

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2006.06.30	(73) Titular(es): CONARIS RESEARCH INSTITUTE AG SCHAUENBURGERSTRASSE 116 24118 KIELDE
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 2008.01.02	(72) Inventor(es): GEORG WÄTZIG DE DIRK SEEGER DE
(45) Data e BPI da concessão: 2010.09.08 236/2010	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA PT AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA

(54) Epígrafe: **DÍMEROS DE SGP130FC MELHORADOS**

(57) Resumo:

DESCREVEM-SE DÍMEROS POLIPEPTÍDICOS QUE CONSISTEM EM DUAS MOLÉCULAS DE GP130 SOLÚVEIS EM QUE CADA UMA DESSAS MOLÉCULAS ESTÁ FUNDIDA COM UM DOMÍNIO FC DE UMA PROTEÍNA IGG1 E NOS QUAIS A REGIÃO DE CHARNEIRA DO DOMÍNIO FC ESTÁ MODIFICADA, O QUE RESULTA EM PROPRIEDADES VANTAJOSAS DO DÍMERO. NUMA EXPERIÊNCIA PARTICULARMENTE PREFERIDA, A REGIÃO DE CHARNEIRA CONTÉM O MOTIVO DE SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ALA234-GLU235-GLY236-ALA237. ALÉM DISSO, DESCREVE-SE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA QUE CONTÉM ESSE DÍMERO E DIVERSOS USOS MÉDICOS.

RESUMO**"DÍMEROS DE SGP130FC MELHORADOS"**

Descrevem-se dímeros polipeptídicos que consistem em duas moléculas de gp130 solúveis em que cada uma dessas moléculas está fundida com um domínio Fc de uma proteína IgG1 e nos quais a região de charneira do domínio Fc está modificada, o que resulta em propriedades vantajosas do dímero. Numa experiência particularmente preferida, a região de charneira contém o motivo de sequência de aminoácidos Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇. Além disso, descreve-se uma composição farmacêutica que contém esse dímero e diversos usos médicos.

DESCRIÇÃO**"DÍMEROS DE SGP 130FC MELHORADOS"**

A presente invenção refere-se a um dímero polipeptídico constituído por duas moléculas de gp130 solúveis como são caracterizadas nas reivindicações. Deste modo, refere-se a um dímero polipeptídico capaz de inibir a actividade do complexo agonista IL-6/sIL-6R e que é constituído por dois monómeros em que cada um desses monómeros consiste (a) numa parte extracelular de uma molécula de gp130 ou (b) uma variante ou fragmento dessa parte extra celular capaz de inibir a actividade do complexo agonista IL-6/sIL-6R, fundida com um domínio de Fc de uma proteína IgG1 e em que pelo menos o resíduo de aminoácido Leu₂₃₅ da região de charneira do domínio Fc é substituído pelo menos por um resíduo de aminoácido hidrófilo. A presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica que contém esse dímero e diversos usos médicos.

A citocina pleiotrópica interleucina-6 (IL-6) apresenta um amplo conjunto de funções biológicas entre as quais são de salientar a estimulação de linfócitos B e a indução de síntese proteica de fase aguda no fígado. A IL-6 exerce a sua actividade em células-alvo através da ligação a um receptor de superfície específico de IL-6 (IL-6R). Este complexo receptor/ligando permite a homodimerização de gp130, a segunda sub-unidade do complexo receptor de IL-6. A dimerização de gp130 tem como resultado a transdução de um sinal de IL-6. Formas solúveis da IL-6R (sIL-6R) que se criam por dois mecanismos (splicing alternativo e *shedding*) também são capazes de desencadear a dimerização de gp130 e sinalizar quando formam um complexo com a IL-6.

Sendo que a porção citoplásmica do IL-6R não contribui para a transdução de sinal, a sinalização por um homodímero gp130 pode ser induzida através de IL-6 formado um complexo com o IL-6R ligado à membrana ou solúvel. A presença de sIL-6R, no entanto, conduz ao aumento da sensibilidade de células sensíveis a IL-6 para o ligando. Além disso, as células do hibridoma estritamente dependente do IL-6 não proliferam em resposta a quantidades muito baixas do IL-6 quando o sIL-6R presente nos meios de cultura é retirado continuamente.

Inicialmente descrito como o transdutor de sinal de interleucina 6, IL-6, IL-11, factor inibidor de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM) e factor neurotrófico ciliar (CNTF). Todas estas citocinas actuam mediante um complexo receptor bi ou tripartido em que a sinalização se desencadeia por homodimerização (para IL-6) ou heterodimerização da gp130 com LIF-R (para LIF, CT-1, OSM, CLC e CNTF) ou OSM-R (para OSM). Estas citocinas podem mediar desta forma actividades biológicas semelhantes em diferentes tecidos.

Enquanto que a gp130 se pode encontrar em quase todos os tipos celulares, o IL-6R apresenta uma expressão muito mais restrita. A libertação do sIL-6R por um tipo de células faz com que outras células, que apenas expressam a gp130, sejam sensíveis ao IL-6. Este cenário é denominado trans-sinalização. De facto, descreveram-se várias actividades celulares que necessitam do complexo do sIL-6R e a IL-6 e não ocorrem apenas com a IL-6. A proteína gp130 solúvel encontra-se em concentrações elevadas no plasma humano. Recentemente foi descrita a citocina de desenho Hyper-LL-6 (H-IL-6), em que a extremidade C terminal do sIL-6R está fundida covalentemente com a extremidade N terminal da IL-6 madura por um *linker* peptídico flexível. Como foi visto com o complexo de IL-6/sIL-6R, H-IL-6 também actua em células que apenas expressam gp130. Em contraste

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

Para o tratamento de diversas doenças ou transtornos, pode ser desejável o bloqueio específico de respostas do IL-6 dependentes do IL-6R solúvel. Essas doenças incluem ressorção óssea, hipercalcemia, caquexia, tumores ou outros tipos de cancro (por exemplo, cancro de cólon, mieloma múltiplo, linfoma, leucemia, doença de Hodgkin), doenças auto-imunes (por exemplo, esclerose múltipla (EM) ou diabetes tipo 1) doenças inflamatórias ou atópicas (por exemplo, doença de Crohn, colite ulcerosa, artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, asma, psoríase, sarcoidose, lúpus eritematoso ou uveíte), infecções (por exemplo, por bactérias, vírus, fungos ou outros patogénicos) bem como transtornos endocrinológicos e doenças metabólicas ou catabólicas (por exemplo, diabetes tipo 2, obesidade, hiperglicemia ou hipercolesterolemia). Descobriu-se que, por exemplo, os dímeros da sgp130 ou dímeros de sgp130Fc são úteis para aplicações terapêuticas.

O problema técnico fundamental da presente invenção foi o de proporcionar dímeros de sgp130Fc melhorados.

A solução desse problema técnico consegue-se proporcionando as experiências caracterizadas nas reivindicações. Durante as experiências que levaram à presente invenção descobriu-se que a actividade biológica, a capacidade de purificação e estabilidade das proteínas de fusão de sgp130Fc dependem significativamente da composição de aminoácidos da região de charneira entre a sgp130 e a parte de Fc. Os aminoácidos 234, 235 e 237 da IgG-Fc humana (de acordo com a numeração UE) mutaram-se para reduzir a união do receptor Fc a este motivo (Duncan e col., Nature (1988), 332: 563-564; Canfield e Morrison, J. Exp. Med. (1991), 173: 1483-1491; Wines e col., J. Immunol. (2000),

164: 5313-5318; Sondermann e col., Nature (2000), 406: 267). Surpreendentemente, substituindo Leu₂₃₅ da sequência de tipo selvagem Leu₂₃₄-Leu₂₃₅-Gly₂₃₆-Gly₂₃₇ com glutamato (Glu, E) ou aspartato (Asp, D) e, deste modo, rompendo o motivo hidrófobo com um aminoácido fortemente hidrófilo (carregado), a actividade e estabilidade biológicas das proteínas de fusão sgp130Fc puderam ser melhoradas. As mutações das posições 234 e 237 aumentam este efeito. O mutante mais potente apresenta a sequência Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇.

Breve descrição dos desenhos

Gráfico 1: Muteínas da região de charneira de sgp130Fc

A região de charneira inferior de IgG1-Fc humana foi alterada por mutagénese dirigida. A sequência ideal, como foi determinada nas experiências, é "AEGA" (como se incorpora no composto CR5/18).

Abreviaturas e símbolos: aa, aminoácido ou aminoácidos; C, cisteínas que constituem as duas pontes dissulfureto necessários para a dimerização da proteína de fusão de Fc; X, alanina (Ala, A) ou fenilalanina (Phe, F); Z, glutamato (Glu, E) ou Aspartato (Asp, D).

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

A CRS/18 apresenta uma quantidade significativamente reduzida de agregados (produtos secundários) em comparação com o sgp130Fc de tipo selvagem e, deste modo, um maior rendimento de produto não contaminado.

Gráfico 3: Inibição da proliferação induzida por IL-6/sIL-6R de células BAF3/gp130 através do CR5/18 ou do sgp130Fc de tipo selvagem como foi determinado através do ensaio de MTS de viabilidade celular

O CR5/18 é significativamente más activo biologicamente que o sgp130Fc de tipo selvagem (wt) no bloqueio da proliferação desencadeada pelo IL-6 100 ng/ml e sIL-6R 50 ng/ml. Isto reflecte-se pela CI_{50} do CR5/18 (1), que é aproximadamente a metade da CI_{50} do sgp130Fc (2). Abreviaturas e símbolos: CI_{50} , concentração com eficácia inibidora de 50%; IL-6, interleucina-6; I/R, IL-6 mais sIL-6R; MTS, substrato que é convertido através de células metabolicamente activas num produto de formação solúvel que absorve a 490 nm; DO, densidade óptica a 490 nm; sIL-6R, receptor de interleucina 6 solúvel.

Desta forma, a presente invenção refere-se a um dímero polipeptídico capaz de inibir a actividade do complexo agonista IL-6/sIL-6R como é caracterizado adicionalmente nas reivindicações.

O termo "solúvel" como é utilizado no presente documento refere-se a uma molécula de gp130 que carece do domínio intracelular e, preferencialmente, do domínio transmembrana.

Os dímeros da presente invenção podem ser obtidos por engenharia genética usando procedimentos conhecidos. Os domínios utilizados podem consistir no domínio extra celular completo de gp130 ou podem consistir em mutantes ou fragmentos do mesmo que mantêm a capacidade de inibir a actividade do complexo agonista IL-6/sIL-6R. Os fragmentos preferentes são fragmentos que consistem em pelo menos os domínios extra celulares D1 a D3.

A expressão "fundido a um domínio Fc de uma proteína IgG" significa que, preferencialmente, o par de fusão do dímero consiste apenas no domínio Fc da proteína IgG1. No entanto, a parte de Fc pode consistir em sequências de mais do que um isotipo de IgG e a selecção de motivos de sequência particulares para otimizar as funções com os

efeitos pretendidos dentro da experiência habitual da técnica.

Numa experiência preferida do dímero polipeptídico da presente invenção, o aminoacídico restante da região de charneira Leu₂₃₄ substitui-se por Phe ou Ala.

Numa experiência mais preferida do dímero polipeptídico da presente invenção, os resíduos de aminoácidos Leu₂₃₄ e/ou Gly₂₃₇ da região de charneira são substituídos pelo aminoacídico Ala restante.

Numa experiência ainda mais preferida do dímero polipeptídico da presente invenção, a região de charneira consiste no motivo de sequência de aminoácidos Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇ em lugar de Leu₂₃₄-Leu₂₃₅-Gly₂₃₆-Gly₂₃₇.

Prefere-se particularmente um dímero polipeptídico, em que a região de charneira consiste na 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 extra celular gp130 (sgp130), preferencialmente na extremidade C terminal, ou a variante ou fragmento do mesmo com a região de charneira da parte de Fc pode ser directa ou pode utilizar um domínio de *linker* polipeptídico flexível de diversos comprimentos e combinações de aminoácidos. Estes linkers podem ser completamente artificiais (por exemplo, que constituam de 2 a 50 de resíduo de aminoácidos seleccionados independentemente do grupo que consiste em glicina, serina, asparagina, treonina e alanina) ou adoptados de proteínas de origem natural. Estes linkers podem melhorar a flexibilidade e propriedades de ligação do dímero.

Adicionalmente, as proteínas de fusão de sgp130Fc da invenção podem fundir-se adicionalmente a marcadores, como poli(His), Myc, Strep, poliarginina, Flag, proteína verde fluorescente (GFP), TAP, glutathione S-transferase (GST), HA, péptido de ligação à calmodulina (CBP), proteína de

ligação à maltose (MBP), V5, HSV, S, vírus da estomatite vesicular (VSV), Proteína C, Luciferase, Glu-Glu, E, beta-GAL, T7 e outros epítomos para os quais estão disponíveis anticorpos ou outras moléculas de ligação para permitir uma rápida purificação, detecção em transferência de Western ou ELISA, imuno-precipitação ou esgotamento/bloqueio da actividade em bio-ensaios.

Numa experiência adicional preferencial do dímero polipeptídico da presente invenção, insere-se um ou mais sítios de N-glicosilação entre a molécula de gp130 solúvel ou variante ou fragmento e o domínio Fc. Os motivos de aminoácidos dos sítios de N-glicosilação com a sequência central Asn-X-Ser ou Asn-X-Thr dependem do contexto do motivo na proteína e podem-se prever e desenhar por um especialista na matéria, por exemplo, mediante a utilização de software gratuito como NetNGlyc (Centro para a Análise de Sequências Biológicas, Universidade Técnica de Dinamarca). Um elemento de ligação de N-glicosilação preferencial para dímeros de sgp130Fc da invenção é His-Asn-Leu-Ser-Val-Ile.

Outro objecto da presente invenção são as formas peguiladas ou modificadas quimicamente de outra forma diferente dos dímeros. A peguilação das moléculas sgp130 pode realizar-se, por exemplo, de acordo com os procedimentos descritos para IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-15 ou IL-2 humanas (Youngster e col., Curr Pharm Des (2002), 8: 2139; Grace e col., J Interferon Cytokine Res (2001), 21: 1103; Pepinsky e col., J Pharmacol Exp Ther (2001), 297:1059; Pettit e col., J Biol Chem (1997), 272: 2312; Goodson e col. Biotechnology NY (1990), 8: 343; Katre; J Immunol (1990), 144:209).

Qualquer tipo de polietileno glicol é adequado para a presente invenção sempre que o dímero PEG-polipéptido ainda seja capaz de bloquear respostas de IL-6 dependentes de sIL-6R que podem ensaiar-se de acordo com procedimentos

conhecidos na técnica. Preferencialmente, o polietileno glicol do dímero polipeptídico da presente invenção é PEG 1000, 2000, 3000, 5000, 10000, 15000, 20000 ó 40000 preferindo-se particularmente PEG 20000 ou 40000.

Para formar o dímero, as duas moléculas de gp130 solúveis unem-se entre si através de uma ligação covalente simples, um *linker* peptídica flexível ou, preferencialmente, mediante uma ou mais pontes dissulfureto. As ligações peptídicas podem ser completamente artificiais (por exemplo, que constituam de 2 a 20 de resíduos de aminoácidos seleccionados independentemente do grupo que consiste em glicina, serina, asparagina, treonina e alanina) ou adoptados de proteínas de origem natural. A formação de pontes dissulfureto pode conseguir-se, por exemplo, por expressão recombinante, em que a sequência de ácidos nucleicos que codifica o monómero de sgp130Fc contém um ou mais codões que codificam cisteína, preferencialmente na região de charneira do domínio Fc.

Os dímeros da presente invenção produzem-se preferencialmente de forma recombinante mediante a utilização de um polinucleótido que codifica um monómero do dímero e vectores, preferencialmente vectores de expressão que contêm esses polinucleótidos. Para a produção dos dímeros da invenção, os polinucleótidos obtêm-se de clones existentes, isto é, preferencialmente codificam o polipéptido de origem natural ou uma parte do mesmo (para gp130/IL6ST humano: sequência de GenBank NM_002184 e clones de apoio; para a região constante de IgG1/IGHG1: por exemplo, sequência de GenBank AK057754). Os polipéptidos codificados por qualquer polinucleótido que hibrida com a cadeia complementar do ADN ou ARN nativa em condições de restringência elevada ou de restringência moderada (para definições, ver Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y.) sempre

que esse polipéptido mantenha a actividade biológica da sequência nativa, também são úteis para produzir os dímeros da presente invenção.

Os vectores recombinantes podem ser construídos de acordo com os procedimentos bem conhecidos para o especialista na matéria; ver, por exemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y. Pode utilizar-se uma diversidade de sistemas de vector de expressão/hóspede para conter e expressar sequências que codificam os dímeros da presente invenção. Estes incluem, mas sem limitação, microorganismos como bactérias transformadas com vectores de expressão de ADN de bacteriófago, plasmídicos ou de cósmidos recombinantes; leveduras transformadas com vectores de expressão de leveduras; sistemas celulares de insectos infectados com vectores de expressão víricos (por exemplo, baculovírus); sistemas de células vegetais transformados com vectores de expressão víricos (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou com vectores de expressão bacterianos (por exemplo, plásmidos Ti ou pBR322); ou sistemas celulares animais.

Em sistemas bacterianos, podem seleccionar-se vários vectores de expressão consoante a utilização pretendida para o dímero polipeptídico da presente invenção. Os vectores adequados para a sua utilização na presente invenção incluem, mas sem limitação, o vector de expressão pSKK para a expressão em bactérias.

Em espécies de leveduras de tipo selvagem ou modificadas (por exemplo, desenvolvidas por gluco-engenharia), como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ou *Pichia pastoris*, podem ser utilizados diferentes vectores que contêm promotores ou sistemas de promotores constitutivos ou induzidos como factor alfa, álcool oxidase, PGH, tetraciclina, glucose, etc; para revisões, ver Grant e col. (1987) Methods

Enzymol. 153: 516-544; Siam e col. (2004) Methods 33: 189-198; Macauley-Patrick e col. (2005) Yeast 22: 249-270, Gellissen e col. (2005) FEMS Yeast Res. 5:1079-1096; Wildt e Gerngross (2005) Nat.Rev.Microbiol. 3: 119-128.

Nos casos em que se utilizam sistemas de expressão vegetais do estado da técnica (para revisão, ver por exemplo, Stoger e col. (2005) Curr.Opin.Biotechnol.16:167-173; Gomord e col. (2005) Trends Biotechnol. 23: 559-565) a expressão de sequências que codificam um dímero (ou monómeros do mesmo) da presente invenção podem conduzir-se por qualquer um dos diferentes promotores. Por exemplo, promotores víricos como os promotores de 35S e 19S de CaMV podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com a sequência líder ómega de TMV (Takamatsu (1987) EMBO J. 6: 307-311). Como alternativa, podem ser utilizados promotores vegetais como a sub-unidade pequena de RUBISCO ou promotores de choque térmico (Coruzzi e col. (1984) EMBO J. 3: 1671-1680; Broglie e col. (1984) Science 224: 838-843; e Winter e col. (1991) Results Probl. Cell Differ. 17: 85-105). Estas construções podem introduzir-se em células vegetais mediante transformação de ADN directa ou transfecção mediada por patogénio. Essas técnicas descrevem-se em várias revisões geralmente disponíveis (ver, por exemplo, Hobbs e Murry em McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, Nova Iorque, N. Y.; pp. 191-196).

Também pode ser utilizado um sistema de insecto para expressar os dímeros (ou os monómeros dos mesmos) da presente invenção. Por exemplo, num sistema tal, utiliza-se o vírus da poliedrose nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como um vector para expressar genes estranhos em células de *Spodoptera frugiperda* ou em larvas de *Trichoplusia*. As sequências podem ser clonadas numa região não essencial do vírus, como o gene de poliedrina e serem colocadas sob o controlo do promotor da poliedrina. A

inserção bem sucedida da sequência de ADN que codifica monómeros de sgp130Fc ou fragmentos ou variantes dos mesmos transformará o gene da poliedrina em inactivo e produzirá vírus recombinante sem a cobertura protéica. Os vírus recombinantes podem ser utilizados depois para infectar, por exemplo, células de *S. frugiperda* ou larvas de *Trichoplusia* em que pode expressar-se sgp130Fc da presente invenção (Engelhard e col. (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 3224-3227).

Em células hóspede de mamífero, podem ser utilizados vários sistemas de expressão baseados, por exemplo, em transfecção baseada em lípidos ou transdução viral das células. Nos casos em que é utilizado um adenovírus como vector de expressão, as sequências que codificam o polipéptido ou os polipéptidos da presente invenção podem ligar-se a um complexo de transcrição/tradução de adenovírus que consiste no promotor de expressão tardia e a sequência líder tripartida. A inserção numa região E1 ou E3 não essencial do genoma viral pode ser utilizada para obter um vírus viável que seja capaz de expressar os polipéptidos da presente invenção em células hóspede infectadas (Logan, J. e Shenk, T. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 3655-3659). Além disso, podem ser utilizados intensificadores da transcrição, como o intensificador do vírus do sarcoma de Rous (RSV), para aumentar a expressão em células hóspede de mamífero.

Após a introdução do vector ou vectores recombinantes, as células hospedeiras cultivam-se num meio selectivo, que selecciona o crescimento de células que contiverem vectores. Pode utilizar-se qualquer número de sistemas de selecção para recuperar linhas celulares transformadas. Estes incluem, mas sem limitação, os genes da timidina quinase do vírus do herpes simples (Wigler, M. e col. (1977) Cell 11: 223-32) e da adenina fosforribosiltransferasa phosphoribosyltransferase (Lowy,

I. e col. (1980) Cell 22: 817-23) que podem ser utilizadas em células tk.sup. ou aprt.sup., respectivamente. Além disso, é possível utilizar resistência a antimetabolitos, antibióticos ou herbicidas como a base da selecção; por exemplo, dhfr que confere resistência a metotrexato (Wigler, M. e col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77: 3567-70); npt, que confere resistência aos aminoglicosidos neomicina e G-418 (Colbere-Garapin, F. e col (1981) J. Mol. Biol. 150: 1-14) e als ou pat, que conferem resistência a clorsulfuron e fosfinotricina acetiltransferase, respectivamente. Descreeveram-se genes seleccionáveis adicionais, por exemplo, trpB, que permite às células utilizar indol em lugar de triptofano ou hisD, que permite às células utilizar histinol em lugar de histidina (Hartman, S. C. e R. C. Mulligan (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8047-51). A utilização de marcadores visíveis ganhou popularidade com esses marcadores como antocianinas, beta-glucuronidase e o seu substrato GUS e luciferase e o seu substrato luciferina, utilizando-se não apenas para identificar transformantes, mas também para quantificar a quantidade de expressão protéica transitória ou estável atribuível a um sistema de vector específico (Rhodes, C. A. e col. (1995) Methods Mol. Biol. 55: 121-131).

A purificação dos polipéptidos recombinantes realiza-se por qualquer um dos procedimentos conhecidos para esta finalidade, isto é, qualquer procedimento convencional que envolva extracção, precipitação, cromatografia, electroforese ou semelhantes. Um procedimento de purificação adicional que pode ser utilizado é a cromatografia por afinidade que utiliza, por exemplo, Proteína A, Proteína G ou anticorpos monoclonais, que se unem ao polipéptido-alvo e que se produzem e imobilizam numa matriz de gel contida dentro de uma coluna. As preparações impuras que contêm o polipéptido recombinante passam através da coluna. O polipéptido unir-se-á à coluna

pela interacção específica com a matriz de gel de afinidade enquanto as impurezas a atravessarão. Depois de lavar, o polipéptido remove-se por eluição do gel mediante uma mudança no pH ou pela força iónica e depois, se é produzido como o monómero, dimeriza-se e, se se pretende, pega-se.

Em consequência, a presente invenção também se refere a um procedimento para produzir o dímero polipeptídico da presente invenção, que consiste em cultivar uma célula hóspede transformada com uma sequência de ADN que codifica um monómero desse polipéptido e recuperar o monómero ou dímero polipeptídico dessa célula hóspede ou da cultura.

Os dímeros polipeptídicos da presente invenção são úteis no tratamento e/ou prevenção de todas as patologias em que a actividade do complexo agonista IL-6/sIL6R deveria inibir-se.

Deste modo, a presente invenção também se refere a uma composição farmacêutica que contém uma quantidade eficaz de um dímero polipeptídico da presente invenção, preferencialmente combinado com um veículo farmacêuticamente aceitável. "Farmaceuticamente aceitável" significa que abrange qualquer veículo, que não interfira com a eficácia da actividade biológica do princípio activo e que não é tóxico para o hóspede ao qual lhe é administrada. Conhecem-se bem na técnica exemplos de veículos farmacêuticos adequados e incluem soluções salinas tamponadas com fosfato, água, emulsões como emulsões de óleo/água, diversos tipos de agentes humectantes, soluções estéreis, etc. Esses veículos podem formular-se por procedimentos convencionais e podem administrar-se ao sujeito numa dose eficaz.

Uma "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade do princípio activo que é suficiente para influir no curso e a gravidade da doença, provocando a redução ou remissão dessa patologia.

Uma "dose eficaz" útil para o tratamento e/ou prevenção destas doenças ou transtornos pode determinar-se usando procedimentos conhecidos para um especialista na matéria (ver, por exemplo, Fingl e col., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman e Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nova Iorque, pp. 1-46 ((1975))).

As composições podem ser administradas de diferentes formas, por exemplo, por administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, tópica ou intradérmica. O regime de dosagem será determinado pelo médico responsável pelo caso e outros factores clínicos. Como é bem conhecido na técnica médica, as dosagens para qualquer doente dependem de muitos factores, incluindo o tamanho, área de superfície corporal, idade, sexo do doente, o composto particular a administrar, o momento e via de administração, o tipo de terapia, a saúde geral e outros fármacos que se estiverem a administrar simultaneamente.

A presente invenção também se refere ao uso de um dímero polipeptídico como foi definido anteriormente para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção de ressorção óssea, hipercalcemia, caquexia, tumores ou outros tipos de cancro (por exemplo, cancro de cólon, mieloma múltiplo, linfoma, leucemia ou doença de Hodgkin), doenças auto-imunes (por exemplo, esclerose múltipla ou diabetes tipo 1) doenças inflamatórias ou atópicas (por exemplo, doença de Crohn, colite ulcerosa, artrite reumatóide, artrite reumatóide juvenil, asma, psoríase, sarcoidose, lúpus eritematoso ou uveítis), infecções (por exemplo, por bactérias, vírus, fungos ou outros patogénios), bem como transtornos endocrinológicos e doenças metabólicas ou catabólicas (por exemplo, diabete tipo 2, obesidade, hiperglucemia ou hipercolesterolemia).

Os seguintes exemplos explicam a invenção com mais pormenor.

Exemplo 1

Construção e produção da muteína CRS/18 de sgp130Fc

(A) Material

As componentes do sistema de clonagem Gateway (Pfx ADN Polimerase AccuPrime, o vector doador pDONR221, o vector de expressão controlado por promotor de CMV pcDNA-DEST40, recombinase BP e LR para transferência da inserção e células de *E. coli* competentes) obtiveram-se de Invitrogen (Karlsruhe, Alemanha). O kit de mutagénese dirigida QuikChange II obteve-se de Stratagene (Amsterdam, Holanda). Os iniciadores de mutagénese purificados de PAGE foram obtidos na Microsynth (Balgach, Suíça). As células CHO-K1 obtiveram-se da Colecção Alemã de Microorganismos e Culturas Celulares (Braunschweig, Alemanha). Os componentes de meio de cultura obtiveram-se como se descreve em seguida: meio F12 de Ham, FBS e PBS de IgG baixa (PAA Laboratories; Cölbe, Alemanha), FBS (Biochrom; Berlim, Alemanha), solução de Tripsina/EDTA (Invitrogen) e solução de G418 (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Alemanha). O reagente de transfecção Lipofectamine 2000 foi de Invitrogen. Santa Cruz (Heidelberg, Alemanha) proporcionou agarose Protein A/G Plus para imuno-precipitação. Para imuno-precipitação e detecção primária em transferências de Western, utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-IgG humano (Fc) de rato (CBL102; Chemicon; Hofheim, Alemanha). A detecção secundária por transferência de Western realizou-se com um anticorpo unido a anti-IgG de rato conjugado com HRP, substrato de transferência de Western ECL-Plus e Hyperfilm ECL (todos de GE Healthcare; Munique, Alemanha). Os frascos rotatórios (2,1 l, superfície de 2,5X) obtiveram-se na Greiner Bio-One (Frickenhausen, Alemanha). Os filtros de acetato de celulose (0,45 µm) para uma unidade de filtro de

vácuo obtiveram-se de Sartorius (Göttingen, Alemanha). Os materiais para cromatografia de afinidade e de exclusão por tamanho (SEC) foram todos obtidos de GE Healthcare (Munique, Alemanha): material MabSelect (código de produto 17-5199-01) numa coluna XK16/20, colunas de dessalinização PD-10 e uma coluna HiLoad 26/60 Superdex de 200 µg para SEC. As unidades de concentração de membrana Amicon Ultra-15 50 kDa Ultracel-PL obtiveram-se de Millipore (Eschborn, Alemanha). A solução de acrilamida-bis preparada (19:1, 30%) para PAGE obteve-se de Bio-Rad (Munique, Alemanha).

(B) Construção de CR5/18

Optimizaram-se os codões de um ADNc para sgp130Fc de comprimento completo que compreende o domínio extra celular completo de gp130 e o IgG1 Fc de tipo selvagem humano (fontes: para o gp130/IL6ST humano: sequência de GenBank NM_002184 e clones de apoio; para a região constante de IgG1/IGHG1 humano: por exemplo, sequência de GenBank AK057754) para a sua expressão em células CHO-K1 e subclonou-se em pDONR221 usando iniciadores Gateway, Pfx ADN Polimerase AccuPrime e recombinase BP num procedimento de clonagem Gateway convencional. Verificou-se completamente a sequência da inserção subclonado usando iniciadores de sequenciação directos e reversos escalonados cada 250-300 pares de bases. Numa mutagénese dirigida com o kit QuikChange II, a região de charneira inferior do IgG1-Fc (aminoácidos 234, 235 e 237 de acordo com a numeração UE) mudou-se desde a sequência de tipo selvagem "LLGG" até "AEGA". Os clones mutados foram verificados por sequenciação completa como foi descrito anteriormente. Posteriormente, a inserção foi transferida para o vector de expressão pcDNA-DEST40 mediante recombinação LR Gateway. Como a inserção codifica dois codões de terminação após a parte de Fc, os marcadores codificados em pcDNA-DEST40 (epítos V5 e 6xHis) não estão presentes em CR5/18. Os

clones positivos foram identificados mediante digestão de restrição por AlwNI e a sequência foi verificada novamente.

(C) Cultura e transfecção celulares

As células CHO-K1 foram cultivadas num meio F12 de Ham complementado com FBS a 10% a 37°C e CO₂ 5% numa atmosfera saturada de água. As culturas de manutenção separaram-se cada 3-4 dias e usaram-se só até 20 passagens. As células transfectaram-se com a construção de expressão pcDNA-DEST40_CR5/18 usando Lipofectamine 2000 e condições convencionais para CHO-K1 proporcionadas por Invitrogen. Para um primeiro ensaio de expressão transitória, transfectaram-se células CHO-K1 em placas de 6 cavidades e ambos, células e sobrenadantes, recolheram-se 24 horas após a transfecção. O CR5/18 imuno-precipitou-se dos sobrenadantes usando agarose Protein A/G Plus e o anticorpo anti IgG humano (Fc) de acordo com as instruções do fabricante. Extraiu-se proteína celular completa e realizaram-se transferências de Western com anticorpo anti IgG humano (Fc) com os lisatos celulares e os imuno-precipitados como se descreve em Waetzig e col., J. Immunol. 168: 5342 (2002).

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

Depois de uma expressão transitória bem sucedida, as células CHO-K1 transferiram-se e seleccionaram-se clones positivos usando 400 µg/ml de G418 em placas de 10 cm. Para determinar a qualidade e propriedades do produto, transferiu-se um conjunto pré-seleccionado de CHO-K1 policlonais a frascos rotatórios e cultivou-se com FBS de IgG baixo. Os sobrenadantes das células em confluência recolheram-se 2-3 vezes por semana, centrifugaram-se duas vezes a 3.500 x g a 4°C durante 15 minutos para retirar resíduos celulares e processaram-se imediatamente ou congelaram-se a -80°C. Paralelamente, seleccionaram-se clones celulares estáveis do conjunto pré-seleccionado usando um procedimento de diluição limitado e

caracterizaram-se mediante análise de expressão de transferência de Western como foi descrito anteriormente. O clone com a expressão maior e mais estável foi transferido para frascos rotatórios e usou-se para produção permanente. (E) Purificação por cromatografia de afinidade e de exclusão por tamanho

Os sobrenadantes que continham o CR5/18 das culturas de frascos rotatórios purificaram-se a 4°C usando uma bomba peristáltica P-1 e um Sistema Purificador 100 ÄKTA (ambos de GE Healthcare; Munique, Alemanha). O protocolo baseou-se nas recomendações do fabricante para a purificação de anticorpos monoclonais.

Após a centrifugação, ajustou-se o pH do sobrenadante fresco ou descongelado (no gelo) a 6,7-7,0. Após dois ciclos de filtração em vácuo (0,45 µm) desgasificou-se o sobrenadante e, se necessário, ajustou-se o pH novamente para um valor de 6,7-7,0. Posteriormente, a coluna de cromatografia de afinidade equilibrada com PBS (6-25 ml de MabSelect numa coluna XK16/20) carregou-se com 2-4 l de sobrenadante a um caudal de 3-10 ml/minuto usando a bomba P-1. Após a lavagem com PBS, a coluna foi transferida para o purificador ÄKTA e lavou-se novamente com PBS até que o A_{280} se estabilizou depois da retirada quantitativa de proteína não unida. Para a eluição, o sistema ÄKTA equipou-se com dois tapões de citrato sódico 50 mM a pH 3,25 e 5,5, respectivamente, que foram misturados para produzir as condições de pH desejadas. Seguiu-se uma etapa de lavagem a pH 5,1 com eluição com pH 3,7. Recolheram-se fracções de 10 ml em tubos de 15 ml que continham 2 ml de Tris-HCl 1 M (pH 11). As fracções máximas agruparam-se e foi medido e ajustado o pH a 7,5, quando necessário. Mediu-se a concentração de proteína de conjunto mediante A_{280} e concentrou-se cuidadosamente o conjunto a um máximo de 1,5 mg/ml usando unidades de concentração de membrana Amicon Ultra-15 50 kDa Ultracel-PL. Utilizaram-se colunas de

dessalinização PD-10 equilibradas com PBS para substituir o tampão citrato com PBS, seguido de outra medida da concentração de proteína a 250 nm.

Para a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), era recomendável uma concentração de proteína máxima de 1,2 mg/ml em PBS. A SEC realizou-se com o sistema ÄKTA numa coluna HiLoad 26/60 Superdex de 200 µg equilibrada com PBS a um caudal de 0,8 ml/minuto. Contrariamente ao sgp130Fc de tipo selvagem, o CR5/18 é eluído num pico único depois de um pico baixo de agregados de peso molecular maior (Gráfico 2). Nos primeiros ciclos, obtiveram-se amostras de todas as fracções para análise por PAGE. As fracções de picos agruparam-se, foram medidas as suas concentrações de proteína e levaram-se a 400-500 µg/ml em PBS e foram congeladas aliquotas de uso único a -80°C para o seu armazenamento a longo prazo. As fracções e amostras de conjunto analisaram-se mediante PAGE nativo (7,5%) e coloração posterior de prata ou Coomassie.

Como é apresentado no Gráfico 2, a quantidade de produtos secundários (agregados) do CR5/18 reduz-se significativamente em comparação com o composto parental sgp130Fc que foi purificado numa experiência paralela. Além disso, a eluição do produto pretendido (dímero CR5/18) é claramente separável das fracções de impurezas (agregados), que não é o caso com sgp130Fc de tipo selvagem. Deste modo, tanto o rendimento (devido a uma maior proporção do produto pretendido) como a qualidade das preparações do CR5/18 são melhores que as de sgp130Fc convencional, o que conduz a menores custos para a produção industrial. Estes resultados indicam uma clara melhoria do CR5/18 face à molécula parental sgp130Fc.

Exemplo 2

Bioactividade do CR5/18 num ensaio normalizado de proliferação celular

(A) Material

Utilizou-se a linha celular BAF3/gp130 precursora de linfócitos B transfectada e a citocina de desenho Hyper-IL-6. As componentes de meio de cultura obtiveram-se como se segue: DMEM e PBS (PAA Laboratories; Cölbe, Alemanha), FBS (Biochrom; Berlim, Alemanha) e solução de Tripsina/EDTA (Invitrogen; Karlsruhe, Alemanha). A interleucina-6 (IL-6) e o receptor de interleucina-6 (sIL-6R) obtiveram-se de BioSource (Solingen, Alemanha) e R&D Systems (Wiesbaden, Alemanha), respectivamente. O ensaio de proliferação celular não radiactivo aquoso de titulação celular 96 (MTS) foi obtido de Promega (Mannheim, Alemanha).

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

As células BAF3/gp130 dependem da presença do complexo IL-6/sIL-6R no meio da cultura para a sua proliferação e viabilidade. Para a manutenção, as células BAF3/gp130 cultivaram-se a uma densidade de menos de 5×10^5 células/ml ou em DMEM com FBS a 10% e Hyper-IL-6 10 ng/ml (uma citocina de desenho que consiste em IL-6 e sIL-6R unidos covalentemente; Fischer e col. 1997, Nat. Biotechnol. 15: 142-145). A Hyper-IL-6 10 ng/ml podia ser substituída por IL-6 100 ng/ml e sIL-6R 50 ng/ml. As células foram passadas duas vezes por semana. Para os ensaios, as células lavaram-se duas vezes em meio sem Hyper-IL-6 (ou IL-6/sIL-6R) e foram semeadas depois a 5.000 células/cavidades em placas de 96 cavidades. Adicionou-se o CR5/18 ou o composto parental sgp130Fc a diversas concentrações que mudavam de 20 µg/ml a 78 ng/ml (séries de diluição 1:4; Gráfico 3). Posteriormente, as células foram incubadas durante 3 dias em presença de IL-6 100 ng/ml e sIL-6R 50 ng/ml. Os controlos incluíram células não estimuladas com ou sem a concentração máxima do CR5/18 ou sgp130Fc bem como células incubadas com os IL-6 e sIL-6R, apenas estimulantes (Gráfico 3).

(C) Resultados

A actividade biológica do CR5/18 ou sgp130Fc de tipo selvagem na cultura celular foi medida pela redução do número de células BAF3/gp130 (segundo foi determinado por conversão de substrato MTS) após de 3 dias. O CR5/18 é mais activo biologicamente que sgp130Fc de tipo selvagem, alcançando o seu CI_{50} a uma concentração de aproximadamente 400 ng/ml enquanto que o sgp130Fc ($CI_{50} \approx 800$ ng/ml) ainda não apresenta um efeito significativo (Gráfico 3). Isto indica que o CR5/18 poderia ser utilizado aproximadamente a metade da concentração terapêutica do composto de tipo selvagem.

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> Conaris research institute AG

<120> Dímeros sgp130Fc melhorados

<130> C1057EP

<140> EP06013668

<141> 06-06-2006

<160> 9

<170> Patentln 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

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (221)..(240)
 <223> região de charneira de IgG1 de tipo selvagem

<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> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> aminoácido substituído

<220>

<221> misc_feature

<222> (221)..(240)

<223> esquema de mutação da região de charneira de IgG1 X é aminoácido substituído

<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> Homo sapiens

<220>

<221> MUTAGÉNICO

<222> (14)..(15)

<220>

<221> misc_feature

<222> (221)..(240)

<223> mutante 1; região de charneira de IgG1

<400> 6

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (221)..(240)

<223> mutante 3; região de charneira de 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> Homo sapiens

<220>

<221> MUTAGÉNICO

<222> (14). . (15)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (234) .. (240)

<223> mutante 4; região de charneira de 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

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

A lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor, não sendo parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- EP 06013668 A [0052]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Duncan et al.** Nature, 1988, vol. 332, 563-564 [0008]
- **Canfield ; Morrison.** J. Exp. Med., 1991, vol. 173, 1483-1491 [0008]
- **Wines et al.** J. Immunol., 2000, vol. 164, 5313-5318 [0008]
- **Sondermann et al.** Nature, 2000, vol. 406, 267 [0008]
- **Youngster et al.** Curr Pharm Des, 2002, vol. 8, 2139 [0021]
- **Grace et al.** J Interferon Cytokine Res, 2001, vol. 21, 1103 [0021]
- **Pepinsky et al.** J Pharmacol Exp Ther, 2001, vol. 297, 1059 [0021]
- **Pettit et al.** J Biol Chem, 1997, vol. 272, 2312 [0021]
- **Goodson et al.** Biotechnology NY, 1990, vol. 8, 343 [0021]
- **Katre.** J Immunol, 1990, vol. 144, 209 [0021]
- **Sambrook.** Molecular Cloning A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0024] [0025]

- **Grant et al.** *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 153, 516-544 [0027]
- **Siam et al.** *Methods*, 2004, vol. 33, 189-198 [0027]
- **Macauley-Patrick et al.** *Yeast*, 2005, vol. 22, 249-270 [0027]
- **Gellissen et al.** *FEMS Yeast Res.*, 2005, vol. 5, 1079-1096 [0027]
- **Wildt ; Gerngross.** *Nat.Rev.Microbiol.*, 2005, vol. 3, 119-128 [0027]
- **Stoger et al.** *Curr.Opin.Biotechnol.*, 2005, vol. 16, 167-173 [0028]
- **Gomord et al.** *Trends Biotechnol.*, 2005, vol. 23, 559-565 [0028]
- **Takamatsu.** *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 307-311 [0028]
- **Coruzzi et al.** *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 1671-1680 [0028]
- **Brogie et al.** *Science*, 1984, vol. 224, 838-843 [0028]
- **Winter et al.** *Results Probl. Cell Differ.*, 1991, vol. 17, 85-105 [0028]
- **Hobbs ; Murry.** *McGraw Hill Yearbook of Science and Technology.* McGraw Hill, 1992, 191-196 [0028]
- **Engelhard et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 3224-3227 [0029]
- **Logan, J. ; Shenk, T.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 3655-3659 [0030]
- **Wigler, M. et al.** *Cell*, 1977, vol. 11, 223-32 [0031]
- **Lowy, I. et al.** *Cell*, 1980, vol. 22, 817-23 [0031]
- **Wigler, M. et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1980, vol. 77, 3567-70 [0031]
- **Colbere-Garapin, F. et al.** *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 150, 1-14 [0031]

- **Hartman, S. C. ; R. C. Mulligan.** Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, vol. 85, 8047-51 [0031]
- **Rhodes, C. A. et al.** Methods Mol. Biol., 1995, vol. 55, 121-131 [0031]
- **Fingl et al.** The Pharmacological Basis of Therapeutics. Macmillan Publishing Co, 1975, 1-46 [0037]
- **Waetzig et al.** J. Immunol., 2002, vol. 168, 5342 [0043]
- **Fischer et al.** Nat. Biotechnol., 1997, vol. 15, 142-145 [0050]

Lisboa, 01/12/2010

REIVINDICAÇÕES

1. Um dímero polipeptídico capaz de inibir a actividade do complexo agonista IL-6/sIL-6R e que consiste em dois monómeros em que cada um desses monómeros consiste em (a) uma parte extra celular de uma molécula de gp130 ou (b) uma variante ou fragmento dessa parte extra celular capaz de inibir a actividade do complexo agonista IL-6/sIL-6R, fundida com um domínio Fc de uma proteína IgG1 e em que pelo menos o resíduo de aminoácido Leu₂₃₅ da região de charneira do domínio Fc é substituído por pelo menos um resíduo de aminoácido hidrófilo.
2. O dímero polipeptídico da reivindicação 1, em que o resíduo de aminoácido hidrófilo é Glu ou Asp.
3. O dímero polipeptídico da reivindicação 1 ou 2, em que, além disso, o resíduo de aminoácido Leu₂₃₄ da região de charneira é substituído por Phe ou Ala.
4. O dímero polipeptídico da reivindicação 3, em que os resíduos de aminoácidos Leu₂₃₄ e/ou Gly₂₃₇ da região de charneira são substituídos pelo resíduo de aminoácido Ala.
5. O dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 4, em que a região de charneira contém o motivo de sequência de aminoácidos Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇ em vez de Leu₂₃₄-Leu₂₃₅-Gly₂₃₆-Gly₂₃₇.
6. O dímero polipeptídico da reivindicação 5, em que a região de charneira contém a sequência de aminoácidos Asp₂₂₁-Lys₂₂₂-Thr₂₂₃-His₂₂₄-Thr₂₂₅-Cys₂₂₆-Pr₂₂₇-Pro₂₂₈-Cys₂₂₉-Pro₂₃₀-Ala₂₃₁-Pro₂₃₂-Glu₂₃₃-Ala₂₃₄-Glu₂₃₅-Gly₂₃₆-Ala₂₃₇-Pro₂₃₈-Ser₂₃₉-Val₂₄₀.

7. O dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a molécula de gp130 solúvel ou uma variante ou fragmento da mesma é fundida directamente com a região de charneira do domínio Fc da proteína IgG1 ou mediante um *linker* polipeptídico flexível.

8. O dímero polipeptídico da reivindicação 7, em que o *linker* é uma sequência de ligação constituída por 2 a 50 resíduos de aminoácidos seleccionados independentemente do grupo que consiste em glicina, serina, asparagina, treonina e alanina.

9. O dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que um ou mais sítios de N-glicosilação estão inseridos entre a molécula de gp130 solúvel ou uma sua variante ou fragmento e o domínio Fc.

10. O dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que os monómeros estão unidos entre si através de uma ligação covalente simples, um *linker* peptídico flexível ou uma ou mais pontes dissulfureto.

11. O dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que pelo menos um monómero desse dímero é peguilado.

12. Um polinucleótido que codifica um monómero do dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

13. Um vector de expressão que contém um polinucleótido da reivindicação 12.

14. Uma célula hospedeira que contém um vector de expressão da reivindicação 13.

15. Um procedimento para produzir o dímero polipeptídico de qualquer uma das reivindicações 1 a 10, que consiste em cultivar uma célula hospedeira da reivindicação 14 e recuperar o monómero ou dímero dessa célula hóspede ou do meio de cultura.

16. Uma composição farmacêutica que contém um dímero polipeptídico de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

17. Utilização de um dímero polipeptídico de acordo com o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento e/ou prevenção de reabsorção óssea, hipercalcemia, caquexia, um tumor ou outro tipo de cancro, uma doença auto-imune, uma doença inflamatória ou atópica, uma infecção, um distúrbio endocrinológico ou uma doença metabólica ou catabólica.

Lisboa, 01/12/2010

Região de cadeia -- FC

	DKTHTCPPCPAPE	LLGG PSV...	IgG1 tipo selvagem
...sgp130 domínio extra celular			
...sgp130 domínio extra celular	DKTHTCPPCPAPE	XZGA PSV...	Esquema de mutação
...sgp130 domínio extra celular	DKTHTCPPCPAPE	AEGA PSV...	mutante 1 (por ex. no CR5/18)
...sgp130 domínio extra celular	DKTHTCPPCPAPE	ADGA PSV...	mutante 2
...sgp130 domínio extra celular	DKTHTCPPCPAPE	FEGA PSV...	mutante 3
...sgp130 domínio extra celular	DKTHTCPPCPAPE	FDGA PSV...	mutante 4

aa 234-235-236-237
 Numeração EU

Fig. 1

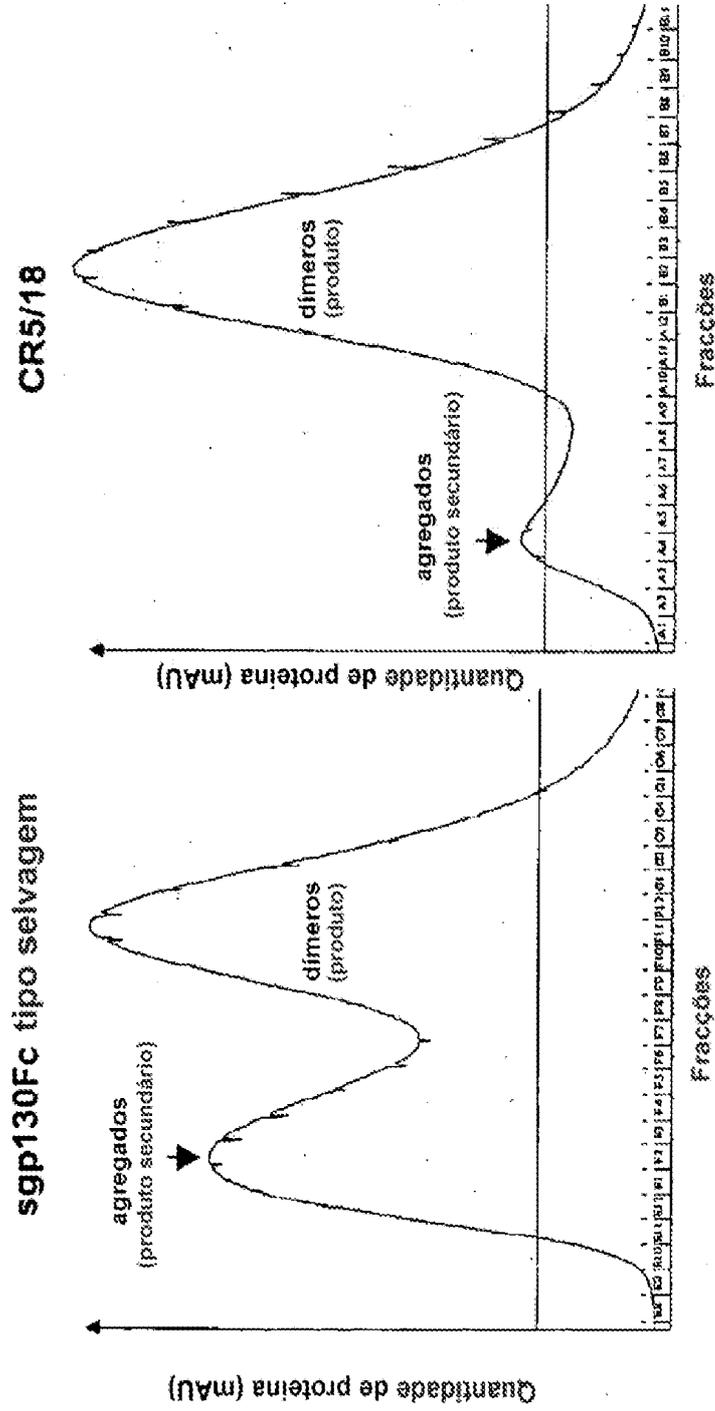
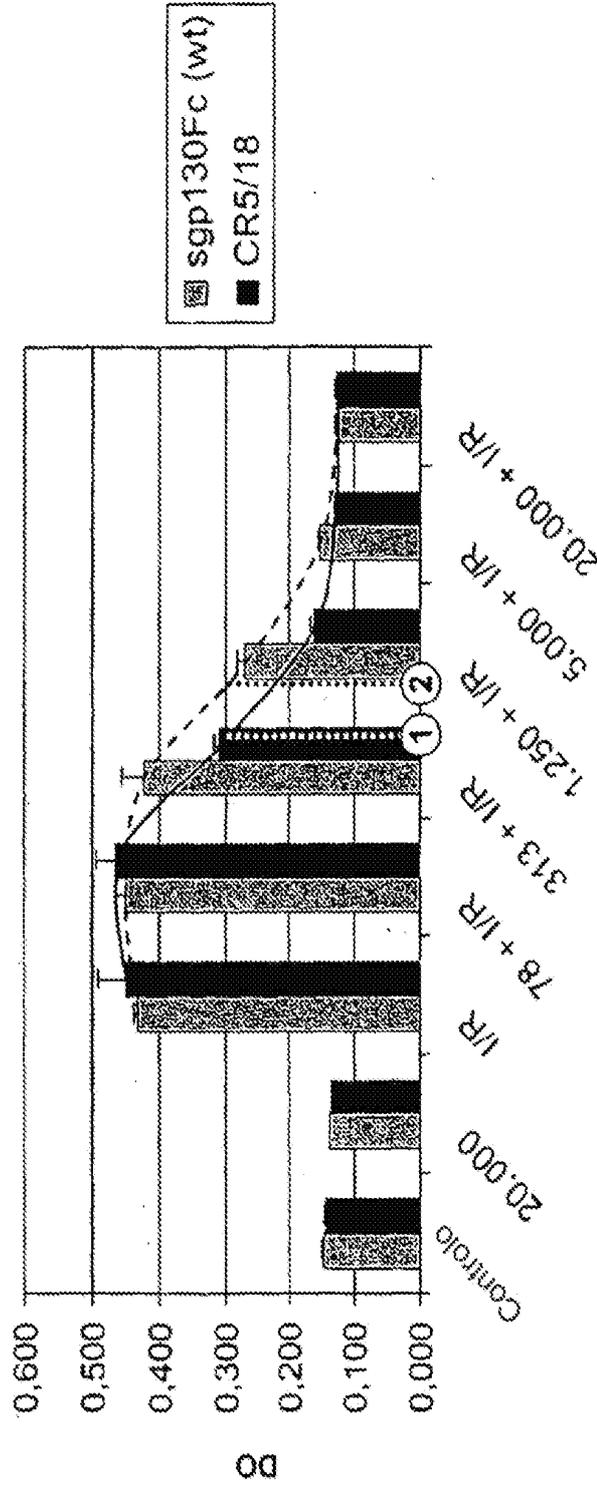


Fig. 2

Ensaio MTS de viabilidade celular com células BAF/gp130



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

Fig. 3