



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 139 759**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

86 Número de solicitud europea: **94930818 .3**

86 Fecha de presentación : **19.10.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0726954**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.08.1996**

54 Título: **Antagonistas de citoquina.**

30 Prioridad: **20.10.1993 US 140222**

45 Fecha de publicación de la mención y de la
traducción de patente europea: **16.02.2000**

45 Fecha de la publicación de la mención de la
patente europea modificada BOPI: **16.11.2007**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente
europea modificada: **16.11.2007**

73 Titular/es: **REGENERON PHARMACEUTICALS, Inc.**
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591-6707, US

72 Inventor/es: **Stahl, Neil;**
Economides, Aris y
Yancopoulos, George, D.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 139 759 T5

DESCRIPCIÓN

Antagonistas de citoquina.

5 Fundamento del invento

Aunque descubiertos por actividades biológicas variables, el factor neurotrófico ciliar (CNTF; del inglés, ciliary neurotrophic factor), el factor inhibidor de la leucemia (LIF; del inglés, leukemia inhibitory factor), la oncostatina M (OSM) y la interleuquina 6 (Il-6) comprenden una familia de citoquinas recién definida (aquí denominada “familia CNTF” de citoquinas). Estas citoquinas están conjuntamente agrupadas a causa de sus lejanas similitudes estructurales [Bazan, J. Neuron 7: 197-208 (1991); Rose y Bruce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8.641-8.645 (1991)] y, quizás más importantemente, a causa de que comparten componentes β del receptor, transductores de señales [Baumann *et al.*, J. Biol. Chem. 265: 19.853-19.862 (1993); Davis *et al.*, Science 260: 1.805-1.808 (1993); Gearing *et al.*, Science 255: 1.434-1.437 (1992); Ip *et al.*, Cell 69: 1.121-1.132 (1992); Stahl *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 7.628-7.631 (1993); Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. La activación de receptores por esta familia de citoquinas es el resultado de la homodimerización o heterodimerización de estos componentes β [Davis *et al.*, Science 260: 1.805-1.808 (1993); Murakami *et al.*, Science 260: 1.808-1.810 (1993); Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. La activación del receptor de IL-6 requiere la homodimerización de gp130 [Murakami *et al.*, Science 260: 1.808-1.810 (1993); Hibi *et al.*, Cell 63: 1.149-1.157 (1990)], una proteína inicialmente identificada como el transductor de la señal de IL-6 [Hibi *et al.*, Cell 63: 1.149-1.157 (1990)]. La activación de los receptores de CNTF, LIF y OSM es el resultado de la heterodimerización entre gp130 y una segunda proteína relacionada con gp130, conocida como LIFR β [Davis *et al.*, Science 260: 1.805-1.808 (1993)], que fue inicialmente identificada por su capacidad para unirse a LIF [Gearing *et al.*, EMBO J. 10: 2.839-2.848 (1991)].

Además de los componentes β , algunas de estas citoquinas requieren también componentes “ α ” determinantes de la especificidad que están más limitados que los componentes β en cuanto a su distribución tisular y, por lo tanto, determinan las dianas celulares de las citoquinas particulares [Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. De este modo, LIF y OSM son factores de amplia acción que puede que sólo requieran la presencia de gp130 y LIFR β en las células sensibles, mientras que CNTF requiere CNTFR α [Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)] e IL-6 requiere IL-6R α [Kishimoto *et al.*, Science 258: 593-597 (1992)]. Tanto CNTFR α [Davis *et al.*, Science 259: 1.736-1.739 (1993)] como IL-6R α [Hibi *et al.*, Cell 63: 1.149-1.157 (1990); Murakami *et al.*, Science 260: 1.808-1.810 (1990); Taga *et al.*, Cell 58: 573-581 (1989)] pueden actuar como proteínas solubles, lo que es consistente con la idea de que no interaccionan con moléculas generadoras de señales intracelulares sino que sirven para ayudar a sus ligandos a interaccionar con las apropiadas subunidades β transductoras de señales [Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)].

Evidencia adicional procedente de otros sistemas citoquínicos apoya también la idea de que la dimerización proporciona un mecanismo común mediante el cual todos los receptores citoquínicos inician la transducción de señales. La hormona del crecimiento (GH; del inglés, growth hormone) quizás sirva como el mejor ejemplo a este respecto. Estudios cristalográficos han revelado que cada molécula de GH contiene dos diferentes sitios de unión al receptor, siendo ambos reconocidos por el mismo dominio de unión del receptor, lo que permite que una sola molécula de GH se acople con dos moléculas de receptor [de Vos *et al.*, Science 255: 306-312 (1992)]. La dimerización se produce secuencialmente, uniéndose primero el sitio 1 de la GH a una molécula de receptor y uniéndose luego el sitio 2 a una segunda molécula de receptor [Fuh *et al.*, Science 256: 1.677-1.680 (1992)]. Los estudios con el receptor de la eritropoyetina (EPO) son también consistentes con la importancia de la dimerización en la activación de receptores, ya que los receptores de la EPO pueden ser constitutivamente activados mediante el cambio de un único aminoácido que introduce un resto de cisteína y da lugar a homodímeros enlazados por disulfuro [Watowich *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 2.140-2.144 (1992)].

Además de la homodimerización o heterodimerización de subunidades β como etapa crítica para la activación de los receptores, una segunda característica importante es que la formación del complejo final del receptor por la familia CNTF de citoquinas se produce a través de un mecanismo por el que el ligando se une sucesivamente a componentes del receptor de una manera ordenada [Davis *et al.*, Science 260: 1.805-1.818 (1993); Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. De este modo, el CNTF se une primero a CNTFR α , formando un complejo que se une luego a gp130 para formar un compuesto intermedio (llamado aquí el compuesto intermedio $\alpha\beta 1$) que no es competente en cuanto a generar señales porque sólo tiene un único componente β , antes de capturar finalmente LIFR β para formar un heterodímero de componentes β que inicia entonces la transducción de señales. Aunque no se ha aislado directamente un compuesto intermedio similar que contenga IL-6 unida a IL-6R α y a una sola molécula de gp130, se ha considerado aquí el postulado de que existe por analogía con su lejano compuesto relacionado, el CNTF, así como por el hecho de que el complejo final activo del receptor de IL-6 captura dos monómeros de gp130. En conjunto, estos hallazgos condujeron a la propuesta de la estructura de un complejo genérico del receptor de citoquinas (Figura 1) en que cada citoquina puede tener hasta 3 sitios de unión al receptor: un sitio que se une a un componente α opcional determinante de la especificidad (sitio α), un sitio que se une al primer componente β transductor de señales (sitio $\beta 1$) y un sitio que se une al segundo componente β transductor de señales (sitio $\beta 2$) [Stahl y Yancopoulos, Cell 74: 587-590 (1993)]. Estos 3 sitios se utilizan de un modo secuencial, siendo la última etapa de la formación del complejo, la que da lugar a la dimerización de los componentes β , crítica para que se inicie la transducción de señales [Davis *et al.*, Science 260: 1.805-1.818 (1993)].

Una vez que la unión de la citoquina provoca la formación del complejo del receptor, la dimerización de los componentes β activa la actividad tirosina quinasa intracelular que da lugar a la fosforilación de una gran variedad de sustratos [Ip *et al.*, Cell 69: 121-1.132 (1992)]. Parece que esta activación de la tirosina quinasa es crítica para sucesos aguas abajo, ya que inhibidores que bloquean las fosforilaciones de tirosinas también impiden sucesos posteriores tales como inducciones génicas [Ip *et al.*, Cell 69: 121-1.132 (1992); Nakajima y Wall, Mol. Cell. Biol. 11: 1.409-1.418 (1991)]. Recientemente se ha demostrado que tirosina quinasas no pertenecientes a receptores recién descubiertas, que componen una familia que incluye Jak1, Jak2 y Tyk2 (denominadas quinasas Jak/Tyk) [Firmbach-Kraft *et al.*, Oncogene 5: 1.329-1.336 (1990); Wilks *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11: 2.057-2.065 (1991)] y que están implicadas en la transducción de señales con otras citoquinas [Cell 74: 237-244 (1993); Silvennoinen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (en prensa; 1993); Velázquez *et al.*, Cell 70: 313-322 (1992); Witthuhn *et al.*, Cell 74: 227-236 (1993)], se preasocian con los dominios citoplásmicos de las subunidades β gp130 y LIFR β en ausencia del ligando y llegan a tirosina-fosforilarse y a activarse tras la adición del ligando [Stahl *et al.*, Science (presentado; 1993)]. Por lo tanto, parece que estas quinasas son la etapa más próxima a la transducción intracelular de señales que se activa dentro de la célula como resultado de la unión del ligando fuera de la célula. Más adelante se describen sistemas de ensayo para analizar colecciones de pequeñas moléculas en cuanto a sus actividades agonistas o antagonistas específicas basadas en este sistema.

Además, Brakenhoff *et al.* (Cytokine, volumen 3, n° 5, página 496, resumen 279) han identificado dos regiones de la molécula de Il-6 que son importantes para su bioactividad y son reconocidas por dos grupos (I y II) de anticuerpos monoclonales (mAb; del inglés, monoclonal Antibody) neutralizantes. Brakenhoff *et al.* hallaron que el sitio I (reconocido por mAbs del grupo I) estaba implicado en la unión a la cadena de 80 kDa del receptor de Il-6, mientras que el grupo II está implicado en la interacción del complejo Il-6/80 kDa con la cadena gp130 transductora de señales. Los mAbs del grupo II se unen alrededor del resto Trp 158 de Il-6. Una mutagénesis aleatoria alrededor de Trp 158 dio lugar al aislamiento de diversos mutantes que se unían a mAbs del grupo I pero no a mAbs del grupo II y que eran biológicamente activos según mediciones en un ensayo con el hibridoma B9 murino. Dos de estos mutantes fallaron a la hora de ocasionar la producción de IgG1 cuando se ensayaron en células CESS humanas, y uno de estos dos mutantes fue capaz de inhibir la actividad de la Il-6 de tipo salvaje para generar IgG1 y también de inhibir la síntesis de fibrinógeno y de inhibidor de C1, ocasionada por Il-6, en células Hen G2 humanas.

La familia CNTF de citoquinas desempeña funciones importantes en una gran variedad de procesos fisiológicos que proporcionan posibles aplicaciones terapéuticas tanto para antagonistas como para agonistas.

Sumario del invento

El invento proporciona una proteína antagonista de citoquinas soluble capaz de unirse a una citoquina para formar un complejo no funcional, donde la citoquina activa un receptor por unión primero a un componente α determinante de la especificidad, seguido de unión a componentes transductores de señales $\beta 1$ y después $\beta 2$, antagonista el cual es heterodímero y comprende:

- (a) el componente α soluble, determinante de la especificidad, del receptor de la citoquina, y
- (b) un dominio extracelular de un componente $\beta 1$ del receptor de la citoquina.

Preferiblemente, la citoquina es Il-6 o CNTF.

Preferiblemente, el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130.

Más preferiblemente, la citoquina es CNTF, el componente α (a) es sCNTFR α , y el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130; o la citoquina es Il-6, el componente α (a) es sIl-6R α , y el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130.

El invento proporciona también composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína del invento junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El invento proporciona también una proteína del invento en que la citoquina es Il-6, el componente α (a) es sIl-6R α , y el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130, para uso en un método para tratar un trastorno relacionado con Il-6, para uso en el tratamiento de la osteoporosis en un paciente desprovisto de estrógenos, y para uso en el tratamiento del mieloma múltiple y la caquexia.

Un objeto del presente invento es la producción de antagonistas de Il-6 que sean útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con Il-6.

Otro objeto del invento es el uso de los aquí descritos antagonistas de Il-6 para el tratamiento de la osteoporosis.

Otro objeto del invento es el uso de los aquí descritos antagonistas de Il-6 para el tratamiento de los efectos tanto primarios como secundarios de cánceres, incluido el mieloma múltiple.

Aún otro objeto del invento es el uso de los aquí descritos antagonistas de Il-6 para el tratamiento de la caquexia.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: unión ordenada de componentes de receptores en un modelo de un receptor genérico de citoquinas. El modelo indica que las citoquinas contienen hasta 3 sitios de unión al receptor e interaccionan con los componentes de su receptor uniéndose primero al componente α opcional, luego a $\beta 1$ y después a $\beta 2$. Los componentes β de muchos receptores de citoquinas interaccionan a través de regiones próximas a la membrana (recuadros sombreados) con la familia Jak/Tyk de tirosina quinasas citoplásmicas. Sólo se inicia la transducción de señales tras la dimerización de los componentes β , como se esquematiza por las tirosina-fosforilaciones (P; del inglés, phosphorylation) de los componentes β y de las quinasas Jak/Tyk.

Figura 2: El CNTF inhibe las respuestas a Il-6 en una línea celular PC12 (llamada PC12D) que expresa Il-6R α , gp130 y CNTFR α pero no LIFR β . Células PC12D privadas de suero fueron incubadas + Il-6 (50 ng/ml) en presencia o ausencia de CNTF, según se indica. Algunas placas recibieron también Il-6R α soluble (1 mg/ml) o CNTFR α soluble (1 mg/ml), según se indica. Se sometieron productos celulares de lisis a inmunoprecipitación con anti-gp130 y a inmunotransferencia con anti-fosfotirosina. La tirosina-fosforilación de gp130 es indicativa de la activación del sistema receptor de Il-6 provocada por Il-6, la cual es bloqueada tras la coadición de CNTF.

Figura 3: Análisis de Scatchard relativo a la unión de CNTF yodado a células PC12D. Se incubaron células PC12D con CNTF yodado, en diversas concentraciones, en presencia o ausencia de un competidor no radiactivo en exceso para determinar la unión específica. La Figura muestra una representación de Scatchard relativa a la cantidad de CNTF yodado específicamente unido y proporciona datos consistentes con dos sitios de unión con constantes de disociación de 9 pM y 3,4 nM.

Descripción detallada del invento

El invento aquí descrito contempla la producción de antagonistas de cualquier citoquina que utilice un componente α determinante de la especificidad que, cuando se combina con la citoquina, se une a un primer componente β transductor de señales con objeto de formar un compuesto intermedio no funcional que se une luego a un segundo componente β transductor de señales para causar la dimerización de los receptores β y la consiguiente transducción de señales. De acuerdo con el invento, el componente α soluble, determinante de la especificidad, del receptor (sR α) y el dominio extracelular del primer componente β transductor de señales del receptor citoquinico ($\beta 1$) se combinan para formar heterodímeros (sR α : $\beta 1$) que actúan como antagonistas de la citoquina al unirse a la citoquina para formar un complejo no funcional.

Como se describe en el Ejemplo 1, CNTF e Il-6 comparten el componente $\beta 1$ gp130 del receptor. El hecho de que CNTF forme un compuesto intermedio con CNTFR α y gp130 puede ser demostrado (Ejemplo 1) en células que carecen de LIFR β , en las que el complejo de CNTF y CNTFR α se une a gp130 e impide la homodimerización de gp130 por Il-6 e Il-6R α , bloqueándose de este modo la transducción de señales. Estos estudios proporcionan la base para el desarrollo de los antagonistas de Il-6 aquí descritos ya que muestran que si, en presencia de un ligando, puede formarse un complejo intermedio no funcional que consista en el ligando, el componente α de su receptor y el componente $\beta 1$ de su receptor, dicho complejo bloqueará eficazmente la acción del ligando. Pueden usarse otras citoquinas distintas de los componentes $\beta 1$ del receptor las cuales pueden ser también utilizadas para producir antagonistas de acuerdo con el presente invento.

De este modo, por ejemplo, en una realización del invento, los antagonistas eficaces de Il-6 o CNTF consisten en heterodímeros de los dominios extracelulares de los componentes α , determinantes de la especificidad, de sus receptores (sIl-6R α y sCNTFR α respectivamente) y el dominio extracelular de gp130. Los heterodímeros resultantes, que en adelante son denominados sIl-6R α : $\beta 1$ y sCNTFR α : $\beta 1$ respectivamente, actúan como trampas de elevada afinidad para IL-6 o CNTF respectivamente, haciendo por ello que la citoquina sea inaccesible para formar un complejo transductor de señales con las formas nativas, unidas a la membrana, de sus receptores.

Aunque se ha demostrado que dominios solubles de unión a ligandos, de la porción extracelular de los receptores, son algo eficaces como trampas para sus ligandos y, por lo tanto, actúan como antagonistas [Bargetzi *et al.*, Cancer Res. 53: 4.010-4.013 (1993); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8.616-8.620 (1992); Mohler *et al.*, J. Immunol. 151: 1.548-1.561 (1993); Narazaki *et al.*, Blood 82: 1.120-1.126 (1993)], los receptores de Il-6 y CNTF son peculiares porque los componentes α del receptor constituyen dominios de unión a ligandos que, junto con sus ligandos, actúan eficazmente en forma soluble como agonistas de receptores [Davis *et al.*, Science 259: 1.736-1.739 (1993); Taga *et al.*, Cell 58: 573-581 (1989)]. Los heterodímeros sR α : $\beta 1$ preparados de acuerdo con el presente invento proporcionan trampas eficaces para sus ligandos, uniéndose a estos ligandos con afinidades en el intervalo picomolar (basadas en estudios de unión de CNTF a células PC12D) sin crear compuestos intermedios funcionales.

Los dominios extracelulares α y $\beta 1$ del receptor pueden ser preparados usando métodos conocidos por los expertos en la técnica. El receptor CNTFR α ha sido clonado, secuenciado y hecho expresar [Davis *et al.* (1991), Science 253: 59-63; documento que se incorpora aquí en su totalidad por referencia]. Las clonaciones de LIFR β y gp130 son descritas por Gearing *et al.* en EMBO J. 10: 2.839-2.848 (1991), y por Hibi *et al.* en Cell 63: 1.149-1.157 (1990), y en la solicitud PCT publicada WO 93/10151, publicada el 27 de mayo de 1993, incorporándose aquí todos los citados documentos en su totalidad por referencia.

Las moléculas de receptor útiles para llevar el presente invento a la práctica pueden prepararse por clonación y expresión en un sistema de expresión procariótico o eucariótico. El gen recombinante del receptor puede ser hecho expresar y ser purificado utilizando diversos métodos. El gen que codifica el factor puede ser subclonado en un vector de expresión bacteriano tal como, por ejemplo, pero no a modo de limitación, pCP110.

Los factores recombinantes pueden purificarse mediante cualquier técnica que permita la subsiguiente formación de una proteína estable y biológicamente activa. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los factores pueden recuperarse de células en forma de proteínas solubles o en forma de cuerpos de inclusión de los que pueden ser cuantitativamente extraídos mediante una disolución 8 M de hidrócloruro de guanidinio y diálisis. Con objeto de purificar adicionalmente los factores, pueden utilizarse cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en fase inversa o filtración en gel convencionales.

Los receptores heterodímeros $sR\alpha:\beta 1$ pueden construirse usando regiones de fusión conocidas, como se describe en la solicitud PCT publicada WO 93/10151, publicada el 27 de mayo de 1993 y titulada "Receptor for Oncostatin M and Leukemia Inhibitory Factor" (Receptor para oncostatina M y el factor inhibidor de la leucemia), en la que se describe la producción de heterodímeros β de receptor, o pueden prepararse mediante entrecruzamiento de dominios extracelulares por medios químicos. Los dominios utilizados pueden consistir en el dominio extracelular completo de los componentes α y $\beta 1$, o pueden consistir en mutantes o fragmentos de los mismos que mantengan la capacidad para formar un complejo con su ligando y otros componentes del complejo $sR\alpha:\beta 1$.

En una realización del invento, los dominios extracelulares se construyen usando cremalleras de leucina. Se ha demostrado que los dominios de cremallera de leucina de los factores de transcripción humanos c-jun y c-fos forman heterodímeros estables [Busch y Sassone-Corsi, Trends Genetics 6: 36-40 (1990); Gentz *et al.*, Science 243: 1.695-1.699 (1989)] con una estequiometría 1:1. Aunque también se ha demostrado que se forman homodímeros jun-jun, estos son aproximadamente 1.000 veces menos estables que los heterodímeros jun-fos. No se han detectado homodímeros fos-fos.

Los dominios de cremallera de leucina de c-jun o de c-fos se fusionan en marco de lectura por el extremo C de los dominios solubles o extracelulares de los susodichos componentes de receptor mediante genes quiméricos genéticamente contruidos. Las fusiones pueden ser directas o en ellas se puede emplear un dominio conector flexible, tal como la región bisagra de una IgG humana, o conectores polipeptídicos que consistan en aminoácidos pequeños tales como glicocola, serina, treonina o alanina, con diversas longitudes y en diversas combinaciones. Además, las proteínas quiméricas pueden ser marcadas mediante His-His-His-His-His-His (His6) [Identificación (ID.) de secuencia (SEQ.) nº 1] para permitir una rápida purificación por cromatografía de metal-quelato, y/o mediante epítomos hacia los que estén disponibles anticuerpos, para permitir su detección en transferencias Western, inmunoprecipitación, o reducción/bloqueo de actividad en bioensayos.

En otra realización, el heterodímero $sR\alpha:\beta 1$ se prepara utilizando un método similar pero usando el dominio Fc de una IgG1 humana [Aruffo *et al.*, Cell 67: 35-44 (1991)]. Por contraste con lo anterior, la formación de heterodímeros debe realizarse bioquímicamente ya que las moléculas quiméricas que lleven el dominio Fc se expresarán como homodímeros unidos por disulfuros. Por lo tanto, los homodímeros pueden ser reducidos bajo condiciones que favorezcan la ruptura de disulfuros intercatenarios pero no afecten a los disulfuros intracatenarios. Los monómeros con diferentes porciones extracelulares se mezclan luego en cantidades equimolares y se oxidan para formar una mezcla de homodímeros y heterodímeros. Los componentes de esta mezcla son separados por técnicas cromatográficas. Alternativamente, la formación de este tipo de heterodímeros puede ser soslayada mediante la construcción y expresión genéticas de moléculas que consistan en la porción soluble o extracelular de los componentes del receptor, seguida del dominio Fc de una IgG humana, seguido de las cremalleras de leucina de c-jun o de c-fos anteriormente descritas [Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148: 1.547-1.553 (1992)]. Puesto que estas cremalleras de leucina forman predominantemente heterodímeros, pueden ser usadas para forzar la formación de los heterodímeros cuando se desee. En cuanto a las proteínas quiméricas descritas al usarse cremalleras de leucina, pueden ser también marcadas con quelatos metálicos o con un epítomo. Este dominio marcado puede ser usado para una rápida purificación mediante cromatografía de metal-quelato, y/o mediante anticuerpos, para permitir su detección en transferencias Western, inmunoprecipitación, o reducción/bloqueo de actividad en bioensayos.

En otra realización del invento, los heterodímeros $sR\alpha:\beta 1$ se preparan mediante su expresión como moléculas quiméricas usando bucles conectores flexibles. Se crea una construcción de DNA que codifique la proteína quimérica, de modo que exprese dos dominios solubles o extracelulares conjuntamente fusionados en tándem ("cabeza con cabeza") mediante un bucle flexible. Este bucle puede ser totalmente artificial (por ejemplo, repeticiones de poliglicocola interrumpidas por serina o treonina con un cierto intervalo) o "prestado" de proteínas presentes en la naturaleza (por ejemplo, la región bisagra de una IgG humana). Pueden construirse moléculas en que el orden de los dominios solubles o extracelulares fusionados esté cambiado (por ejemplo, sII-6R α /bucle/sgp130 o sgp130/bucle/sII-6R α) y/o en que la longitud y la composición del bucle estén variadas, para permitir la selección de moléculas con las características deseadas.

Alternativamente, los heterodímeros preparados de acuerdo con el presente invento pueden ser purificados a partir de líneas celulares cotransfectadas con los componentes α y $\beta 1$ apropiados. Los heterodímeros pueden ser separados de los homodímeros usando métodos al alcance de los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden recuperarse cantidades limitadas de heterodímeros por elución pasiva de geles de poliacrilamida preparativos no desnaturizantes.

Alternativamente, los heterodímeros pueden ser purificados utilizando cromatografía de intercambio catiónico a alta presión. Se ha obtenido una excelente purificación usando una columna Mono S de intercambio catiónico.

Los antagonistas de la familia CNTF aquí descritos se unen a, o compiten con, las citoquinas CNTF e IL-6. En consecuencia, son útiles para tratar enfermedades o trastornos mediados por CNTF o IL-6. Por ejemplo, los usos terapéuticos de los antagonistas de IL-6 incluirían los siguientes:

1) En la osteoporosis, la cual puede resultar exacerbada al reducirse los niveles de estrógenos en mujeres posmenopáusicas o sometidas a ovariectomía, la IL-6 parece ser un mediador crítico de la osteoclastogénesis, conduciendo a resorción ósea [Horowitz, *Science* 260: 626-627 (1993); Jilka *et al.*, *Science* 257: 88-91 (1992)]. Es importante resaltar que parece que la IL-6 sólo desempeña una función importante en el estado desprovisto de estrógenos y que aparentemente está mínimamente implicada en el mantenimiento óseo normal. Consistentemente con esto, una evidencia experimental indica que anticuerpos hacia IL-6, bloqueadores de su función, pueden reducir el número de osteoclastos [Jilka *et al.*, *Science* 257: 88-91 (1992)]. Aunque también se usa la terapia de reposición de estrógenos, parece que hay efectos secundarios que pueden incluir un riesgo aumentado de cánceres de endometrio y mama. Por lo tanto, antagonistas de IL-6 como los aquí descritos serían más específicos para reducir la osteoclastogénesis hasta niveles normales.

2) Parece que la IL-6 está directamente implicada en el mieloma múltiple al actuar de un modo autocrino o paracrino para activar la formación de tumores [van Oers *et al.*, *Ann. Hematol.* 66: 219-223 (1993)]. Además, los altos niveles de IL-6 crean efectos secundarios indeseables, tales como resorción ósea, hipercalcemia y caquexia; en estudios limitados, anticuerpos hacia IL-6 o IL-6R α , bloqueadores de su función, tienen cierta eficacia [Klein *et al.*, *Blood* 78: 1.198-1.204 (1991); Suzuki *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 22: 1.989-1.993 (1992)]. Por lo tanto, antagonistas de IL-6 como los aquí descritos serían beneficiosos tanto para los efectos secundarios como para inhibir el crecimiento tumoral.

3) la IL-6 puede ser un mediador del factor de necrosis tumoral (TNF; del inglés, tumor necrosis factor) que conduce a la caquexia asociada con el SIDA y el cáncer [Strassmann *et al.*, *J. Clin. Invest.* 89: 1.681-1.684 (1992)], quizás al reducir la actividad lipoproteína lipasa en el tejido adiposo [Greenberg *et al.*, *Cancer Research* 52: 4.113-4.116 (1992)]. En consecuencia, los antagonistas aquí descritos serían útiles para aliviar o reducir la caquexia en dichos pacientes.

Las dosis eficaces útiles para tratar éstas u otras enfermedades o trastornos relacionadas con la familia CNTF pueden ser determinadas utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica [véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (La Base Farmacológica de la Terapéutica), compilado por Goodman y Gilman, Macmillan Publishing Company, New York, EE.UU., páginas 1-46 (1975)]. Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con el invento incluyen los anteriormente descritos antagonistas en un vehículo líquido, sólido o semisólido farmacológicamente aceptable, unidos a una molécula portadora o directora (por ejemplo, un anticuerpo, hormona, factor de crecimiento, etc.) y/o incorporados a liposomas, microcápsulas y preparaciones de liberación controlada (incluyendo células que expresan antagonistas) antes de su administración *in vivo*. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender uno o más de los antagonistas en una disolución acuosa, tal como agua, disolución salina, tampón de fosfato o disolución de dextrosa estériles. Alternativamente, los agentes activos pueden estar comprendidos en una formulación sólida (por ejemplo, cérea) o semisólida (por ejemplo, gelatinosa) que puede ser implantada en un paciente que necesite dicho tratamiento. La vía de administración puede ser cualquier modo de administración conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, intravenosamente, intratecalmente, subcutáneamente, por inyección en el tejido afectado, intraarterialmente, intranasalmente, oralmente o por medio de un dispositivo implantado.

La administración puede dar lugar a la distribución del agente activo del invento por todo el cuerpo o en una zona localizada. Por ejemplo, en algunos estados en que están afectadas regiones distantes del sistema nervioso, puede ser deseable la administración intravenosa o intratecal del agente. En algunas situaciones, puede colocarse una implantación que contenga el agente activo en, o cerca de, la zona lesionada. Las implantaciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a, las implantaciones basadas en gelatina esponjosa, cera o micropartículas.

Ejemplo 1

CNTF Compite con IL-6 por unirse a gp130

Materiales y métodos

Materiales: Se obtuvo de DNAX un clon de células PC12 que responden a IL-6 (PC12D). Se preparó CNTF de rata del modo descrito [Masiakowski *et al.*, *J. Neurochem.* 57: 1.003-10.012 (1991)]. La IL-6 y el sIL-6R se obtuvieron de R & D Systems. Se generaron antisueros en conejos frente a un péptido procedente de una región próxima al extremo C de gp130 [secuencia: CGTEGQVERFETVGME (ID. SEQ. n° 2)] mediante el método descrito [Stahl *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 7.628-7.631 (1993)]. De UBI se obtuvo el anticuerpo monoclonal 4G10 anti-fosfotirosina, y de Amersham los reactivos para ECL.

Ensayos de transducción de señales: Se dejaron hambrientas células PC12D en placas (10 cm) con medio exento de suero (RPMI 1640 + glutamina) durante 1 hora, y luego se incubaron durante 5 minutos, a 37°C, con IL-6 (50 ng/ml) + sIL-6R (1 μ g/ml) en presencia o ausencia de CNTF de rata añadido en las concentraciones indicadas. Las muestras

se sometieron luego a inmunoprecipitación con anti-gp130, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, sodium dodecylsulfate), e inmunotransferencia con anti-fosfotirosina del modo descrito [Stahl *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 7.628-7.631 (1993)].

5 Resultados

La capacidad de CNTF para bloquear las respuestas a Il-6 fue medida usando una línea celular PC12 (llamada PC12D) que expresa Il-6R α , gp130 y CNTFR α pero no LIFR β . Como era de esperar, estas células responden a Il-6 pero no a CNTF (Figura 2) puesto que LIFR β es un componente necesario para la transducción de la señal de CNTF [Davis *et al.*, Science 260: 59-63 (1993)]. De acuerdo con los resultados en otras líneas celulares [Ip *et al.*, Cell 69: 121-1.132 (1992)], las células PC12D proporcionan la tirosina-fosforilación de gp130 (así como de una diversidad de otras proteínas llamadas CLIPs) en respuesta a Il-6 2 nM (Figura 2). La adición de Il-6R α soluble (sIl-6R α) recombinante potencia el nivel de la tirosina-fosforilación de gp130, como se ha comunicado en relación con ciertos sistemas diferentes [Taga *et al.*, Cell 58: 573-581 (1989)]. Sin embargo, la adición de CNTF 2 nM simultáneamente con Il-6 disminuye drásticamente la tirosina-fosforilación de gp130. Aunque en presencia de CNTF, Il-6 y sIl-6R α queda una ligera respuesta de fosforilación de gp130, ésta resulta eliminada si la concentración de CNTF es aumentada cuatro veces, hasta 8 nM. Por lo tanto, en células sensibles a Il-6 que contienen CNTFR α pero no LIFR β , el CNTF es un antagonista bastante potente de la acción de Il-6.

20 Ejemplo 2

Unión de CNTF al CNTFR α : β

Materiales y métodos

Análisis de Scatchard relativo a la unión de CNTF: Se preparó y purificó ¹²⁵I-CNTF del modo descrito [Stahl *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 7.628-7.631 (1993)]. Se llevaron a cabo estudios de unión a saturación en células PC12 usando concentraciones de ¹²⁵I-CNTF comprendidas en el intervalo de 20 pM a 10 nM. La unión se llevó directamente a cabo sobre una monocapa de células. Se separó el medio de los pocillos y se lavaron una vez las células con tampón de ensayo que consistía en disolución salina tamponada con fosfato [PBS (del inglés, phosphate buffered saline); pH de 7.4], bacitracina 0,1 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, 1 μ g/ml de leupeptina, y 1 mg/ml de seroalbúmina bovina. Se incubaron las células con ¹²⁵I-CNTF durante 2 horas a temperatura ambiental, lo que fue seguido de 2 rápidos lavados con tampón de ensayo. Se sometieron las células a lisis con PBS que contenía SDS al 1%, y se sometió el producto de lisis a cuenta en un contador Packard de partículas gamma con una eficacia de 90-95%. La unión inespecífica resultó definida por la presencia de CNTF no marcado en un exceso de 100 veces. La unión específica estaba comprendida en el intervalo de 70% a 95%.

Resultados

La constante de equilibrio para la unión de CNTF a CNTFR α : β 1 fue estimada del análisis de Scatchard relativo a la unión de CNTF yodado a células PC12D (Figura 3). Los datos son consistentes con un ajuste de 2 sitios que tienen constantes de disociación de 9 pM y 3,4 nM. El sitio de baja afinidad corresponde a la interacción de CNTF con CNTFR α , la cual tiene una Kd próxima a 3 nM [Panayotatos *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 19.000-19.003 (1993)]. Aquí se interpreta que el complejo de alta afinidad es el compuesto intermedio que contiene CNTF, CNTFR α y gp130. Una línea celular de sarcoma de Ewing (EW-1) que contiene CNTFR α , gp130 y LIFR β y, por lo tanto, proporciona una intensa fosforilación de tirosinas en respuesta a CNTF, presenta un ajuste de dos sitios muy similar con constantes de disociación de 1 nM y 10 pM (Wong *et al.*, datos no publicados). Por lo tanto, es evidente que el CNTF se une con una afinidad igualmente elevada a un complejo que sólo contenga CNTFR α y gp130, que a un complejo que contenga además LIFR β , lo que demuestra la viabilidad de crear los antagonistas de sR α : β 1 aquí descritos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína antagonista de citoquinas soluble capaz de unirse a una citoquina para formar un complejo no funcional, donde la citoquina activa un receptor por unión primero a un componente α determinante de la especificidad, seguido de unión a componentes transductores de señales $\beta 1$ y después $\beta 2$, antagonista el cual es heterodímero y comprende:
 - (a) el componente α soluble, determinante de la especificidad, del receptor de la citoquina, y
 - 10 (b) un dominio extracelular de un componente $\beta 1$ del receptor de la citoquina.
2. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la citoquina es la interleuquina 6 (Il-6) o el factor neurotrófico ciliar (CNTF).
- 15 3. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130.
4. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en la que la citoquina es CNTF, el componente (a) es sCNTFR α , y el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130.
- 20 5. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en la que la citoquina es Il-6, el componente α (a) es sIl-6R α , y el dominio extracelular (b) es el dominio extracelular de gp130.
- 25 6. Una secuencia de DNA que codifica una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 8. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en un método para tratar una enfermedad o un trastorno relacionados con Il-6.
9. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en un método para tratar la osteoporosis en un paciente desprovisto de estrógenos.
- 35 10. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en un método para tratar el mieloma múltiple en un paciente.
11. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en un método para tratar la caquexia en un paciente.

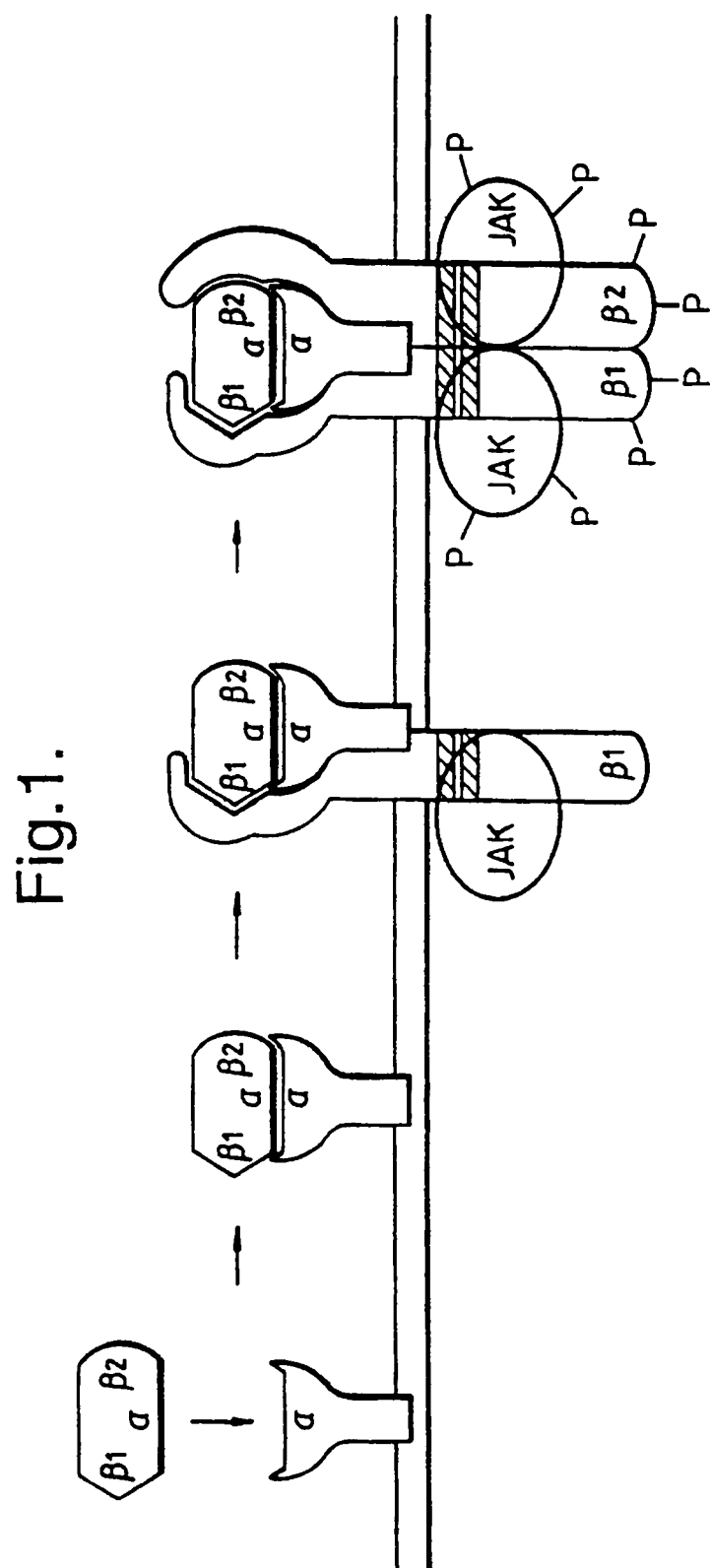


Fig.2.

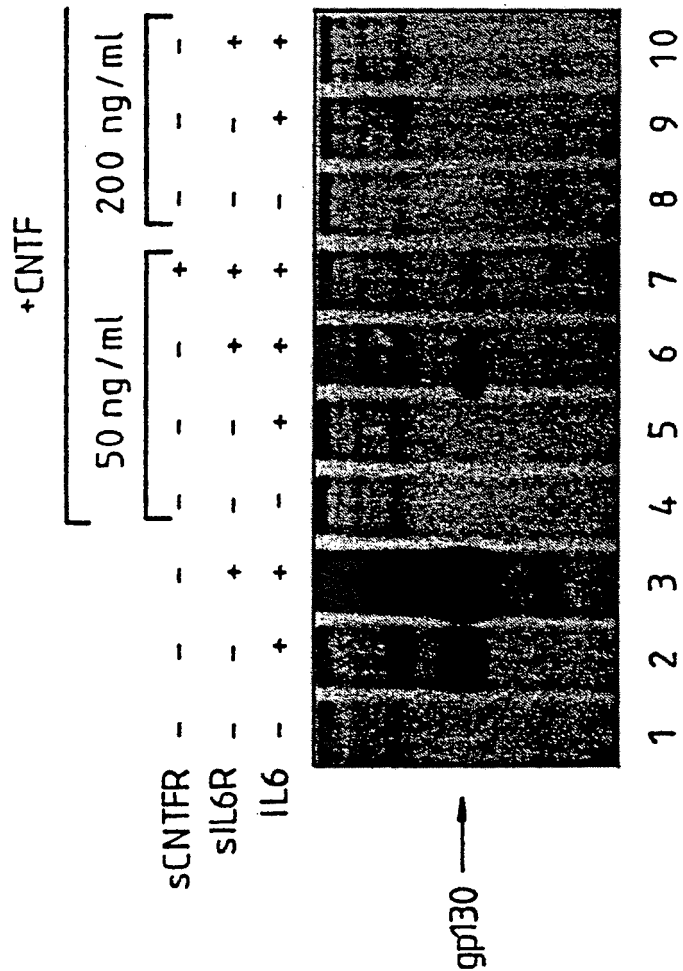
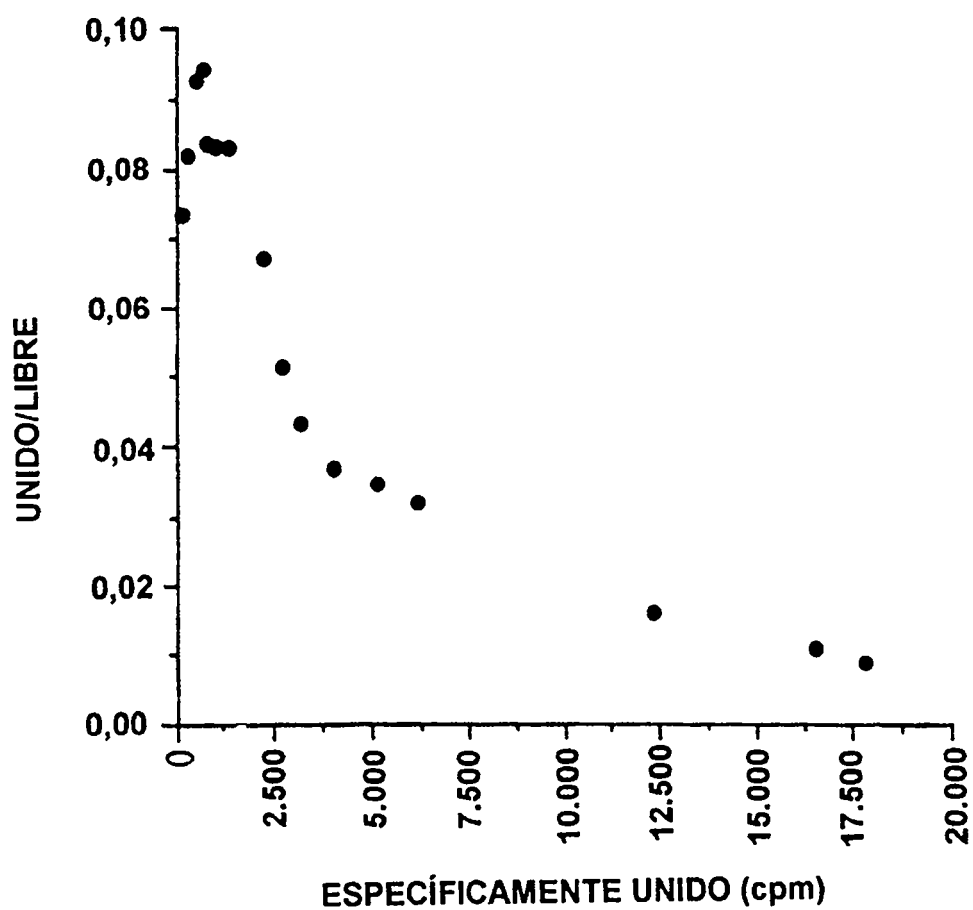


Fig.3.



ES 2 139 759 T5

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(ii) TÍTULO DEL INVENTO: Antagonistas de la familia CNTF
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
10 (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
(A) DESTINATARIO: Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
(B) CALLE: 777 Old Saw Mill River Road
15 (C) CIUDAD: Tarrytown
(D) ESTADO: New York
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) CÓDIGO POSTAL: 10591
20 (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR
(A) TIPO DE MEDIO: disco flexible
(B) ORDENADOR: compatible con ordenador personal IBM
25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, versión nº 1.25
(vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD
30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
35 (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:
(A): NOMBRE: Dr. Gail M. Kempler
(B): NÚMERO DE REGISTRO: 32,143
40 (C): NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: REG200
(ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
(A): TELÉFONO: 914-345-7400
45 (B): TELEFAX: 914-345-7721

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEQ. Nº 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
50 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADENA: desconocido
55 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEQ. Nº 1:
60 His His His His His His
1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEQ. Nº 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

ES 2 139 759 T5

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: desconocido

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEQ. N° 2:

10

Cys Gly Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly
1 5 10

Met Glu
15

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65