:25). En particular, la presente invención contempla variantes conservativas de secuencias de los ácidos nucleicos que codifican las muteínas de IL-11 de la invención. "Variantes conservativas de secuencias" de una secuencia polinucleotídica son aquellas en las que un cambio de uno o más nucleótidos en un codón dado no da como resultado una alteración en el aminoácido codificado en esa posición. Las variantes conservativas de funciones de las muteínas de IL-11 de la invención también están contempladas por la presente invención. Las "variantes conservativas de funciones" son aquellas en las que uno o más restos de aminoácidos en una proteína se han cambiado sin alterar la conformación y función global de la proteína, incluyendo, pero de ningún modo limitado a, la sustitución de un aminoácido por otro que tiene propiedades similares. Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los aminoácidos polares/hidrófilos que pueden ser intercambiables incluyen asparagina, glutamina, serina, cisteína, treonina, lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos no polares/hidrófobos que pueden ser intercambiables incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, tirosina, fenilalanina, triptófano y metionina; los aminoácidos ácidos que pueden ser intercambiables incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; y los aminoácidos básicos que pueden ser

intercambiables incluyen histidina, lisina y arginina. Preferiblemente, las variantes conservativas de funciones de las muteínas de IL-11 de la invención tienen menos de 20, más preferiblemente menos de 15, más preferiblemente menos de 10 cambios de aminoácidos.

5 También están incluidas en la presente invención muteínas de IL-11 en las que la secuencia de aminoácidos AMSAG (SEC ID NO:23) en las posiciones 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje está sustituida por la  
 10 secuencia de aminoácidos PAIDY (SEC ID NO:24) o FMQIQ (SEC ID NO:25) y que comprenden secuencias de aminoácidos que son al menos 85% idénticas, particularmente al menos 90% idénticas, más particularmente al menos 94% idénticas (por ejemplo 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) a las secuencias de aminoácidos descritas aquí cuando la comparación se realiza mediante un algoritmo BLAST en el que los parámetros del algoritmo se  
 15 seleccionan para dar la coincidencia más grande entre las secuencias respectivas a lo largo de toda la longitud de las secuencias de referencia respectivas.

Identidad de secuencias se refiere a coincidencias exactas entre los aminoácidos de dos secuencias que se están comparando.

15 Las descripciones para los algoritmos BLAST se pueden encontrar en las siguientes referencias que se incorporan aquí como referencia: BLAST ALGORITHMS: Altschul et al, J Mol. Biol. 215:403-410, 1990; Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991.

20 Las muteínas de IL-11 de la presente invención se pueden producir recombinantemente, por ejemplo en un sistema de expresión de *E. coli*. La transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedante. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica, e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación y encapsulamiento del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas, inyección biolística y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico se pueden introducir en células de mamífero mediante vectores víricos. Los métodos para transformar células son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes  
 25 US n<sup>os</sup> 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 y 4.959.455.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción de una muteína de IL-11 de la invención, comprendiendo dicho método clonar una secuencia de ácido nucleico que codifica una muteína de IL-11 en un vector apropiado, transformar una estirpe celular hospedante con el vector, y cultivar la estirpe celular hospedante transformada en condiciones adecuadas para la expresión de las muteínas de IL-11 de la presente invención.

35 Los vectores disponibles para la clonación y expresión en estirpes celulares hospedantes son bien conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, vectores para la clonación y expresión en estirpes celulares de mamíferos, vectores para la clonación y expresión en estirpes celulares bacterianas, y vectores para la clonación y expresión en estirpes celulares de insectos. Las muteínas de IL-11 se pueden recuperar usando métodos de purificación de proteínas estándar.

En otro aspecto, la presente invención proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican muteínas de IL-11 que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID NOs:5 a 12.

40 En todavía un aspecto adicional, la presente invención proporciona estirpes celulares hospedantes transformadas con los vectores de la presente invención. Las estirpes celulares hospedantes incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas, tales como *E. coli*, y estirpes celulares de mamíferos.

45 Las estirpes celulares de mamíferos disponibles como hospedantes para la expresión son bien conocidas en la técnica, e incluyen muchas estirpes celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC). Éstas incluyen, entre otras, células de ovario de hámster chino (CHO), NSO, células SP2, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep 02), células A549, células 3T3, y un número de otras estirpes celulares. Las células hospedantes de mamíferos incluyen células humanas, de ratón, de rata, de perro, de mono, de cerdo, de cabra, bovinas, de caballo y de hámster. Las estirpes celulares de preferencia particular se seleccionan determinando qué estirpes celulares tienen niveles altos de expresión. Otras estirpes celulares que se pueden usar son estirpes celulares de insectos, tales como células Sf9, células de anfibios, células bacterianas, células vegetales y células  
 50 fúngicas. Cuando se introducen en las células hospedantes de mamíferos vectores de expresión recombinantes que codifican las muteínas de IL-11, las muteínas de IL-11 se producen cultivando las células hospedantes durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de las muteínas de IL-11 en las células hospedantes o, más preferiblemente la secreción de las muteínas de IL-11 en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células hospedantes.

55 Las muteínas de IL-11 se pueden recuperar del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar. Además, la expresión de muteínas de IL-11 de la invención procedentes de estirpes celulares de producción se puede potenciar usando un número de técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión del gen de glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque habitual para potenciar la expresión en ciertas

condiciones. El sistema GS se explica en todo o en parte en relación con las Patentes Europeas n<sup>os</sup> 0.216.846, 0.256.055, y 0.323.997 y la Solicitud de Patente Europea n<sup>o</sup> 89303964.4.

5 Es probable que las muteínas de IL-11 expresadas por diferentes estirpes celulares o en animales transgénicos tendrán diferente glicosilación entre sí. Sin embargo, todas las muteínas de IL-11 codificadas por las moléculas de ácido nucleico proporcionadas aquí, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas aquí, son parte de la invención, independientemente de la glicosilación de las muteínas de IL-11.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona muteínas de IL-11 humanas o murinas que se han modificado adicionalmente para potenciar sus propiedades farmacocinéticas y semivida *in vivo*. Las modificaciones incluyen PEGilación con polietilenglicol, (Clark et al, J Biol Chem. 271(36):21969-77, 1996), fusiones a grandes proteínas vivas largas tales como albúmina (Yeh et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 89(5):1904-8, 1992) o la porción Fc de una Ig (Ashkenazi y Chamow, Curr Opin Immunol. 9(2):195-200, 1997), y la introducción de sitios de glicosilación (Keyt et al, Proc Natl Acad Sci USA. 91(9):3670-4, 1994).

Un aspecto de la invención proporciona antagonistas de muteínas de IL-11 que están PEGilados.

15 Un aspecto de la presente invención proporciona muteínas de IL-11 que tienen las secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:12 aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:12, SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:15, SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:20, SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:21 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:21 que están PEGiladas.

Las muteínas de IL-11 de la invención se pueden suministrar convenientemente en composiciones adecuadas para uso farmacéutico. Tales composiciones son otro aspecto de la presente invención.

25 La administración puede ser sistémica o local. La administración sistémica es particularmente útil. La referencia a "administración sistémica" incluye intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, e inyección subcutánea, infusión, así como administración por vía oral, rectal y nasal, o por vía de inhalación.

30 Las composiciones adecuadas para uso sistémico incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua), polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles, y polvos estériles para inhalación. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe de conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser cualesquiera vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de tensioactivos. Se pueden incluir diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes para ajustar la tonicidad, por ejemplo azúcares y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

40 Las disoluciones estériles se preparan incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado y opcionalmente con otros ingredientes activos y excipientes según sea necesario, seguido de la esterilización por filtración u otros medios apropiados de esterilización. En el caso de polvos estériles, los métodos adecuados de preparación incluyen secado a vacío y la técnica de liofilización que produce un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente adicionalmente deseado que se puede obtener en un tamaño de partículas apropiado.

45 Cuando el ingrediente activo se protege adecuadamente, se puede administrar oralmente, por ejemplo con un diluyente inerte o con un vehículo comestible asimilable, o se puede encerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, o se puede comprimir en comprimidos. Para la administración terapéutica oral, el ingrediente activo se puede incorporar con excipientes y se puede usar en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares.

50 Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para la facilidad de administración y uniformidad de dosificación.

55 Un médico o veterinario que tenga pericia normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis del antagonista, empleado en la composición farmacéutica, a niveles menores que los requeridos a fin de lograr el efecto terapéutico deseado, e incrementar gradualmente la dosis hasta que se logra el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la invención puede ser aquella cantidad del compuesto que sea la dosis

más baja eficaz para producir un efecto terapéutico.

Para aplicaciones terapéuticas, las muteínas de IL-11 de la presente invención, o composiciones que contienen esas muteínas, se administran a un mamífero, preferiblemente un ser humano, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, tal como las explicadas anteriormente, incluyendo aquellas que se pueden administrar intravenosamente a un ser humano como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo.

En un aspecto, la presente invención contempla una composición farmacéutica para uso en un método para el tratamiento de una afección mediada por IL-11.

Las muteínas de IL-11 de la presente invención que son agonistas, y las composiciones que comprenden tales muteínas, se pueden usar en un método para el tratamiento de afecciones mediadas por IL-11 en las que IL-11 ejerce un efecto positivo.

Las muteínas de IL-11 de la presente invención que son antagonistas, y las composiciones que comprenden tales muteínas, se pueden usar en un método para el tratamiento de afecciones mediadas por IL-11 en las que IL-11 ejerce un efecto negativo.

Las muteínas de IL-11 de la presente invención, y las composiciones que comprenden tales muteínas, se pueden usar en un método de fabricación de un medicamento para el tratamiento de afecciones mediadas por IL-11.

Los antagonistas de muteínas de IL-11 particulares de la presente invención son muteínas de IL-11 que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:12 aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:12, SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:15, SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:20, SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:21 o aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:21 y que pueden estar PEGiladas. Particularmente, la PEGilación es vía la unión al resto de cisteína correspondiente a la posición 147 de SEC ID NOs 11, 12, 15, 19, 20 ó 21.

La invención contempla además el uso de una muteína de IL-11 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección mediada por IL-11.

La presente invención se describe además mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

## EJEMPLO 1

Proteínas mutantes de IL-11

A. Producción recombinante de proteínas mutantes de IL-11 solubles

Los mutantes de IL-11 1.21 (SEC ID NO:10), 1B.382 (SEC ID NO:17) y mL-11-W147A se clonaron en una versión modificada del vector pET15b (número de Catálogo 69661-3 de Novagen). El vector pET15b se modificó sustituyendo el sitio de escisión de trombina y sitios de clonación múltiples por sitios de restricción *AscI* y *EcoRI*, e insertando un origen de replicación M13 de manera que el vector se pudiese usar como un fagómodo.

Las proteínas correspondientes etiquetadas con hexahistidina N-terminal se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus [marca registrada] (DE3)-RIL *E. coli* (número de catálogo 230245 de Strategene). Típicamente, se hicieron crecer hasta una densidad óptica (600 nm) de 0,5 cultivos en matraces de agitación de 400 ml en Superbroth que contiene 2% v/v de glucosa y 100 µg/ml de ampicilina. La expresión proteica se indujo entonces mediante la adición de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido hasta una concentración final de 200 µM, y los cultivos se incubaron con agitación a 37°C durante otras 4 horas. Las proteínas recombinantes se purificaron de las células bacterianas (lisadas en hidrocloreuro de guanidinio 7 M) usando cromatografía de afinidad de ion de níquel inmovilizado, y se volvieron a plegar mediante diálisis en PBS. Las muestras replegadas se dializaron adicionalmente frente a ácido trifluoroacético acuoso al 0,15%. En algunos casos, las muestras también se purificaron mediante HPLC de fase inversa usando gradientes de acetonitrilo en 0,15% v/v de ácido trifluoroacético antes de la liofilización. Las muestras se reconstituyeron en un pequeño volumen de agua antes de la dilución con tampón.

La afinidad por IL-11Rα de los mutantes de IL-11 seleccionados se determinó en un experimento ELISA de competición. Se incubaron placas de 96 pocillos revestidas con mL-11Rα-Fc con una cantidad subsaturante constante de los variantes de IL-11 presentados en fagos en presencia de diferentes concentraciones de proteínas de IL-11 solubles. Tras la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron, y el fago unido se marcó entonces con un anticuerpo policlonal anti-M13 conjugado a peroxidasa de rábano picante. Tras eliminar el exceso de anticuerpo mediante lavado con PBS que contiene 0,05% de Tween 20, se añadió a cada pocillo sustrato TMB, y se incubó durante 10 minutos antes de que la reacción se paralizase mediante la adición de ácido fosfórico 2M. Entonces se determinó la absorbancia a 450 nm para cada pocillo mediante análisis en un lector de placas de microtitulación.

La mutación W147A no tuvo ningún efecto sobre la unión a IL-11R $\alpha$ , pero previene el reclutamiento de gp130 hacia el complejo receptor de IL-11 (Underhill-Day et al, 2003 más arriba), previniendo de ese modo la señalización de IL-11. IL-11 W147A es una variante antagonista de IL-11.

- 5 Se observaron claras diferencias entre las afinidades de la mL-11-W147A y proteínas mutantes por la unión a IL-11R $\alpha$ -Fc. Con respecto a IL-11 W147A, el clon 1.21 (SEC ID NO:10) se unió a IL-11R $\alpha$  con una afinidad mayor que 20 veces, mientras que el clon 1B.382 (SEC ID NO:17) también se unió a IL-11R $\alpha$  con una afinidad mayor que 20 veces.

#### B. Actividad *in vitro* de antagonista

- 10 Se generó una estirpe celular Ba/F3 sensible a IL-11 para evaluar la capacidad de las proteínas IL-11 mutantes para bloquear la bioactividad de IL-11. Células Ba/F3, una estirpe celular pro linfocitos B murina que no expresa normalmente IL-11R $\alpha$  o gp130 ni prolifera en respuesta a IL-11, se transfectaron de forma estable con constructos que codifican IL-11R $\alpha$  murino de tipo salvaje y el correceptor gp130 murino, y se seleccionaron mediante crecimiento en medio que contiene IL-11. Las estirpes celulares clonales se derivaron mediante clonación por dilución límite. Se analizó un número de clones transfectados de forma estable en busca de su proliferación sensible a la dosis (usando un ensayo de MTT) cuando se cultivan en presencia de IL-11, y se seleccionó uno para el trabajo posterior.

- 15 Células Ba/F3 sensibles a IL-11 transfectadas de forma estable con IL-11R $\alpha$ /gp130 murino se sembraron a  $3 \times 10^4$  células/pocillo en 50  $\mu$ l de medio de Eagle modificado de Dulbecco que contiene 10% (v/v) de suero fetal de ternera y concentraciones crecientes de proteínas IL-11 mutantes en presencia de una concentración fija submáxima de IL-11 murina (50 pM) en un volumen total de 100  $\mu$ l/pocillo. Tras incubar durante 48 horas, la proliferación se midió colorimétricamente a 570 nm usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich). Los ensayos se llevaron a cabo siempre por duplicado, y entonces se representaron los valores medios para cada punto de ensayo.

- 25 IL-11 W147A se ha caracterizado previamente como un antagonista de la bioactividad de IL-11 (Underhill-Day et al, 2003 más arriba). Cuando se estimularon células Ba/F3 transfectadas con IL-11R $\alpha$ /gp130 con una dosis submáxima de IL-11, IL-11 W147A fue capaz de inhibir la proliferación celular de una manera dependiente de la dosis. Se evaluaron varias de las proteínas IL-11 mutantes en busca de su capacidad para inhibir la proliferación inducida por IL-11, y se compararon con IL-11 W147A (Tabla 3). Las proteínas IL-11 mutantes fueron significativamente más potentes a la hora de bloquear la proliferación inducida por IL-11, según se mide en un ensayo de MTT estándar. Los clones 1.21 (SEC ID NO:10) y 1B.382 (SEC ID NO:17) fueron ambos antagonistas de IL-11 20 a 30 veces más potentes que IL-11 W147A.

## EJEMPLO 2

### Muteínas de IL-11 PEGiladas

#### Producción de muteínas de IL-11 PEGiladas

- 35 La secuencia proteica madura de IL-11 murina contiene una secuencia de aminoácidos que se puede escindir mediante trombina, dando como resultado la eliminación de los primeros nueve aminoácidos. Una comparación de la muteína de IL-11 1.21 (SEC ID NO:10) con y sin los primeros nueve aminoácidos mostró actividad idéntica, e indicó que los primeros nueve restos de IL-11 murina no son necesarios para la unión a IL-11R $\alpha$ . El sitio de trombina interno se optimizó mediante mutagénesis dirigida al sitio para permitir la escisión eficiente mediante mutación de los restos 6 y 7 a Leu (L) y Val (V), respectivamente. Para la producción a gran escala de la muteína de IL-11 PEGilada de aminoácidos 10-178 de SEC ID NO:12, se eliminaron mediante digestión con trombina la etiqueta His amino-terminal y los primeros nueve restos de la secuencia de mL-11 modificada.

- 40 Para la escisión de la etiqueta de hexahistidina N-terminal, se resuspendieron muestras liofilizadas de la proteína de muteína de IL-11 relevante en tampón de escisión por trombina (150 mM de NaCl, 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 20 mM de Tris.HCl pH 8,4) a una concentración de 0,5 mg/ml, y se trataron con 5 unidades de trombina/mg de proteína durante 4 horas a temperatura ambiente. En estas condiciones, la trombina escinde eficientemente la muteína de IL-11 derivada de ratón en el sitio interno óptimo entre los restos Arg<sup>9</sup>-Val<sup>10</sup>, y las muestras digeridas con trombina tienen una secuencia N-terminal de Val<sup>10</sup>-Ser<sup>11</sup>-Ser<sup>12</sup>. Tras el tratamiento con trombina, las muestras escindidas se purificaron mediante HPLC de fase inversa como se describe previamente.

- 50 PEGilación específica del sitio

- Una limitación al uso *in vivo* de pequeñas proteínas es su rápido aclaramiento de la circulación. Una de las rutas principales del aclaramiento es vía filtración a través del riñón, cuya eficiencia es inversamente proporcional al peso molecular. Una estrategia para reducir la velocidad de aclaramiento *in vivo* de pequeñas proteínas es a través de modificación química con polietilenglicol (Tsutsumi et al, Thjromb. Haemost. 77.1:168-73, 1997); sin embargo, esto puede reducir o incluso eliminar la actividad de una proteína si se une en un sitio inapropiado.

Para mejorar las propiedades farmacocinéticas potenciales de una proteína IL-11 mutante para uso *in vivo*, se diseñó una estrategia para la modificación, específica del sitio, de las proteínas IL-11 mutantes con un resto de polietilenglicol de 40 kDa. Se explotó la ausencia de cisteína con la secuencia de IL-11 para introducir un solo resto de Cys único en la posición 147 mediante mutagénesis dirigida al sitio. Esto proporcionó una cadena lateral químicamente reactiva que se pudo modificar específicamente para el sitio con un reactivo de PEG derivatizado con maleimida. Además, el sitio de unión de PEG corresponde al sitio III en la superficie de IL-11, y no debería de interferir con la unión de las proteínas IL-11 mutantes a IL-11R $\alpha$ , o a la molécula gp130 que se une a la superficie del sitio II.

Se generaron formas modificadas de las proteínas IL-11 mutantes que contienen una mutación W147C y el sitio de trombina interno optimizado descrito anteriormente. Las proteínas se expresaron en *E. coli* y se purificaron y replegaron como se describe en el Ejemplo 1. La etiqueta de His N-terminal y los primeros 9 aminoácidos N-terminales se escindieron entonces con trombina como se describe anteriormente. Las muestras tratadas con trombina se purificaron como se describe en el Ejemplo 1, excepto que las muestras se ajustaron a pH 8,0 y se redujeron con 5 mM de DTT antes del replegamiento en PBS que contiene 2 mM de EDTA y 2 mM de DTT.

Las proteínas IL-11 mutantes que contienen un resto de Cys manipulado por ingeniería en la posición que corresponde a la posición 147 de SEC ID NO:12 se modificaron entonces con polietilenglicol derivatizado con maleimida de 40 kDa. De forma breve, las proteínas IL-11 mutantes liofilizadas tratadas con trombina se resuspendieron a una concentración de 5 mg/ml en ácido acético acuoso 1 mM que contiene 5 mM de tris(2-carboxietil)fosfina, y se mezclaron con 4 volúmenes de 12,5 mg/ml de mPEG2-maleimida (número de catálogo 2D3YOTO1 de Nektar Therapeutics) en PBS. Las reacciones se incubaron durante 16 horas a temperatura ambiente, y entonces los conjugados de proteína-PEG se separaron de los componentes no conjugados mediante cromatografía de intercambio catiónico en una columna SP Sepharose, usando un gradiente de NaCl en 20 mM de tampón de acetato de sodio, pH 5,5. Las fracciones que contienen los productos PEGilados se reunieron, se dializaron frente a 5 mM de tampón de acetato de amonio, pH 5,5, y entonces se liofilizaron.

Una forma modificada del clon 1.21, que contiene una mutación W147C y un sitio de trombina interno optimizado, se expresó en *E. coli*, y se purificó y se replegó como se describió. La etiqueta de His N-terminal y el fragmento de 9 restos de aminoácidos se escindieron con trombina y entonces se PEGiló específicamente para el sitio en Cys147 (en el que Cys147 es la posición que corresponde a la posición 147 de SEC ID NO:12). El reactivo de PEG en exceso se eliminó mediante cromatografía de intercambio iónico. El análisis de la forma modificada PEGilada y troncada del clon 1.21 (denominada aquí como  $\Delta$ 1.21) mediante SDS-PAGE mostró un desplazamiento en el peso molecular aparente consistente con la unión de un único resto de PEG de 40 kDa.

La actividad de  $\Delta$ 1.21 se ensayó en el ELISA de unión a IL-11R $\alpha$  y en el ensayo de células Ba/F3, y se comparó con la actividad de 1.21 no PEGilado (que contiene Ala en la posición 147) y con IL-11 W147A no PEGilado. En ambos ensayos, la actividad de  $\Delta$ 1.21 se redujo con respecto a 1.21 no PEGilado. La afinidad de unión a IL-11R $\alpha$  se redujo aproximadamente 5 veces, mientras que la capacidad de  $\Delta$ 1.21 para antagonizar la proliferación de células Ba/F3 inducida por IL-11 se redujo aproximadamente 10 veces. Normalmente se observan disminuciones moderadas en la potencia para proteínas PEGiladas, y a menudo resulta de una disminución en la velocidad de asociación entre la proteína y su receptor diana. A pesar de la disminución en la potencia,  $\Delta$ 1.21 fue no obstante más potente que IL-11 W147A no PEGilada en ambos ensayos.

### EJEMPLO 3

#### Semivida *in vivo*

Se usaron ratones C57BL/6J hembra (alrededor de 8 semanas y 20 +/- 2 g) para determinar la semivida *in vivo* de muteína PEGilada ( $\Delta$ 1.21) y muteína escindida por trombina no PEGilada 1.21 (es decir, aminoácidos 10-178 de SEC ID NO:10). Cada ratón recibió 1 inyección IP. A los ratones se les inyectó con la muteína 1.21 escindida por trombina, a una dosis de 1 mg/kg (20 ug por animal), o con una dosis molar equivalente de  $\Delta$ 1.21, a una dosis de 3,2 mg/kg (64 ug por animal). En un momento apropiado después de la inyección IP, los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO<sub>2</sub>, seguido de la dislocación cervical, y se recogió sangre mediante punción cardíaca. El suero se separó de la sangre mediante incubación a 37°C durante 1 hora y después toda la noche a 4°C antes de la centrifugación para peletizar los glóbulos rojos. Se recogió sangre a los 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 5 horas, de ratones inyectados con muteína 1.21 escindida por trombina, y a los 10 minutos, 1 hora, 2 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas de ratones inyectados con  $\Delta$ 1.21. Para cada punto de tiempo se usó un total de 4 ratones.

La concentración de la muteína 1.21 escindida por trombina se cuantificó usando un ELISA de captura. De forma breve, se revistieron placas de ELISA con 2  $\mu$ g/ml de mL-11R $\alpha$ -Fc (50  $\mu$ l/pocillo) [R&D systems] toda la noche a 4°C en PBS, y las placas se bloquearon entonces con PBS que contiene 5% p/v de leche desnatada (200  $\mu$ l/pocillo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas bloqueadas con PBS que contiene 0,05% v/v de Tween 20, las muestras de suero se diluyeron en serie en disolución salina tamponada con Tris que contiene 1% p/v de BSA y 0,05% v/v de Tween 20 (TBS+BT), y se añadieron a las placas (100  $\mu$ l/pocillo). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS que contiene 0,05% v/v de Tween 20 después de la

unión durante toda la noche de la muteína en el suero al mL-11R $\alpha$ -Fc revestido en la placa, y entonces se incubaron con anti-mIL-11 biotinilado policlonal (50  $\mu$ l/pocillo) [R&D systems, número de catálogo BAF418] a 0,3  $\mu$ g/ml en TBS+BT durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS que contiene 0,05% v/v de Tween 20, la placa se incubó con estreptavidina-HRP (Sigma) [50  $\mu$ l/pocillo] diluido 1000 veces en TBS+BT, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS que contiene 0,05% v/v de Tween 20, se añadió sustrato TMB a cada pocillo (100  $\mu$ l/pocillo) y, tras 10 minutos de incubación, la reacción se detuvo con ácidos fosfóricos 2M (50  $\mu$ l/pocillo) y la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm usando un lector de placas de microtitulación. Se generó una curva estándar para tanto la muteína 1.21 escindida por trombina como para  $\Delta$ 1.21 usando concentraciones conocidas de proteínas. Estas curvas estándar se usaron entonces para convertir los datos de ELISA en valores de nM para muteína 1.21 escindida por trombina y  $\Delta$ 1.21 contenidas en el suero.

La PEGilación de la muteína mejoró claramente la semivida. La concentración más elevada de muteína 1.21 escindida por trombina no PEGilada en el suero se observó en el punto de tiempo más temprano de 5 minutos tras la administración, y declinó continuamente. Solo cantidades mínimas de muteína 1.21 escindida por trombina no PEGilada permanecieron en el suero 5 horas después de la administración, y se estimó que tenía una semivida de menos de 1 hora. Por comparación, la concentración más elevada de  $\Delta$ 1.21 en el suero se observó a 6 horas tras la administración, y todavía estaba presente en concentraciones medibles 72 horas después de la inyección. La semivida de la  $\Delta$ 1.21 se estimó que era aproximadamente 24 horas.

#### EJEMPLO 4

##### Muteína de IL-11 humana PEGilada

Se preparó una muteína de IL-11 humana PEGilada basándose en SEC ID NO:11. Ésta se expresó, se purificó y se replegó como se describió, y después se PEGiló específicamente para el sitio en Cys147 (numeración basada en SEC ID NO:11) usando el enfoque general descrito anteriormente para la muteína de IL-11 murina. IL-11 humana no contiene un sitio de trombina interno, de manera que los primeros 9 aminoácidos de la secuencia de IL-11 humana así como una secuencia de etiqueta del vector se retuvieron para proporcionar la muteína de SEC ID NO:22.

La muteína de IL-11 humana PEGilada de SEC ID NO:22 tuvo actividad equivalente a la muteína de IL-11 de ratón pegilada  $\Delta$ 1.21 descrita anteriormente en los ensayos tanto ELISA como de Ba/F3.

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita aquí es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se ha de entender que la invención incluye todas las citadas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos citados o indicados en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualesquiera y todas las combinaciones de cualesquiera dos o más de dichas etapas o características.

TABLA 3

Datos de ensayos celulares

ID del clon	secuencia	IC <sub>50</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (mutante)/IC <sub>50</sub> (tipo salvaje*)
tipo salvaje*		14	1,0
1.21	<sup>58</sup> P-A-I-D-Y <sup>62</sup>	0,54	26
1B.382	<sup>58</sup> F-M-Q-I-Q <sup>62</sup>	0,49	29

#### BIBLIOGRAFÍA

- Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990
- Altschul, *J. Mol. Biol.* 219:555-565, 1991
- Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, 1997
- Ashkenazi y Chamow, *Curr Opin Immunol.* 9(2):195-200, 1997
- Ausubel, *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1994
- Barton *et al.*, *J Biol Chem.* 274(9):5755-61, 1999
- Barton *et al.*, *J Biol Chem* (2000) 275:36197-36203, 2000
- Baumann y Schendel, *J Biol Chem* 266:20424-20427, 1991

- Benoist, *et al.*, *Nature* 290:304-310, 1981
- Bilinski *et al.*, *Genes Dev* 12:2234-2243, 1998
- Brakenhoff *et al.*, *J Biol Chem* 269:86-93, 1994
- Chang *et al.*, *Blood Cells Mol Dis* 22(1):57-67, 1996
- 5 Clark *et al.*, *J Biol Chem.* 271 (36):21969-77, 1996
- Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085, 1989
- Czupryn *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270 (2): 978-985, 1995
- Czupryn *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 762:152-164, 1995
- Dimitriadeis *et al.*, *Mol Hum Reprod.* 6(10): 907-914,2000
- 10 Du *et al.*, *J Cell Physiol* 168:362-372, 1996
- Ehlers *et al.*, *J Biol Chem* 270:8158-8163, 1995
- Girasole *et al.*, *J Clin Invest* 93:1516-1524, 1994
- Harmegnies *et al.*, *Biochem J.* 375(1):23-32, 2003
- Herrlinger *et al.*, *Am J Gastroenterol* 101(4):793-797, 2006
- 15 Heymann y Rousselle, *Cytokine* 12 (10):1455-1468, 2000
- Hudson *et al.*, *J Biol Chem* 271:11971-11978, 1996
- Hughes *et al.*, *Calcif Tissue Int* 53:362-364, 1993
- Keyt *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.* 91(9):3670-4, 1994
- Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82.2:488-92, 1985
- 20 Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol* 204: 1991
- Lopez-Valpuesta *et al.*, *Neuropharmacology* 33:989-994, 1994
- Maier *et al.*, *J Biol Chem* 268:21527-21532, 1993
- Maxam y Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(2): 560-564,1977
- Mehler *et al.*, *Nature* 362:62-65, 1993
- 25 Miyadai *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem* 60.3:541-542, 1996
- Ohsumi *et al.*, *FEBS Lett* 288:13-16, 1991
- Ohsumi *et al.*, *Biochem Mol Biol Int* 32:705-712, 1994
- Redlich *et al.*, *J Immunol* 157:1705-1710, 1996
- Robb *et al.*, *Nat Med* 4:303-308, 1998
- 30 Saggio *et al.*, *Embo J* 14; 3045-3054, 1995
- Saiki, *et al.*, *Science* 239:487, 1988
- Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II, D. N. Glover ed. 1985
- 35 Sanger, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(12):5463 5467, 1977
- Savino *et al.*, *Embo J* 13:5863-5870, 1994
- Sidhu *et al.*, *Methods Enzymol* 328:333-363, 2000

Tacken *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 265.2:645-655, 1999

Tepler *et al.*, *Blood* 87(9):3607-3614, 1996

Trepicchio *et al.*, *J Clin Invest* 104:1527-1537, 1999

Tsutsumi *et al.*, *Thromb. Haemost.* 77.1:168-73, 1997

5 Underhill-Day *et al.*, *Endocrinology* 144; 3406-3414, 2003

Wang *et al.*, *Eur J Biochem.* 269(1):61-68, 2002

Yeh *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(5):1904-8, 1992

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> CSL LIMITED BACA, Manuel (US SOLAMENTE)

<120> MUTEÍNAS DE CITOCINA

<130> 30663421/EJH

<150> US 61/000576

<151> 26-10-2007

15 <160> 25

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 178

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala
1          5          10          15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr
20          25          30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp
35          40          45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly Ala Leu
50          55          60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser
85          90          95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu
100         105         110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu
115        120        125
    
```

ES 2 536 877 T3

Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 2

<211> 178

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly Thr Leu  
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
 130 135 140

Ser Ala Trp Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

10 Arg Leu

ES 2 536 877 T3

<210> 3

<211> 178

<212> PRT

<213> *M. mulatta*

5 <400> 3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Ala Met Ser Ala Gly Ala Leu  
50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
130 135 140

Ser Thr Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
165 170 175

Arg Leu

<210> 4

10 <211> 178

<212> PRT

<213> *M. mulatta*

<400> 4

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Thr Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 5

5 <211> 178

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30  
 Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45  
 His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu  
 50 55 60  
 Gly Ala Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asp Leu  
 65 70 75 80  
 Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
 85 90 95  
 Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110  
 Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125  
 Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140  
 Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160  
 His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 6

5 <211> 178

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 6

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Thr Leu  
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
 130 135 140

Ser Ala Trp Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 7

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Ala Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 8

<211> 178

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 8

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Thr Leu  
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
 130 135 140

Ser Ala Trp Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 9

<211> 178

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Ala Ala Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 10

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 10

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Thr Leu  
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
 130 135 140

Ser Ala Ala Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 11

<211> 178

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Ala Cys Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 12

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 12

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Thr Leu  
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
 130 135 140

Ser Ala Cys Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 13

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *M. mulatta*

<400> 13

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Thr Trp Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 14

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *M. mulatta*

<400> 14

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu  
50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
130 135 140

Ser Thr Ala Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
165 170 175

Arg Leu

<210> 15

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *M. mulatta*

<400> 15

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Thr Cys Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 16

<211> 178

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Ala Ala Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 17

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 17

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Thr Leu  
50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
130 135 140

Ser Ala Ala Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
165 170 175

Arg Leu

<210> 18

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *M. mulatta*

<400> 18

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Thr Ala Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 19

<211> 178

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Pro Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Ala Cys Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 20

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 20

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Ala Gly Ser Pro Arg Val Ser Ser Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Asp Leu Asp Ser Ala Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Ala Ala Gln Met Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Ser Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Thr Leu  
 50 55 60

Gly Ser Leu Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Val Asp Leu  
 65 70 75 80

Met Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Gly Gly Pro  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Ala Leu Gln Ala Arg Leu  
 100 105 110

Glu Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Ala Ala Pro Asp Gln Pro Val Ile Pro Leu Gly Pro Pro Ala  
 130 135 140

Ser Ala Cys Gly Ser Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 21

<211> 178

<212> PRT

5 <213> *M. mulatta*

<400> 21

ES 2 536 877 T3

Pro Gly Pro Pro Pro Gly Ser Pro Arg Ala Ser Pro Asp Pro Arg Ala  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Glu Asp Thr  
 20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ile Gln Leu Lys Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp  
 35 40 45

His Asn Leu Asp Ser Leu Pro Thr Leu Phe Met Gln Ile Gln Ala Leu  
 50 55 60

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

Leu Ser Tyr Leu Arg His Val Gln Trp Leu Arg Arg Ala Met Gly Ser  
 85 90 95

Ser Leu Lys Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Thr Arg Leu  
 100 105 110

Asp Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu  
 115 120 125

Pro Gln Leu Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser  
 130 135 140

Ser Thr Cys Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu  
 145 150 155 160

His Leu Thr Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr  
 165 170 175

Arg Leu

<210> 22

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 536 877 T3

Met Gly Ser His His His His His His Gly Ala Arg Gln Pro Gly Pro  
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Pro Pro Arg Val Ser Pro Asp Pro Arg Ala Glu Leu Asp  
 20 25 30

Ser Thr Val Leu Leu Thr Arg Ser Leu Leu Ala Asp Thr Arg Gln Leu  
 35 40 45

Ala Ala Gln Leu Arg Asp Lys Phe Pro Ala Asp Gly Asp His Asn Leu  
 50 55 60

Asp Ser Leu Pro Thr Leu Pro Ala Ile Asp Tyr Ala Leu Gly Ala Leu  
 65 70 75 80

Gln Leu Pro Gly Val Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asp Leu Leu Ser Tyr  
 85 90 95

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

Thr Leu Glu Pro Glu Leu Gly Thr Leu Gln Ala Arg Leu Asp Arg Leu  
 115 120 125

Leu Arg Arg Leu Gln Leu Leu Met Ser Arg Leu Ala Leu Pro Gln Pro  
 130 135 140

Pro Pro Asp Pro Pro Ala Pro Pro Leu Ala Pro Pro Ser Ser Ala Cys  
 145 150 155 160

Gly Gly Ile Arg Ala Ala His Ala Ile Leu Gly Gly Leu His Leu Thr  
 165 170 175

Leu Asp Trp Ala Val Arg Gly Leu Leu Leu Leu Lys Thr Arg Leu  
 180 185 190

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> Aminoácido IL-11

<400> 23

Ala Met Ser Ala Gly  
 1 5

10 <210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial



**REIVINDICACIONES**

1. Una muteína de IL-11 que muestra unión potenciada a la cadena alfa del receptor de IL-11, en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG en la posición 58 a 62 de IL-11 de mamífero de tipo salvaje está sustituida por la secuencia de aminoácidos PAIDY o FMQIQ.
- 5 2. La muteína de IL-11 de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG está sustituida por PAIDY.
3. La muteína de IL-11 de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos AMSAG está sustituida por FMQIQ.
- 10 4. La muteína de IL-11 de la reivindicación 1 ó 2 ó 3, que comprende además una mutación en un triptófano (W) en una posición de aminoácido 147 de IL-11 de tipo salvaje, mutación la cual inhibe la unión de la muteína de IL-11 a gp130.
5. La muteína de IL-11 de la reivindicación 4, en la que la mutación adicional es una sustitución de aminoácido.
6. La muteína de IL-11 de la reivindicación 5, en la que la sustitución es a una alanina (A) o cisteína (C).
- 15 7. La muteína de IL-11 de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:4, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:5, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:6, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:7, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:8, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:8, SEC ID NO:13, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:13, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:13, y secuencias de aminoácidos que son al menos 85% idénticas a una cualquiera de las SEC ID NOs mencionadas anteriormente, en la que las secuencias de aminoácidos que son al menos 85% idénticas a una cualquiera de las SEC ID NOs mencionadas anteriormente muestran unión potenciada a la cadena alfa del receptor de IL-11.
- 20 8. La muteína de IL-11 de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:9, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:10, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:11, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:12, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:12, SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:14, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:15, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:16, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:17, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:17, SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:18, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:18, SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:19, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:20, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:20, SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 178 de SEC ID NO:21, aminoácidos 10 a 175 de SEC ID NO:21, y secuencias de aminoácidos que son al menos 85% idénticas a una cualquiera de las SEC ID NOs mencionadas anteriormente, en la que las secuencias de aminoácidos que son al menos 85% idénticas a una cualquiera de las SEC ID NOs mencionadas anteriormente muestran unión potenciada a la cadena alfa del receptor de IL-11.
- 25 9. La muteína de IL-11 de la reivindicación 1 ó 7 u 8, en la que dicha muteína de IL-11 está PEGilada.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende la muteína de IL-11 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y uno o más vehículos, diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 35 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 o la muteína de IL-11 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para el uso en un método para el tratamiento o profilaxis de una afección seleccionada del grupo de trombocitopenia, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, infertilidad, daño mucosal por quimioterapia y/o terapia de radiación, cáncer de huesos metastásico, mieloma, enfermedad de Paget del hueso y osteoporosis, y fertilidad.
- 40
- 45

Humana: Secuencia de IL-11 madura  
(SEC ID NO:1)

PGPPPGPRV .SPDPRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLAMS  
AGALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLQA RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ PPPDPPAPPL APPSSAWGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Secuencia de IL-11 madura  
(SEC ID NO:2)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLAMS  
AGTLGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGPSLKT LEPELGAALQA RLRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQPIPL GPPASAWGSI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Macaco: Secuencia de IL-11 madura  
(SEC ID NO:3)

PGPPPGSPRA SPDPRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLAMS  
AGALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLQT RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTWGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Figura 1a

Macaco: Secuencia de IL-11 PAIDY

(SEC ID NO:4)

PGPPPGSPRA SPDRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLP  
DIALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLOT RLDRLRLRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTWGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Humana: Muteína de IL-11 PAIDY

(SEC ID NO:5)

PGPPPGPPRV .SPDRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLP  
DIALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLDRLRLRLQ  
LLMSRLALPQ PPPDPPAPPL APPSSAWGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Muteína de IL-11 PAIDY

(SEC ID NO:6)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLP  
DYTLGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLERLLRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQVVIPL GPPASAWGSI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Figura 1b

Humana: Muteína de IL-11 FMQIQ  
(SEC ID NO:7)

PGPPPGPPRV .SPDPRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLFMQ  
IQALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ PPPDPPAPPL APPSSAWGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Muteína de IL-11 FMQIQ  
(SEC ID NO:8)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLFMQ  
IQTLGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLERLLRRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQPIPL GPPASAWGSI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Macaco: Secuencia de IL-11 FMQIQ  
(SEC ID NO:13)

PGPPPGSPRA SPDPRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLFMQ  
IQALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLOT RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTWGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Figura 1c

Humana: Muteína de IL-11 PAIDY y W147A  
(SEC ID NO:9)

PGPPPGPPRV .SPDPRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLP  
DIALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ PPPDPPAPPL APPSSAAGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Muteína de IL-11 PAIDY y W147A  
(SEC ID NO:10)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLP  
DYTLGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLERLLRRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQVPIPL GPPASAAGSI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Macaco: Secuencia de IL-11 PAIDY y W147A  
(SEC ID NO:14)

PGPPPGSPRA SPDPRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLP  
DIALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLOT RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTAGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Figura 1d

Humana: Muteína de IL-11 PAIDY y W147C

(SEC ID NO:11)

PGPPPGPRV .SPDPRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLP  
DIALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLQA RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ PPPDPPAPPL APPSSACGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Muteína de IL-11 PAIDY y W147C

(SEC ID NO:12)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLP  
DYTLGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLQA RLERLLRRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQPIPL GPPASACGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Macaco: Secuencia de IL-11 PAIDY y W147C

(SEC ID NO:15)

PGPPPGSPRA SPDPRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLP  
DIALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLQT RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTCGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Figura 1e

Humana: Muteína de IL-11 FMQIQ y W147A  
(SEC ID NO:16)

PGPPPGPRV .SPDPRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLFMQ  
IQALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLQA RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ PPPDPPAPPL APPSSAAGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Muteína de IL-11 FMQIQ y W147A  
(SEC ID NO:17)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLFMQ  
IQTGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGPSLKT LEPELGALQA RLERLLRRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQPIPL GPPASAAGSI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Macaco: Secuencia de IL-11 FMQIQ y W147A  
(SEC ID NO:18)

PGPPPGSPRA SPDPRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLFMQ  
IQALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLQT RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTAGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Figura 1f

Humana: Muteína de IL-11 FMQIQ y W147C  
(SEC ID NO:19)

PGPPPGPPRV .SPDPRAELDS .TVLLTRSLLA .DTRQLAAQLR .DKFPADGDHN .LDSLPTLFMQ  
IQALGALQLP GVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGTLOA RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ PPDPPAPPL APPSSACGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Murina: Muteína de IL-11 FMQIQ y W147C  
(SEC ID NO:20)

PGPPAGSPRV SSDPRADLDS AVLLTRSLLA DTRQLAAQMR DKFPADGDHS LDSLPTLFMQ  
IOTLGSLQLP GVLTRLRVDL MSYLRHVQWL RRAGGSSLKT LEPELGALQA RLERLLRRLQ  
LLMSRLALPQ AAPDQVVIPL GPPASACGSI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Macaco: Secuencia de IL-11 FMQIQ y W147C  
(SEC ID NO:21)

PGPPPGSPRA SPDPRAELDS TVLLTRSLLE DTRQLTIQLK DKFPADGDHN LDSLPTLFMQ  
IQALGALQLP SVLTRLRADL LSYLRHVQWL RRAMGSSLKT LEPELGTLOT RLDRLLRRLQ  
LLMSRLALPQ LPPDPPAPPL APPSSTCGGI RAAHAILGGL HLTLDWAVRG LLLLKTRL

Humana: Secuencia de IL-11 PAIDY y W147C  
etiquetada N-terminalmente  
(SEC ID NO:22)

MGSHHHHHHG ARQPGPPPGP PRVSPDPRAE LDSTVLLTRS LLADTRQLAA QLRDKFPADG  
DHNLDLPTL PAIDYALGAL QLPGLVTRLR ADLLSYLRHV QWLRRAGGSS LKTLEPELGT  
LQARLDRLLR RLQLLMSRLA LPQPPDPPA PPLAPPSSAC GGIRAAHAIL GGLHLTLDWA  
VRGLLLLKTR L

Figura 1g