

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0713063-5 A2**

(22) Data de Depósito: 29/06/2007
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 19/00
C07K 14/705

(54) **Título:** DÍMEROS SGP130FC APERFEIÇOADOS

(30) **Prioridade Unionista:** 30/06/2006 EP 06 013668.6

(73) **Titular(es):** Conaris Research Institute AG

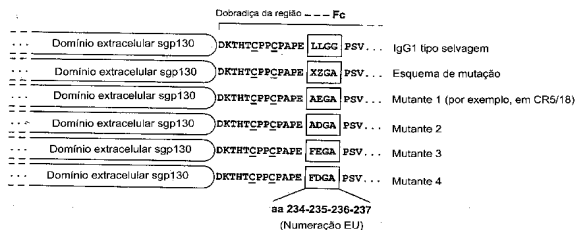
(72) **Inventor(es):** Dirk Seegert, Georg H. Wätzig

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007005812 de
29/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2008/000516de
03/01/2008

(57) **Resumo:** DÍMEROS SGP130FC APERFEIÇOADOS. A presente invenção refere-se a dímeros polipeptídeos compreendendo duas moléculas gp130 solúveis, em que cada uma das ditas moléculas é fundida a um domínio Fc de uma proteína IgG1 e em que a região articulada do domínio Fc é modificada resultando em vantajosas propriedades do dímero. Em uma modalidade particularmente preferida, a região articulada compreende a motivo sequência de aminoácidos Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇. Além disso, uma composição farmacêutica contendo o dito dímero e vários usos médicos são descritos.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"DÍMEROS SGP130FC APERFEIÇOADOS"**.

A presente invenção refere-se a um dímero de polipeptídeo compreendendo duas moléculas gp130 solúveis cada uma estando fundida a um domínio Fc de uma proteína IgG1, em que a região articulada do domínio Fc é modificada resultando em vantajosas propriedades do dímero. A presente invenção também refere-se a uma composição farmacêutica contendo o dito dímero e vários usos médicos.

A interleucina-6 citocina pleiotrópica (IL-6) mostra um amplo espectro de funções biológicas entre as quais estimulação de células B e indução de síntese de proteína de fase aguda em fígado são principalmente notáveis. IL-6 exerce sua atividade sobre células-alvo através de ligação a um receptor de superfície específico de IL-6 (IL-6R). Este complexo de receptor / ligante facilita homodimerização de gp130, a segunda subunidade do complexo de receptor de IL-6. Dimerização de gp130 resulta em transdução de um sinal IL-6. Formas solúveis da IL-6R (sIL-6R) que são geradas por dois mecanismos (alternativa união e separação) também são capazes de disparar dimerização de gp130 e sinalização quando complexadas com IL-6.

Uma vez que a porção citoplásmica da IL-6R não contribui para transdução de sinal, sinalização por um homodímero gp130 pode ser induzida por IL-6 em complexo com IL-6R solúvel ou ligada à membrana. A presença de sIL-6R, entretanto, conduz à sensibilização de células responsivas a IL-6 na direção de ligante. Além disso, células hibridoma dependentes estritamente de IL-6 não proliferam em resposta a quantidades muito baixas de IL-6 quando sIL-6R presente nos meios de cultura é continuamente removida.

Inicialmente descrita como o transdutor de sinal interleucina-6, gp130 é uma cadeia transdutora compartilhada por muitas citocinas, tais como IL-6, IL-11, fator de inibição de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM) e fator neurotrófico ciliar (CNTF). Todas estas citocinas atuam através de um complexo receptor bi- ou tri-partite no qual sinalização é disparada por homodimerização (para IL-6) ou heterodimerização de gp130 com LIF-R (para

LIF, CT-1, OSM, CLC e CNTF) ou OSM-R (para OSM). Estas citocinas assim podem mediar similares atividades biológicas em vários tecidos.

Embora gp130 possa ser encontrada sobre aproximadamente todos os tipos de células, a IL-6R mostra uma expressão muito mais restrita.

5 A liberação de sIL-6R por um tipo de célula rende outras células, que somente expressam gp130, responsivas a IL-6. Este cenário é chamado trans-sinalização. Realmente, várias atividades celulares foram descritas as quais requerem o complexo de sIL-6R e IL-6 e não são vistas com IL-6 sozinha. Proteína gp130 solúvel é encontrada em altas concentrações em plasma

10 humano. Recentemente a hiper-IL-6 citocina programadora ("designer-cytokine") (H-IL-6), em que o terminal-C de sIL-6R está covalentemente fundido ao terminal-N de IL-6 madura através de um ligante peptídeo flexível, foi descrita. Como visto com o complexo de IL-6/sIL-6R, H-IL-6 também atua sobre células que somente expressam gp130. Em contraste aos componentes

15 separados, IL-6 e sIL-6R, uma concentração 100 a 1000 vezes menor desta molécula de fusão é suficiente para induzir comparáveis sinais biológicos.

Para o tratamento de várias doenças ou distúrbios, específico bloqueio de respostas IL-6 dependentes de IL-6R solúvel pode ser desejável.

20 Tais doenças incluem ressorção de osso, hipercalcemia, caquexia, tumores ou outros tipos de câncer (por exemplo, câncer de cólon, mieloma múltiplo, linfoma, leucemia, doença de Hodgkin), doenças autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla (MS) ou diabetes tipo 1), doenças inflamatórias ou atópicas (por exemplo, doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatóide,

25 artrite reumatóide juvenil, asma, psoríase, sarcoidose, lupus eritematoso ou uveíte), infecções (por exemplo, por bactérias, vírus, fungos, ou outros patógenos), assim como distúrbios endocrinológicos e doenças metabólicas ou catabólicas (por exemplo, diabetes tipo 2, obesidade, hiperglicemia, ou hipercolesterinemia). Foi verificado que, por exemplo, dímeros sgp130 ou

30 dímeros sgp130Fc são úteis para aplicações terapêuticas.

O problema técnico suportando a presente invenção foi o provimento de aperfeiçoados dímeros sgp130Fc.

A solução do dito problema técnico é obtida através de provimento de modalidades caracterizadas nas reivindicações. Durante os experimentos conduzindo à presente invenção foi verificado que a atividade biológica, capacidade de purificação e estabilidade de proteínas de fusão sgp130Fc dependem significativamente da composição de aminoácido da região articulada entre a sgp130 e a parte Fc. Os aminoácidos 234, 235, e 237 da IgG1-Fc humana (de acordo com numeração EU) sofreram mutação de modo a reduzir ligação de receptor de Fc para este motivo (Duncan et al., Nature (1988), 332: 563-564; Canfield e Morrison, J. Exp. Méd. (1991), 173:1483-1491; Wines et al., J. Immunol. (2000), 164:5313-5318; Sondermann et al., Nature (2000), 406:267). Inesperadamente, através de substituição de Leu₂₃₅ da sequência tipo selvagem Leu₂₃₄-Leu₂₃₅-Gly₂₃₆-Gly₂₃₇ com glutamato (Glu, E) ou aspartato (Asp, D) e, assim, rompendo o motivo hidrofóbico com um aminoácido fortemente hidrofílico (carregado), a atividade biológica e a estabilidade de proteínas de fusão sgp130Fc podem ser aperfeiçoadas. Mutações em posição 234 e 237 adicionam a este efeito. O mutante mais potente apresenta a sequência Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1: Muteínas de região articulada de sgp130Fc

A região articulada inferior de IgG1-Fc humana foi modificada por mutagênese direcionada a sítio. A sequência ideal, como determinada nos experimentos, é "AEGA" (como incorporada no composto CR5/18).

Abreviaturas e símbolos: aa, aminoácido(s); C, cisteínas formando as duas pontes dissulfeto necessárias para dimerização da proteína de fusão Fc; X, alanina (Ala, A) ou fenil alanina (Phe, F); glutamato (Glu, E) ou aspartato (Asp, D).

Figura 2: Curvas de eluição de cromatografia de exclusão de tamanho de sgp130Fc tipo selvagem e CR5/18

CR5/18 mostra uma quantidade significativamente reduzida de agregados (subprodutos) comparado a sgp130Fc tipo selvagem e, assim, um maior rendimento de produto não-contaminado.

Figura 3: Inibição de proliferação induzida por IL-6/sIL-6R de células

BAF3/gp130 por CR5/18 ou sgp130Fc tipo selvagem como determinada por ensaios de viabilidade de célula MTS

CR5/18 é significativamente mais biologicamente ativo que sgp130Fc tipo selvagem (wt) em bloqueio de proliferação disparada por 100
5 ng/mL de IL-6 e 50 ng/mL de sIL-6R. Isto é refletido pela IC₅₀ de CR5/18 (1), que é cerca de metade de IC₅₀ de sgp130Fc (2).

Abreviaturas e símbolos: IC₅₀, concentração com 50% de eficácia inibidora; IL-6, interleucina-6; I/R, IL-6 mais sIL-6R; MTS, substrato que é
10 convertido por células metabolicamente ativas a um produto formazan solúvel absorvendo em 490nm; OD, densidade ótica em 490nm; sIL-6R, receptor de interleucina-6 solúvel.

Assim, a presente invenção refere-se a um dímero de polipeptídeo capaz de inibir a atividade do complexo agonístico IL-6/sIL-6R e compreendendo dois monômeros, em que cada monômero compreende uma
15 molécula de gp130 solúvel ou uma sua variante ou fragmento fundido a um domínio de uma proteína IgG e em que pelo menos um resíduo de aminoácido Leu₂₃₅ da região articulada do domínio Fc é substituído por pelo menos um resíduo aminoácido hidrofílico. Resíduos de aminoácidos hidrofílicos preferidos são Glu e Asp.

20 O termo "solúvel" como aqui usado refere-se a uma molécula de gp130 carecendo de domínio intracelular e, preferivelmente, o domínio transmembrana.

Os dímeros da presente invenção podem ser engenheirados usando processos conhecidos. Os domínios utilizados podem consistir no inteiro domínio extracelular de gp130 ou eles podem consistir em mutantes ou
25 em seus fragmentos que mantêm a habilidade para inibir a atividade do complexo agonístico IL6/sIL-6R. Fragmentos preferidos são fragmentos consistindo pelo menos nos domínios extracelulares D1 a D3.

A expressão "fundida a um domínio Fc de uma proteína IgG" 30 significa que, preferivelmente, o parceiro de fusão do dímero meramente consiste no domínio Fc da proteína IgG1. Entretanto, a parte Fc pode compreender sequências de mais de um isotipo IgG, e seleção de particulares

motivos de sequências para otimizar desejadas funções efetoras está dentro do conhecimento comum na técnica.

Em uma modalidade preferida do dímero de polipeptídeo da presente invenção, o resíduo de aminoácido de região articulada Leu₂₃₄ é substituído por Phe ou Ala.

Em uma modalidade mais preferida do dímero de polipeptídeo da presente invenção, os resíduos de aminoácidos Leu₂₃₄ e/ou Gly₂₃₇ da região articulada são substituídos pelo resíduo de aminoácido Ala.

Em uma modalidade mesmo mais preferida do dímero de polipeptídeo da presente invenção, a região articulada compreende o motivo de sequência de aminoácido Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇ ao invés de Leu₂₃₄-Leu₂₃₅-Gly₂₃₆-Gly₂₃₇.

Particularmente preferido é um dímero de polipeptídeo, em que a região articulada compreende a sequência de aminoácidos Asp₂₂₁-Lys₂₂₂-Thr₂₂₃-His₂₂₄-Thr₂₂₅-Cys₂₂₆-Pro₂₂₇-Pro₂₂₈-Cys₂₂₉-Pro₂₃₀-Ala₂₃₁-Pro₂₃₂-Glu₂₃₃-Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇-Pro₂₃₈-Ser₂₃₉-Val₂₄₀.

As fusões do domínio extracelular de gp130 (sgp130), preferivelmente no terminal-C, ou sua variante ou fragmento para a região articulada da parte Fc podem ser diretas ou elas podem empregar um domínio ligante de polipeptídeo flexível de vários comprimentos e combinações de aminoácidos. Estes ligantes podem ser inteiramente artificiais (por exemplo, compreendendo 2-50 resíduos de aminoácidos independentemente selecionados do grupo consistindo em glicina, serina, asparagina, treonina e alanina) ou adotados de proteínas ocorrendo naturalmente. Tais ligantes podem aperfeiçoar propriedades de flexibilidade e ligação do dímero.

Adicionalmente, as proteínas de fusão sgp130Fc da invenção ainda podem ser fundidas a marcadores, tais como poli(His), Myc, Strep, poliarginina, Flag, proteína fluorescente verde (GFP), TAP, glutathione S-transferase (GST), HA, peptídeo de ligação de calmodulina (CBP), proteína de ligação de maltose (MBP), V5, HSV, S, vírus de estomatite vesicular (VSV), Proteína C, Luciferase, Glu-Glu, E, beta-GAL, T7 ou outros epítomos aos quais anticorpos ou outras moléculas ligantes são disponíveis para per-

mitir rápida purificação, detecção em Western blot ou ELISA, imunoprecipitação, ou esgotamento / bloqueio de atividade em bioensaios.

Ainda em uma modalidade preferida do dímero de polipeptídeo da presente invenção, um ou mais sítios de N-glicosilação são inseridos entre a molécula de gp130 solúvel ou sua variante ou fragmento e o domínio Fc. Motivos de aminoácidos de sítios de N-glicosilação com a sequência núcleo Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr dependem do contexto do motivo na proteína e podem ser previstos e desenhados por aqueles versados na técnica, por exemplo, através do uso de software livre tal como NetNGlyc (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark). Um preferido elemento ligante de N-glicosilação para dímeros sgp130Fc da invenção é His-Asn-Leu-Ser-Val-Ile.

Um outro objeto da presente invenção são formas PEGuiladas ou outras quimicamente modificadas dos dímeros. PEGuilação das moléculas de gp130 pode ser realizada, por exemplo, de acordo com os processos descritos para IFN- γ , IFN-alfa, IFN-beta, IL-15 ou IL-2 (Youngster et al., Curr Pharm Dês (2002), 8:2139; Grace et al., J Interferon Cytokine Res (2001), 21:1103; Pepinsky et al., J Pharmacol Exp Ther (2001), 297:1059; Pettit et al., J Biol Chem (1997), 272:2312; Goodson et al. Biotechnology NY (1990), 8:343; Katre; J Immunol (1990), 144:209).

Qualquer tipo de polietileno glicol é apropriado para a presente invenção contanto que o dímero de polipeptídeo PEG ainda seja capaz de bloquear respostas de IL-6 dependendo de sIL-6R que pode ser ensaiado de acordo com os processos conhecidos na técnica.

Preferivelmente, o polietileno glicol do dímero de polipeptídeo da presente invenção é PEG 1000, 2000, 3000, 5000, 10000, 15000, 20000, ou 40000 com PEG 20000 ou 40000 sendo particularmente preferido.

De modo a formar o dímero, as duas moléculas de gp130 solúveis são ligadas uma à outra através de uma ligação covalente simples, um ligante peptídeo flexível ou, preferivelmente, via uma ou mais pontes dissulfeto. Ligantes peptídeo podem ser inteiramente artificiais (por exemplo, compreendendo 2 a 20 resíduos de aminoácidos selecionados independente-

mente do grupo consistindo em glicina, serina, asparagina, treonina e alanina) ou adotado de proteínas ocorrendo naturalmente. Formação de ponte dissulfeto pode ser obtida, por exemplo, através de expressão recombinante, onde a sequência de ácidos nucleicos codificando o monômero sgp130Fc contém um ou mais códons cisteína, preferivelmente na região articulada do domínio Fc.

Os dímeros da presente invenção são preferivelmente produzidos recombinantemente através de uso de um polinucleotídeo codificando um monômero do dímero e vetores, preferivelmente vetores de expressão contendo os ditos polinucleotídeos. Para a produção dos dímeros da invenção, os polinucleotídeos são obtidos de clones existentes, isto é, preferivelmente codificam o polipeptídeo ocorrendo naturalmente ou uma sua parte (para gp130/IL6ST humana: sequência GenBank NM_002184 e clones suportando; para a região constante de IgG1/IGHG1 humana: por exemplo, sequência GenBank AK057754). Polipeptídeos codificados por qualquer polinucleotídeo que hibridize para o complemento do DNA ou RNA nativo sob condições altamente rigorosas ou moderadamente rigorosas (para definições, ver Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.) tanto quanto este polipeptídeo mantenha a atividade biológica da sequência nativa, são úteis para produção de dímeros da presente invenção.

Os vetores recombinantes podem ser construídos de acordo com processos bem-conhecidos por aqueles versados na técnica; ver, por exemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. Uma variedade de sistemas de vetor de expressão / hospedeiro pode ser utilizada para conter e expressar sequências codificando os dímeros da presente invenção. Estes incluem, mas não são limitados a, microorganismos tais como bactérias transformadas com bacteriófago recombinante, plasmídeo, ou vetores de expressão de DNA cosmídeo; levedura transformada com vetores de expressão de levedura; sistemas de células de insetos infectados com vetores de expressão de vírus (por exemplo, baculovírus); sistemas de células de planta transformadas com veto-

res de expressão de vírus (por exemplo, vírus de mosaico de couve-flor, CaMV; vírus mosaico de tabaco, TMV) ou com vetores de expressão bacteriana (por exemplo, plasmídeos Ti ou pBR322); ou sistemas de células de animal.

5 Em sistemas de bactérias, um número de vetores de expressão podem ser selecionados dependendo do uso pretendido para o dímero polipeptídeo da presente invenção. Vetores apropriados para uso na presente invenção incluem, mas não são limitados ao vetor de expressão pSKK para expressão em bactérias.

10 Em espécies de levedura tipo selvagem ou modificadas (por exemplo, glicoengenheiradas), tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ou *Pichia pastoris*, um número de vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis ou sistemas promotores como fator alfa, álcool oxidase, PGH, tetraciclina glucose etc. podem ser usados; para
15 revisões, ver Grant et al. (1987) *Methods Enzymol.* 153:516-544; Siam et al. (2004) *Methods* 33:189-198; Macauley-Patrick et al. (2005) *Yeast* 22:249-270, Gellissen et al. (2005) *FEMS Yeast Res.* 5:1079-1096; Wildt and Gerngross (2005) *Nat. Rev. Microbiol.* 3:119-128.

 Em casos onde sistemas de expressão de planta da técnica são
20 usados (para revisão, ver, por exemplo, Stoger et al. (2005) *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:167-173; Gomord et al. (2005) *Trends Biotechnol.* 23:559-565) a expressão de sequências codificando um dímero (ou seus monômeros) da presente invenção pode ser dirigida através de qualquer um de um número de promotores. Por exemplo, promotores virais tais como os promotores 35S
25 e 19S de CaMV podem ser usados sozinhos ou em combinação com a sequência-líder ômega de TMV (Takamatsu (1987) *EMBO J.* 6:307-311). Alternativamente, promotores de plantas como a subunidade pequena de RUBISCO ou promotores de choque térmico podem ser usados (Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680; Broglie et al. (1984) *Science* 224:838-843; e
30 Winter et al. (1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105). Estes constructos podem ser introduzidos em células de plantas através de transformação de DNA direta ou transfecção mediada por patógeno. Tais técnicas são descri-

tas em um número de revisões genericamente disponíveis (ver, por exemplo, Hobbs e Murry em McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, N.Y.; pp. 191-196).

Um sistema de inseto também pode ser usado para expressar os dímeros (ou os seus monômeros) da presente invenção. Por exemplo, em um tal sistema, vírus *Autographa californica nuclear polyhedrosis* (AcNPV) é usado como um vetor para expressar genes estranhos em células de *Spartan frugiperda* ou em larvas *Trichoplusia*. As sequências podem ser clonadas em uma região não-essencial do vírus, tal como o gene poliedrina, e colocado sob controle do promotor poliedrina. Inserção bem-sucedida da sequência de DNA codificando monômeros sgp130Fc ou suas variantes ou fragmentos tornará o gene poliedrina inativo e produzirá vírus recombinantes carecendo de proteína de revestimento. Os vírus recombinantes então podem ser usados para infectarem, por exemplo, células de *S. frugiperda* ou larvas de *Trichoplusia* nas quais sgp130Fc da presente invenção pode ser expresso (Engelhard et al. (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. 91:3224-3227).

Em células hospedeiras mamíferas, um número de sistemas de expressão baseados, por exemplo, em transfecção baseada em lipídeo ou transdução viral das células, pode ser utilizados. Em casos onde um adenovírus é usado como um vetor de expressão, sequências codificando o(s) polipeptídeo(s) da presente invenção podem ser ligadas em um complexo de transcrição / tradução de adenovírus consistindo no promotor tardio e sequência-líder tripartite. Inserção em uma região E1 ou E3 não-essencial do genoma viral pode ser usada para obter um vírus viável que é capaz de expressar os polipeptídeos da presente invenção em células hospedeiras infectadas (Logan, J. e Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:3655-3659). Em adição, aperfeiçoadores de transcrição, como o aperfeiçoador de vírus sarcoma de Rous (RSV), podem ser usados para aumentarem expressão em células hospedeiras mamíferas.

Após a introdução do(s) vetor(es) recombinante(s), as células hospedeiras são crescidas em um meio seletivo, que seleciona o crescimento de células contendo vetor. Qualquer número de sistemas de seleção pode

ser usado para recuperar linhas de células transformadas. Estes incluem, mas não são limitados a, vírus de herpes simplex timidina cinase (Wigler, M. et al. (1977) *Cell* 11:223-32) e genes adenina fosforribosil transferase (Lowy, I. et al. (1980) *Cell* 22:817-23) que podem ser empregados em células tk.sup.- ou aprt. Sup.-, respectivamente. Também, resistência a antimetabólito, a herbicida ou a antibiótico, pode ser usada como a base para seleção; por exemplo, dhfr que confere resistência a metotrexato (Wigler, M. et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77:3567-70); npt, que confere resistência aos aminoglicosídeos neomicina e G-418 (Colbere-Garapin, F. et al. (1981) *J. Mol. Biol.* 150:1-14) e als ou pat, que confere resistência a clorsulfuron e fosfinotricina acetil transferase, respectivamente. Adicionais genes selecionáveis foram descritos, por exemplo, trpB, que permite que células utilizem indol no lugar de triptofano, ou hisD, que permite células utilizarem histinol no lugar de histidina (Hartman, S. C. e R.C. Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:8047-51). O uso de marcadores visíveis ganhou popularidade com marcadores tais como antocianinas, beta-glucuronidase e seu substrato GUS, e luciferase e seu substrato luciferina, sendo amplamente usados não somente para identificar transformantes, mas também para quantificar a quantidade de expressão de proteína transiente ou estável atribuível a um específico sistema vetor (Rhodes, C.A. et al. (1995) *Methods Mol. Biol.* 55:121-131).

Purificação dos polipeptídeos recombinantes é realizada através de qualquer um dos processos conhecidos para este propósito, isto é, qualquer procedimento convencional envolvendo extração, precipitação, cromatografia, eletroforese, ou similar. Ainda um procedimento de purificação que pode ser usado é cromatografia de afinidade usando, por exemplo, Proteína A, Proteína G ou anticorpos monoclonais, que se ligam a polipeptídeo-alvo e que são produzidos e imobilizados sobre uma matriz-gel contida em uma coluna. Preparações impuras contendo o polipeptídeo recombinante são passadas através da coluna. O polipeptídeo se ligará à coluna através de específica interação com a matriz de gel de afinidade enquanto as impurezas passarão direto. Após lavagem, o polipeptídeo é eluído do gel através de

uma mudança em pH ou resistência iônica e então, se ele for produzido como o monômero, dimerizado e, se desejado, PEGuilado.

Da mesma maneira, a presente invenção também refere-se a um processo de produção de dímero de polipeptídeo da presente invenção,
5 compreendendo cultura de uma célula hospedeira transformada com uma sequência de DNA codificando um monômero do dito polipeptídeo e recuperação de monômero ou dímero de polipeptídeo da dita célula hospedeira ou da cultura.

Os dímeros polipeptídeos da presente invenção são úteis no tratamento e/ou prevenção de todas as patologias, nas quais a atividade do complexo agonístico IL-6/sIL6R deve ser inibida.
10

Assim, a presente invenção também refere-se a uma composição farmacêutica contendo uma quantidade efetiva de um dímero de polipeptídeo da presente invenção, preferivelmente combinado com um veículo
15 farmaceuticamente aceitável. "Farmaceuticamente aceitável" é pretendido abranger qualquer veículo, que não interfira com a eficácia da atividade biológica do ingrediente ativo e que não seja tóxico para o hospedeiro ao qual é administrado. Exemplos de apropriados veículos farmacêuticos são bem-conhecidos na técnica e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato,
20 água, emulsões, como emulsões de óleo / água, vários tipos de agentes umectantes, soluções estéreis, etc. Tais veículos podem ser formulados através de processos convencionais e podem ser administrados ao sujeito em uma dose eficaz.

Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade do ingrediente ativo que é suficiente para afetar o curso e a severidade da doença, conduzindo à redução ou à remissão de tal patologia.
25

Uma "dose eficaz" útil para tratamento e/ou prevenção destas doenças ou distúrbios pode ser determinada usando processos conhecidos por aqueles versados na técnica (ver, por exemplo, Fingl et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman e Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1-46 ((1975)).
30

Administração das composições pode ser efetuada através de

diferentes maneiras, por exemplo, através de administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. O regime de dosagem será determinado pelo médico atendente e outros fatores clínicos. Como é bem-conhecido nas técnicas de medicina, dosagens para qual-

5 quer paciente dependem de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, área de superfície de corpo, idade, sexo, o particular composto a ser administrado, tempo e rota de administração, o tipo de terapia, saúde geral e outros fármacos sendo administrados simultaneamente.

A presente invenção também refere-se ao uso de um dímero de

10 polipeptídeo como definido acima para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou distúrbios onde bloqueio do complexo agonístico IL-6/sIL-6R tem um efeito benéfico. Usos médicos preferidos dos dímeros de polipeptídeos da presente invenção são o tratamento / prevenção de resorção de osso, hipercalcemia, caquexi-

15 a, tumores ou outros tipos de câncer (por exemplo, câncer de cólon, mieloma múltiplo, linfoma, leucemia ou mal de Hodgkin), doenças autoimunes (por exemplo, esclerose múltipla ou diabetes tipo 1), doenças inflamatórias ou atópicas (por exemplo, mal de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, asma, psoríase, sarcoidose, lupus eritematoso ou

20 uveíte), infecções (por exemplo, por bactérias, vírus, fungos ou outros patógenos), assim como distúrbios endocrinológicos e doenças metabólicas ou catabólicas (por exemplo, diabetes tipo 2, obesidade, hiperglicemia ou hipercolesterolemia).

Os exemplos abaixo explicam a invenção em mais detalhes.

25 Exemplo 1

Construção e produção da muteína de sgp130Fc CR5/18

(A) Material

Os componentes de sistema de clonagem Gateway (AccuPrime Pfx DNA Polymerase, o vetor doador pDON221, o vetor de expressão controlado por promotor CMV pCDNA-DEST40, BP e LR recombinase para

30 transferência de inserção e células E. coli competentes) foram adquiridos de Invitrogen (Karlsruhe, Germany). O kit de mutagênese de direcionado a sítio

QuikChange II foi obtido de Stratagene (Amsterdam, The Netherlands). Iniciadores de mutagênese purificados por PAGE foram de Microsynth (Balgach, Switzerland). Células CHO-K1 foram obtidas de German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany). Componentes de meio de cultura foram adquiridos como se segue: meio F12 Ham, baixa IgG FBS e PBS (PAA Laboratories; Cölbe, Germany), FBS (Biochrom; Berlin, Germany), solução de tripsina/EDTA (Invitrogen) e solução G418 (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Germany). O reagente de transfecção Lipofectamina 2000 foi de Invitrogen. Santa Cruz (Heidelberg, Germany) forneceu Proteína A/G Mais Agarose para imunoprecipitação. Para ambas, imunoprecipitação e detecção primária em Western blots, um anticorpo monoclonal (Fc) camundongo anti-humano IgG foi usado (CBL102; Chemicon; Hofheim, Germany). Detecção secundária Western blot foi realizada com um anticorpo ligado-HRP anticamundongo IgG, ECL-Plus substrato de Western blotting e Hyperfilm ECL (todos de GE Healthcare; Munich, Germany). Garrafas rolantes (2,1 L, 2,5X superfície) foram adquiridas de Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany). Filtros de acetato de celulose (0,45 µm) para uma unidade de filtro a vácuo foram adquiridos de Sartorius (Göttingen, Germany). Materiais para cromatografia de exclusão de tamanho e de afinidade (SEC) foram todos obtidos de GE Healthcare (Munich, Germany): material MabSelect (código de produto 17-5199-01) em uma coluna XK16/20, colunas de dessalinização PD-10 e uma coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 pg para SEC. Unidades de concentração de membrana Amicon Ultra-15 50kDa Ultracel-PL foram adquiridas de Millipore (Eschborn, Germany). Solução de bis-acrilamida fácil de fazer (19:1, 30%) para PAGE foi fornecida por Bio-Rad (Munich, Germany).

(B) Construção de CR5/18

Um DAc para sgp130Fc de inteiro comprimento compreendendo o domínio extracelular completo de gp130 e Fc IgG1 humano tipo selvagem (fontes: para gp130/IL6ST humana: sequência GenBank NM_002184 e clones suportando; para a região constante de IgG1/IGHG1 humana: por exemplo, sequência GenBank AK057754) foi otimizada – códon para expres-

são em células CHO-K1 e subclonada em pDONR221 usando iniciadores Gateway, AccuPrime Pfx DNA Polimerase e BP recombinase em um procedimento de clonagem Gateway. A inserção subclonada foi completamente verificada – sequência usando iniciadores de sequenciamento reverso e para frente empilhados cada 250-300pb. Em uma mutagênese direcionada a sítio com o kit QuikChange II, a região articulada inferior de IgG1-Fc (amino-ácidos 234, 235, e 237 de acordo com numeração EU) sofreu mutação da sequência tipo selvagem "LLGG" para "AEGA". Clones mutados foram verificados através de completo sequenciamento como descrito acima. Subsequentemente, a inserção foi transferida para o vetor de expressão pcDNA-DEST40 por recombinação LR Gateway. Na medida em que a inserção codifica dois códons de interrupção após a parte Fc, os marcadores codificados em pcDNA-DEST40 (epítomos V5 e 6xHis) não estão presentes em CR5/18. Clones positivos foram identificados por digestão de restrição A1wNI e sequência novamente verificada.

(C) Cultura e transfecção de célula

Células CHO-K1 foram crescidas em meio F12 Ham suplementado com FBS 10% a 37°C e 5% CO₂ em uma atmosfera saturada com água. Culturas de manutenção foram separadas a cada 3-4 dias e usadas somente até 20 passagens. Células foram transfectadas com o construto de expressão pcDNA-DEST40_CR5/18 usando Lipofectamina 2000 e condições-padrão para CHO-K1 fornecida por Invitrogen. Para um primeiro teste de expressão transiente, células CHO-K1 foram transfectadas em placas de 6 cavidades, e ambos, células e sobrenadantes, foram colhidos 24 horas após transfecção. CR5/18 foi imunoprecipitado dos sobrenadantes usando Proteína A/G Mais Agarose e o anticorpo (Fc) IgG anti-humano de acordo com as instruções do fabricante. Proteína de célula integral foi extraída e Western blots com anticorpo (Fc) IgG anti-humano foram realizados com os lisados de célula e imunoprecipitados como descrito em Waetzig et al., J. Immunol. 168: 5342 (2002).

(D) Produção de CR5/18 em células CHO-K1

Após expressão transiente bem-sucedida, células CHO-K1 fo-

ram transfectadas e clones positivos foram selecionados usando 400 µg/mL G418 em placas de 10cm. Para determinar qualidade e propriedades de produto, uma reunião de CHO-K1 policlonais pré-selecionadas foi transferida para garrafas rolantes e cultivadas com FBS IgG baixo. Sobrenadantes das células confluentes foram colhidos 2-3 vezes por semana, centrifugados duas vezes em 3500xg e 4°C por 15 minutos para remover os fragmentos de células e tanto processados imediatamente como congelados a -80°C. Em paralelo, clones de células estáveis foram selecionados da reunião pré-selecionada usando um processo de diluição limitada e caracterizados por análise de expressão Western blot como descrito acima. O clone com a expressão mais alta e mais estável foi transferido para garrafas rolantes e usado para produção permanente.

(E) Purificação através de cromatografia de exclusão de tamanho e afinidade

Sobrenadantes contendo CR5/18 de culturas de garrafas rolantes foram purificados a 4°C usando uma bomba peristáltica P-1 e um ÄKTA Purifier 100 System (ambos de GE Healthcare; Munich, Germany). O protocolo foi baseado nas recomendações do fabricante para a purificação de anticorpos monoclonais. Após centrifugação, o pH do sobrenadante recente ou descongelado (sobre gelo) foi ajustado para 6,7-7,0. Após dois ciclos de filtração a vácuo (0,45 µm) o sobrenadante foi degaseificado e – se necessário – o pH foi novamente ajustado para um valor de 6,7-7,0. Subsequentemente, a coluna de cromatografia de afinidade equilibrada com PBS (6-25mL MabSelect em uma coluna XK16/20) foi carregada com 2-4 L de sobrenadante em uma taxa de fluxo de 3-10 mL/minuto usando a bomba P-1. Após lavagem com PBS, a coluna foi transferida para o purificador ÄKTA e novamente lavada com PBS até a A₂₈₀ ter estabilizado após remoção quantitativa de proteína não-ligada. Para a eluição, o sistema ÄKTA foi equipado com dois tampões de citrato de sódio 50 mM em pH 3,25 e 5,5, respectivamente, que foram misturados para produção de desejadas condições de pH. Uma etapa de lavagem em pH 5,1 foi seguida por eluição com pH 3,7. Frações de 10mL foram coletadas em tubos de 15mL contendo 2mL de Tris-HCl 1M (pH 11). As frações de pico foram reunidas, e o pH foi medido e ajustado

para 7,5, se necessário. Concentração de proteínas reunidas foi medida por A_{280} e a reunião foi cuidadosamente concentrada para um máximo de 1,5 mg/mL usando unidade de concentração de membrana Amicon Ultra-15 50 kDa Ultracel-PL. Colunas de dessalinização PD-10 equilibradas com PBS
5 foram usadas para substituir o tampão citrato com PBS, seguido por uma outra medição de concentração de proteína em 280 nm.

Para cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), uma concentração máxima de proteína de 1,2 mg/mL em PBS foi recomendável. SEC foi realizada com o sistema ÄKTA em uma coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 pg equilibrada com PBS em uma taxa de fluxo de 0,8 mL/minuto.
10 Em contraste, a sgp130Fc tipo selvagem, CR5/18 eluiu em um pico simples após um baixo pico de agregados de maior peso molecular (Figura 2). Nas primeiras corridas, amostras de todas as frações foram obtidas para análises PAGE. Frações de picos foram reunidas, suas concentrações de proteínas
15 foram medidas e fixadas para 400-500 μ g/mL em PBS, e alíquotas de uso único foram congeladas a -80°C para estocagem de longo termo. Frações e amostras reunidas foram analisadas por PAGE nativa (7,5%) e subsequente manchamento com prata ou Coomassie.

Como mostrado na Figura 2, a quantidade de subprodutos (agregados) de CR5/18 é significativamente reduzida comparada ao composto
20 parente sgp130Fc que foi purificado em um experimento paralelo. Além disso, a eluição do desejado produto (dímero CR5/18) é claramente separável das frações de impureza (agregados), o que não é o caso com sgp130Fc tipo selvagem. Assim, ambos, rendimento (devido a uma maior proporção do
25 desejado produto) e qualidade de preparações de CR5/18 são melhores que aqueles de sgp130Fc convencional, conduzindo a menores custos para a produção industrial. Estes resultados indicam um claro aperfeiçoamento de CR5/18 sobre a molécula sgp130Fc parente.

Exemplo 2

30 Bioatividade de CR5/18 em um ensaio de proliferação padronizada de células

(A) Material

A linha de célula precursora de célula B estavelmente transfectada BAF3/gp130 e o Hyper-IL-6 citocina programadora foram usados. Componentes de meio de cultura foram adquiridos como se segue: DMEM e PBS (PAA Laboratories; Cölbe, Germany), FBS (Biochrom; Berlin, Germany) e solução de tripsina / EDTA (Invitrogen; Karlsruhe, Germany). Interleucina-6 (IL-6) e receptor de interleucina-6 solúvel (sIL-6R) foram adquiridos de BioSource (Solingen, Germany) e R&D Systems (Wiesbaden, Germany), respectivamente. O ensaio de proliferação de células não-radioativo aquoso 96 de título de célula (MTS) foi obtido de Prômega (Mannheim, Germany).

10 (B) Bloqueio de proliferação de células BAF3/gp130 induzido por IL-6/sIL-6R por sgp130Fc ou CR5/18

Células BAF3/gp130 dependem da presença do complexo de IL-6/sIL-6R no meio de cultura para proliferação e viabilidade. Para manutenção, células BAF3/gp130 foram cultivadas em uma densidade de menos que 15 5×10^5 células/mL em DMEM com FBS 10% e 10 ng/mL de Hyper-IL-6 (uma citocina desenhista consistindo em IL-6 e sIL-6R ligadas covalentemente; Fischer et al. 1997, Nat. Biotechnol. 15: 142-145). O Hyper-IL-6 10 ng/mL pode ser substituído por 100 ng/mL de IL-6 e 50 ng/mL de sIL-6R. Células foram passadas duas vezes por semana. Para ensaios, células foram lava- 20 das duas vezes em meio sem Hyper-IL-6 (ou IL-6/sIL-6R) e então foram semeadas em 5000 células / cavidade em placas de 96 cavidades. CR5/18 ou o composto parente sgp130Fc foram adicionados em várias concentrações variando de 20 μ g/mL a 78 ng/mL (séries de diluições 1:4; Figura 3). Subsequentemente, células foram incubadas por 3 dias na presença de 100 ng/mL 25 de IL-6 e 50 ng/mL de sIL-6R. Controles incluíram células não-estimuladas sem e com a concentração máxima de CR5/18 ou sgp130Fc assim como células incubadas somente com os estimulantes IL-6 e sIL-6R (Figura 3).

(C) Resultados

A atividade biológica de CR5/18 ou sgp130Fc tipo selvagem na 30 cultura de células foi medida através de redução do número de células BAF3/gp130 viáveis (como determinado por conversão de substrato MTS) após 3 dias. CR5/18 é mais biologicamente ativo que sgp130Fc tipo selva-

gem, atingindo sua IC_{50} em uma concentração de aproximadamente 400 ng/mL, em que sgp130Fc ($IC_{50} \approx 800$ ng/mL) ainda não mostra efeito significativo (Figura 3). Isto indica que CR5/18 pode ser usado em cerca de metade de concentração terapêutica do composto tipo selvagem.

5 Listagem de sequência

<110> Conaris research institute AG
 <120> DÍMEROS SGP130FC APERFEIÇADOS
 <130> C 1087
 <140> PCT/EP2007/005812
 <141> 2007-06-29
 <150> EP06013668
 <151> 2006-06-30
 <160> 9
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

Ala Glu Gly Ala
1

<210> 2
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

Leu Leu Gly Gly
1

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Pro Ser Val
20

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val
20

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MUTAGÊNIO
<222> (14)
<223> Xaa é Ala ou Phe

<220>
<221> MUTAGÊNIO
<222> (15)
<223> Xaa é Asp ou Glu

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Xaa Xaa Gly
1 5 10 15

Ala Pro Ser Val
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>
<223> mutante 1; região articulada IgG1

<400> 6

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly
1 5 10 15

Ala Pro Ser Val
20

<210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Sequência artificial

<220>

<223> mutante 2; região articulada IgG1

<400> 7

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Asp	Gly
1				5				10						15	

Ala	Pro	Ser	Val
			20

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> mutante 3; região articulada IgG1

<400> 8

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly
1				5				10						15	

Ala	Pro	Ser	Val
			20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> mutante 4; região articulada IgG1

<400> 9

Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Asp	Gly
1				5				10						15	

Ala	Pro	Ser	Val
			20

REIVINDICAÇÕES

1. Dímero de polipeptídeo capaz de inibir a atividade do complexo agonístico IL-6/sIL-6R e compreendendo dois monômeros, em que cada um dos ditos monômeros compreende uma parte extracelular de uma molécula gp130 ou sua variante ou fragmento fundido a um domínio Fc de uma proteína IgG1 e em que pelo menos o resíduo de aminoácido Leu₂₃₅ da região articulada do domínio Fc está substituído por pelo menos um resíduo aminoácido hidrofílico.
2. Dímero de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que o resíduo de aminoácido hidrofílico é Glu ou Asp.
3. Dímero de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que além disso, o resíduo de aminoácido Leu₂₃₄ da região articulada é substituído por Phe ou Ala.
4. Dímero de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 3, em que os resíduos de aminoácidos Leu₂₃₄ e/ou Gly₂₃₇ da região articulada são substituídos pelo resíduo de aminoácido Ala.
5. Dímero de polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a região articulada compreende o motivo sequência de aminoácidos Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇ ao invés de Leu₂₃₄-Leu₂₃₅-Gly₂₃₆-Gly₂₃₇.
6. Dímero de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, em que a região articulada compreende a sequência de aminoácidos Asp₂₂₁-Lys₂₂₂-Thr₂₂₃-His₂₂₄-Thr₂₂₅-Cys₂₂₆-Pro₂₂₇-Pro₂₂₈-Cys₂₂₉-Pro₂₃₀-Ala₂₃₁-Pro₂₃₂-Glu₂₃₃-Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇-Pro₂₃₈-Ser₂₃₉-Val₂₄₀.
7. Dímero de polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a molécula gp130 solúvel ou sua variante ou fragmento é diretamente fundido à região articulada do domínio Fc da proteína IgG1 ou através de um ligante de polipeptídeo flexível.
8. Dímero de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 7, em que o ligante é um ligante compreendendo 2 a 50 resíduos de aminoácidos selecionados independentemente do grupo consistindo em glicina, serina, asparagina, treonina e alanina.

9. Dímero de polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que um ou mais sítios de N-glicosilação são inseridos entre a molécula gp130 solúvel ou sua variante ou fragmento e o domínio Fc.

5 10. Dímero de polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que os monômeros são ligados uns aos outros através de uma ligação covalente simples, um ligante peptídeo flexível ou uma ou mais pontes dissulfeto.

10 11. Dímero de polipeptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que o pelo menos um monômero do dito dímero é PEGuilado.

12. Polinucleotídeo codificando um monômero do dímero de polipeptídeo de qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

13. Vetor de expressão contendo um polinucleotídeo como definido na reivindicação 12.

15 14. Célula hospedeira contendo um vetor de expressão como definido na reivindicação 13.

20 15. Processo de produção de dímero de polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, compreendendo cultura de uma célula hospedeira como definida na reivindicação 14, e recuperação de monômero ou dímero da dita célula hospedeira ou cultura.

16. Composição farmacêutica contendo um dímero de polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

25 17. Uso de um dímero de polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou para a prevenção de uma doença ou de um distúrbio, em que o bloqueio do complexo agonista IL-6/sIL-6R tem um efeito benéfico.

30 18. Uso de acordo com a reivindicação 17, em que a dita doença é ressorção de osso, hipercalcemia, caquexia, um tumor ou outro tipo de câncer, uma doença autoimune, uma doença inflamatória ou atópica, uma infecção, um distúrbio endocrinológico ou uma doença metabólica ou catabólica.

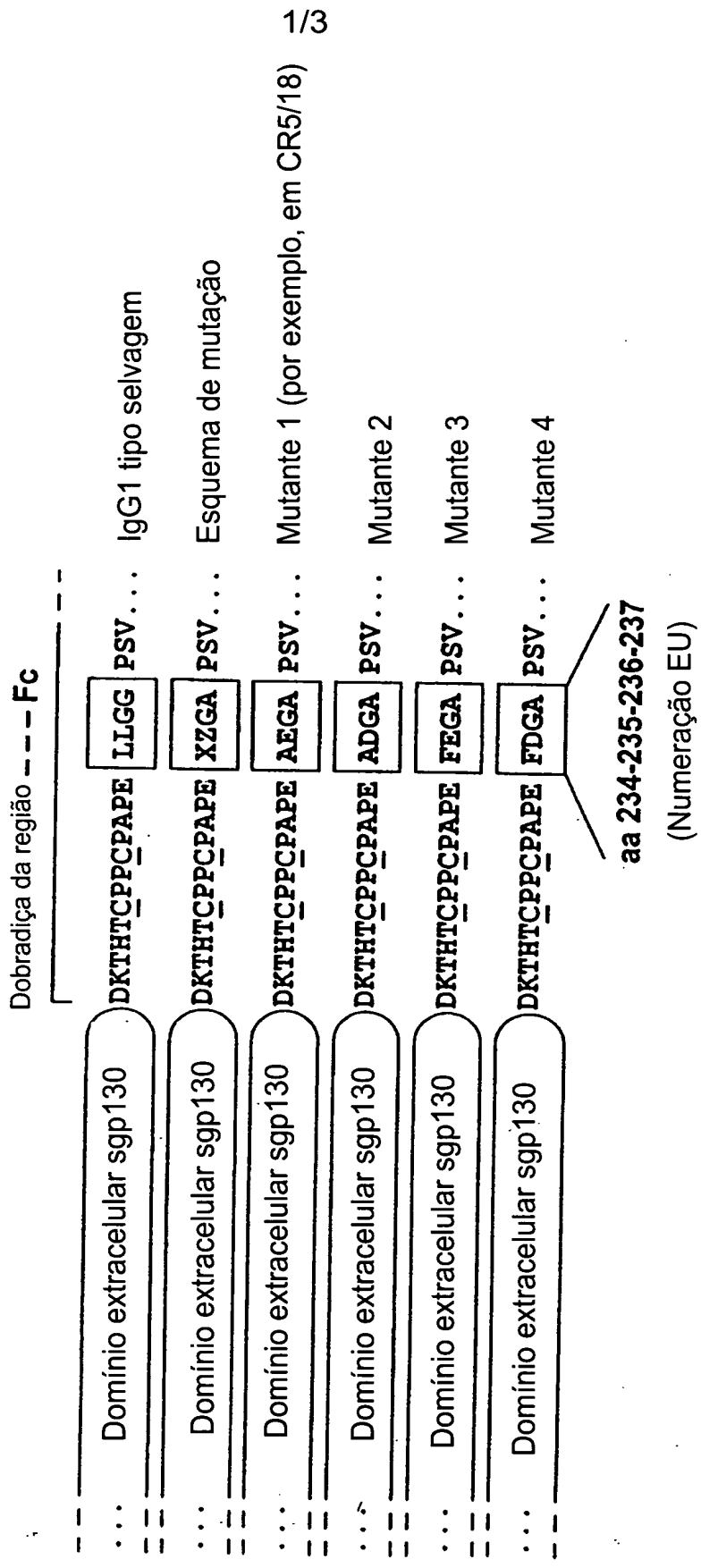


FIG. 1

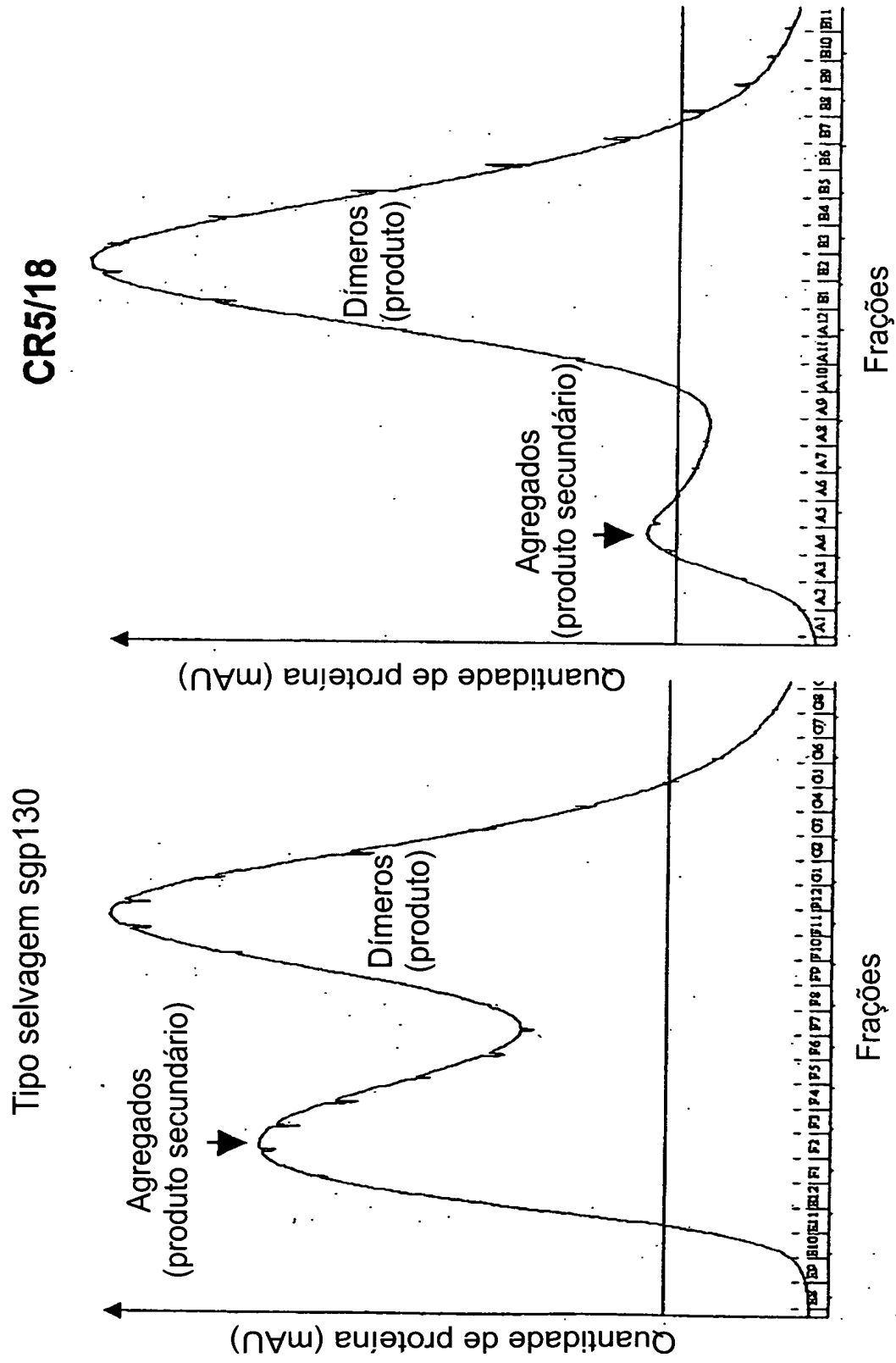
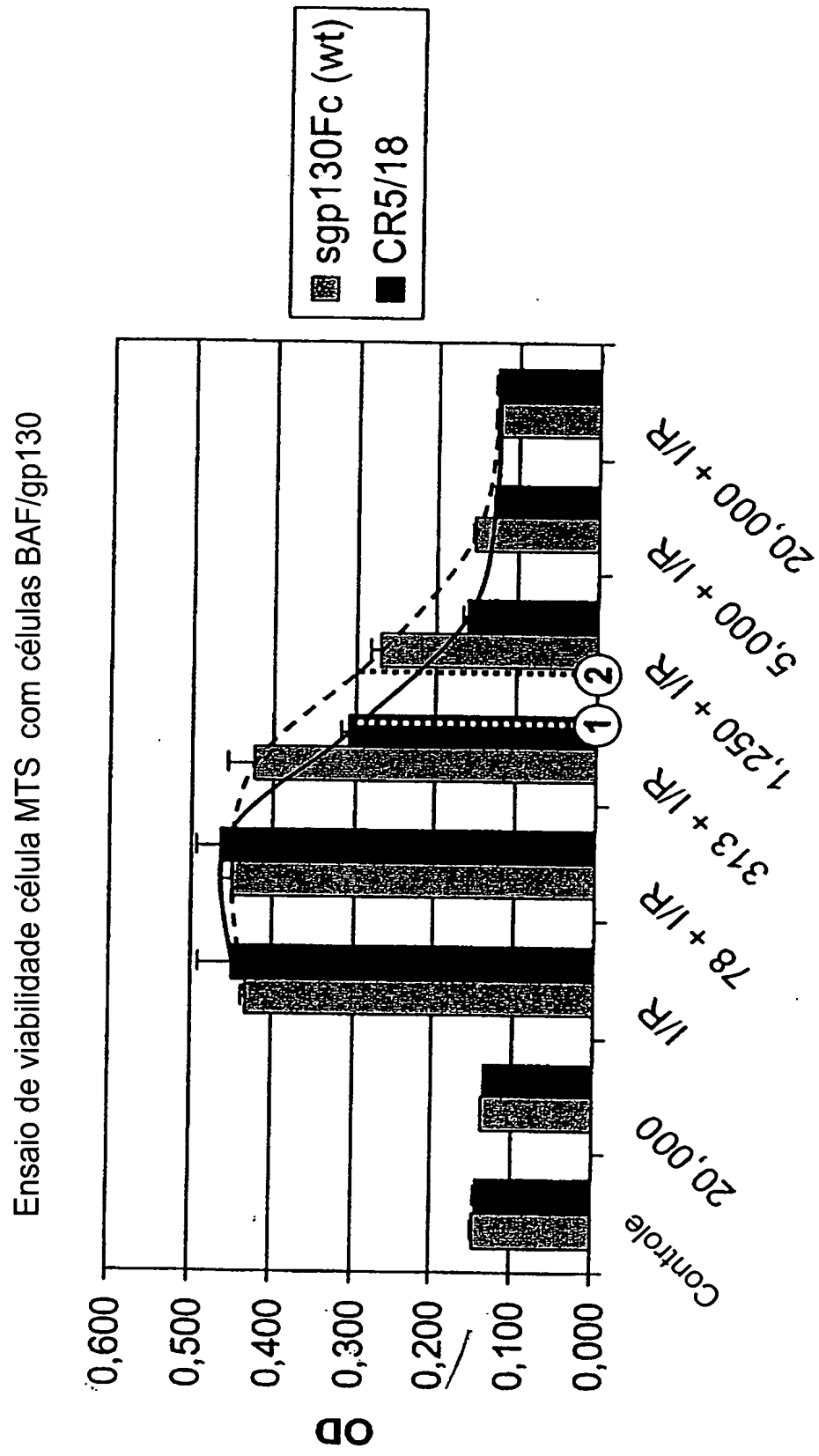


FIG. 2



sgp130Fc ou CR5/18 [ng/mL]; I/R = IL-6+sIL-6R

FIG. 3

RESUMO

Patente de Invenção: **"DÍMEROS SGP130FC APERFEIÇADOS"**.

A presente invenção refere-se a dímeros polipeptídeos compreendendo duas moléculas gp130 solúveis, em que cada uma das ditas moléculas é fundida a um domínio Fc de uma proteína IgG1 e em que a região articulada do domínio Fc é modificada resultando em vantajosas propriedades do dímero. Em uma modalidade particularmente preferida, a região articulada compreende a motip sequência de aminoácidos Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇. Além disso, uma composição farmacêutica contendo o dito dímero e
5
10 vários usos médicos são descritos.