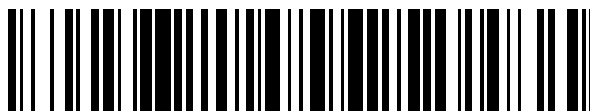


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 844**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2012 PCT/NL2012/050790**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.05.2013 WO13070076**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2012 E 12791293 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2776460**

54 Título: **Proteína de fusión que comprende una interleucina 4 e interleucina 10**

30 Prioridad:

08.11.2011 US 201161556843 P
22.08.2012 US 201261691816 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2018

73 Titular/es:

UMC UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)
Yalelaan 40
3584 CM Utrecht, NL

72 Inventor/es:

VAN ROON, JOEL ADRIANUS GIJSBERT;
HARTGRING, SARITA AIMEE YVONNE;
HACK, CORNELIS ERIK;
LOUWS, CHRISTINA y
LAFEBER, FLORIS PAULUS JACOBUS
GERARDUS

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 683 844 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

Proteína de fusión que comprende una interleucina 4 e interleucina 10

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención está en el campo de la inmunología y la farmacología, particularmente para el tratamiento de osteoartritis, dolor crónico, enfermedades o trastornos inflamatorios, y enfermedades y trastornos relacionados. La descripción se refiere particularmente a una novedosa proteína de fusión que comprende
 10 interleucina 4 (IL4) e interleucina 10 (IL10), opcionalmente físicamente fusionadas juntas por un conector. Particularmente, la presente invención proporciona una proteína de fusión IL4-IL10 dotada de una actividad biológica superior con respecto a una combinación de las citocinas individuales. La presente descripción también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican dicha proteína de fusión IL4-IL10, vectores de expresión que comprenden dichas secuencias de ácidos nucleicos, o células hospedadoras alteradas para alojar la secuencia de
 15 ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión IL4-IL10 y la propia proteína de fusión IL4-IL10. La descripción proporciona además procedimientos de producción de una proteína de fusión IL4-IL10 usando una célula que aloja dichas secuencias de ácidos nucleicos. También se desvelan los organismos no humanos transgénicos que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos de la invención. La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión IL4-IL10. Finalmente, en el presente documento
 20 se enseña el uso de la proteína de fusión IL4-IL10 como un medicamento, en particular para la prevención y/o el tratamiento de osteoartritis y/o afecciones caracterizadas por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria, linfoproliferación y/o dolor crónico.

Antecedentes de la invención

25 **[0002]** Las enfermedades inflamatorias y sus afecciones relacionadas, tales como inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación, se seleccionan del grupo que consiste en septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso
 30 sistémico y artritis reumatoide, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperusión, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos
 35 monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico, y dolor neuropático y/o inflamatorio, están entre las afecciones más debilitantes observadas en la práctica clínica. El proceso de inflamación es fundamental para estas afecciones médicas, donde tanto las citocinas proinflamatorias como las citocinas antiinflamatorias desempeñan funciones importantes como mediadores de los procesos inflamatorios.

40 **[0003]** Las citocinas proinflamatorias promueven la inflamación local y sistémica. Entre los grandes grupos de citocinas proinflamatorias, dos son particularmente importantes, es decir, el factor de necrosis tumoral (TNF α) y la interleucina 1 (IL1 β). Se han dedicado grandes esfuerzos a desarrollar estrategias terapéuticas que tienen como objetivo inhibir TNF α e IL1 β . Específicamente, se ha llevado a cabo la reducción de las actividades biológicas de TNF α e IL1 β por varias estrategias tales como anticuerpos neutralizantes, receptores solubles, antagonistas de
 45 receptores e inhibidores de proteasas que convierten los precursores inactivos en moléculas activas. Por ejemplo, se han probado en ensayos clínicos los inhibidores de TNF α , tales como Infliximab® (anticuerpo anti-TNF α), Humira® (anticuerpo anti-TNF α completamente humano), Enbrel® (proteína de fusión receptor de TNF-Fc) y Anakinra (Kineret®; antagonista de receptor de interleucina-1, IL1ra). Aunque el bloqueo de TNF α y/o IL1 β tiene éxito en muchos pacientes que padecen artritis reumatoide y enfermedades inflamatorias del intestino, no todos los pacientes
 50 responden bien a dicho tipo de intervenciones terapéuticas. Por tanto, existe todavía una gran necesidad de estrategias terapéuticas alternativas y eficaces para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, dolor crónico y afecciones relacionadas.

[0004] La osteoartritis (OA) es el trastorno de las articulaciones más común, y existe evidencia de que la
 55 mayoría de los individuos por encima de la edad de 65 tienen evidencia radiográfica y/o clínica de OA. Los sitios más frecuentemente afectados son las manos, rodillas, caderas y la columna vertebral. Es importante destacar que los síntomas frecuentemente están asociados con alteración funcional significativa, así como signos y síntomas de inflamación, que incluyen dolor, rigidez y pérdida de movilidad. Los cambios estructurales característicos en OA incluyen pérdida progresiva de cartílago articular, elevado espesor de placas subcondrales, formación de nuevo

hueso en los márgenes de la articulación (osteofitos) y desarrollo de quistes de hueso subcondral. Además, en la zona de unión del cartílago hialino articular y el hueso subcondral adyacente, en la región de la denominada línea de calcificación, existe un remanente de cartílago calcificado. A medida que avanza la OA, existe evidencia de invasión vascular y avance de esta zona de cartílago calcificado en el cartílago articular que contribuye además a una

5 disminución en el espesor del cartílago articular. Estas alteraciones estructurales en el cartílago articular y el hueso periarticular pueden conducir a la modificación de los contornos de las superficies adyacentes de articulación. Estos cambios, así como las alteraciones que acompañan en la remodelación de hueso subcondral y módulo, pueden contribuir además al desarrollo de un entorno biomecánico adverso y potenciar la progresión del deterioro de cartílago articular. Se ha mostrado que múltiples factores afectan la progresión de OA, que incluyen la presencia de

10 enfermedad poliarticular, aumento de la edad, deposición asociada de cristal intrarticular, obesidad, inestabilidad de las articulaciones y/o alineamiento erróneo, debilidad muscular y neuropatía periférica. Estos factores se pueden segregar en categorías que incluyen contribuciones hereditarias, factores mecánicos, y los efectos del envejecimiento. Solo se proponen intervenciones terapéuticas muy limitadas para el tratamiento de OA, y las pocas intervenciones terapéuticas disponibles tiene como objetivo el tratamiento del dolor en vez del tratamiento de las

15 alteraciones funcionales. La combinación de IL4 e IL10 protege contra el daño al cartílago inducido por la sangre (van Meegeren et al. Osteoarthritis and Cartilage, vol. 18, octubre de 2010, páginas S102-S103, resumen 219). Por tanto, existe una necesidad de proporcionar una única molécula para la que sea factible el desarrollo clínico y que se pueda usar para la prevención o el tratamiento de OA, así como dolor crónico, y para la prevención o el tratamiento de una afección caracterizada por una inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación. Esto

20 permitiría el desarrollo clínico de una única molécula para múltiples enfermedades o trastornos con etiología muy diferente.

Resumen de la invención

25 **[0005]** En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende una interleucina 4 (IL4) e interleucina 10 (IL10) para su uso en la prevención o el tratamiento de osteoartritis; dolor crónico; o una afección caracterizada por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación seleccionada del grupo que consiste en: septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades

30 autoinmunitarias, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperfusion, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales

35 terapéuticos, síndrome de dolor crónico y dolor neuropático y/o inflamatorio.

[0006] En una realización, dicha IL4 y dicha IL10 se unen por un conector.

40 **[0007]** En una realización, la IL4 se fusiona en el extremo N de la IL10.

[0008] En una realización, la IL10 se fusiona en el extremo N de la IL4.

[0009] En una realización, dicha proteína de fusión comprende además una o más modificaciones químicas. Dichas modificaciones químicas se pueden seleccionar del grupo que consiste en glucosilación, fucosilación,

45 sialilación y pegilación.

[0010] En una realización, dicha IL10 es IL10 humana.

50 **[0011]** En una realización dicha IL4 es IL4 humana.

[0012] En un segundo aspecto, la presente descripción se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión enseñada en el presente documento.

55 **[0013]** En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico enseñada en el presente documento.

[0014] En un aspecto, la presente descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico enseñada en el presente documento o el vector enseñado en el presente documento.

[0015] En un aspecto, la presente descripción proporciona un procedimiento de producción de una proteína de fusión como se enseña en el presente documento, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: cultivar una célula hospedadora como se enseña en el presente documento en condiciones que permiten la producción de la proteína de fusión como se enseña en el presente documento; y opcionalmente, recuperar la proteína de fusión.

5

[0016] Incluso en otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión como se enseña en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **[0017]** La descripción también se refiere a una proteína de fusión como se enseña en el presente documento para su uso como un medicamento, tal como para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección caracterizada por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria, linfoproliferación y/o dolor seleccionado del grupo que consiste en: septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, osteoartritis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades
15 autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperfusión, periférico neuropatía,
20 toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico, y dolor neuropático y/o inflamatorio.

[0018] En un aspecto, la descripción se refiere a una proteína de fusión como se enseña en el presente documento para su uso en la prevención o el tratamiento de un estado clínico en un mamífero, tal como un ser
25 humano, para el que se indica IL10.

[0019] La descripción también se refiere a una proteína de fusión como se enseña en el presente documento para su uso en la prevención o el tratamiento de un estado clínico en un mamífero, tal como un ser humano, para el que se indica IL4.

30

[0020] Finalmente, la descripción enseña un vector como se enseña en el presente documento para su uso en la prevención o el tratamiento de una afección caracterizada por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria, linfoproliferación y/o dolor crónico, afección que se puede seleccionar del grupo que consiste en: septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino,
35 sarcoidosis, alergias, psoriasis, osteoartritis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus,
40 diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperfusión, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico, y dolor neuropático y/o inflamatorio.

Descripción detallada de la invención

45

DEFINICIONES GENERALES

[0021] El término "molécula de ácido nucleico" (o "secuencia de ácidos nucleicos", "polinucleótido" o "secuencia de nucleótidos") se refiere a una molécula de ADN o ARN en forma mono o bicatenaria, particularmente
50 un ADN que codifica una proteína según la invención. Una "secuencia de ácidos nucleicos aislada" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que ya no está en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos en una célula hospedadora bacteriana o en el genoma nuclear o de plástido de la planta.

[0022] Los términos "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente y se refieren a moléculas que consisten en una cadena de aminoácidos, sin referencia a un modo específico de acción, tamaño, estructura tridimensional u origen. Una "proteína aislada" se usa para referirse a una proteína que ya no está en su entorno natural, por ejemplo
55 *in vitro* o en una célula hospedadora recombinante bacteriana o de planta.

[0023] El término "proteína de fusión" se refiere a una proteína o polipéptido que tiene una secuencia de

aminoácidos derivada de dos o más proteínas. La proteína de fusión también puede incluir regiones de unión o un conector de aminoácidos entre porciones de aminoácidos derivadas de proteínas separadas.

5 **[0024]** El término "proteína de fusión IL4-IL10" se refiere a un polipéptido de fusión que comprende al menos IL4 e IL10, opcionalmente acopladas entre sí mediante un conector. La proteína de fusión puede comprender secuencias de polipéptidos adicionales, por ejemplo, una secuencia señal, una marca de histidina, un fragmento Fc de anticuerpo, y similares.

10 **[0025]** Como se usa en el presente documento, un "conector" significa un polipéptido usado para acoplar dos proteínas o polipéptidos, en este caso IL4 e IL10. El conector normalmente es una extensión de aminoácidos, por ejemplo, predominantemente glicina y/o serina. En una realización, el conector es una extensión de aminoácidos que tiene una longitud de hasta 100 nucleótidos, tal como desde aproximadamente 2, 5, 7, 10, 15 aminoácidos hasta aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 50, 75 o 100 aminoácidos, que comprende preferentemente predominantemente restos de serina y glicina.

15 **[0026]** Como se usa en el presente documento, "interleucina 10" (IL10) se refiere a cualquier IL10 de mamífero, tal como IL10 humana, IL10 de ratón.

Como se usa en el presente documento, "interleucina 4" (IL4) se refiere a cualquier IL4 de mamífero, tal como IL4 humana, IL4 de ratón.

20 Como se usa en el presente documento, el término "dimérico" se refiere a una molécula en la que dos polipéptidos se asocian establemente mediante interacciones covalentes o no covalentes. El término "homodimérico" se refiere a una molécula en la que dos polipéptidos idénticos se asocian establemente mediante interacciones covalentes o no covalentes. En una realización adecuada, se asocian establemente mediante interacciones no covalentes.

25 **[0027]** "Funcional", en relación con las proteínas de fusión de la presente invención, se refiere a la capacidad de mostrar tanto funcionalidad de IL4 como de IL10. Un ensayo funcional para IL4 e IL10 es la liberación de citocinas inducida por lipopolisacárido (LPS) (por ejemplo, IL1, IL6, IL8, TNF α) en sangre completa.

30 **[0028]** El término "gen" significa una secuencia de ADN que comprende una región (región transcrita), que se transcribe en una molécula de ARN (por ejemplo, un ARNm) en una célula, operativamente unida a regiones reguladoras adecuadas (por ejemplo, un promotor). Un gen puede así comprender varias secuencias operativamente unidas, tales como un promotor, una secuencia conductora de 5' que comprende, por ejemplo, secuencias implicadas en la iniciación de la traducción, una región codificante (de proteína) (ADNc o ADN genómico), intrones y una secuencia no traducida de 3' que comprende, por ejemplo, sitios de terminación de la transcripción.

35 **[0029]** Una "3' UTR" o "secuencia no traducida de 3'" (también denominada frecuentemente región no traducida de 3', o extremo 3') se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos encontrada en la dirección 3' de la secuencia codificante de un gen, que comprende, por ejemplo, un sitio de terminación de la transcripción y (en la mayoría, pero no todos los ARNm eucariotas) una señal de poliadenilación (tal como, por ejemplo, AAUAAA o variantes del mismo). Después de la terminación de la transcripción, el transcrito de ARNm se puede escindir en la dirección 3' de la señal de poliadenilación y se puede añadir una cola de poli(A), que participa en el transporte del ARNm al citoplasma (donde tiene lugar la traducción).

45 **[0030]** "Expresión de un gen" se refiere al proceso en el que una región de ADN, que está operativamente unida a regiones reguladoras apropiadas, particularmente un promotor, se transcribe en un ARN, que es biológicamente activo, es decir, que es capaz de ser traducido en una proteína o péptido biológicamente activo (o fragmento activo de péptido). "Expresión de un polipéptido" se refiere además a un proceso en el que un ARNm se traduce en un producto de proteína, que se puede o no se puede secretar.

50 **[0031]** Una "secuencia reguladora de la transcripción" se define en el presente documento como una secuencia de ácidos nucleicos que puede regular la tasa de transcripción de una secuencia (codificante) operativamente unida a la secuencia reguladora de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción como se define en el presente documento comprenderá así todos los elementos de secuencia necesarios para el inicio de la transcripción (elementos promotores), para mantener y para regular la transcripción, que incluye por ejemplo atenuadores o potenciadores. Aunque se refiere principalmente a las secuencias reguladoras de la transcripción aguas arriba (5') de una secuencia codificante, también están englobadas por esta definición las secuencias reguladoras encontradas aguas abajo (3') de una secuencia codificante.

[0032] Como se usa en el presente documento, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona controlando la transcripción de uno o más genes, localizados aguas arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de la transcripción del gen, y se identifica estructuralmente por la presencia de un sitio de unión para ARN polimerasa dependiente de ADN, sitios de iniciación de la transcripción y cualesquiera otras secuencias de ADN, que incluyen, pero no se limitan a, sitios de unión al factor de transcripción, sitios de unión a proteínas represoras y activadoras, y cualesquiera otras secuencias de nucleótidos conocidas para un experto en la técnica por actuar directamente o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de los tejidos en la mayoría de las condiciones fisiológicas y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que se regula fisiológicamente (por ejemplo por aplicación externa de ciertos compuestos) o por el desarrollo. Un promotor "específica de tejido" es solo activo en tipos específicos de tejidos o células.

[0033] Como se usa en el presente documento, el término "operativamente unido" se refiere a un enlace de elementos de polinucleótido en una relación funcional. Un ácido nucleico "se une operativamente" cuando se pone en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un promotor, o más bien una secuencia reguladora de la transcripción, se une operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia codificante. Operativamente unido significa que las secuencias de ADN que se unen normalmente son contiguas.

[0034] Una "construcción de ácidos nucleicos" o "vector" se entiende en el presente documento que significa una molécula de ácido nucleico hecha por el hombre resultante del uso de tecnología de ADN recombinante y que se usa para administrar ADN exógeno en una célula hospedadora. Los vectores normalmente comprenden elementos genéticos adicionales para facilitar su uso en la clonación molecular, tal como, por ejemplo, marcadores de selección, sitios de clonación múltiple y similares (véase más adelante).

[0035] Se pueden usar "condiciones de hibridación rigurosas" para identificar secuencias de nucleótidos, que son sustancialmente idéntica a una secuencia de nucleótidos dada. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para las secuencias específicas a una fuerza iónica definida y pH. La T_m es la temperatura (bajo fuerza iónica definida y pH) a la que el 50 % de las secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente compatible. Normalmente, se elegirán condiciones rigurosas en las que la concentración de sales es aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y la temperatura es al menos 60 °C. El reducir la concentración de sales y/o aumentar la temperatura aumenta la rigurosidad. Condiciones rigurosas para hibridaciones de ARN-ADN (transferencias Northern usando una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, las que incluyen al menos un lavado en 0,2X SSC a 63 °C durante 20 min, o condiciones equivalentes. Condiciones rigurosas para la hibridación de ADN-ADN (transferencias Southern usando una sonda de, por ejemplo, 100 nt) son, por ejemplo, las que incluyen al menos un lavado (normalmente 2) en 0,2X SSC a una temperatura de al menos 50 °C, normalmente aproximadamente 55 °C, durante 20 min, o condiciones equivalentes. Véase también Sambrook *et al.* (1989) y Sambrook y Russell (2001).

[0036] Se pueden determinar la "identidad de secuencias" y la "similitud de secuencias" por alineamiento de dos secuencias de péptidos o dos de nucleótidos usando algoritmos de alineamiento global o local. Entonces, las secuencias se pueden denominar "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando (cuando se alinean óptimamente por, por ejemplo, los programas GAP o BESTFIT usando parámetros por defecto) comparten al menos un cierto porcentaje mínimo de identidad de secuencias (como se define más adelante). GAP usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias a lo largo de su longitud entera, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de huecos. Generalmente, se usan parámetros de GAP por defecto, con una penalización por creación de hueco = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y penalización por extensión de hueco = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para nucleótidos, la matriz de puntuación por defecto usada es nwsgapdna y para proteínas la matriz de puntuación por defecto es Blosum62 (Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89, 915-919). Los alineamientos y puntuaciones de secuencias para el porcentaje identidad de secuencias se pueden determinar usando programas informáticos, tales como GCG Wisconsin Package, Versión 10.3, disponible de Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, CA 92121-3752, EE.UU., o EmbossWin versión 2.10.0 (usando el programa "needle"). Alternativamente, se pueden determinar el porcentaje de similitud o identidad buscando por comparación con bases de datos, usando algoritmos tales como FASTA, BLAST, etc. Preferentemente, la identidad de secuencia se refiere a la identidad de secuencia a lo largo de la longitud entera de la secuencia.

[0037] Una "célula hospedadora" o una "célula hospedadora recombinante" o "célula transformada" son

términos con referencia a una nueva célula individual que surge como resultado de al menos una molécula de ácido nucleico, especialmente que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína deseada. La célula hospedadora es preferentemente una célula de planta o una célula bacteriana. La célula hospedadora puede contener la molécula de ácido nucleico o vector de la presente invención como una molécula
5 extracromosómicamente replicante (episomal), o más preferentemente, comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la presente invención integrado en el genoma de la célula hospedadora.

[0038] El término "marcador de selección" es un término familiar para un experto habitual en la técnica y se usa en el presente documento para describir cualquier entidad genérica que, cuando se expresa, se puede usar para
10 seleccionar una célula o células que contienen el marcador de selección. Los productos de gen marcador de selección confieren, por ejemplo, resistencia a antibióticos o requisitos nutricionales.

[0039] El término "semivida biológica" se refiere al tiempo requerido para que la cantidad de una sustancia, por ejemplo, proteína, en un sistema biológico, por ejemplo, la circulación dentro del animal o cuerpo humano se
15 reduzca a la mitad de su valor por procesos biológicos tales como eliminación renal y degradación.

[0040] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitante para significar que los artículos que siguen a la palabra están incluidos, pero no se excluyen los artículos no específicamente mencionados. También engloba el verbo más limitante "consistir en". Además, la
20 referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa así normalmente "al menos uno". Se entiende además que, cuando en el presente documento se refiere a "secuencias", generalmente se refiere a las moléculas físicas reales con una cierta secuencia de subunidades (por ejemplo aminoácidos).

25 Proteínas, secuencias de ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras de la invención

[0041] Los presentes inventores han ideado ahora una novedosa "terapia de molécula única". Específicamente, los inventores desvelan una proteína de fusión que comprende una proteína IL4 y una proteína
30 IL10, opcionalmente físicamente fusionadas juntas mediante un conector. Particularmente, se encontró que la proteína de fusión de la presente invención tenía una actividad biológica superior (por ejemplo, inhibe TNF α e IL1 β) con respecto a sus homólogos individuales, es decir, IL4 e IL10 por separado. Específicamente, se encontró que la proteína de fusión de la presente invención era significativamente mayor (~ 35 kD) que las citocinas individuales (ambas < 20 kD). Los presentes inventores también encontraron inesperadamente que la propia proteína de fusión
35 formaba dímeros (mediante la porción de IL10 de la proteína de fusión), proporcionando así una proteína de fusión con un peso molecular incluso mayor (~ 70 kD). Dicho aumento en el peso molecular, y por consiguiente el radio molecular, no solo prolonga significativamente la semivida biológica de la proteína de fusión IL4-IL10 en la circulación en comparación con las citocinas individuales, sino que también aumenta su biodisponibilidad en el sitio de inflamación a un nivel sin precedentes. La proteína de fusión de la presente invención también alarga
40 enormemente la ventana terapéutica de tiempo para que ocurran los efectos sinérgicos entre IL4 e IL10, puesto que la proteína de fusión administra ambas citocinas en el sitio de inflamación, donde ambas pueden ejercer sus acciones durante una cantidad igual de tiempo la una en presencia de la otra. Además, se encontró inesperadamente que la proteína de fusión de la presente invención también ejerce una acción terapéutica doble. Específicamente, se mostró que la proteína de fusión IL4-IL10 actuaba de agente antiinflamatorio cuando se
45 administraba sistemáticamente, mientras que actuaba de agente antihiperalgésico cuando se administraba por vía intratecal.

[0042] En una realización de la descripción, se proporcionan secuencias de ácidos nucleicos y secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión IL4-IL10. Las proteínas de fusión IL4-IL10, así como en funcional fragmentos
50 y variantes de las mismas, muestran actividad de IL4 así como actividad de IL10.

[0043] En un aspecto, se desvela una proteína de fusión que comprende IL4 e IL10. La proteína de fusión comprende una proteína IL4. La proteína IL4 es preferentemente una proteína IL4 de mamífero, tal como una IL4 humana, o IL4 de ratón. Una secuencia de aminoácidos de IL4 se expone en SEQ ID NO: 1. Variantes de IL4
55 incluyen, por ejemplo, proteínas que tienen al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, tal como el 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos a SEQ ID NO: 1, preferentemente a lo largo de la longitud entera. La identidad de secuencias de aminoácidos se determina preferentemente por alineamiento de pares usando el algoritmo de Needleman y Wunsch y parámetros de GAP por defecto como se ha definido anteriormente. Las variantes también incluyen proteínas que tienen actividad de IL4, que han derivado, a

modo de una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones, del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Preferentemente, dichas proteínas comprenden desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más hasta aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

5

[0044] La proteína de fusión comprende además una proteína IL10. La proteína IL10 es preferentemente una proteína IL10 de mamífero, tal como una IL10 humana, o IL10 de ratón. Una secuencia de aminoácidos que representa IL10 se expone en SEQ ID NO: 2. Variantes de IL10 incluyen, por ejemplo, proteínas que tienen al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, tal como el 100 %, de identidad de secuencias de aminoácidos a SEQ ID NO: 2, preferentemente a lo largo de la longitud entera. La identidad de secuencias de aminoácidos se determina preferentemente por alineamiento de pares usando el algoritmo de Needleman y Wunsch y los parámetros de GAP por defecto como se ha definido anteriormente. Las variantes también incluyen proteínas que tienen actividad de IL10, que han derivado, a modo de una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones, del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Preferentemente, dichas proteínas comprenden desde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más hasta aproximadamente 100, 90, 80, 70, 60, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos.

[0045] La IL4 e IL10 en la proteína de fusión se pueden o no se pueden conectar por un conector. Secuencias de aminoácidos adicionales pueden estar presentes en el extremo N y/o C de la proteína de fusión de la presente invención, por ejemplo, para facilitar la purificación. Por ejemplo, puede estar presente una marca de histidina en el extremo C o N para facilitar la purificación. Alternativamente, la proteína de fusión IL4-IL10 de la invención puede comprender opcionalmente restos de proteína adicionales, tales como restos capaces de dirigirse, por ejemplo, a un resto de proteína que comprende uno o más regiones Fc de anticuerpo.

25

[0046] La IL4 se puede localizar en el extremo N de la IL10, o se puede localizar en el extremo C de la IL10. En una realización preferida, la molécula IL4 se localiza en el extremo N de la molécula IL10. Se encontró que la última proteína de fusión presentó mayor actividad específica en comparación con una proteína de fusión IL4-IL10 en la que la IL4 molécula se localizó en el extremo C de la molécula IL10 (datos no mostrados).

30

[0047] La proteína de fusión IL4-IL10 puede estar presente en su forma monomérica, en cuyo caso tiene kDa de aproximadamente 35 kDa, o puede ser una proteína de fusión IL4-IL10 dimérica, es decir, se pueden asociar dos proteínas de fusión IL4-IL10 entre sí no covalentemente, en cuyo caso tiene kDa de aproximadamente 70 kDa.

[0048] En una realización, la proteína de fusión de la descripción consiste esencialmente en IL4 e IL10, opcionalmente unidas por un conector.

[0049] En una realización, tanto los restos de IL4 como de IL10 dentro de la proteína de fusión de la presente descripción son activos y capaces de señalar células para regular por disminución la producción de al menos un citocina inflamatoria o mediador tal como IL1 β , IL6, IL8, TNF α . Preferentemente, al menos TNF α , IL6 e IL8 se regulan por disminución.

40

[0050] En una realización, la proteína de fusión inhibe la generación de citocinas tales como TNF α , IL1 β , IL6, IL8 y otras citocinas inflamatorias mientras que inducen la secreción de moléculas inhibitoras tales como el antagonista de receptor de IL1 y receptores de TNF solubles por células inflamatorias y otras células estimuladas por endotoxina, otros agonistas de receptor del tipo toll (TLR), u otros estímulos. En una realización, la proteína de fusión de la presente descripción inhibe la expresión de moléculas de adhesión por células inflamatorias, endoteliales y otras estimuladas por agonistas que incluyen endotoxina, otros agonistas de TLR, y otros.

45

[0051] En una realización, la proteína de fusión inhibe la expresión de factor tisular por células endoteliales, inflamatorias y otras estimuladas por endotoxina, otros agonistas de TLR, u otros estímulos.

50

[0052] En una realización, la proteína de fusión de la presente invención inhibe la generación de radicales de oxígeno por células inflamatorias y otras estimuladas por endotoxina, otros agonistas de TLR, u otros estímulos.

55

[0053] En una realización, la proteína de fusión inhibe la actividad de células Th1 y Th17 secretoras de IFN γ e IL17 e inducen o sostienen los linfocitos T supresores que expresan FoxP3 (CD25+), células Th2, Tr1 y Th3 secretoras de TGF β generadas *in vitro* en presencia o ausencia de células presentadoras de antígenos estimuladas por antígenos propios y no propios, superantígenos que incluyen enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) o

mitógenos tales que incluye CD3, CD28, fitohemaglutinina (PHA) o miristato-acetato de forbol (PMA).

[0054] En una realización, las proteínas de fusión inhiben la expresión de receptores de Fc γ activantes, mientras que inducen la expresión de receptores de Fc γ inhibidores que previenen la activación de células tales como monocitos, macrófagos y células dendríticas por complejos inmunitarios que contienen IgG.

5

[0055] En una realización adecuada, la proteína de fusión de la presente invención está presente en una forma homodimérica.

[0056] En una realización, tiene un peso molecular superior a 60 kDa.

10

[0057] La proteína de fusión de la presente invención se puede preparar por técnicas que son rutinarias para el experto. Por ejemplo, se puede preparar usando una técnica que proporciona la producción de proteínas de fusión recombinantes por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden producir en un transfectoma de células hospedadoras usando una combinación de técnicas de ADN recombinante y procedimientos de transfección de genes.

15

[0058] Por ejemplo, para expresar las proteínas de fusión de la presente invención, una molécula de ácido nucleico que codifica las proteínas de fusión de la presente invención se puede preparar por técnicas de biología molecular estándares. La molécula de ácido nucleico de la invención se une preferentemente operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción tales como un promotor, y opcionalmente una región no traducida de 3'. La molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede insertar en un vector, tal como un vector de expresión, de forma que los genes se unen operativamente a secuencias de control transcripcionales y traduccionales. El vector de expresión y las secuencias reguladoras de la transcripción se seleccionan para ser compatibles con la célula hospedadora de expresión usada. La molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de la presente invención se puede insertar en el vector de expresión por procedimientos rutinarios. La molécula de ácido nucleico o vector de la presente invención puede incluir además una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal, que puede facilitar la secreción de la proteína de fusión de la célula hospedadora. Dicha secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal se puede unir operativamente a la molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferentemente, dicho péptido señal se localiza en el extremo amino de la proteína de fusión de la presente invención, y como tal, la secuencia de nucleótidos que codifica dicho péptido señal se puede localizar 5' de la molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención. El péptido señal puede ser un péptido señal de citocina o un péptido señal de una proteína distinta de citocina. El promotor puede ser constitutivo o inducible. El vector puede comprender un marcador de selección para la selección de una célula hospedadora portadora de vector. El vector puede comprender un origen de replicación cuando el vector es un vector replicable.

20

25

30

35

[0059] La proteína de fusión según la invención se puede sintetizar *de novo* por síntesis química (usando, por ejemplo, un sintetizador de péptidos tal como se suministra por Applied Biosystems) o se puede producir por células hospedadoras recombinantes expresando la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de fusión, fragmento o variante. Variantes y fragmentos son preferentemente funcionales, es decir, tienen actividad de IL4 y/o IL10, preferentemente actividad de IL4 e IL10.

40

[0060] Se puede determinar la actividad antiinflamatoria y así la funcionalidad de IL4 e IL10, así como de la proteína de fusión IL4-IL10, usando procedimientos rutinarios. Por ejemplo, un ensayo adecuado para la funcionalidad de IL4 e IL10, así como la proteína de fusión IL4-IL10, es la liberación de citocina inducida por lipopolisacárido (LPS) (IL1 β , IL6, IL8, TNF α) en sangre completa, por ejemplo, como se expone en el Ejemplo 6.

45

[0061] En otro aspecto, se desvelan secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican cualesquiera de las proteínas de fusión anteriores, tales como las secuencias de ADNc, ADN genómico y ARN. Debido a la degeneración del código genético, diversas secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar la misma secuencia de aminoácidos. Cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas de fusión de la descripción se denominan en el presente documento "proteína de fusión IL4-IL10 que codifica secuencias de ácidos nucleicos". Las secuencias de ácidos nucleicos desveladas incluyen secuencias de ácidos nucleicos recombinantes, artificiales o sintéticas. Se entiende que cuando las secuencias se representan como secuencias de ADN aunque se refieren a ARN, la secuencia de bases real de la molécula de ARN es idéntica con la diferencia de que la timina (T) se sustituye por uracilo (U). Las secuencias de ácidos nucleicos de la descripción son particularmente útiles para la expresión de la proteína de fusión IL4-IL10 de la descripción, para cualquier la producción de estas proteínas o para fines de terapia génica.

50

55

[0062] La secuencia de ácidos nucleicos, particularmente la secuencia de ADN, que codifica la proteína de fusión IL4-IL10 de la descripción se puede insertar en vectores de expresión de producción de (altas cantidades de) proteína de fusión IL4-IL10. Vectores adecuados incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos lineales, plásmidos, fagémidos, cósmidos, vectores de ARN, vectores virales y similares. Ejemplos no limitantes de un vector viral incluyen un retrovirus, un adenovirus y un virus adeno-asociado. Secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células hospedadoras de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamífero, tal como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus 40 simio (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal del adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Alternativamente, se pueden usar secuencias reguladoras no virales, tal como el promotor de ubiquitina. Además de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión IL4-IL10 y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la descripción pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores de selección. El gen marcador de selección facilita la selección de células hospedadoras en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.399.216, US 4.634.665 y US 5.179.017, todos por Axel et al.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la que se ha introducido el vector. Genes marcadores de selección preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en células hospedadoras dhfr- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección de G418). Finalmente, el vector de expresión recombinante puede contener un gen que codifica una glucosil transferasa, además de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas de fusión de la presente invención. En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una célula hospedadora que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente descripción, o una construcción de ácidos nucleicos o vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente descripción. La célula hospedadora puede ser cualquier célula hospedadora. La célula hospedadora se puede seleccionar de células procariotas y eucariotas. La célula hospedadora también puede ser una línea celular, tal como una línea celular procariota o eucariota. La célula hospedadora es preferentemente una célula de animal o línea celular, tal como una célula o línea celular de mamífero. En una realización, las proteínas de fusión de la presente descripción se expresan en células eucariotas, tales como células hospedadoras de mamífero. Las células hospedadoras de mamífero preferidas para expresar la proteína de fusión IL4-IL10 recombinante de la invención incluyen células CHO (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en (Urlaub et al., 1980), usadas con un marcador de selección de DHFR, células de mieloma NS/O, células COS, células HEK293 y células SP2.0. Cuando los vectores de expresión recombinantes que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión IL4-IL10 se introducen en células hospedadoras de mamífero, las proteínas de fusión de la presente descripción se pueden producir cultivando las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión de las proteínas de fusión en las células hospedadoras o, más preferentemente, la secreción de las proteínas de fusión en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras. Las proteínas de fusión de la presente descripción se pueden recuperar del medio de cultivo en el que se cultivan las células hospedadoras y/o se pueden purificar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas convencionales. Alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión de la descripción se pueden expresar en otros sistemas de expresión, que incluyen células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo *E. coli*, algas, así como células de insecto. Además, las proteínas de fusión de la presente descripción se pueden producir en animales no humanos transgénicos, tales como en leche de ovejas y conejos o huevos de gallinas, o en plantas transgénicas.

[0063] La introducción de la secuencia de ácidos nucleicos de la presente descripción en una célula hospedadora se puede llevar a cabo por cualquier técnica estándar conocida en la técnica. Para la expresión de las proteínas de fusión de la presente descripción, el (los) vector(es) de expresión que codifica(n) la proteína de fusión se puede(n) transfectar en una célula hospedadora por técnicas convencionales. Las diversas formas del término "transfección" pretenden englobar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, transfección con Lipofectamine y transfección por procedimiento de liofilización, y similares. Las líneas celulares que secretan las proteínas de fusión de la presente invención se pueden identificar ensayando sobrenadantes de cultivo para la presencia de la proteína de fusión. El procedimiento de cribado preferido comprende dos etapas secuenciales, siendo la primera la identificación de líneas celulares que secretan la proteína de fusión, siendo la segunda la determinación de la calidad de la proteína de fusión tal como la capacidad de la proteína de fusión para inhibir la producción de citocinas por glóbulos sanguíneos estimulados con LPS u otros agonistas de receptor del tipo toll, patrones de glucosilación, y otros.

[0064] Para la expresión óptima en una célula hospedadora, la proteína de fusión IL4-IL10 que codifica las secuencias de ADN se pueden optimizar en codones adaptando el uso de codones al más preferido en genes de

células hospedadoras. Se pueden encontrar en la bibliografía de patentes y científica varias técnicas para modificar el uso de codones al preferido por las células hospedadoras. El procedimiento exacto de modificación del uso de codones no es crítico para la presente invención.

5 **[0065]** En otra realización de la descripción, se proporcionan cebadores de PCR y/o sondas y kits para detectar la proteína de fusión IL4-IL10 que codifica secuencias de ADN o ARN. Se pueden sintetizar pares de cebadores de PCR degenerados o específicos para amplificar la proteína de fusión IL4-IL10 que codifica ADN de muestras (véase Dieffenbach y Dveksler (1995) PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, y McPherson et al. (2000) PCR-Basics: From Background to Bench, Primera Edición, Springer Verlag, 10 Alemania). Por ejemplo, se puede usar como cebador o sonda cualquier extensión de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18 o más nucleótidos contiguos de una proteína de fusión IL4-IL10 que codifica las secuencia de ácidos nucleicos (o la hebra complementaria). Asimismo, se pueden usar como sondas de hibridación los fragmentos de ADN de una proteína de fusión IL4-IL10 que codifica la secuencia de ácidos nucleicos. Un kit de detección para una proteína de fusión IL4-IL10 que codifica la secuencia de ácidos nucleicos puede comprender cebadores específicos para una 15 proteína de fusión IL4-IL10 que codifica la secuencia de ácidos nucleicos y/o sondas específicas para una proteína de fusión IL4-IL10 que codifica las secuencias de ácidos nucleicos, y un protocolo asociado para usar los cebadores o sondas para detectar específicamente la proteína de fusión IL4-IL10 que codifica la secuencia de ácidos nucleicos en una muestra. Dicho kit de detección se puede usar, por ejemplo, para determinar si una célula hospedadora ha sido transformada con una proteína de fusión IL4-IL10 específica que codifica la secuencia de ácidos nucleicos de la 20 descripción. Debido a la degeneración del código genético, se pueden sustituir algunos codones de aminoácido por otros sin cambiar la secuencia de aminoácidos de la proteína.

[0066] En un aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de producción de una proteína de fusión IL4-IL10, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de: cultivar una célula hospedadora de la 25 presente invención en condiciones que permiten la producción de la proteína de fusión IL4-IL10; y opcionalmente, recuperar la proteína de fusión. El experto podrá seleccionar habitualmente condiciones que permitan la producción de las proteínas de fusión IL4-IL10 de la presente invención. Además, un experto en la materia podrá recuperar la proteína de fusión producida usando procedimientos habituales, que incluyen, sin limitación, procedimientos cromatográficos (que incluyen, sin limitación, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción 30 hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, unión a metales, y similares), inmunoprecipitación, HPLC, ultracentrifugación, precipitación y solubilización diferencial, y extracción. Como se ha dicho anteriormente, la recuperación o purificación de las proteínas de fusión de la presente invención se pueden facilitar añadiendo, por ejemplo, una marca de histidina a la proteína de fusión.

35 **Composición farmacéutica**

[0067] En un aspecto, la descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 **[0068]** Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualesquiera otros adyuvantes y excipientes conocidos según técnicas convencionales (por ejemplo, como se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995).

45 **[0069]** El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a vehículos o excipientes, que son inherentemente no tóxicos y no terapéuticos. Ejemplos de dichos excipientes son, pero no se limitan a, solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa y disolución de Hank. También se pueden usar excipientes no acuosos tales como aceites no volátiles y oleato de etilo. Un excipiente preferido es 5 % de dextrosa en solución salina. El excipiente puede contener cantidades menores de aditivos tales como sustancias que potencian la 50 isotonicidad y estabilidad química, que incluyen tampones y conservantes.

[0070] La composición farmacéutica se puede administrar por cualquier vía adecuada y modo. Como será apreciado por el experto, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

55 **[0071]** Las composiciones farmacéuticas según la descripción se pueden formular según procedimientos habituales para administración por cualquier vía, tal como oral, tópica, parenteral, sublingual, transdérmica, o por inhalación. Las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pastillas para chupar, cremas o preparaciones líquidas, tales como disoluciones o suspensiones parenterales orales o estériles o en forma de un espray, aerosol u otro procedimiento convencional para inhalación.

[0072] Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral.

5 [0073] En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral.

[0074] Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, 10 intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, e infusión.

[0075] En una realización, la composición farmacéutica se administra por inyección intravenosa o subcutánea o infusión.

15

[0076] En una realización, las proteínas de fusión de la invención se administran en forma cristalina por inyección subcutánea.

[0077] Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes de retraso de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles.

[0078] Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones inyectables estériles o dispersión. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en la composición farmacéutica de la invención. Preferentemente, el vehículo es adecuada para administración parenteral, por ejemplo inyección intravenosa o subcutánea o infusión.

[0079] Las composiciones farmacéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una disolución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, 35 aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, usando materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones, y usando tensioactivos.

[0080] La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede provocar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0081] Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes, por ejemplo, como se enumera anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos, por ejemplo, de los anteriormente enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y secado por congelación (liofilización), que dan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de la misma.

50

[0082] Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, las proteínas de fusión IL4-IL10, se puede recubrir en un material para protegerlo de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así 55 como liposomas convencionales (Strejan et al., 1984).

[0083] Las proteínas de fusión de la presente descripción también se pueden preparar con vehículos que las protegerán de la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden usar polímeros biocompatibles

biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones generalmente son conocidos para aquellos expertos en la materia. Véanse, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

5

[0084] Se pueden ajustar las pautas posológicas para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se pueden administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parentales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la descripción viene impuesta por y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la materia de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

[0085] Se pueden variar los niveles de dosificación reales de las proteínas de fusión IL4-IL10 en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción para obtener una cantidad de la proteína de fusión IL4-IL10 que sea eficaz ("cantidad eficaz") para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de eliminación, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general y antecedentes personales previos del paciente que está tratándose, y factores similares muy conocidos en las ciencias médicas.

[0086] En una realización, las proteínas de fusión IL4-IL10 de la presente descripción se puede administrar como inyección intravenosa o una infusión breve, en otra realización, se administran por infusión continua lenta durante un largo periodo, tal como superior a 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos.

[0087] En otra realización más, las proteínas de fusión IL4-IL10 de la presente descripción se pueden administrar como terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.

Usos terapéuticos

[0088] En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a la proteína de fusión de la presente descripción o una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión para su uso como un medicamento.

[0089] En un aspecto, la presente invención se refiere a la proteína de fusión de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión para su uso en prevenir o tratar osteoartritis. Particularmente, se encontró que la proteína de fusión de la presente invención tiene una actividad protectora de cartílago. Por tanto, la proteína de fusión se puede usar para la prevención y tratamiento de la rotura de cartílago, particularmente en OA. Además, se encontró en un modelo canino de OA que los perros administrados con la proteína de fusión de la presente invención experimentaron significativamente menos dolor en comparación con los perros no administrados con la proteína de fusión de la presente invención. Como tal, la proteína de fusión de la invención puede ser particularmente útil para la prevención o el tratamiento de OA (prevención o tratamiento de degradación de cartílago) con su dolor crónico asociado.

[0090] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una proteína de fusión de la presente invención o a una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión para su uso en la prevención o el tratamiento de OA, dolor crónico, o una afección caracterizada por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación seleccionada del grupo que consiste en: septicemia, síndrome diséico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis

múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperfusión, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico, y dolor neuropático y/o inflamatorio.

[0091] En una realización, dicha afección se caracteriza por dolor y se puede seleccionar de dolor inflamatorio y dolor neuropático.

10 **[0092]** En otro aspecto, la descripción se refiere a una proteína de fusión de la presente invención para su uso en la prevención o el tratamiento de un estado clínico en un mamífero, tal como un ser humano, para el que se indica IL10.

15 **[0093]** En un aspecto adicional, la descripción se refiere a una proteína de fusión de la presente descripción para su uso en la prevención o el tratamiento de un estado clínico en un mamífero, tal como un ser humano, para el que se indica IL4.

20 **[0094]** En una realización de la descripción, el polipéptido de fusión de la invención se usa para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno, en la que es beneficiosa la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios.

25 **[0095]** En otro aspecto más, la descripción se refiere a un procedimiento de prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno, en el que tiene un efecto beneficioso la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios, que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo la proteína de fusión de la presente descripción en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o trastorno.

30 **[0096]** En una realización, dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad inflamatoria mediada por la producción de citocinas proinflamatorias tales como TNF, IL1 β , IL6, quimiocinas tales como IL8, y otros mediadores inflamatorios.

35 **[0097]** Según una realización, las proteínas de fusión enseñadas en el presente documento se pueden usar para inhibir la producción y la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios por células, tales como macrófagos, monocitos, linfocitos T y otras células. Como resultado, las proteínas de fusión de la presente descripción se pueden usar para la preparación de un medicamento para atenuar las reacciones inflamatorias que inhiben la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios por estas células *in vivo*. Las proteínas de fusión de la presente descripción se pueden usar como fármaco independiente o en combinación con otros fármacos.

40 **[0098]** El tratamiento (profiláctico o terapéutico) puede consistir en administrar la proteína de fusión de la presente invención por vía parenteral, preferentemente por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intratecal, por vía epidural, por vía espinal o por vía subcutánea. Sin embargo, también se pueden emplear otras vías de administración como se exponen anteriormente con respecto a las composiciones farmacéuticas que comprenden las proteínas de fusión citadas anteriormente. La dosis y pauta de administración pueden depender del grado de inhibición de la producción y liberación de citocinas inflamatorias que se pretende. Normalmente, la cantidad de la proteína de fusión dada estará en el intervalo de 0,5 μ g a 1 mg por kg de peso corporal. La dosificación se puede determinar o ajustar midiendo la cantidad de citocina circulante (IL10, IL4) tras la administración en una muestra biológica.

50 **[0099]** Para administración parenteral, la proteína de fusión se formula preferentemente en una forma inyectable combinada con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos son muy conocidos en la técnica y ejemplos incluyen solución salina, disolución de dextrosa, disolución de Ringer y disoluciones que contienen pequeñas cantidades de albúmina de suero humano. Normalmente, las proteínas de fusión de la presente invención se pueden formular en dichos vehículos a una concentración desde aproximadamente 50 μ g hasta aproximadamente 100 mg por ml. En una realización de la presente invención, la proteína de fusión se administra por inyección intravenosa.

[0100] Detalles de administración adicionales se exponen anteriormente en la sección que se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden la proteína de fusión de la presente invención.

Terapia génica

[0101] Las construcciones de ácidos nucleicos o vectores de la presente invención se pueden usar como agentes de terapia génica para el tratamiento de las afecciones expuestas anteriormente. En una realización de la invención, se usan virus adeno-asociados como vectores de terapia génica.

[0102] Como tal, un aspecto la invención se refiere a un vector de terapia génica como se ha descrito anteriormente para su uso en la prevención o el tratamiento de OA, dolor crónico, una afección caracterizada por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación en el que dicha afección caracterizada por inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación se selecciona del grupo que consiste en: septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperusión, y toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico, y dolor neuropático y/o inflamatorio.

[0103] La presente invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que exponen realizaciones particularmente ventajosas. Sin embargo, se debe observar que estas realizaciones son ilustrativas y no se deben interpretar de ningún modo como limitantes de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0104]

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de IL4

HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTR
 CLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSK
 CSS

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de IL10

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLKESLLEDFKGYLG
 CQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKLRLRLRCHRFLPCENKSKAVE
 QVKNAFNKLQEKG IYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de aminoácidos del conector

GSGGGGSGT

SEQ ID NO: 4 - Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IL4-IL10 (se subraya la secuencia de conector; IL4 se localiza en el extremo N de IL10)

HKCDITLQEIIKTLNSLTEQKTLCTELTVTDIFAASKNTEKETFCRAATVLRQFYSHHEKDTR
 CLGATAQQFHRHKQLIRFLKRLDRNLWGLAGLNSCPVKEANQSTLENFLERLKTIMREKYSK
 CSSGSGGGGSGTSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNL
 LKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKLRLRLRCH
 RFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKG IYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

Breve descripción de las figuras relacionadas con la invención

[0105]

- La **Figura 1** muestra niveles de la proteína de fusión IL4-IL10 obtenida de células HEK293 transfectadas con la proteína de fusión IL4-IL10. Se probó el sobrenadante de células HEK293, que se transfectaron con un vector de expresión pUPE que lleva el transgén para la proteína de fusión IL4-IL10, en ensayos de ELISA de sándwich para IL4 (A) e IL10 (B), según las instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como densidad óptica (DO) frente a dilución de sobrenadante de cultivo.
- 10 La **Figura 2** muestra la identificación inmunoquímica de la proteína de fusión IL4-IL10 por ELISA cruzado. Se probó el sobrenadante de células HEK293, que se transfectaron con un vector de expresión pUPE que lleva el transgén para la proteína de fusión IL4-IL10, en el ELISA cruzado con anticuerpos monoclonales anti-IL4 (A) o anti-IL10 (usados como anticuerpos de captura) (B), y anticuerpos monoclonales biotinilados anti-IL10 (A) o anti-IL4 (B) (usados como anticuerpos de detección). Se probó IL10 recombinante como control negativo.
- 15 La **Figura 3** muestra la transferencia Western que identifica la proteína de fusión IL4-IL10 en sobrenadante de células HEK293. Se sometió a SDS-PAGE una cantidad de 10 microlitros de sobrenadante obtenido de células HEK293, que se transfectaron con ADNc que codifica la proteína de fusión IL4-IL10. Las transferencias se desarrollaron con anticuerpos anti-IL4 marcados (A) o con anticuerpos anti-IL10 marcados (B). Como control, se usaron IL4 e IL10 recombinante. Carril 1 = marcador molecular, Carril 2 = proteína de fusión IL4-IL10 no tratada, carril 3 = proteína de fusión IL4-IL10 desglucosilada, carril 4 = IL4 y carril 5 = IL10.
- 20 La **Figura 4** muestra los resultados de un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento que identifica la polimerización de la proteína de fusión IL4-IL10. Se desarrollaron muestras de la proteína de fusión IL4-IL10, IL4 recombinante e IL10 recombinante en el sistema de cromatografía líquida de alta resolución. La columna se calibró usando una mezcla de proteínas de tiroglobulina, albúmina de suero bovino (66 KD, primera línea de puntos desde la izquierda), anhidrasa carbónica (30 KD, segunda línea de puntos desde la izquierda), mioglobulina (18 KD, tercera línea de puntos desde la izquierda) y ribonucleasa (13,7 KD, cuarta línea de puntos desde la izquierda). Usando estos marcadores, se estimó el peso molecular de las proteínas en las fracciones por comparación de los tiempos de retención. Se midió con ELISA el contenido de IL4 e IL10 en las fracciones de las diversas series y se expresó como ng por ml. IL4 eluyó como un monómero aparente, IL10 como un dímero aparente, mientras que el patrón de elución de la proteína de fusión IL4-IL10 reveló un dímero aparente.
- 30 La **Figura 5** muestra que la proteína de fusión IL4-IL10 inhibe la liberación de citocinas inducida por LPS en cultivos de sangre completa. Se diluyó 1:10 en medio de cultivo la sangre heparinizada de voluntarios sanos y se incubó con LPS a una concentración de 10 ng/ml en presencia de diversas concentraciones de la proteína de fusión IL4-IL10. Se midió con ELISA TNF α en los sobrenadantes. El panel A muestra la capacidad de la proteína de fusión IL4-IL10 para inhibir la producción de TNF (resultados expresados como % de inhibición). Obsérvese que no se observó inhibición de la producción de TNF cuando se probó un volumen de medio de cultivo similar que carecía de la proteína de fusión IL4-IL10. El panel B muestra la inhibición de la producción de TNF α inducida por LPS (gráfico izquierdo), IL6 (gráfico central) e IL8 (gráfico derecho) (las concentraciones de TNF α , IL6 e IL8 medidas del sobrenadante se dan en el eje Y). Se probó la proteína de fusión IL4-IL10 a 100 ng/ml, y se comparó con el efecto de una mezcla de IL4 e IL10 recombinante a una concentración final de 50 ng/ml de cada una. El panel C muestra que se suprimió completamente el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la producción inducida por LPS de IL6 cuando los anticuerpos bloqueantes de receptor contra el receptor de IL4 (anti-IL4R) y el receptor de IL10 (anti-IL10R) se añadieron ambos con respecto a cuando solo se añadió medio (que carece de anticuerpos). Obsérvese que el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 fue solo parcialmente suprimido cuando se añadió un anticuerpo bloqueante de receptor contra cualquiera del receptor de IL4 (anti-IL4R) o el receptor de IL10 (anti-IL10R), pero no ambos.
- 40 La **Figura 6** muestra que la potente inhibición de la producción de citocinas Th1 y Th17 por la proteína de fusión IL4-IL10 se asocia con los porcentajes de linfocitos T reguladores sostenidos (FoxP3+) en cultivos de células mononucleares activadas por el superantígeno enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB). La activación de células mieloides y linfocitos B es críticamente dependiente del equilibrio de linfocitos T Th1 y Th17 proinflamatorios y reguladores CD4 que expresan FoxP3. Para evaluar los efectos de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la activación de linfocitos T, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 5 donantes sanos. La activación de linfocitos T se indujo por tratamiento de CMSP (5,10 /ml) durante 3 días en presencia o ausencia de SEB (1 ng/ml) y/o la proteína de fusión IL4-IL10. Después de este periodo de cultivo, se midieron la proliferación (panel A), expresión de FoxP3 y producción de citocinas de linfocito T proinflamatorias (panel B). SEB indujo una proliferación
- 50

significativa asociada (panel A) con la regulación por incremento de la expresión de FoxP3 (panel B). Tanto la proliferación (panel A) como la expresión de FoxP3 (panel B) se afectaron fuertemente por la proteína de fusión IL4-IL10. Por el contrario, las citocinas IFN γ Th1 y Th17 (gráfico izquierdo, panel C), IL17 (grafica media, panel C) y TNF α (gráfico derecho, panel C) se redujeron fuertemente por la proteína de fusión IL4-IL10. Juntos, esto demuestra que la proteína de fusión IL4-IL10 altera fuertemente el equilibrio entre linfocitos T CD4 reguladores supresores y células Th1 y Th17 proinflamatorias.

La **Figura 7** muestra la estabilización de la expresión de receptores para IgG sobre monocitos por la proteína de fusión IL4-IL10 en cultivos de células mononucleares activados por enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB). El equilibrio entre receptores activadores e inhibidores para IgG (Fc γ R) desempeña una función clave en la activación mediada por el complejo inmunitario de células mieloides y linfoides. Para evaluar los efectos de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la expresión de Fc γ R en monocitos, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de un donante sano. Se indujo la activación de monocitos dependiente de linfocitos T por tratamiento de CMSP ($5 \cdot 10^5$ /ml) durante 2 días en presencia o ausencia del superantígeno SEB (0,1 ng/ml) y/o proteína de fusión IL4-IL10. Después de este periodo de cultivo, se midió la expresión de Fc γ R. IL10 reguló por incremento la expresión de Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIII. IL4 solo mostró una ligera disminución en la expresión de estos Fc γ R activantes en comparación con las células cultivadas en ausencia de citocinas. La combinación de IL4 e IL10 y la proteína de fusión IL4-IL10 normalizó la expresión de Fc γ RI y Fc γ RIIa. Se midió un ligero aumento por IL4 en combinación con IL10 o proteína de fusión IL4-IL10 en la expresión de Fc γ RIII, aunque fue despreciable en comparación con la regulación por incremento inducida de este receptor por IL10 sola. IL4 sola mostró una ligera disminución en la expresión de Fc γ RIIb. La combinación de IL4 con IL10 y la proteína de fusión IL4-IL10 no alteraron la expresión del inhibidor de Fc γ RIIb. Juntos, esto demuestra que la proteína de fusión IL4-IL10 estabiliza la expresión de Fc γ R activantes y, por consiguiente, esto puede inhibir la activación inmunitaria inducida por el complejo inmunitario.

La **Figura 8** muestra un efecto dosis-respuesta de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la renovación de proteoglicano de cartílago. Se expusieron explantes de cartílago de 5 donantes durante 4 días al 50 % v/v de sangre de 5 donantes (n=5). Durante la exposición de la sangre, la proteína de fusión IL4-IL10 se añadió en una concentración de 0,0001 a 100 ng/ml. Se determinaron la velocidad de síntesis (A), liberación (B) y contenido (C) de proteoglicanos después de un periodo de recuperación de 12 días. Disminuyeron significativamente la velocidad de síntesis y el contenido de proteoglicanos debido a la exposición a la sangre cuando se comparó con el cartílago de control, mientras que aumentó la liberación de proteoglicanos (indicado por asteriscos; $p < 0,05$). Las almohadillas indica las diferencias estadísticamente significativas en comparación con 50 % v/v de sangre ($p < 0,05$), mientras que la línea de puntos en A y B enfatiza el aspecto sigmoide de la dosis-respuesta. Se representan valores medios \pm intervalos intercuartílicos. La adición de la proteína de fusión IL4-IL10 a los cultivos de cartílago produjo una recuperación dependiente de la dosis de la velocidad de síntesis de proteoglicanos; se contrarrestaron la normalización de la liberación y el contenido de proteoglicanos.

La **Figura 9** muestra que la proteína de fusión IL4-IL10 previene el daño al cartílago inducido por la sangre. Se expusieron durante 4 días explantes de cartílago de 8 donantes a 50 % v/v de sangre de 8 donantes. Durante la exposición a la sangre, se añadieron la proteína de fusión IL4-IL10, así como IL4, IL10 y la combinación de IL4 con IL10 (todos a 10 ng/ml). La velocidad de síntesis de proteoglicanos de los explantes de cartílago disminuyó el 76 % debido a la exposición a la sangre (A, $p = 0,012$). La proteína de fusión IL4-IL10 aumentó la velocidad de síntesis de proteoglicanos el 241 % en comparación con la exposición a la sangre sola. El cartílago expuesto a la sangre mostró el 59 % de aumento de liberación de proteoglicanos (B, $p = 0,017$). La adición de la proteína de fusión IL4-IL10 disminuyó la liberación inducida por la sangre de proteoglicanos ($p = 0,012$) de nuevo a los valores de control. El cartílago expuesto a la sangre mostró una disminución del 10 % en el contenido de proteoglicanos en comparación con el control (C, $p = 0,012$). La proteína de fusión IL4-IL10 aumentó significativamente el contenido de proteoglicanos en comparación con la exposición a la sangre sola ($p = 0,012$). El símbolo * indica diferencia estadísticamente significativa en comparación con control. El símbolo # indica diferencia estadísticamente significativa en comparación con 50 % v/v de sangre ($p < 0,05$). Se representan valores medios \pm intervalos intercuartílicos.

La **Figura 10** muestra que la proteína de fusión IL4-IL10 reduce el dolor en el modelo canino de surcos para osteoartritis. Se indujo osteoartritis (OA) en 4 perros, y se administraron inyecciones intrarticulares de 1 ml de proteína de fusión IL4-IL10 a las 5 semanas (1 μ g/ml) y 7 semanas (10 μ g/ml) después de la inducción de OA (véanse las flechas). Se realizó el análisis de plataforma de fuerza (FPA) cada 2 semanas empezando 3 semanas antes y terminando 8 semanas después de la inducción, con FPA diario adicional después de las inyecciones de proteína de fusión IL4-IL10. Casi se normalizó la carga de la articulación con OA (articulación experimental frente a articulación de control contralateral) en comparación con el nivel justo antes de la inyección (2 % frente al 9 % de

inhibición en comparación con la precarga de OA, respectivamente), indicado por un pico en la fuerza de apoyo. Este efecto sobre la carga, indicativo del alivio de dolor, se obtuvo durante días después de que la carga disminuyera otra vez. Después de la segunda inyección en la semana 7, se alcanzó un cambio en sin carga desde -7 % (en comparación con la precarga de OA) hasta -2 % en comparación con la precarga de OA. Así, nuevamente se estableció un efecto positivo de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre el patrón de carga de la articulación afectada con OA y normalización casi completa. El símbolo * indica $p=0,05$ en comparación con el valor preinyección mientras que el símbolo # indica $p<0,05$ en comparación con el valor inicial. La línea de puntos curvada indicó la evolución natural del dolor por OA (sin carga) sin tratamiento.

10 La **Figura 11** muestra la evolución temporal de la hiperalgesia térmica inducida por carragenina en ratones tratados con la proteína de fusión IL4-IL10. Se determinaron las latencias de retirada de calor usando la prueba de Hargreaves. Los ratones recibieron una inyección intraplantar de carragenina (véase la primera flecha desde la izquierda), y se determinó la disminución en la latencia de retirada de calor. La inyección intratecal con la proteína de fusión IL4-IL10 (véase la segunda flecha desde la izquierda) redujo significativamente la respuesta hiperalgésica a carragenina intraplantar. El efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 fue menos evidente después de 2 días, aunque la disminución en la latencia de retirada de calor presentada por los ratones tratados con la proteína de fusión IL4-IL10 fue todavía significativamente más pequeña en comparación con los ratones tratados con solución salina después de 48 h. Los datos se expresan como media \pm EEM. El símbolo * indica $p < 0,05$; el símbolo ** indica $p < 0,001$.

20 La **Figura 12** muestra las latencias de retirada de calor determinadas usando la prueba de Hargreaves. Los ratones recibieron una inyección intraplantar de carragenina, y se determinó la disminución en la latencia de retirada de calor. Se administraron inyecciones intratecales (véanse flechas) con cualquiera de IL4 o IL10 (A) o proteína de fusión IL4-IL10 (B) en el día 6 después de la inducción de hiperalgesia. Tanto IL4 como IL10 redujeron ligeramente la respuesta hiperalgésica a la respuesta de dolor por carragenina intraplantar, pero el efecto es despreciable en comparación con el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10. El efecto de IL4 o IL10 separadas duró durante 1 día, mientras que el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 duró durante un periodo mucho más largo, hasta el día 4. Los datos se expresan como media \pm EEM. El símbolo * indica $p < 0,05$; el símbolo ** indica $p < 0,001$.

30 La **Figura 13** muestra que la proteína de fusión IL4-IL10 inhibe la liberación de citocinas inducida por LPS en cultivos de sangre completa. Se diluyó 1:10 sangre heparinizada de voluntarios sanos en medio de cultivo y se incubó con LPS a una concentración de 10 ng/ml en presencia de diversas concentraciones de los conjuntos que contenían diferentes construcciones de la proteína de fusión IL4-IL10. Se midió con ELISA TNF α en los sobrenadantes. Los resultados se expresaron como % de inhibición. La producción de TNF en ausencia de proteína de fusión IL4-IL10 dio como resultado el 0 % inhibición. Los conjuntos 2 y 4, donde el extremo C de IL4 se asoció al extremo N de IL10, mostraron la mayor inhibición de producción de TNF α a concentraciones similares en comparación con los conjuntos 1 y 3, donde el extremo C de IL10 se asoció al extremo N de IL4. Esto indica que la funcionalidad de proteína de fusión la IL4-10 depende de la forma en la que las citocinas separadas se asocian dentro de la proteína de fusión IL4-IL10.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Transfección de células HEK293.

45 **[0106]** Procedimiento: Se transfectaron transitoriamente células HEK293 según procedimientos convencionales con un vector que contenía un transgén (Y Derocher et al., Nucleic Acids Research 2002, vol 30, no 2, e9). Brevemente, se clonó el inserto de proteína de fusión IL4-IL10 en un vector de expresión pUPE, que contenía una secuencia señal de cistatina. Entonces se transfectaron células HEK293E con el vector de expresión pUPE que contenía la proteína de fusión IL4-IL10 de la presente invención. Al mismo tiempo, las células se co-transfectaron con un vector que llevaba el transgén para beta-galactósido alfa-2,3-sialiltransferasa 5 (SIA 9) homo sapiens para optimizar la terminación de los glicanos con ácido siálico. Las células se cultivaron en medio FreeStyle (Invitrogen) con 0,9 % de primatone y $\sim 0,04$ %, v/v, de suero bovino fetal. Cinco días después de transfección, se recogió el medio acondicionado por centrifugación a baja velocidad, después de lo cual se concentró sobre un cartucho de fibra hueca QuixStand de 10 kDa (GE Healthcare) y se diafiltró contra solución salina tamponada con fosfato (PBS).

55 **Ejemplo 2. Ensayos de ELISA para la detección inmunoquímica de proteína de fusión IL4-IL10, IL4 e IL10.**

[0107] Procedimiento: Se midió por ELISA el contenido de IL4 e IL10 en fracciones de sobrenadante de cultivo o de cromatografía (kit de ELISA IL4 PeliPair; Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos; Cat N° M9314 o kit de

ELISA IL10 PeliPair; Sanquin; Cat N° M9310) según instrucciones del fabricante. Brevemente, se diluyeron 1:200 en solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS), anticuerpos de captura contra IL4 o IL10 y se recubrieron durante la noche sobre una placa de ELISA. Todas las etapas posteriores se realizaron en PBS complementado con 0,1 %, p/v, de Tween-20 (PBS-T). Se probó una curva de respuesta a dosis que consiste en diluciones sucesivas para dar un intervalo de 100 a 2 pg/ml de IL4 o IL10 recombinante. Los anticuerpos unidos se detectaron con estreptavidina-poli-HRP (Sanquin) seguido por incubación con TMB (3,3',5,5"-tetrametilbencidina; Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.; Cat N° SB02). La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 1 M (Chem Lab; Cat N° CL05-2658-1000). Se compararon los resultados de los ELISA con los de curvas de referencias de diluciones de IL4 e IL10 recombinantes proporcionadas por el fabricante.

10

[0108] Se hizo un ELISA cruzado que detectó específicamente proteína de fusión IL4-IL10 usando placas recubiertas de anti-IL4 y anticuerpo monoclonal anti-IL10 biotinilado para la detección. El ELISA cruzado se realizó exactamente igual que el ELISA para IL10, excepto que se usaron placas recubiertas de anti-IL4 en lugar de placas recubiertas de anti-IL10. Las placas recubiertas de anti-IL4 se prepararon exactamente como se describe para el ELISA de IL4. Como no hubo patrón para este ensayo, los resultados se dan como DO. Se probó una cantidad fija de sobrenadante, que era equivalente a 75 pg/ml de IL10 recombinante de control y proteína de fusión IL4-IL10 en este ELISA cruzado específico de la proteína de fusión IL4-IL10.

[0109] Resultados: Detección de la proteína de fusión IL4-IL10. Ambos ensayos de ELISA (véanse las Figuras 1 y 2) dieron curvas de dosis-respuesta de sobrenadante de cultivo de las células HEK293 transfectadas, que indica la presencia de proteínas IL4 e IL10, que tenían una conformación estructural que fue reconocida por los anticuerpos monoclonales usados en los ELISA (Figura 1). Los ELISA (ELISA cruzado) se modificaron entonces para medir específicamente la proteína de fusión IL4-IL10 y no las moléculas de citocina no mutantes recombinantes (véase la Figura 2A y B). Cuando se probaron en este ELISA cruzado una cantidad equivalente a 75 pg/ml de IL10 recombinante y proteína de fusión IL4-IL10, solo la proteína de fusión IL4-IL10 dio una señal, pero no IL10 (Figura 2A y B). Así, estos resultados demuestran que solo el sobrenadante obtenido de las células HEK293 transfectadas con la secuencia de la proteína de fusión IL4-IL10 de la presente invención contuvo una proteína en la que se habían asociado entre sí las secuencias de IL4 e IL10.

30 Ejemplo 3. SDS-PAGE y transferencia Western.

[0110] Procedimiento: Se diluyeron muestras 1:1 en tampón de muestra (Tris-HCl pH 6,8, 25 %, p/v, de glicerol, 2 %, p/v, de SDS, 0,01 %, p/v, de azul de bromofenol; BioRad, Richmond, VA, EE.UU., Cat N° 161-0737), que contenía 2-mercaptoetanol 710 mM y se incubaron durante 10 minutos a 100 °C. Posteriormente, las muestras se cargaron en un gel de 7,5 %, p/v, de poli(acrilamida Tris/glicina (geles Mini-PROTEAN TGX Precast sin SDS; BioRad, Cat N° 456-1023). Los marcadores de peso molecular (patrón de WesternC, 250-10 kD; BioRad; Cat N° 161-0376) se realizaron en un carril separado. La electroforesis se realizó en condiciones reductoras, usando un tampón de Tris/glicina/SDS (BioRad; Cat N° 161-0732). Para identificar la proteína de fusión IL4-IL10, se realizó inmunotransferencia con anticuerpos anti-IL4 o anti-IL10. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente, y entonces se transfirieron a una membrana de PVDF (BioRad; Cat N° 161-0277) por transferencia Western, usando un tampón Tris/glicina (BioRad; Cat N° 161-0734) a 100 V durante 1 hora.

[0111] Después de la transferencia, la membrana se incubó con PBS-T que contenía 4 %, p/v, de leche en polvo (leche en polvo Elk; Campina, Zaltbommel, Países Bajos) para bloquear los restantes sitios de unión. Entonces se lavó la membrana de PVDF 3x en PBS-T y se incubó con el anticuerpo primario (IgG1 de ratón anti-IL4 humana; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.; Cat N° SC80093 o IgG1 de ratón anti-IL10 humana; Santa Cruz; Cat N° SC32815) en 1 %, p/v, de leche (disuelta en PBST) durante 1 hora. Después de otra etapa de lavado, la transferencia se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP); Santa Cruz; Cat SC2005) y un anticuerpo detector del marcador WesternC (StrepTactin-HRP; BioRad; Cat N° 161-0382) en PBST-1 % de leche. Se añadió disolución de ECL (GE Healthcare, Diegem, Bélgica, Cat N° RPN2132) a la membrana lavada, donde después la membrana se transfirió a un casete y se desarrolló hasta 15 minutos usando el generador de imágenes de Kodak. Para caracterizar adicionalmente la proteína de fusión IL4-IL10, el sobrenadante de cultivo también se trató con PNGaseF (Sigma Aldrich, Cat N° G5166) según las instrucciones del fabricante, para desglucosilar la proteína de fusión IL4-IL10, y a partir de aquí se analizó en SDS-PAGE e inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente.

[0112] Resultados: IL4 e IL10 no mutantes migraron ambas con una migración relativa (Mr) de acuerdo con un MW <20kD (carriles 4 y 5 de las transferencias mostradas en las Figura 3A y B). A partir del sobrenadante obtenido de HEK293 transfectadas, la proteína de fusión IL4-IL10 migró como una banda doble con una Mr compatible con MW ~30-35 kD. Ambas bandas fueron reconocidas por anticuerpos monoclonales anti-IL4 (Figura

3A) y por anti-IL10 (Figura 3B) y, por tanto, ambas representan variantes de la proteína de fusión IL4-IL10, supuestamente glucoformas diferentes. En particular, no se detectaron bandas que se correspondieran con Mr en el intervalo de IL4 o IL10 no mutantes recombinantes (carriles 2 en la Figura 3A y 3B). Estos resultados confirman que solo la proteína de fusión IL4-IL10 y no las citocinas individuales (es decir, IL4 e IL10) se detectan en el sobrenadante de las células HEK293 transfectadas. Para confirmar que la banda doble descrita en el carril 2 de los paneles 3A y 3B son glucoformas, se trató el sobrenadante que contenía proteína de fusión IL4-IL10 con PNGasaF para la desglucosilación y se comparó con el sobrenadante no tratado por inmunotransferencia. Los resultados muestran que solo se detecta una banda tras la desglucosilación (véanse los carriles 3 en ambas transferencias mostradas en las Figuras 3A y 3B), que confirma que la banda doble observada en el carril 2 de ambas transferencias (Figura 2A y B) es de hecho la proteína de fusión IL4-IL10 de la presente invención, pero en una forma glucosilada.

Ejemplo 4. Filtración en gel de la proteína de fusión IL4-IL10 - cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) a alta presión.

15

[0113] Procedimiento: Para determinar el peso molecular de la proteína de fusión IL4-IL10, se realizó un ensayo de cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HP-SEC). La filtración en gel (columna BioSuite 125 4 µm UHR SEC; Waters; Cat N° 186002161) se realizó en un sistema de cromatografía de líquidos de alto rendimiento (Shimadzu) con tampón fosfato 50 mM que contenía NaCl 0,5 M como fase móvil. La columna se calibró antes de la serie usando una mezcla de proteínas de tiroglobulina, albúmina de suero bovino, anhidrasa carbónica, mioglobulina y ribonucleasa. La proteína de fusión IL4-IL10 purificada por intercambio catiónico se obtuvo reuniendo y concentrando las fracciones de cromatografía con el contenido más alto de proteína fusión IL4-IL10 (se concentraron 2 ml de fracciones reunidas a 100 µl, que contenían 2 µg de proteína de fusión IL4-IL10). Se inyectaron cincuenta µl de 20 µg/ml de proteína de fusión IL4-IL10 reunida y se hicieron pasar a través de la columna a un caudal de 0,35 ml/min y a una presión de 35 bares. Se recogieron fracciones de 175 µl y se midió el contenido de IL4 e IL10 en el ELISA de IL4 e IL10 anteriormente descrito (1/500 dilución). Se realizaron series similares con IL4 humana recombinante (Sigma, Cat N° I4269) e IL10 humana recombinante (Sigma, Cat N° I9276) para comparar el tamaño molecular de la proteína de fusión IL4-IL10 con el de las citocinas no mutantes.

[0114] Resultados: El patrón de elución de HP-SEC de IL4 indica que IL4 está presente como un monómero (~15 kD). El patrón de elución de IL10 muestra que esta citocina está presente en una forma dimérica (~40 kD), que es la forma de IL10 que existe de forma natural (Zdanov et al, Structure 1995, 3:591-601). El patrón de proteína de fusión IL4-IL10 indica que está principalmente presente en una forma dimérica (~70 kD) (Figura 4).

Ejemplo 5. Ensayos para medir citocinas proinflamatorias.

[0115] Procedimiento: Se midió la producción de TNFα usando un ELISA comercial (kit de ELISA TNF-α Pelipair; Sanquin, Ámsterdam, Países Bajos; Cat N° M9323) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se recubrieron placas con anticuerpo de captura anti-TNFα diluido 1 a 150 en un tampón de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, se lavaron 3 veces con PBS-T y se incubaron con 2,5 %, p/v, de albúmina de suero bovino (BSA; Roche Applied Science, Mannheim, Alemania, Cat N° 10735108001) en PBS para bloquear cualquier sitio de unión restante sobre la placa. Después de otra etapa de lavado, los pocillos se incubaron con muestras diluidas en PBS-T. Se probó una curva patrón de TNF-α recombinante a concentraciones de 200-1,56 pg/ml en PBS-T para referencia. El TNF-α recombinante se suministró con el kit. Finalmente, se detectó TNF-α unido por incubaciones con anti-TNF-α biotinilado y estreptavidina-poli-HRP (Sanquin; Cat N° 2032), respectivamente, en PBS-T. Se visualizó HRP unido con TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina; Invitrogen; Cat N° SB02). Para completar el ELISA, se añadieron ácido sulfúrico 1 M (Chem Lab; Cat N° CL05-2658-1000). Los resultados se refirieron a los de la curva patrón de TNFα recombinante y se expresaron como pg/ml. Se usaron procedimientos de ELISA similares para medir IL6 e IL8 (comprados de Sanquin) e IFNγ e IL17 (comprados de Biosource).

50

Ejemplo 6. Ensayos para medir la actividad de la proteína de fusión IL4-IL10, IL4 e IL10.

[0116] Procedimiento: Se usó la liberación de citocinas inducida por lipopolisacárido (LPS) (IL6, IL8, TNFα) en sangre completa en el ensayo funcional para IL4 e IL10. Se obtuvo sangre humana heparinizada de voluntarios sanos y se diluyó 1 a 10 en medio de cultivo RPMI 1640 (Glutamax; Invitrogen, Cat N° 61870010) complementado con Pen/Estrep (PAA Laboratories, Pasching, Austria; Cat N° P11-013). Se añadió LPS (lipopolisacárido; Sigma; Cat N° L4391) dando una concentración final de 10 ng/ml. Se añadió la proteína de fusión IL4-IL10 a una concentración final de 100 ng/ml. Como controles, se añadieron IL4 humana recombinante (Sigma, Cat N° I4269) e IL10 humana recombinante (Sigma, Cat N° I9276) a una concentración final de 50 ng/ml cada una. Para verificar la actividad de

55

IL10 e IL4, se añadieron anticuerpos bloqueantes de receptor contra el receptor de IL4 humana (a-hIL4-R; R&D Systems; Mineápolis, MN, EE.UU., Cat N° MAB230) y receptor de IL10 humana (a-IL10-R, BioLegend, San Diego, CA, EE.UU., Cat N° 308807) a concentraciones finales de 10 µg/ml y 20 µg/ml, respectivamente. Entonces se incubó el cultivo de sangre completa durante 18 horas a 37 °C, donde después se recogió el sobrenadante, se guardó a -80 °C hasta que se probó para citocinas.

[0117] Resultados: Se midieron los niveles de TNFα presente en los sobrenadantes con ELISA y se expresaron como % de inhibición de TNFα (Figura 5A). Los resultados muestran que la producción de TNFα en ausencia de proteína de fusión IL4-IL10 dio como resultado 0 % de inhibición (Figura 5A). No se observó inhibición de la producción de TNFα cuando se probó un volumen similar de tampón que carecía de la proteína de fusión IL4-IL10 (Figura 5A). También se midió la inhibición de la producción de TNFα, IL6 e IL8 inducida por LPS por proteína de fusión IL4-IL10, o una combinación de IL4 e IL10, usando ensayos de ELISA (Figura 5B). Las concentraciones de TNFα, IL6 e IL8 presentes en el sobrenadante se dan en el eje y. La proteína de fusión IL4-IL10 se probó a 50 ng/ml, y se comparó con el efecto de una mezcla de IL4 e IL10 humanas recombinantes a una concentración final de 25 ng/ml de cada una. Los resultados muestran que tanto la proteína de fusión IL4-IL10 como la combinación de IL4 e IL10 inhibieron significativamente la producción de TNF, IL6 e IL8 inducida por LPS con respecto al control (es decir, medio sin citocinas). Se suprimió completamente el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la producción inducida por LPS de IL6 cuando se añadieron tanto anticuerpos bloqueantes de receptor contra el receptor de IL4 humana (a-hIL4-R) como contra el receptor de IL10 humana (a-IL10-R) con respecto a la situación de control (por ejemplo, medio solo). Sin embargo, se suprimió parcialmente el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la producción inducida por LPS de IL6 cuando uno cualquiera de los dos restos (es decir, IL4 o IL10) se bloqueó por un anticuerpo bloqueante de receptor contra el receptor de IL4 humana (a-hIL4-R) o contra el receptor de IL10 humana (a-IL10-R), con respecto a la situación de control (por ejemplo, medio solo).

25 Ejemplo 7. Efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre el equilibrio de la actividad de linfocitos T proinflamatorios (células que expresan citocinas Th1 y Th17) y reguladores (linfocitos T CD4 que expresan FoxP3).

[0118] Procedimiento: La activación de células mieloides y linfocitos B es críticamente dependiente del equilibrio de linfocitos T de linfocitos proinflamatorios T Th1 y Th17 y reguladores CD4 que expresan FoxP3. Para evaluar los efectos de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la producción de citocinas de linfocitos T, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donantes sanos. Brevemente, se diluyó 1:1 de sangre con medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Merelbeke, Bélgica) que contenía penicilina (100 U/ml, Yamanouchi, Leiderdorp, Países Bajos), estreptomocina (100 mg/ml, Fisiopharma, Milán, Italia) y glutamina (2 mm, Gibco BRL). Se aislaron CMSP por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Se cultivaron CMSP (5.10^5 /ml) durante 3 días a 37 °C en RPMI/glutamax (Gibco BRL) con penicilina añadida (100 U/ml), estreptomocina (100 mg/ml) y 10 % de suero bovino fetal reunido (FCS, Gibco BRL). Las CMSP se cultivaron en presencia o ausencia del superantígeno enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB, 1 ng/ml) y/o la proteína de fusión IL4-IL10. Después de este periodo de cultivo, el sobrenadante se recogió, se liberó de células y se guardó a -80 °C hasta que se probó para IFNγ, IL17 y TNFα por ELISA. Además, se midió la proliferación celular por incorporación de 3H-timidina. Se añadió 3H-timidina (5 mCi/ml, NEN Life Science Products, Ámsterdam, Países Bajos) a cada pocillo durante las últimas 18 horas del cultivo celular de 3 días. Después de este periodo de cultivo, las células se recogieron y se midió la incorporación de 3H-timidina por recuento de centelleo líquido y se expresó en recuentos por minuto (CPM). Por tanto, se realizó tinción intracelular con FoxP3 usando un conjunto de tinción de FoxP3 de rata antihumano conjugado con APC (eBioscience, San Diego, EE.UU.). Para la tinción intracelular, se usó un anticuerpo de control de isotipo de rata marcado con APC (eBioscience). Se determinaron los porcentajes de células positivas/negativas basándose en los marcadores que se fijaron usando controles de isotipo. La adquisición de células se hizo usando un citómetro de flujo FACScan y los datos se analizaron con el software FlowJo, versión 7.5 (Tree Star Inc., Oregon, EE.UU.).

[0119] También se probó la actividad sinérgica de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la expresión del receptor de Fcγ inhibitor (FcγRIIb) en monocitos. Ésta se comparó con la regulación de FcγRI y FcγRIII activantes. Se cultivaron CMSP (1.10^6 /ml) durante 4 días a 37 °C en RPMI/glutamax (Gibco BRL) con penicilina añadida (100 U/ml), estreptomocina (100 mg/ml) y 10 % de suero AB humano reunido (Gibco BRL). Las CMSP se cultivaron en presencia o ausencia del superantígeno SEB (1 ng/ml) y/o la proteína de fusión IL4-IL10. Después de este periodo de cultivo, se evaluó la expresión de FcγR por análisis de FACS. Para el análisis de FACS, se incubaron monocitos con el mAb CD14 marcado con APC, mAb anti-FcγRI y anti-FcγRIII marcados con FITC (Pharmingen), y mAb anti-FcγRIIb marcado con FITC (2B6, Genmab, Utrecht, Países Bajos). La adquisición de células se hizo usando un citómetro de flujo FACScan y los datos se analizaron con el software FlowJo, versión 7.5 (Tree Star Inc., Oregon,

EE.UU.).

[0120] Resultados: SEB indujo una proliferación significativa asociada con la regulación por incremento de la expresión de FoxP3. Tanto la proliferación como la expresión de FoxP3 fueron difícilmente afectadas por la proteína de fusión IL4-IL10 (Figura 6A y B, respectivamente). Por el contrario, todas las citocinas IFN γ Th1 y Th17 (gráfico izquierdo), IL-17 (gráfico central) y TNF α (gráfico derecho) se redujeron fuertemente por la proteína de fusión IL4-IL10 y la combinación de IL4 e IL10 (Figura 6C). Juntos, esto demuestra que la proteína de fusión IL4-10 altera fuertemente el equilibrio entre los linfocitos T CD4 reguladores supresores y las células Th1 y Th17 proinflamatorias.

10 Ejemplo 8. Efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre el equilibrio del receptor I y III de Fc γ activante y Fc γ RIIb inhibitor por la proteína de fusión IL4-IL10, IL4, IL10, y combinación de IL4 e IL10.

[0121] Procedimiento: El equilibrio entre receptores activantes e inhibidores para IgG (Fc γ R) desempeña una función clave en la activación mediada por el complejo inmunitario de células mieloides y linfoides. Para evaluar los efectos de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la expresión de Fc γ R en monocitos, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de un donante sano. Se indujo la activación de monocitos dependientes de linfocitos T por tratamiento de CMSP ($5 \cdot 10^5$ /ml) durante 2 días en presencia o ausencia del superantígeno enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB) (0,1 ng/ml) y/o proteína de fusión IL4-IL10. Después de este periodo de cultivo, se midió la expresión de Fc γ R.

[0122] Resultados: IL10 reguló por incremento la expresión de Fc γ RI, Fc γ RIIa y Fc γ RIII (Figura 7), mientras que IL4 en estas condiciones mostró una ligera disminución en la expresión de estos Fc γ R activantes en comparación con las células cultivadas en ausencia de citocinas. La combinación de IL4 e IL10 y la proteína de fusión IL4-IL10 normalizó la expresión de Fc γ RI y Fc γ RIIa. Aunque se observó un ligero aumento en Fc γ RIII por la combinación de IL4 e IL10 y la proteína de fusión IL4-IL10, éste fue despreciable en comparación con la regulación por incremento inducida de este receptor por IL10 sola. IL10 sola mostró un ligero aumento en la expresión del inhibidor Fc γ RIIb, mientras que IL4 sola mostró una ligera disminución en la expresión de este receptor. La combinación de IL4 e IL10, y la proteína de fusión IL4-IL10, no alteraron la expresión del inhibidor Fc γ RIIb (Figura 7). Juntos, esto demuestra que la proteína de fusión IL4-IL10 estabiliza la expresión de Fc γ R activantes y, por consiguiente, esto puede inhibir la activación inmunitaria inducida por el complejo inmunitario.

Ejemplo 9. Cultivos de cartílago para daño de cartílago inducido por la sangre.

[0123] Procedimiento: Se obtuvo tejido de cartílago articular humano sano *post mortem* de cabezas humerales en el plazo de 24 horas después de la muerte del donante, autorizado por las normas éticas médicas del Centro Médico Universitario de Utrecht. Los donantes (n=8; edad media $69,8 \pm 8,7$ años, 3 varones y 5 mujeres) no tenían antecedentes conocidos de trastornos de las articulaciones. Se cortaron asépticamente cortes de espesor completo de cartílago de la cabeza humeral, excluyendo el hueso subyacente, y se mantuvieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4). En el plazo de 1 hora después de la disección, los cortes se cortaron en pequeños explantes cúbicos de espesor completo y se pesaron asépticamente (intervalo 5-15 mg, exactitud $\pm 0,1$ mg). Los explantes se cultivaron individualmente en una placa de microtitulación de fondo redondo de 96 pocillos (al 5 % de CO $_2$ en aire, pH 7,4, 37 °C, y 95 % de humedad). El medio de cultivo consistió en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen) complementado con glutamina (2 mM), penicilina (100 UI/ml), sulfato de estreptomycin (100 μ g/ml; todos de PAA), ácido ascórbico (85 μ M; Sigma) y 10 % de suero AB $^+$ masculino humano reunido inactivado por calor (Gemini Bioproducts).

[0124] Para cada experimento, se extrajo sangre roja de donantes humanos sanos (n=8, edad media $28,0 \pm 5,0$ años, 2 varones y 6 mujeres) en un tubo vacutainer (N $^{\circ}$ 367895; Becton Dickinson). Para imitar una hemorragia de articulación humana, se expuso cartílago a 50 % v/v de sangre completa durante 4 días, que se considera que es el tiempo natural de evacuación de la sangre de la cavidad de la articulación. Después de la exposición a la sangre, se lavaron los explantes de cartílago dos veces en condiciones de cultivo durante 45 minutos para eliminar todos los aditivos y se cultivaron durante 12 días adicionales. El medio se repuso cada 4 días. En la primera configuración experimental usando cartílago y sangre de 5 de los 8 donantes, se hizo una curva de dosis-respuesta de la proteína de fusión IL4-IL10 añadiendo la proteína de fusión IL4-IL10 durante la exposición a la sangre a una concentración de 0,0001, 0,0003, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 ng/ml (n=5). En un experimento separado, se comparó la concentración óptima de 10 ng/ml de proteína de fusión IL4-IL10 con una concentración similar de la combinación de IL10 más IL4, así como los componentes individuales (cada uno 10 ng/ml, n=8).

[0125] Como una medida de la velocidad de síntesis de proteoglicanos, siendo los proteoglicanos uno de los

principales componentes de la matriz de cartílago, se determinó la tasa de incorporación de sulfato en glucosaminoglicanos (GAG). Al final de cada experimento se añadieron 74 kBq de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ (NEX-041-H libre de soporte; DuPont) por pocillo. Después de 4 horas de marcado por pulsos de los GAG sulfatados recién formados, se lavaron las muestras de cartílago dos veces en PBS frío y se guardaron a -20°C . Se digirieron las muestras
 5 descongelaadas durante 2 horas a 65°C con 2 % de papaína (Sigma). Se determinó la tasa de síntesis de proteoglicanos mediante precipitación de GAG con cloruro de hexadecilpiridinio 0,3 M monohidratado (CPC; Sigma) en NaCl 0,2 M. El precipitado se disolvió en NaCl 3 M y se midió la cantidad de radiactividad por análisis de centelleo líquido. Se normalizaron los recuentos radiactivos a la actividad específica del medio, tiempo de marcado y peso húmedo de cartílago. Los resultados se expresaron como nanomoles de sulfato incorporado por peso húmedo en
 10 gramos de tejido de cartílago ($\text{nmol/h}\cdot\text{g}$).

[0126] Se establecieron el contenido de proteoglicanos de cada explante de cartílago y la liberación de proteoglicanos en medio de cultivo por tinción y precipitación de GAG con azul alcian (Sigma) en el digesto de papaína de muestras de cartílago y en medio de cultivo, respectivamente. La tinción se cuantificó por absorciometría
 15 a 620 nm usando sulfato de condroitina (Sigma) como referencia. Los resultados se expresaron como mg de GAG por peso húmedo de tejido de cartílago (mg/g) y mg de GAG liberados durante 4 días por peso húmedo de tejido (mg/g), para el contenido y la liberación, respectivamente. Debido a las diferencias focales en la composición y bioactividad del cartílago, se determinaron los parámetros de renovación de proteoglicanos de 10 explantes de cartílago del mismo donante, obtenidos al azar, y se manipularon individualmente. El promedio de estas 10 muestras
 20 se tomó como un valor representativo para ese donante de cartílago.

[0127] Resultados: La exposición de cartílago a 50 % v/v de sangre durante 4 días disminuyó fuertemente la velocidad de síntesis de proteoglicanos el 74 % (Figura 8A; $p=0,043$). La adición de la proteína de fusión IL4-IL10 produjo una recuperación dependiente de la dosis de la velocidad de síntesis de proteoglicanos, es decir, desde 0,1
 25 ng/ml de proteína de fusión IL4-IL10 y en adelante, se observó un aumento significativo en la velocidad de síntesis de proteoglicanos cuando se comparó con la exposición a sangre sin proteína de fusión IL4-IL10 (todos $p=0,043$). El aumento del 62 % en la liberación de proteoglicanos debido a la exposición a sangre fue (estadísticamente) significativamente inversa (restaurada para niveles de control) por la adición de la proteína de fusión IL4-IL10 desde 0,1 ng/ml y en adelante (Figura 8B, todos $p=0,043$, excepto para 1 ng/ml , $p=0,080$). Esto produjo normalización de la
 30 liberación de proteoglicanos que ya no fue diferente de los cultivos de control. El contenido total de proteoglicanos disminuyó el 11 % cuando los explantes de cartílago se expusieron a sangre (Figura 8C; $p=0,043$). La disminución en el contenido por exposición a la sangre se contrarrestó por la adición de la proteína de fusión IL4-IL10 a concentraciones de 0,3 ng/ml y en adelante (todos $p=0,043$, excepto para 1 y 100 ng/ml , ambos $p=0,080$).

[0128] Para comparar el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 con la combinación de las citocinas y los componentes individuales, se probaron en el mismo ensayo la proteína de fusión IL4-IL10, IL4, IL10, y la combinación de ambos (cada uno a 10 ng/ml). Se redujo el 76 % la velocidad de síntesis de proteoglicanos debido a la exposición a sangre (Figura 9A; $p=0,012$). Tanto IL10 como IL4 aumentaron estadísticamente significativamente la velocidad de síntesis cuando se compararon con sangre ($p=0,017$ y $p=0,012$, respectivamente). La proteína de
 40 fusión IL4-IL10 usada a la misma concentración también aumentó la velocidad de síntesis de proteoglicanos, y así fue igual de eficaz que la combinación de las dos citocinas individuales (241 % y 245 %, respectivamente, en comparación con la exposición a sangre). El efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 también fue estadísticamente significativamente mejor que el efecto de IL10 sola ($p=0,025$). La velocidad de la síntesis de proteoglicanos de los cultivos con la proteína de fusión IL4-IL10, con la combinación de ambas citocinas, y con IL4 sola ya no fue
 45 significativamente diferente de los controles. Se obtuvo recuperación completa de la inhibición inducida por la sangre de la síntesis de proteoglicanos, concretamente la normalización. La exposición a sangre de cartílago aumentó la liberación de proteoglicanos el 59 % (Figura 9B; $p=0,017$). La adición de IL10 redujo esta liberación potenciada ($p=0,012$ en comparación con sangre). IL4, la combinación de IL-4 e IL-10 y la proteína de fusión IL4-IL10 disminuyeron la liberación a un mayor grado cuando se comparó con la exposición a sangre (todos $p=0,012$). La
 50 proteína de fusión IL4-IL10 fue más potente cuando se comparó con IL10 sola ($p=0,012$), e igual de eficaz que la combinación de las citocinas individuales ($p=0,611$).

[0129] El cartílago expuesto a sangre mostró una disminución en el contenido de proteoglicanos del 10 % (Figura 9C; $p=0,012$). Las citocinas individuales IL4 e IL10 no previnieron esta reducción en el contenido ($p=0,093$ y $p=0,327$, respectivamente, cuando se compara con exposición a sangre). Sin embargo, la proteína de fusión IL4-IL10 aumentó (estadísticamente) significativamente el contenido de proteoglicanos en comparación con la exposición a sangre sin adiciones ($p=0,012$).

Ejemplo 10. El modelo canino de surcos para dolor y osteoartritis.

[0130] Procedimiento: El efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre el dolor y la capacidad funcional en el modelo canino de surcos para osteoartritis. Las características del modelo de surcos reflejan la osteoartritis (OA) humana, que hace que sea un modelo apropiado para estudiar OA humana. El modelo de surcos es característico por que los cambios degenerativos de cartílago son progresivos, dando como resultado por último lugar la osteoartritis (OA), mientras que la inflamación sinovial disminuye con el tiempo. Debido a esto, la evaluación de los efectos directos de la medicación sobre la degeneración de cartílago y el dolor se influye menos por posibles efectos indirectos sobre la inflamación. Además, el modelo es característico debido a que no existe desencadenante permanente que cause el daño articular, que hace que el modelo sea más sensible al tratamiento. Un desencadenante permanente de daño articular, tal como la inestabilidad articular usada en otros modelos (caninos) para OA, contrarrestará los posibles efectos beneficiosos del tratamiento. Por completo, el modelo de surcos es adecuado para probar el efecto terapéutico de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la incapacidad causada por el daño articular y el dolor por OA. El dolor y la capacidad funcional se acreditan como parámetros muy importantes en la investigación clínica de la osteoartritis, ya que estos parámetros, en vez de cambios estructurales, obligan a los pacientes a buscar atención médica. En modelos caninos, se pueden evaluar cambios en el frenado, postura vertical y fuerzas propulsoras de reacción del suelo - indicadores de dolor y capacidad funcional - por el análisis de la plataforma de fuerza (FPA). La carga de una articulación se influirá por el dolor y la capacidad funcional, dependiendo de la etapa del proceso de degeneración articular. En las dos primeras semanas después de la inducción de OA se encuentra una clara reducción en la descarga, causado lo más probablemente por el dolor relacionado con la cirugía. Sin embargo, después de 3 semanas existe una descarga más constante de la extremidad afectada como resultado del dolor relacionado con OA.

[0131] Se indujo osteoartritis (OA) en 4 perros mestizos (cruce mixto, esqueléticamente maduros), en la rodilla derecha, según el modelo de surcos. Se hicieron diez ranuras longitudinales y diagonales, profundidad 0,5 mm, en las partes que soportan peso de los cóndilos femorales. Se previnieron la hemorragia y el daño a tejido blando en la medida de lo posible para prevenir la dominancia de un componente inflamatorio que contrasta con los modelos de acción inflamatoria y modelos específicos de artritis. Después de la cirugía, se suturaron el sinovio, las fascias y la piel. La rodilla sin operar contralateral sirvió de control. Se administró inyección intrarticular de 1 ml de proteína de fusión IL4-IL10 (1ug/ml) 5 semanas después de la inducción de OA (véase la primera flecha desde la izquierda). Dos semanas después de la primera inyección (semana 7) se administró una segunda inyección de una dosificación más alta (10 ug/ml) (véase la segunda flecha desde la izquierda).

[0132] Se evaluó el patrón de marcha en suelo, tomado como una medida de dolor y capacidad funcional, por análisis de la plataforma de fuerza (FPA). En modelos caninos, se pueden evaluar cambios longitudinales en la frenada, postura vertical y fuerzas de reacción impulsoras (GRF) para cada pata por FPA. Una plataforma de fuerza (FP), montada alineada con la superficie de una pasarela de 11 m, muestreó GRF pico (100 Hz). Las fuerzas se normalizaron por peso corporal y tiempo, y se expresaron en N/kg. Un único adiestrador guio a los perros con correa sobre la FP, a un ritmo de paseo, a una velocidad constante ($1 \pm 0,2$ m/s). Una serie satisfactoria consistió en golpes de la pata secuenciales distintos de la pata derecha delantera y trasera o la pata izquierda delantera y trasera, respectivamente. Se recogieron diez series válidas para cada lado del perro y se promediaron GRF para cada una de las cuatro patas. Se realizó FPA cada 2 semanas empezando 3 semanas antes y terminando 8 semanas después de la inducción. Se hizo FPA diario adicional después de las inyecciones con proteína de fusión IL4-IL10 (semana 5 y 7).

[0133] Resultados: Los resultados muestran que tras la primera inyección de proteína de fusión IL4-IL10, la carga de la articulación por OA (articulación experimental frente a la articulación de control contralateral) casi se normalizó (2 % de inhibición en comparación con la precarga de OA) en comparación con el nivel justo antes de la inyección (9 % de inhibición en comparación con la precarga de OA) como se indica por un pico en la fuerza de apoyo (Figura 10). Se obtuvo el efecto sobre la carga, que es indicativo del alivio de dolor, durante los días después de que la carga disminuyera otra vez. Después de la segunda inyección en la semana 7, también se observó un efecto positivo de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre el patrón de carga de la articulación con OA afectada. Esto se mostró por un cambio en la descarga desde el -7 % (en comparación con la precarga de OA) hasta el -2 % en comparación con la precarga de OA, otra vez normalización casi completa. La proteína de fusión IL4-IL10 fue, por tanto, capaz de reducir el dolor en este modelo canino para OA.

Ejemplo 11. El modelo canino de surcos - modelo para dolor y osteoartritis

[0134] Procedimiento: Se induce osteoartritis (OA) en perros mestizos (cruce mixto, esqueléticamente maduros), en la rodilla derecha, según el modelo de surcos. Se hacen diez ranuras longitudinales y diagonales,

profundidad 0,5 mm, en las partes que soportan peso de los cóndilos femorales. Se previene la hemorragia y el daño a tejido blando en la medida de lo posible para prevenir la dominancia de un componente inflamatorio que contrasta con los modelos de acción inflamatoria y modelos específicos de artritis. Después de la cirugía, se suturan el sinovio, las fascias y la piel. La rodilla sin operar contralateral sirve de control. Los perros se dividen en dos grupos. El primer grupo recibe una inyección intrarticular de la proteína de fusión IL4-IL10 5 semanas después de la inducción de OA. El segundo grupo recibe una inyección intrarticular de tanto IL4 como IL10 pero en una forma libre, 5 semanas después de la inducción de OA. Dos semanas después de la primera inyección (semana 7), se administró una segunda inyección de una dosificación más alta en el primer grupo (10 ug/ml de proteína de fusión IL4-IL10) y segundo grupo (5 ug/ml de IL4 y 5 ug/ml de IL10).

10

[0135] Se evalúa el patrón de marcha en suelo, tomado como una medida del dolor y la capacidad funcional, por análisis de plataforma de fuerza (FPA). En modelos caninos, se pueden evaluar cambios longitudinales en la frenada, postura vertical y fuerzas de reacción impulsoras (GRF) para cada pata por FPA. Una plataforma de fuerza (FP), montada alineada con la superficie de una pasarela de 11 m, muestreó GRF pico (100 Hz). Las fuerzas se normalizaron por peso corporal y tiempo, y se expresaron en N/kg. Un único adiestrador guió a los perros con correa sobre la FP, a un ritmo de paseo, a una velocidad constante ($1 \pm 0,2$ m/s). Una serie satisfactoria consistió en golpes de la pata secuenciales distintos de la pata derecha delantera y trasera o la pata izquierda delantera y trasera, respectivamente. Se recogen diez series válidas para cada lado del perro y se promediaron GRF para cada una de las cuatro patas. Se realiza FPA cada 2 semanas empezando 3 semanas antes y terminando 8 semanas después de la inducción. En ambos grupos, se hace FPA diario adicional después de la inyección con proteína de fusión IL4-IL10 (grupo 1) y la inyección con IL4 e IL10 en una forma libre (grupo 2), en tanto la semana 5 como la semana 7.

Resultados: Los resultados muestran que tras ambas inyecciones (semana 5 y semana 7), los tratamientos con cualquiera de la proteína de fusión IL4-IL10 (grupo 1) o la combinación de IL4 e IL10 en una forma libre (grupo 2) producen efectos positivos sobre los patrones de carga de la articulación afectada con OA. Sin embargo, se observan mejoras mucho mayores en los patrones de carga de la articulación afectada con OA en respuesta al tratamiento con la proteína de fusión IL4-IL10 con respecto al tratamiento con la combinación de IL4 e IL10 en una forma libre, tanto en la semana 5 como la semana 7. También se observa que los efectos del tratamiento con la proteína de fusión IL4-IL10 son más duraderos en el tiempo que los efectos del tratamiento con una combinación de IL4 e IL10 en una forma libre. Por tanto, la proteína de fusión IL4-IL10 de la presente invención puede reducir el dolor en el modelo canino de OA a un grado mucho mayor que el que se logra con la combinación de IL4 e IL10 en una forma libre.

Ejemplo 12. El modelo murino inducido por carragenina de hiperalgesia.

[0136] **Procedimiento:** Se indujo hiperalgesia en ratones C57BL/6 hembra por una inyección intraplantar en la pata trasera de 5 μ l de A-carragenina (2 % p/v; Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) diluida en solución salina en el día 0 (véase la primera flecha desde la izquierda en la Figura 11). La inyección intraplantar de solución salina sola no indujo hiperalgesia detectable. Se determinaron respuestas a un estímulo térmico por infrarrojos, medidas como la latencia hasta la retirada de la pata, usando la prueba de Hargreaves (IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Se eligió la intensidad del haz de luz para inducir un tiempo de latencia de retirada por calor de aproximadamente 8 segundos en el nivel inicial. Se determinaron las latencias de retirada iniciales en tres días consecutivos. Los ratones desarrollaron hiperalgesia como se demuestra por una disminución en la latencia de retirada que duró al menos 10 días después de la inyección de carragenina. En el día 6, los ratones recibieron una única inyección intratecal de cualquiera de IL4 (100 ng), IL10 (100 ng) o proteína de fusión IL4-IL10 (40, 100 y 200 ng), o vehículo (solución salina) (véanse las flechas en la Figura 11 y 12).

[0137] **Resultados:** Los ratones muestran hiperalgesia, hasta 6 días después de la inyección de carragenina, indicada por una disminución en la latencia de retirada (Figura 11). En el día 6, los ratones recibieron una única inyección intratecal de cualquiera de 100 ng de proteína de fusión IL4-IL10 (n=4) o solución salina (n=4) como control. Después de la inyección de proteína de fusión IL4-IL10, se inhibió la hiperalgesia como se demuestra por una reducción en los valores de latencia de retirada de la pata de nuevo al nivel inicial (Figura 11). El efecto de una única dosificación de proteína de fusión IL4-IL10 duró hasta 2 días. Después de 48 horas, el efecto fue decreciente, pero todavía significativamente diferente del % de disminución en la latencia en ratones tratados con solución salina de control (Figura 11).

55

[0138] En un experimento complementario usando la misma metodología que se ha descrito anteriormente, también se evaluó la hiperalgesia térmica inducida por carragenina en ratones tratados con IL4, IL10, o proteína de fusión IL4-IL10. Específicamente, se administraron inyecciones intratecales con cualquiera de IL4 o IL10 (A) o proteína de fusión IL4-IL10 (B) en el día 6 después de la inducción de hiperalgesia (Figura 12). Aunque tanto IL4

como IL10 redujeron ligeramente la respuesta hiperalgésica a la respuesta de dolor intraplantar por carragenina, este efecto fue despreciable en comparación con el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 (Figura 12). El efecto de IL4 o IL10 separadas duró durante 1 día, mientras que el efecto de la proteína de fusión IL4-IL10 persistió durante un periodo mucho más largo, es decir, hasta el día 4 (Figura 12B).

5

Ejemplo 13: Modelo murino inducido por carragenina de hiperalgnesia.

[0139] Procedimiento: Se induce hiperalgnesia en ratones C57BL/6 hembra por una inyección intraplantar en la pata trasera de 5 µl de λ-carragenina (2 % p/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) diluida en solución salina en el día 0. La inyección intraplantar de solución salina sola no induce hiperalgnesia detectable. Se determinan respuestas a un estímulo térmico por infrarrojos, medidas como la latencia hasta la retirada de la pata, usando la prueba de Hargreaves (IITC Life Science, Woodland Hills, CA). Se elige la intensidad del haz de luz para inducir un tiempo de latencia de retirada por calor de aproximadamente 8 segundos en el nivel inicial. Se determinan las latencias de retirada iniciales en tres días consecutivos. Los ratones desarrollan hiperalgnesia como se demuestra por una disminución en la latencia de retirada que dura al menos 10 días después de la inyección de carragenina. En el día 6, los ratones reciben una única inyección intratecal de cualquiera de la proteína de fusión IL4-IL10 (40, 100 y 200 ng), o disolución que contiene una combinación de IL4 (100 ng) e IL10 (100 ng) en una forma libre, o vehículo (solución salina).

[0140] Resultados: Los resultados muestran que, con respecto a la situación de control (tratamiento con vehículo), el tratamiento con cualquiera de la proteína de fusión IL4-IL10 o una combinación de IL4 e IL10 en una forma libre, produce una disminución significativa en la hiperalgnesia. Sin embargo, se observa que el tratamiento con la proteína de fusión IL4-IL10 ejerce efectos inhibidores mucho mayores sobre la hiperalgnesia que el tratamiento basado en la combinación de IL4 e IL10 en una forma libre. También se observa que los efectos de una única dosificación de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la hiperalgnesia perduran hasta un grado mucho mayor con el tiempo que los efectos de una dosificación equivalente de las citocinas individuales (es decir, combinación de IL4 e IL10 en una forma libre).

Ejemplo 14. Actividad de la proteína de fusión IL4-IL10 sobre la producción de TNF inducida por LPS en un cultivo de sangre completa.

[0141] Procedimiento: Se usó la liberación de citocinas (TNFα) inducida por lipopolisacárido (LPS) en sangre completa en un ensayo funcional para la actividad de la proteína de fusión IL4-IL10. Se obtuvo sangre humana heparinizada de voluntarios sanos y se diluyó 1 a 10 en medio de cultivo RPMI 1640 (Glutamax; Invitrogen, Cat N° 61870010) complementado con Pen/Estrep (PAA Laboratories, Pasching, Austria; Cat N° P11-013). Se añadió LPS (lipopolisacárido; Sigma; Cat N° L4391) dando una concentración final de 10 ng/ml. Se probaron cuatro conjuntos diferentes que contenían diferentes construcciones de proteína de fusión IL4-IL10. Las diferencias entre los conjuntos se encuentran en la forma en la que IL4 se unió a IL10 (por ejemplo, el extremo C de IL4 se unió al extremo N de IL10 o viceversa). Se añadieron las diferentes construcciones a una concentración final de 2, 10, 20, 30, 40 y 50 ng/ml. Entonces se incubó el cultivo de sangre completa durante 18 horas a 37 °C, donde después se recogió el sobrenadante, se guardó a -80 °C hasta que se probó para el contenido de TNFα. Se midieron los niveles de TNFα en los sobrenadantes usando un ensayo de ELISA (como se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 2 y 5).

[0142] Resultados: Los resultados se muestran como % de inhibición de la producción de TNFα. En ausencia de proteína de fusión IL4-IL10, no se observó inhibición de la producción de TNFα. Los conjuntos 2 y 4, donde el extremo C de IL4 se une al extremo N de IL10, mostraron la mayor inhibición de la producción de TNFα en comparación con los conjuntos 1 y 3, donde el extremo C de IL10 se une al extremo N de IL4 (usado a la misma concentración). Estos resultados indican que la funcionalidad de la proteína de fusión IL4-IL10 depende de la forma en la que las citocinas separadas se unen dentro de la proteína de fusión IL4-IL10.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0143]

55

<110> UMC Utrecht Holding B.V.

<120> Proteínas de fusión

ES 2 683 844 T3

<130> P31410PC00

<150> US 61/556.843

<151> 08-11-2011

5

<150> US 61/691.816

<151> 22-08-2012

<160> 4

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 129

<212> PRT

15 <213> homo sapiens

<400> 1

```

His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
1                               5                               10                               15

Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
                20                               25                               30

Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
                35                               40                               45

Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
50                               55                               60

Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
65                               70                               75                               80

Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
                85                               90                               95

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

Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
115                              120                              125

```

Ser

20 <210> 2

<211> 160

<212> PRT

<213> homo sapiens

25 <400> 2

ES 2 683 844 T3

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 1 5 10 15

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 20 25 30

Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 35 40 45

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 85 90 95

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 100 105 110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 115 120 125

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
 130 135 140

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 145 150 155 160

<210> 3

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> conector polipeptídico

10

<400> 3

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr
 1 5

15 <210> 4

<211> 298

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> proteína de fusión IL4-IL10

<400> 4

ES 2 683 844 T3

His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp Ile
 20 25 30
 Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg Ala
 35 40 45
 Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr Arg
 50 55 60
 Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu Ile
 65 70 75 80
 Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly Leu
 85 90 95
 Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn Phe
 100 105 110
 Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys Ser
 115 120 125
 Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Ser Pro Gly Gln Gly Thr
 130 135 140
 Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met
 145 150 155 160
 Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln
 165 170 175
 Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu
 180 185 190
 Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln
 195 200 205
 Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp
 210 215 220
 Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende interleucina 4 e interleucina 10 para su uso en la prevención o el tratamiento de osteoartritis; dolor crónico o una afección **caracterizada por** inflamación local o sistémica, 5 activación inmunitaria y/o linfoproliferación seleccionada del grupo que consiste en: septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades autoinmunitarias, glomerulonefritis, vasculitis inducida por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas, linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, 10 traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperfusión, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico y dolor neuropático y/o inflamatorio.
- 15 2. La proteína de fusión para su uso según la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de polipéptidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia señal, una marca His y un fragmento Fc de anticuerpo.
3. La proteína de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la 20 interleucina 4 se fusiona en el extremo N de la interleucina 10, opcionalmente mediante un conector.
4. La proteína de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la interleucina 10 se fusiona en el extremo N de la interleucina 4, opcionalmente mediante un conector.
- 25 5. La proteína de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además una o más modificaciones químicas seleccionadas del grupo que consiste en glucosilación, fucosilación, sialilación y pegilación.
6. La proteína de fusión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha 30 interleucina 10 es interleucina 10 humana.
7. La proteína de fusión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha interleucina 4 es interleucina 4 humana.
- 35 8. La proteína de fusión para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la proteína de fusión comprende una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. Un vector de terapia génica que comprende un polinucleótido que codifica la proteína de fusión de 40 cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en la prevención o el tratamiento de osteoartritis; dolor crónico; o una afección **caracterizada por** inflamación local o sistémica, activación inmunitaria y/o linfoproliferación seleccionada del grupo que consiste en: septicemia, síndrome disneico del adulto, alo- y xenotrasplante, dermatitis, enfermedad inflamatoria del intestino, sarcoidosis, alergias, psoriasis, espondiloartritis anquilosante, enfermedades autoinmunitarias tales como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, glomerulonefritis, vasculitis inducida 45 por el complejo inmunitario y otras formas de vasculitis, esclerosis múltiple, enfermedad de Sjogren, gota, enfermedades linfoproliferativas tales como linfoma no Hodgkin y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B, lesiones por quemadura, traumatismo múltiple, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, aterosclerosis, diabetes mellitus, diálisis extracorpórea y oxigenación de la sangre, lesiones por isquemia-reperfusión, toxicidad inducida por la administración *in vivo* de citocinas o anticuerpos monoclonales terapéuticos, síndrome de dolor crónico y dolor 50 neuropático y/o inflamatorio.

FIGURA 1

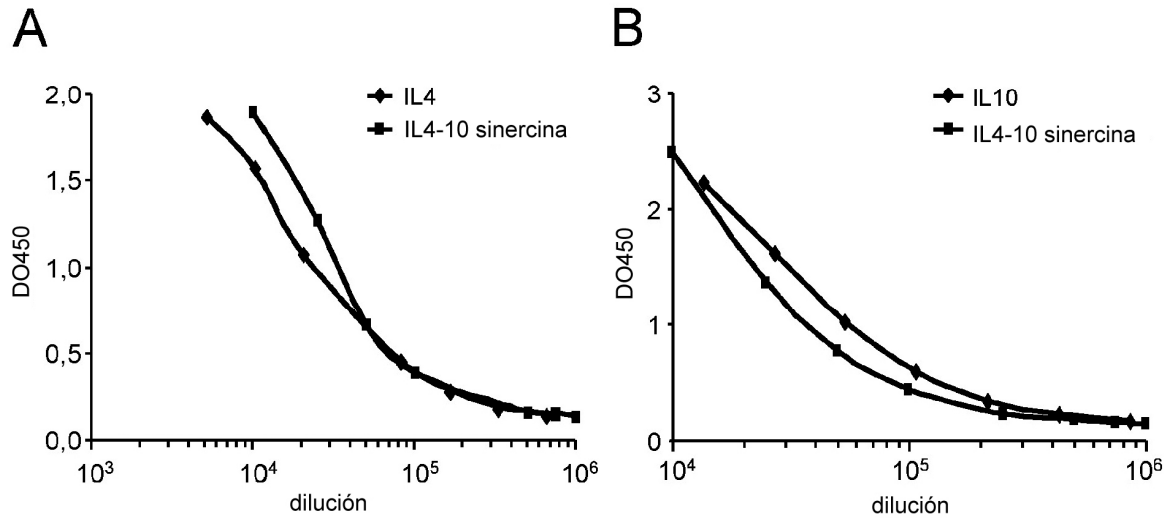


FIGURA 2

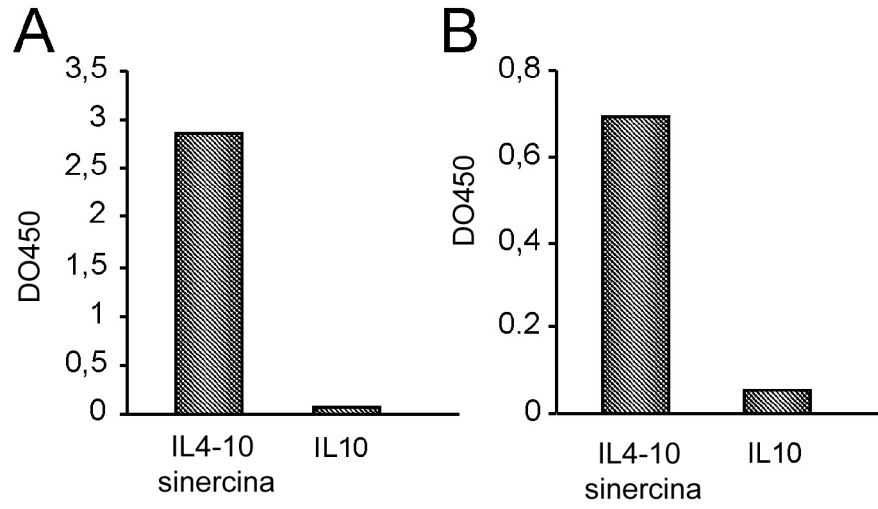


FIGURA 3

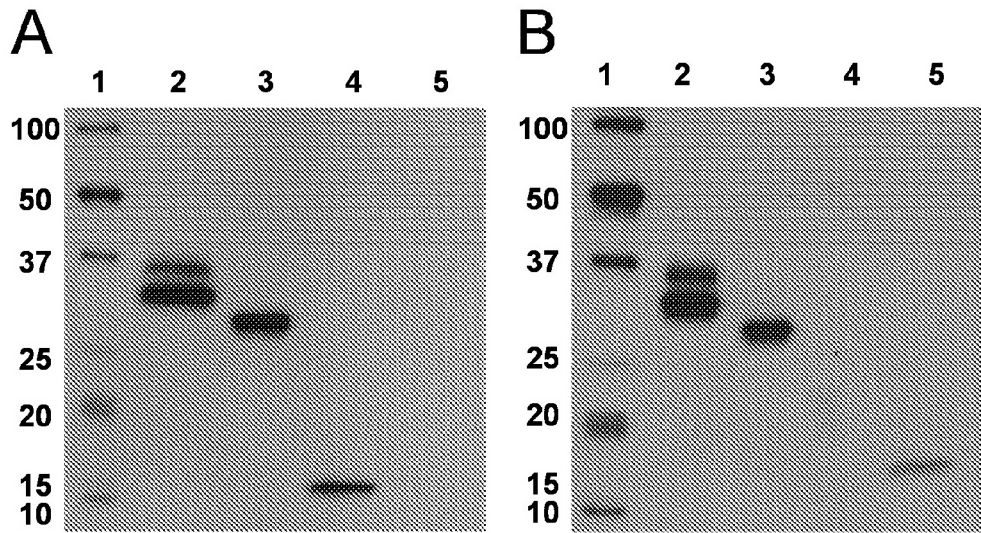


FIGURA 4

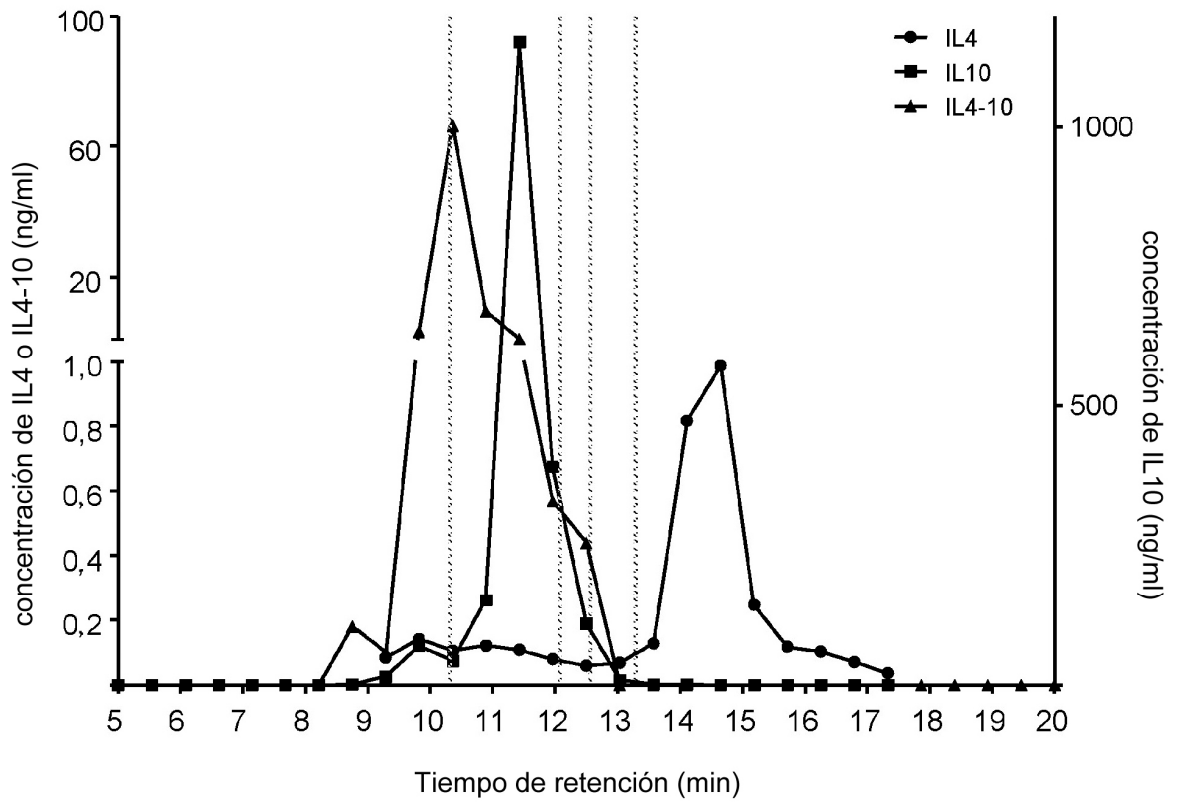


FIGURA 5

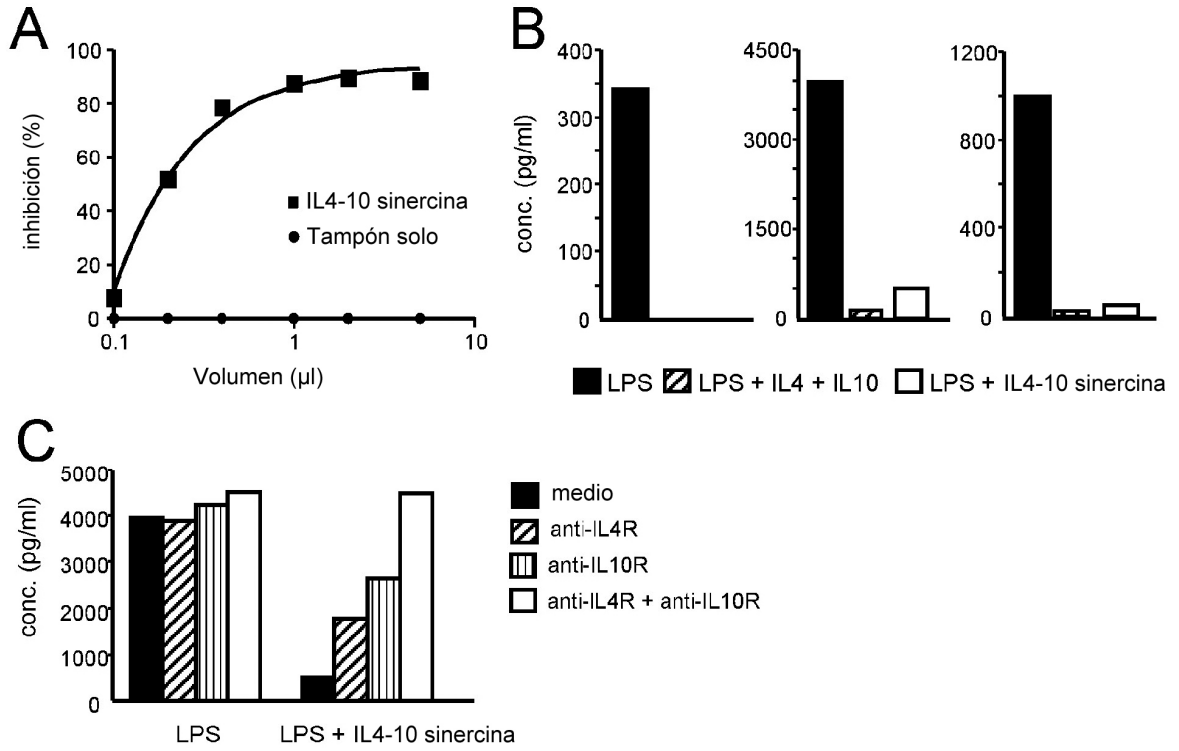


FIGURA 6

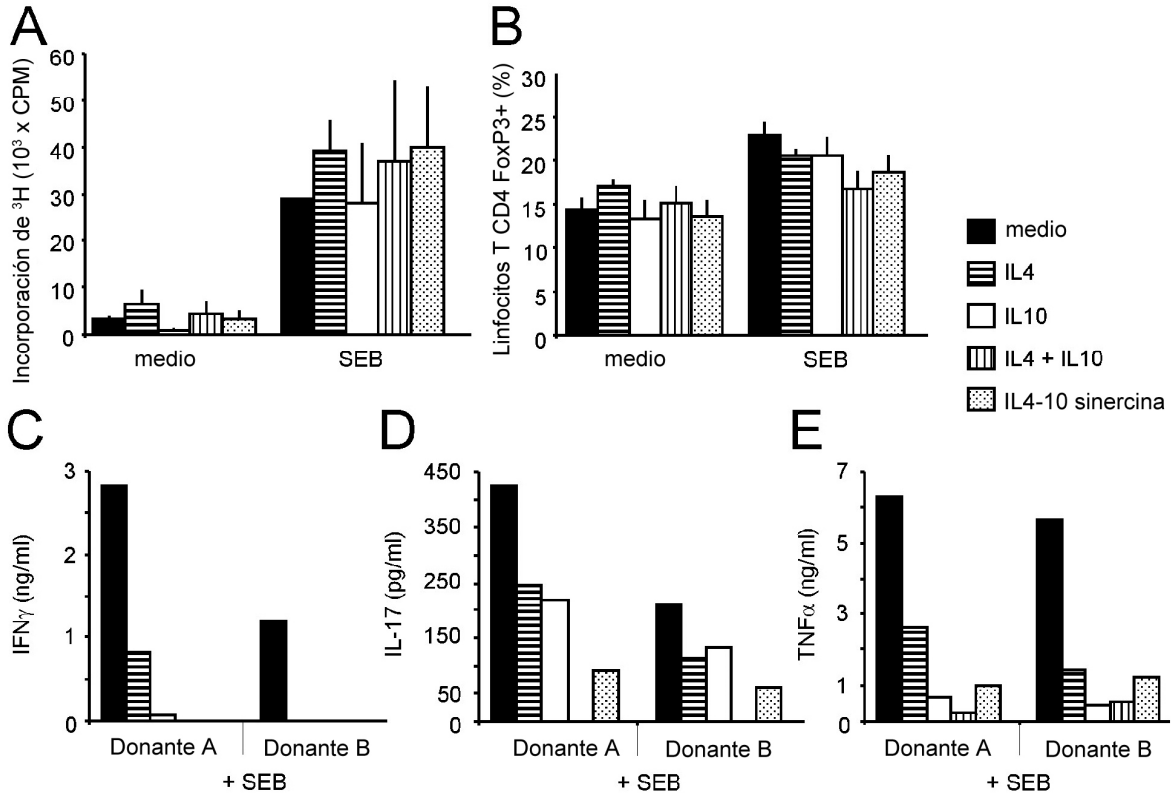


FIGURA 7

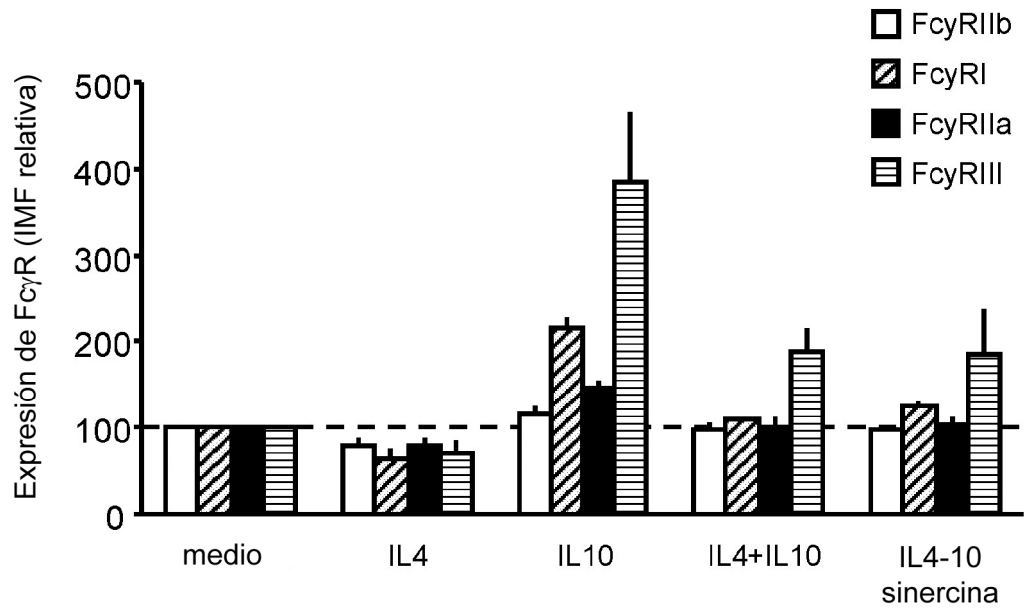


FIGURA 8

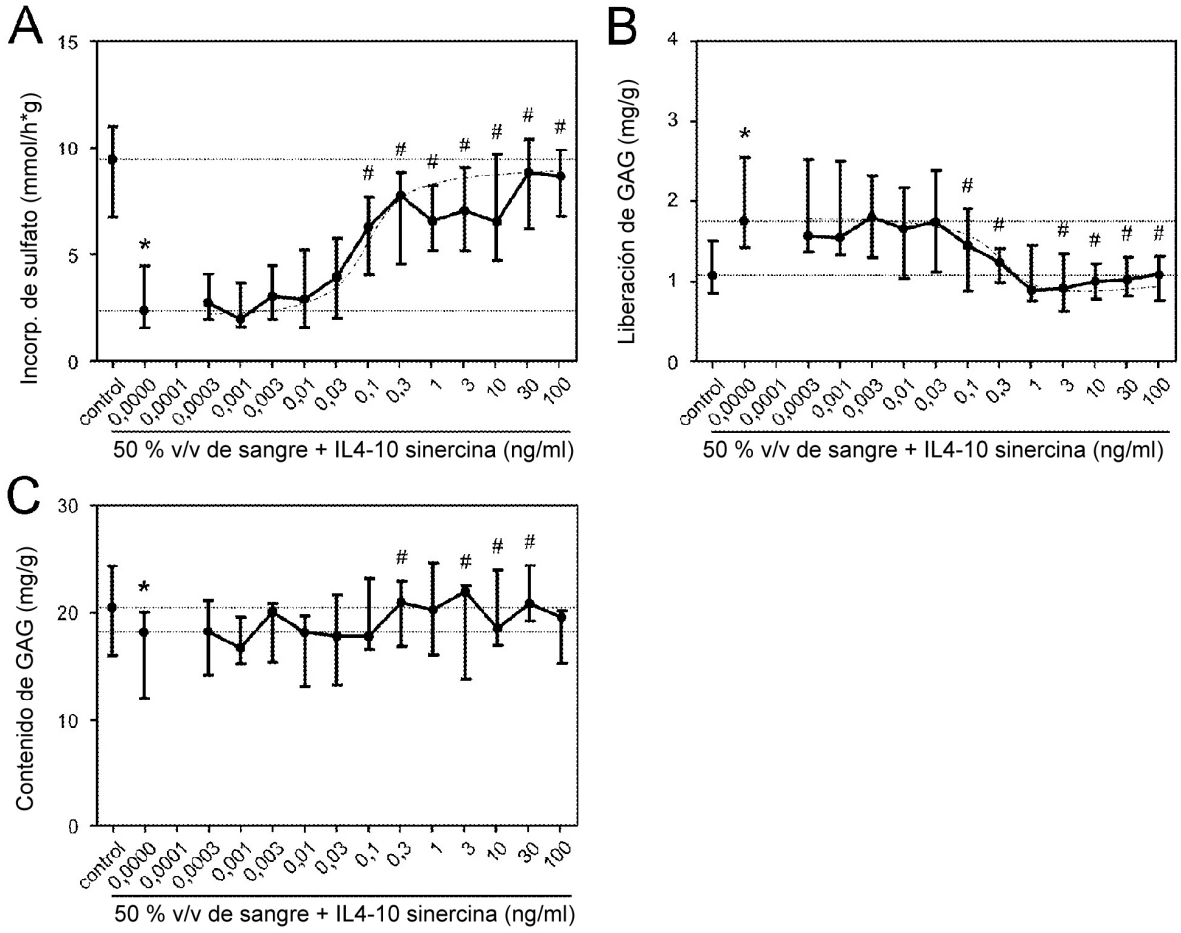


FIGURA 9

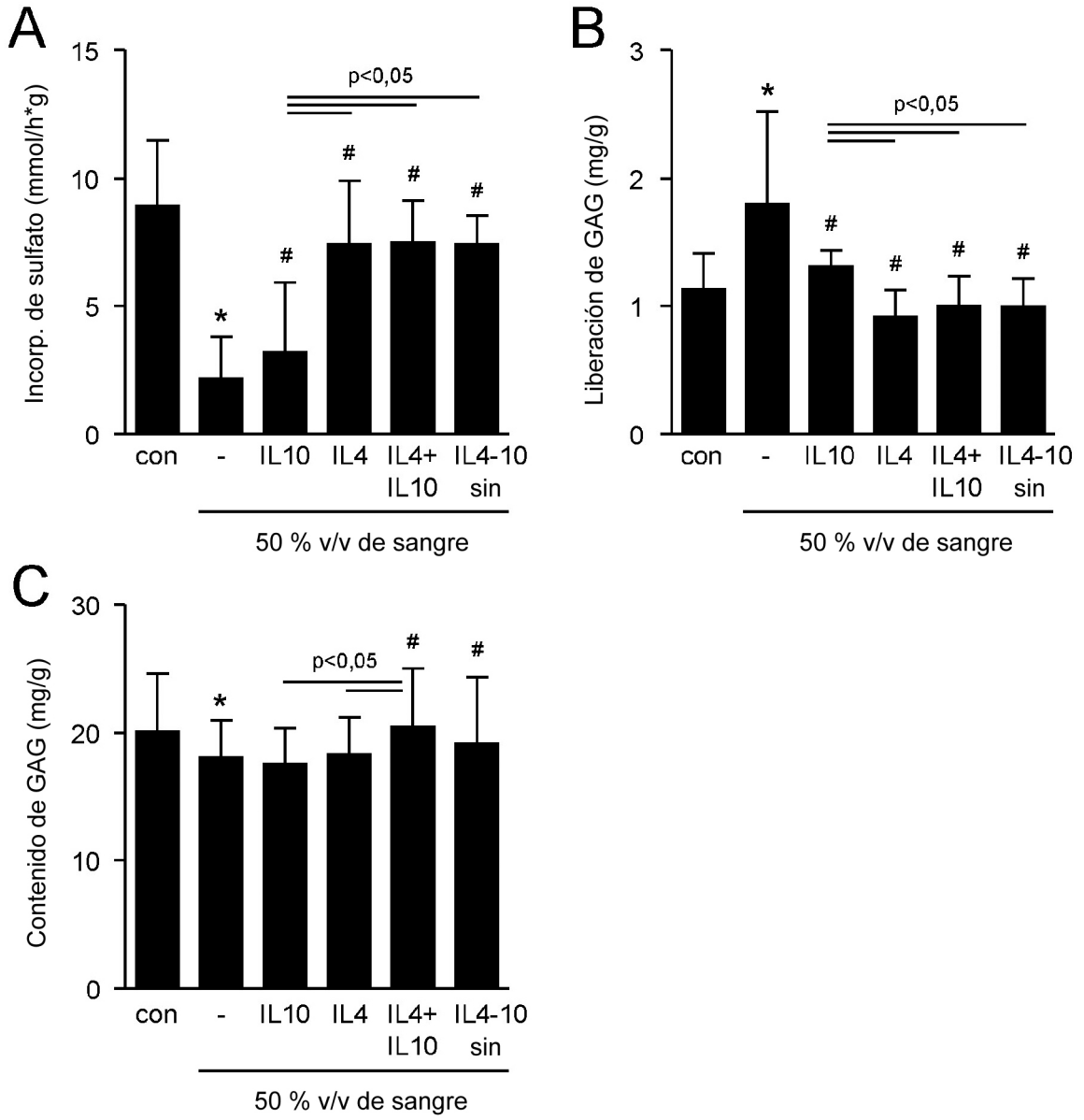


FIGURA 10

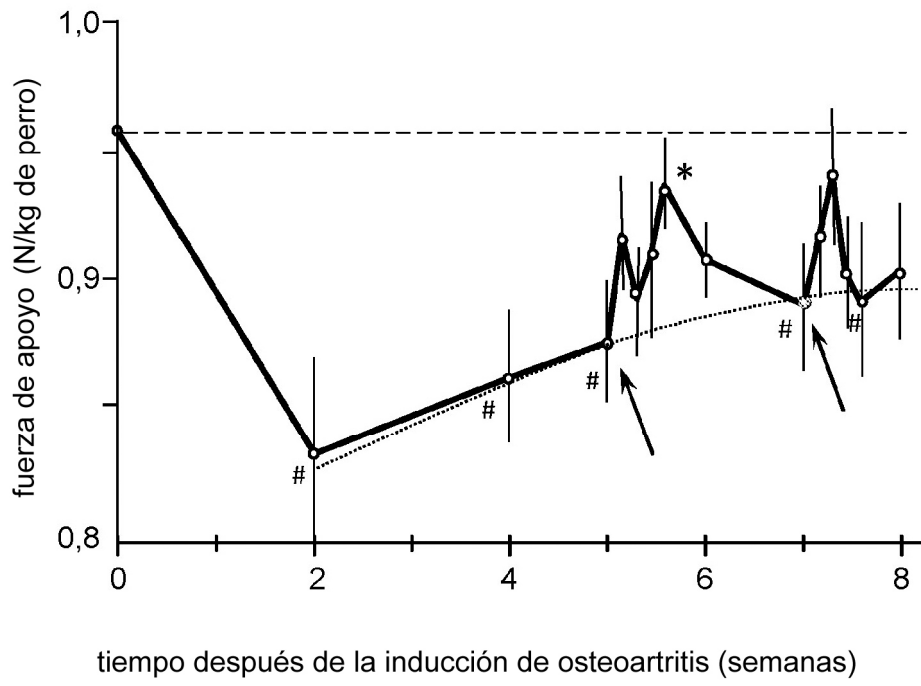


FIGURA 11

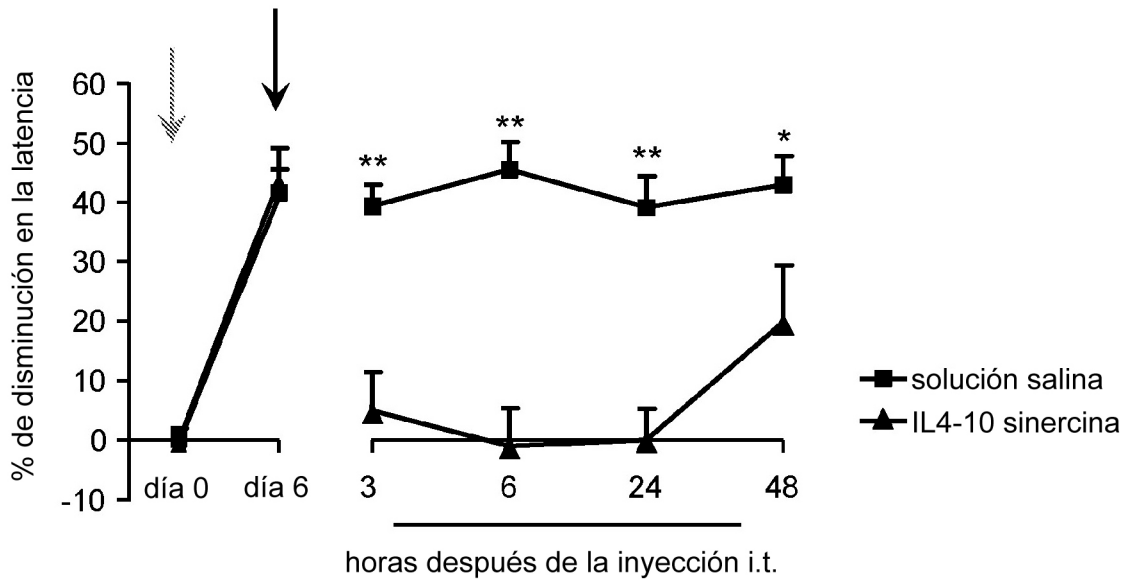


FIGURA 12

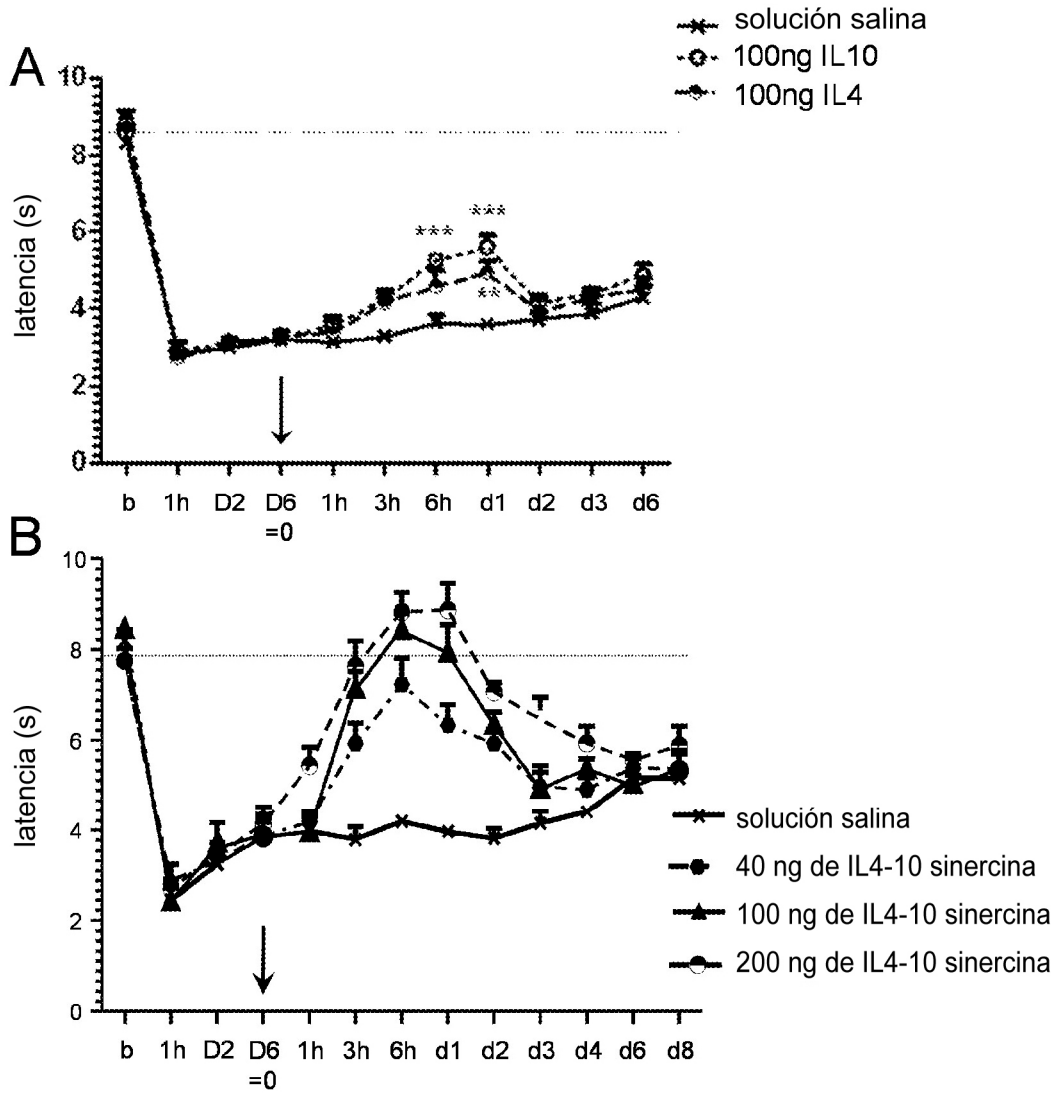


FIGURA 13

