

VARIANTES DE IL-37

REFERENCIA(S) CRUZADA(S) CON SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de las solicitudes provisionales australianas 2015902262 y 2016900703, los contenidos completos de ambas solicitudes se incorporan en la presente descripción como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a polipéptidos, que incluyen variantes de la interleucina-37 (IL-37), y a agentes terapéuticos y composiciones relacionadas. La invención se refiere, además, al uso de los polipéptidos y composiciones en los métodos de tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inflamación juega un papel fundamental en las defensas del huésped y en la progresión de enfermedades mediadas por el sistema inmunitario. La respuesta inflamatoria se inicia en respuesta a una lesión de tejidos (p. ej., trauma, isquemia, y partículas extrañas) y a una infección mediante una cascada compleja de eventos, que incluye mediadores químicos (p. ej., citocinas y prostaglandinas) y células inflamatorias (p. ej., leucocitos). La respuesta inflamatoria se caracteriza por aumento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad capilar, y el influjo de células fagocíticas. Estos eventos producen hinchazón, enrojecimiento, calor (patrones de calor alterados), y formación de pus en el sitio de la lesión.

Una interacción entre los elementos inmunitarios humoral y celular en la respuesta inflamatoria permite la eliminación de agentes dañinos y el inicio de la reparación del tejido dañado. Cuando esta interacción se interrumpe, la respuesta inflamatoria puede producir un daño considerable al tejido normal de las respuestas inflamatorias no controladas, se necesita la intervención clínica para evitar el daño en tejidos y la disfunción de órganos.

La interleucina-37 (IL-37) es un miembro de la familia IL-1 de citocinas con efectos antiinflamatorios únicos y amplios en la inmunidad innata y adaptativa. La IL-37 disminuye específicamente la inflamación mediada por citocinas proinflamatorias tales como IL-1 β y TNF a través de sus receptores, así como también los ligandos del Receptor tipo Toll y tiene funciones protectoras extensas en la inflamación desencadenada por la infección u otras agresiones no

infecciosas. La IL-37 inicia la señalización tanto en la membrana celular, mediante la interacción con el receptor α de IL-18 e IL-1R8 (Sigirr), y dentro de la célula mediante interacciones con Smad3. Sin embargo, actualmente falta una comprensión de la relación entre estructura, función y regulación de la actividad de IL-37.

5 Existe una necesidad de composiciones antiinflamatorias y métodos de tratamiento mejorados.

La referencia a cualquier técnica anterior en la descripción no es un reconocimiento o sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en cualquier jurisdicción o que debe esperarse razonablemente que esta técnica anterior sea comprendida,
10 considerada como relevante, y/o combinada con otras partes de la técnica anterior por un experto en la técnica.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un polipéptido antiinflamatorio monomérico que
15 comprende una secuencia de aminoácidos de un monómero de IL-37, la secuencia de aminoácidos tiene una mutación o modificación para evitar que el péptido antiinflamatorio forme un homodímero.

La presente invención proporciona un polipéptido antiinflamatorio que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-37, la secuencia de aminoácidos tiene una mutación o modificación que reduce la capacidad del polipéptido antiinflamatorio de formar un
20 dímero.

Preferentemente, la mutación o modificación reduce o evita que el polipéptido forme una interfase de dimerización que permita la dimerización de monómeros de IL-37. Típicamente, la mutación o modificación se localiza en una región del polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos que forma la interfase de dimerización de un
25 monómero de IL-37. La mutación o modificación puede localizarse en los bucles $\beta 3$ o $\beta 4$ que forman la interfase de dimerización de un monómero de IL-37.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-37 o fragmento de este, en donde el polipéptido tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia
30 de la sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86

%, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1.

5 La presente invención proporciona un polipéptido de IL-37 que tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1.

10 La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-37 o fragmento de este, en donde el polipéptido tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido tiene una mutación o modificación de al menos un residuo localizado en una posición equivalente a la región del bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ en la sec. con núm. de ident.: 1. Preferentemente, la región del bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ consiste en, o es equivalente a, los residuos 83 a 91 de la sec. con núm. de ident.: 1. Preferentemente, la mutación o modificación se produce para un residuo en una posición, o en una posición equivalente a, K83, N84, Y85, I86, R87 y/o P88. Preferentemente, la mutación es un reemplazo con un residuo no conservador, con mayor preferencia, la mutación es un reemplazo con alanina o un aminoácido con una carga opuesta.

20 La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-37 o fragmento de este, en donde el polipéptido tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido tiene una mutación o modificación de un residuo en, o en una posición equivalente a, D73, K83 y Y85. Preferentemente, la mutación es un reemplazo con un residuo de aminoácidos no conservador, con mayor preferencia, la mutación es un reemplazo con alanina o un aminoácido con una carga opuesta. Con mayor preferencia, la mutación es cualquiera de una o más de D73A, D73K, K83E, K83A y Y85A.

25 La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-37 o fragmento de este, en donde el polipéptido tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido tiene una mutación o modificación de, o en una posición equivalente a, V71, V80 y I78. Preferentemente, la mutación es un reemplazo con un residuo no conservador, con mayor preferencia, la mutación es un reemplazo con alanina o un aminoácido con una carga opuesta.

La presente invención proporciona un polipéptido de IL-37 que tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido tiene la modificación de la región equivalente a la región del bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ en la sec. con núm. de ident.: 1. La modificación incluye, eliminar el bucle, acortar el bucle, alargar el bucle, mutar los residuos del bucle y/o modificar químicamente los residuos del bucle.

La presente invención proporciona un polipéptido monomérico que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 1.

La presente invención proporciona un polipéptido de IL-37 aislado, recombinante o sintético que existe como un monómero.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia paróloga o una ortóloga a la secuencia mostrada en la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el polipéptido existe como un monómero o tiene una capacidad reducida para formar un dímero en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia de la sec. con núm. de ident.: 1. Preferentemente, el polipéptido que comprende una secuencia paróloga u ortóloga a la secuencia mostrada en la sec. con núm. de ident.: 1 tiene una mutación o modificación en un residuo que se localiza en una interfase de dimerización que es equivalente a la interfase de dimerización como se describe en la presente descripción para la sec. con núm. de ident.: 1, por ejemplo los residuos en la Tabla 1.

Un polipéptido de la invención puede aislarse, purificarse, purificarse sustancialmente, enriquecerse, ser sintético o recombinante.

Como se usa en la presente descripción, la capacidad reducida para formar un dímero puede referirse a una capacidad reducida para formar un heterodímero y/o homodímero.

La invención proporciona, además, un polipéptido que comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de IL-37 o fragmento de este, en donde la secuencia de aminoácidos contiene al menos una mutación de, o modificación a, un residuo en, o en una posición equivalente a, la interfase del dímero de la sec. con núm. de ident.: 1. La interfase del dímero en relación con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1 incluye los residuos en la Tabla 1. Típicamente, el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que contiene una mutación o modificación de un residuo en, o en una

posición equivalente a, 73, 83 y 85 de la sec. con núm. de ident.: 1. Con mayor preferencia, la mutación es cualquiera o más de D73A, D73K, K83E, K83A y Y85A.

La presente invención proporciona un polipéptido de IL-37 aislado, recombinante o sintético que no tiene la capacidad para formar un dímero o tiene una capacidad reducida para formar un
5 dímero. En este o cualquier otro aspecto de la invención descrita en la presente descripción, la capacidad de un polipéptido para formar un dímero puede determinarse mediante cualquier método descrito en la presente descripción, que incluye cromatografía de exclusión por tamaño y dispersión de luz multiangular, electroforesis analítica en gel bajo condiciones no desnaturizantes, centrifugación analítica, espectrometría de masas o cromatografía líquida de alta resolución en fase
10 reversa (RP-HPLC).

La reducción en la formación de dímeros puede compararse con un polipéptido de referencia. El polipéptido de referencia puede ser, típicamente, un polipéptido de IL-37 nativo, tipo silvestre, no modificado o no mutado. Preferentemente, el polipéptido de referencia tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1. Alternativamente, si el polipéptido de la invención
15 tiene una secuencia de aminoácidos que es paróloga u ortóloga a la sec. con núm. de ident.: 1, entonces el péptido de referencia es la secuencia de aminoácidos paróloga y ortóloga nativa, tipo silvestre, no modificada o no mutada.

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86
20 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 1, en donde el residuo de aminoácido en, o equivalente a:

la posición 71 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Val;
la posición 72 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Leu;
25 la posición 73 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es un Asp;
la posición 74 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Ser;
la posición 78 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Ile;
la posición 80 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Val;
la posición 83 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Lys;
30 la posición 84 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Asn;
la posición 85 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Tyr;
la posición 86 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Ile;

la posición 87 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Arg;

la posición 88 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Pro; y/o

la posición 184 en la sec. con núm. de ident.: 1 no es una Asn. Preferentemente, el residuo de aminoácido es una sustitución no conservadora en relación con el aminoácido que se produce en esa posición en la sec. con núm. de ident.: 1. En una modalidad, el aminoácido en la posición 85 es una alanina, el aminoácido en la posición 83 es un glutamato, el aminoácido en la posición 73 es una alanina y/o el aminoácido en la posición 73 es una lisina. En una modalidad, el residuo de aminoácido en, o en una posición equivalente a, la posición 71, 72, 73, 74, 78, 80, 83, 84, 85, 86, 87, 88 y/o 184 en la sec. con núm. de ident.: 1 se elimina.

En relación con cualquier polipéptido de la invención descrito en la presente descripción, el polipéptido puede tener un truncamiento N-terminal de, o de residuos equivalentes a, 1 a 20 o 1 a 45 de la sec. con núm. de ident.: 1.

Cualquier polipéptido de la invención descrito en la presente descripción puede mostrar, además, mayores propiedades antiinflamatorias en comparación con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, una secuencia de aminoácidos de IL-37 que no se encuentra modificada o mutada, o un polipéptido de IL-37 que no muestra una capacidad reducida para formar un dímero. Las propiedades antiinflamatorias pueden determinarse mediante un ensayo descrito en la presente descripción, particularmente en los Ejemplos, que incluyen los Ejemplos 1, 3 y 4. En una modalidad, un polipéptido de la invención muestra propiedades antiinflamatorias a concentraciones menores que o aproximadamente 1 μ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml, 100pg/ml, 10pg/ml o 1pg/ml cuando se analiza en un ensayo como se describe en la presente descripción que incluye el ensayo de IL-1 β estimulada con LPS descrito en el Ejemplo 1 y 3. Las agresiones inflamatorias pueden incluir ligandos de un receptor tipo Toll (TLR) 2, 4, 7, 8 y/o 9, tales como HKLM, imiquimod, CpG-A o ssARN40. Un polipéptido de la invención puede reducir la IL-1 β en al menos un 30 % a 10pg/ml, al menos un 40 % a 10ng/ml o al menos aproximadamente un 50 % en cualquiera de una o más de 1pg/ml, 10pg/ml, 100pg/ml, 10ng/ml o 100ng/ml cuando se analiza en el ensayo de IL-1 β estimulada con LPS descrito en el Ejemplo 1 y 3. También puede observarse reducción en otras citocinas proinflamatorias tales como IL-6. Un polipéptido de la invención puede no mostrar una diferencia estadísticamente significativa en la propiedad antiinflamatoria cuando se analiza a 10ng/ml y 100ng/ml en un ensayo descrito en la presente descripción que incluye el ensayo de IL-1 β estimulada con LPS descrito en el Ejemplo 1 y 3. Un

polipéptido de la invención puede mostrar una propiedad antiinflamatoria idéntica o similar a una IL-37 mutada descrita en los Ejemplos.

5 La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o evitar una enfermedad o afección inflamatoria que comprende un polipéptido de la invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, el único ingrediente activo presente en la composición es un polipéptido de la invención.

10 La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o evitar una enfermedad o afección inflamatoria que comprende como un ingrediente activo un polipéptido de la invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, el único ingrediente activo presente en la composición es un polipéptido de la invención.

La invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o evitar una enfermedad o afección inflamatoria que comprende como un ingrediente principal un polipéptido de la invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, el único ingrediente activo presente en la composición es un polipéptido de la invención.

15 La invención proporciona, además, un polipéptido de la invención para el uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria.

La invención proporciona, además, una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable para el uso en el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria.

20 La invención proporciona, además, un método para inhibir la inflamación en un sujeto necesitado de este, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, que inhibe de esta manera la inflamación.

25 La presente invención proporciona un método para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección inflamatoria, el método comprende la etapa de administrar una composición al sujeto para el tratamiento o la prevención, en donde la composición comprende, consiste esencialmente en o consiste en el polipéptido de la invención y un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

30 En cualquier método o uso de la invención descrito en la presente descripción, un polipéptido de la invención puede administrarse sistémicamente o directamente al sitio de la enfermedad. Un polipéptido de la invención puede formularse para administración oral.

La presente invención proporciona un método para tratar o evitar una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto necesitado de este, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o composición farmacéutica de la invención, que trata o evita de esta manera una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto.

5 La invención proporciona, además, un método para aliviar o mejorar un síntoma de una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto necesitado de este, el método comprende administrar al sujeto necesitado de este una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o composición farmacéutica de la invención, que alivia o mejora de esta manera un síntoma de una enfermedad o afección inflamatoria en el sujeto.

10 La invención proporciona, además, el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o composición farmacéutica de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección inflamatoria en un sujeto necesitado de este.

La presente invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o
15 afección inflamatoria en un sujeto que comprende las etapas de
identificar un sujeto que tiene una enfermedad o afección inflamatoria; y
administrar al sujeto necesitado de este una cantidad terapéuticamente eficaz de un
polipéptido o composición farmacéutica de la invención,
tratar de esta manera una enfermedad o afección inflamatoria en el sujeto.

20 La presente invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad o afección inflamatoria que comprende las etapas de
identificar un sujeto que tiene una enfermedad o afección inflamatoria; y
administrar al sujeto necesitado de este una cantidad terapéuticamente eficaz de un
polipéptido o composición farmacéutica de la invención,
25 tratar de esta manera una enfermedad o afección inflamatoria en el sujeto.

La invención proporciona, además, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido como se describe en la presente descripción.

La invención proporciona, además, un vector que comprende una molécula de ácido nucleico descrita en la presente descripción.

30 La invención proporciona, además, una célula que comprende un vector o molécula de ácido nucleico descrita en la presente descripción.

La invención proporciona, además, un animal o tejido derivado del mismo que comprende una célula descrita en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, excepto cuando el contexto lo requiera de cualquier otra manera, el término "comprende" y variaciones del término, tales como "que comprende", "comprende" y "comprendió", no pretenden excluir aditivos, componentes, enteros o etapas adicionales. El término "que incluye" también se usa indistintamente con "que comprende" y además no pretende excluir aditivos, componentes, enteros o etapas.

Aspectos adicionales de la presente invención y modalidades adicionales de los aspectos descritos en los párrafos precedentes se harán evidentes a partir de la siguiente descripción, que se da a modo de ejemplo y con referencia a las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: La IL-37 forma un homodímero simétrico nuevo cabeza a cabeza. (A) SDS-PAGE de IL-37 purificada tipo silvestre (1-218), y variantes IL-37 (21-218) e IL-37 (46-218) con el N-terminal truncado. Se indica una pequeña proporción del dímero de IL-37 estable en SDS. (B) Análisis SEC-MALS del homodímero de IL-37 en relación con la IL-18 monomérica. El registro de la señal SEC corresponde al eje Y izquierdo y la determinación por MALS del peso molecular promedio (eje Y derecho) se muestra como una línea punteada debajo del registro de la señal del índice de refracción. (C) Vista general del homodímero de IL-37 visto desde dos orientaciones, relacionadas por un ángulo de 90° en el sentido de las agujas del reloj sobre el eje horizontal. La estructura se muestra en formato de dibujos con IL-37A a la izquierda e IL-37B a la derecha (A y B se usan para diferenciar las moléculas de IL-37 en el homodímero).

Figura 2: Análisis estructural y mutacional de la interfase del dímero de IL-37. (A) Homodímero de IL-37 en formato de dibujos con el eje de simetría C_2 del homodímero marcado con un círculo. (B) Interfase de homodimerización con cadenas laterales que realizan interacciones críticas mostradas como bastoncillos y enlaces de hidrógeno como líneas punteadas. (C) Interfase de IL-37 rotada 180° sobre el eje horizontal en comparación con (B) las cadenas laterales críticas como bastoncillos. (D) Análisis SEC-MALS de los mutantes de la interfase del dímero de IL-37 con el registro de la señal SEC que corresponde al eje Y izquierdo y la determinación por MALS del peso molecular promedio (eje Y derecho) se muestra como una línea punteada debajo del trazo del índice de refracción.

Figura 3: SEC MALS de la interfase del dímero de IL-37. Análisis SEC-MALS de la IL-37 tipo silvestre y los mutantes de la interfase de IL-37. SEC monitoreado mediante la absorbancia a 280 nm (eje izquierdo) y el peso molecular promedio obtenido de MALS indicado en el eje derecho. *Debe notarse que los picos situados entre los picos del dímero y de la interleucina tipo silvestre son

5 característicos de un dímero que experimenta disociación mientras que pasa a través de la columna (ver Woodbury y otros, Protein Science 2002). Es decir, la proteína no se encuentra en equilibrio entre el monómero y el dímero durante la corrida SEC sino que se disocia constantemente a medida que la concentración cae tras la dilución en la columna.

Figura 4: Isoforma 1 de IL-37 (sec. con núm. de ident.: 1). Número de acceso NP_055254.

10 Esta es la secuencia en toda su extensión de la isoforma de IL-37 usada en la presente descripción y se correlaciona con la numeración referida en la presente descripción. La secuencia usada en los ensayos de cristal fue de los residuos 46-218 de esta secuencia.

Figura 5: Inhibición diferencial de la IL-1 β estimulada con LPS por las variantes de la IL-37 recombinante en PBMC humanas. Las PBMC recién aisladas de voluntarios saludables se

15 incubaron con las concentraciones indicadas de cuatro variantes de IL-37b recombinante, que incluyen la proteína natural (tipo silvestre) y el mutante monómero (D73K), ambos con el N-terminal truncado ya sea en el aminoácido 21 (21-218) o en el 46 (46-218). Treinta minutos después, los cultivos se estimularon con LPS (50 pg/ml) o vehículo (no inducción de IL-1 β , no se muestra). Los sobrenadantes se recolectaron 20 h después de la adición de LPS y la IL-1 β se midió mediante

20 ELISA. La gráfica muestra el por ciento de cambio $\pm$ SEM de IL-1 β proporcionado por las variantes de IL-37b en comparación con LPS+vehículo (fijado como 0); n=15 donores; *, P<0.05 para vehículo+LPS en función de todos los otros grupos; #, P<0.05 y ##, P<0.01 para monoIL-37 en función de todas las otras variantes a la misma concentración.

Figura 6: Reducción de IL-1 β por las variantes de IL-37b transfectadas en los macrófagos

25 THP-1. Los macrófagos THP-1 se transfectaron con las variantes de IL-37b indicadas (en toda su extensión, 1-218) seguido por la diferenciación de las células con PMA y la estimulación posterior con LPS (250 ng/ml) o vehículo. Los sobrenadantes se recolectaron 24 h después y se analizaron para IL-1 β mediante ELISA. Sobrenadante IL-1 β $\pm$ SEM; n=11-26; *, P<0.05 para Control en función de la transfección de IL-37b; #, P<0.05 para natIL-37b en función de monoIL-37. P<0.001 para la

30 transfección de las variantes de IL-37b en comparación con la transfección control.

Figura 7: Los ratones tipo silvestres C57Bl/6 (WT) se inyectaron con las variantes recombinantes de IL-37 (40 μ g/kg) o el vehículo por vía intraperitoneal 60 min antes de 10 mg/kg

de LPS o vehículo (tiempo 0h). Los ratones IL-37tg se inyectaron también con LPS o vehículo para la comparación directa. n=94 ratones en general, 4-24 por grupo para WT, 5 para IL-37tg. La temperatura corporal se midió en los puntos de tiempo indicados y se grafica $\pm$ SEM; todos los ratones con vehículo se muestran juntos. *, $P < 0.05$ y ***, $P < 0.001$ para LPS en función de todas las otras condiciones; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$, y ###, $P < 0.001$ para las variantes D73K o Y85A en función de recIL-37 natural; ns-tg, no significativo en función de IL-37tg; ns-v, no significativo en función de vehículo; *1-4, análisis estadístico a las 7 h: *1, * y ns-v; *2, * y ns-v y ns-tg; y *3, *** y ns-tg; *4, * y ns-tg. RecIL-37²¹⁻²¹⁸ se muestra en gris para la comparación directa, los análisis estadísticos para estos grupos se calcularon por separado.

Figura 8: Como se muestra en la Figura 7, IL-1 β $\pm$ SEM plasmática en ratones WT a las 19h. Veh, vehículo; Nat, recIL-37 natural; Mono, D73K; los números indican el truncamiento N-terminal de las variantes.

Figura 9: Inhibición diferencial de IL-1 β o IL-6 estimulada con HKLM por las variantes de IL-37 recombinante en PBMC humanas. Las PBMC recién aisladas se estimularon como se indicó. HKLM (*Listeria monocytogenes* destruida con calor) se usó a 10⁶ células por ml y se añadió 30 min después de las variantes de recIL-37. Negro, sólo HKLM; blanco, HKLM + recIL-37 natural; gris claro, HKLM + D73K; gris oscuro, HKLM + Y85A (todas las variantes 46-218). Los sobrenadantes se recolectaron 20 h después de la adición de HKLM y la IL-1 β (a-c, g) y la IL-6 (d-f, h) se midieron mediante ELISA. (a-f) Concentración (conc) 1, 10 ng/ml; conc 2, 100 pg/ml; conc 3, 10 pg/ml. Las gráficas muestran las concentraciones absolutas de citocina $\pm$ SEM en los sobrenadantes de los cultivos de donores individuales FC (a, d), JM (b, e), y LM (c, f). (e-f) Datos de conc 1 de HKLM + D73K no disponibles. (g, h) El por ciento de cambio en IL-1 β (g) e IL-6 (h) se calculó a partir de los datos primarios mostrados en los paneles a-f y se representa $\pm$ SEM. Las concentraciones de recIL-37 se indican en pg/ml. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ para HKLM sola en función de HKLM + recIL-37; ##, $P < 0.01$ para Y85A en función de recIL-37 natural a la misma concentración.

Figura 10: Inhibición diferencial de IL-1 β o IL-6 estimulada con imiquimod por variantes de IL-37 recombinante en PBMC humanas. Las PBMC recién aisladas se estimularon como se indicó. El imiquimod se usó a 10 μ g/ml y se añadió 30 min después de las variantes de recIL-37b. Negro, imiquimod solo; blanco, imiquimod + recIL-37 natural; gris claro, imiquimod + D73K; gris oscuro, imiquimod + Y85A (todas las variantes 46-218). Los sobrenadantes se recolectaron 20 h después de la adición de imiquimod y la IL-1 β (a-c, g) y la IL-6 (d-f, h) se midieron mediante ELISA.

(a-f) Concentración (conc) 1, 10 ng/ml; conc 2, 100 pg/ml; conc 3, 10 pg/ml. Las gráficas muestran las concentraciones absolutas de citocina $\pm$ SEM en los sobrenadantes de los cultivos de donores individuales FC (a, d), JM (b, e), y LM (c, f). (e) Datos de conc 2 de imiquimod + natural no disponibles. (g, h) El por ciento de cambio en IL-1 β (g) e IL-6 (h) se calculó a partir de los datos primarios mostrados en los paneles a-f y se representa $\pm$ SEM. Las concentraciones de recIL-37 se indican en pg/ml. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ para imiquimod solo en función de imiquimod + recIL-37; #, $P < 0.05$ para Y85A en función de recIL-37 natural a la misma concentración.

Figura 11: Las PBMC recién aisladas se estimularon como se indicó. CpG-A se usó a 3 μ M y se añadió 30 min después de las variantes recIL-37b. Negro, CpG-A solo; blanco, CpG-A + recIL-37 natural; gris claro, CpG-A + D73K; gris oscuro, CpG-A + Y85A (todas las variantes 46-218). Los sobrenadantes se recolectaron 20 h después de la adición de CpG-A y la IL-6 (a-c) se midió mediante ELISA. (a-c) Concentración (conc) 1, 10 ng/ml; conc 2, 100 pg/ml; conc 3, 10 pg/ml. Las gráficas muestran las concentraciones absolutas de citocina $\pm$ SEM en los sobrenadantes de los cultivos de donores individuales FC (a), JM (b), y LM (c). Datos de conc 3 de CpG-A + D73K no disponibles. (d) El por ciento de cambio en la IL-6 se calculó a partir de los datos primarios mostrados en los paneles a-c y se representa $\pm$ SEM. Las concentraciones de recIL-37 se indican en pg/ml. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ para CpG-A solo en función de CpG-A + recIL-37.

Figura 12: Las PBMC recién aisladas se estimularon como se indicó. ssARN40 se usó a 0.5 μ g/ml y se añadió 30 min después de las variantes de recIL-37. Negro, ssARN40 solo; blanco, ssARN40 + recIL-37 natural; gris claro, ssARN40 + D73K; gris oscuro, ssARN40 + Y85A (todas las variantes 46-218). Los sobrenadantes se recolectaron 20 h después de la adición de ssARN40 y la IL-1 β se midió mediante ELISA. (a, b) Concentración (conc) 1, 10 ng/ml; conc 2, 100 pg/ml; conc 3, 10 pg/ml. Las gráficas muestran las concentraciones absolutas de citocina $\pm$ SEM en los sobrenadantes de los cultivos de donores individuales JF (a) y MS (b). Los datos de conc 3 (JF) y 2 (MS) de ssARN40 + D73K no se encuentran disponibles. (c) El por ciento de cambio en IL-1 β se calculó a partir de los datos primarios mostrados en los paneles a y b y se representa $\pm$ SEM. Las concentraciones de recIL-37 se indican en pg/ml. No se realizaron cálculos estadísticos ya que solo hay disponibles dos conjuntos de datos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS MODALIDADES

Se entenderá que la invención descrita y definida en esta descripción se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes

a partir del texto o las figuras. Todas estas diferentes combinaciones constituyen varios aspectos alternativos de la invención.

Ahora se hará referencia en detalle a ciertas modalidades de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las modalidades, se comprenderá que la intención no es limitar la invención a esas modalidades. Por el contrario, se desea que la invención cubra todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que se puedan incluir dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones.

Un experto en la técnica reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción, los que podrían usarse en la práctica de la presente invención. La presente invención no se limita de ninguna manera a los métodos y materiales descritos. Se comprenderá que la invención descrita y definida en esta descripción se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes a partir del texto o las figuras. Todas estas diferentes combinaciones constituyen varios aspectos alternativos de la invención.

Todas las patentes y publicaciones referidas en la presente descripción se incorporan como referencia en su totalidad.

Para los propósitos de interpretación de esta descripción, los términos usados en el singular también incluirán el plural y viceversa.

El trabajo de los inventores que conduce a la invención incluye la estructura cristalina a resolución de 2.3 Å de IL-37 que revela un pliegue β -trébol característico de citocina IL-1 compuesto por 12 cadenas β y tres hélices α . Inesperadamente, la IL-37 forma una disposición homodimérica de cabeza a cabeza que es única dentro de la superfamilia IL-1. La IL-37 es dimérica en solución, y las mutaciones puntuales guiadas a la estructura dentro de la interfase del dímero convierten la IL-37 en un monómero. La IL-37 monomérica es significativamente más eficaz en suprimir la liberación de citocinas proinflamatorias en una variedad de tipos de células, que incluyen las células sanguíneas humanas. En conjunto, estos datos indican que la homodimerización de IL-37 constituye un mecanismo autorregulador nuevo que controla estrictamente su señalización antiinflamatoria. Significativamente, la IL-37 monomérica representa una molécula de beneficio terapéutico potencial en el tratamiento de una variedad de enfermedades inflamatorias.

Los polipéptidos de la invención muestran un aumento significativo de la actividad antiinflamatoria. Una ventaja de los polipéptidos de la invención es que no se produce la pérdida de eficacia que se observa con la IL-37 tipo silvestre (es decir natural, endógena) a concentraciones

elevadas. En otras palabras, los polipéptidos de la invención continúan mostrando efectos antiinflamatorios a altas concentraciones y en, al menos, un intervalo de concentración de 4 log. Esto es particularmente ventajoso ya que la ventana terapéutica para un polipéptido de la invención es considerablemente más amplia en comparación con la IL-37 recombinante tipo silvestre.

5 Un polipéptido de IL-37 es una molécula que tiene al menos una actividad bioquímica o biofísica de IL-37, por ejemplo, este puede unirse a, y puede ser un ligando para el receptor de interleucina 18 (IL-18R1/IL-1Rrp). Este puede unirse a la proteína de unión a interleucina 18 (IL-18BP), una proteína de unión inhibidora de interleucina 18 (IL-18), y formar posteriormente un complejo con la cadena beta del receptor de IL-18, y mediante el que puede inhibir la actividad de
10 IL-18. Otras actividades bioquímicas o biofísicas de la IL-37 incluyen la unión a IL-1R8 (Sigirr), que bloquea la producción de citocinas proinflamatorias pero no antiinflamatorias, desencadenadas por un amplio espectro de agresiones inflamatorias que incluyen los ligandos de TLR, IFN γ , TNF e IL-1 β en células inmunológicas humanas o murinas, la inhibición de la activación de células dendríticas (reducción de la expresión superficial de CD86 y MHC II), desencadenando un patrón
15 específico de la regulación de cinasas intracelulares que incluyen el bloqueo de las rutas de mTOR, MAPK y NF- κ B, y la inducción de cinasas antiinflamatorias tales como Mer y PTEN (como se describió en (5)).

La IL-37 se conoce, además, como interleucina-37 (FIL1 zeta; IL-1 zeta; IL-1F7b (IL-1H4, IL-1H, IL-1RP1); proteína IL-1X; IL1F7 (producto canónico IL-1F7b); miembro 7 de la familia de
20 interleucina 1; interleucina 1, zeta; homólogo 4 de interleucina-1; superfamilia z de interleucina-1; proteína relacionada con interleucina-1 e interleucina-23). La IL-37 humana tiene 5 isoformas, a, b, c, d y e, las que se incluyen cuando se refiere a la IL-37 en la presente descripción a menos que se establezca de cualquier otra manera. Cualquiera de las isoformas u ortólogos de los polipéptidos de IL-37 humanos que contienen al menos un residuo equivalente a un residuo de la interfase del dímero
25 en la Tabla 1 se contemplan también dentro de la presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye polipéptidos con identidad a cualquiera de las isoformas de IL-37 humana a, b, c, d o e.

Una interfase de dimerización que permite la dimerización de monómeros de IL-37 se refiere a la interfase entre dos moléculas de IL-37 que está implicada en la unión de una molécula a la otra.
30 Típicamente, la interfase no es accesible al solvente cuando las dos moléculas interactúan. La interfase incluye los residuos que producen interacciones críticas y/o contribuyen al área superficial enterrada de la interfase. La interfase puede ser la misma o diferente en términos de tamaño del área

superficial o composición de residuos en cada molécula en la interacción. La interfase incluye cualquiera o más de los residuos enumerados en la Tabla 1 más abajo que producen interacciones críticas y/o contribuyen al área superficial enterrada de la interfase. El bucle $\beta 3\text{-}\beta 4$ (residuos 83-91) es una región crítica de la estructura secundaria que controla la dimerización. Otras regiones contribuyen también a la interfase. Y85 se empaqueta en una superficie hidrófoba formada por Val71, Val80 e Ile78. El enterramiento de Y85 en esta región superficial podría parecer crítico para la formación de dímeros ya que la mutación de la cadena lateral a alanina disipa el dímero.

Tabla 1. Los residuos que contribuyen a la interfase del dímero de IL-37 se enumeran. Cualquiera o más de estos son residuos que podrían modificarse genéticamente/químicamente para interferir con la dimerización de IL-37. Datos obtenidos a partir de PDBePISA (EMBL).

Cadena de IL37: residuo	Tipo de interacción	Área superficial enterrada Å ²
A: Val 71		19.40
A: Leu 72		26.67
A: Asp 73	Enlace de hidrógeno	48.69
A: Ser 74		5.24
A: Ile 78		7.20
A: Val 80		9.87
A: Lys 83	Enlace de hidrógeno, puente salino	38.18
A: Asn 84		31.96
A: Tyr 85	Enlace de hidrógeno	150.42
A: Ile 86	Enlace de hidrógeno	34.53
A: Arg 87	Enlace de hidrógeno	109.21
A: Pro 88		2.35
A: Asn 184		3.26
B: Val 71		21.09
B: Leu 72		19.75
B: Asp 73	Puente salino	42.84
B: Ser 74	Enlace de hidrógeno	10.20
B: Ile 78		6.02

B: Val 80		7.70
B: Lys 83		18.06
B: Asn 84	Enlace de hidrógeno	49.36
B: Tyr 85	Enlace de hidrógeno	143.82
B: Ile 86	Enlace de hidrógeno	35.73
B: Arg 87	Enlace de hidrógeno	106.58
B: Pro 88		10.71
B: Asn 184		6.06

También se contempla una mutación o modificación de cualquiera o más de los residuos en la Tabla 1 que reduce o inhibe su capacidad para implicarse en el tipo de interacción específica. Por ejemplo, cualquier mutación en, o una posición equivalente a, Asp73 que reduce o inhibe la capacidad para formar un puente salino se incluye en la presente invención. La misma aplica a los enlaces de hidrógeno formados por Ser74, Asn84, Tyr85, Ile86 y Arg87.

Cualquier modificación de la región bucle $\beta 3$ - $\beta 4$ (residuos 83-91) podría desplazar el equilibrio de dímero a monómero. Eso incluye, pero no debería limitarse a, eliminar el bucle, acortar el bucle, alargar el bucle, mutar los residuos del bucle y/o modificar químicamente los residuos del bucle. Dentro de la región bucle Lys83, Asn84, Tyr85, Ile86, Arg87 y Pro88 parecen ser los residuos más críticos y se consideran, por lo tanto, para mutación o modificación.

La presente invención proporciona, además, un compuesto que inhibe la dimerización de un polipéptido de IL-37. Preferentemente, el compuesto se une a y/o interrumpe la interfase de dimerización. El compuesto puede ser un péptido, peptidomimético, anticuerpo o molécula pequeña que interactúa con al menos un residuo de aminoácido en la interfase de dimerización.

Además, la presente invención proporciona, además, el uso de un compuesto que inhibe la dimerización de un polipéptido de IL-37 en la fabricación de un medicamento para inhibir la inflamación. Además, la presente invención proporciona un método para inhibir la inflamación en un sujeto necesitado de este, que comprende administrar un compuesto que inhibe la dimerización de un polipéptido de IL-37. Preferentemente, el compuesto se une a e interrumpe la interfase de dimerización. El compuesto puede ser un péptido, peptidomimético, anticuerpo o molécula pequeña que interactúa con al menos un residuo de aminoácido en la interfase de dimerización.

La presente invención proporciona, además, un péptido que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la interfase de dimerización de la sec. con núm. de ident.: 1. Preferentemente, los aminoácidos contiguos son de V71 a P88 de la sec. con núm. de ident.: 1. El péptido puede usarse para generar anticuerpos que pueden inhibir la dimerización de un polipéptido de IL-37.

Como se usa en la presente descripción un residuo de aminoácido en la posición equivalente a la posición en la sec. con núm. de ident.: 1 puede determinarse mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, una alineación de una o más secuencias con una secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1 podría permitir a un experto en la técnica determinar el aminoácido en la posición equivalente a la posición en la sec. con núm. de ident.: 1. Un experto en la técnica puede comparar la estructura tridimensional de un polipéptido con la estructura tridimensional de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1 y determinar el residuo de aminoácido que se encuentra en una posición equivalente a la de la sec. con núm. de ident.: 1.

Como se usa en la presente descripción “capacidad reducida para formar un dímero” se refiere a una menor propensión de un polipéptido para formar un homodímero y/o heterodímero en comparación con un polipéptido de referencia. La capacidad de un polipéptido para formar un dímero puede medirse mediante varios medios que incluyen aquellos métodos descritos en la presente descripción, tales como cromatografía de exclusión por tamaño y dispersión de luz multiangular. Preferentemente, un polipéptido que tiene una capacidad reducida para formar un dímero tiene una reducción de al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % en la formación de dímeros en comparación con un polipéptido de referencia. El polipéptido de referencia será, típicamente, un polipéptido nativo, tipo silvestre, no modificado o no mutado. Para la evaluación de la proporción de un polipéptido presente en una forma dada, es decir un monómero o dímero, un método adecuado es, por ejemplo, electroforesis analítica en gel bajo condiciones no desnaturizantes. En tal método, una solución del polipéptido se corre en un gel de poliacrilamida, junto con un conjunto de marcadores de peso molecular estándar. Si el polipéptido forma dímeros, una banda de proteínas se observará en el gel que corresponde a una especie con un peso molecular de aproximadamente el doble que el calculado por la suma de los aminoácidos del polipéptido. Además, puede observarse una segunda banda que corresponde a una especie con aproximadamente el peso molecular calculado por la suma de los aminoácidos del polipéptido—esto

representa la secuencia en forma monomérica. Las intensidades relativas de las bandas pueden usarse para cuantificar la proporción del polipéptido que se encuentra presente en cada forma. Métodos similares pueden evaluar el peso molecular mediante medios alternativos, por ejemplo, centrifugación analítica, espectrometría de masas o cromatografía de exclusión por tamaño.

5 Alternativamente, los monómeros o dímeros pueden cuantificarse mediante el uso de la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) donde los dímeros y las mayores especies oligoméricas se separan de los monómeros en base a las diferencias en sus hidrofobicidades. La identificación de las especies puede lograrse mediante el uso de la detección por espectrometría de masas. Los mismos métodos pueden adaptarse para evaluar si un polipéptido dado muestra una
10 tendencia a heterodimerizar u homodimerizar.

Las propiedades antiinflamatorias de un polipéptido de la invención pueden determinarse mediante cualquier método descrito en la presente descripción, en particular en los Ejemplos.

"Aislado", cuando se usa para describir los varios polipéptidos descritos en la presente descripción, significa el polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un
15 componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que podrían interferir, típicamente, con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En modalidades preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un
20 secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras mediante el uso de azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. Una proteína aislada incluye el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. Generalmente, sin embargo, un polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

25 Un "fragmento" es una porción de un polipéptido de la presente invención que mantiene una actividad funcional sustancialmente similar o sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido, que puede determinarse mediante el uso de los ensayos descritos en la presente descripción.

"Por ciento (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" o "por ciento (%) idéntico" con
30 respecto a una secuencia de polipéptido, es decir un polipéptido de la invención definida en la presente descripción, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en el polipéptido específico de la

invención, después de alinear las secuencias e introducir interrupciones, si es necesario, para lograr el por ciento máximo de identidad de secuencia, y no se consideran ninguna de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia.

Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir la
5 alineación, incluyendo cualquiera de los algoritmos (ejemplos no limitantes descritos más adelante) necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Cuando se alinean las secuencias de aminoácidos, el por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada a, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que pueden expresarse, alternativamente, como una secuencia de aminoácidos
10 A dada que tiene o comprende un determinado por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos B dada) puede calcularse como: por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos = $X/Y100$, donde X es el número de residuos de aminoácidos anotados como coincidencias idénticas mediante la alineación de programas o algoritmos de alineación de secuencia de A y B y Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Si la
15 longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al por ciento de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

En el cálculo del por ciento de identidad, se cuentan, típicamente, las coincidencias exactas. La determinación del por ciento de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un
20 algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87:2264, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90:5873–5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas BLASTN y BLASTX de Altschul, y otros (1990) J. Mol. Biol. 215:403. Para obtener las alineaciones de interrupción para
25 propósitos de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST (in BLAST 2.0) como se describe en Altschul y otros (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389. Alternativamente, puede usarse PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte las relaciones de distancia entre las moléculas. Ver Altschul y otros (1997) supra. Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej., BLASTX y
30 BLASTN). La alineación también puede realizarse de forma manual mediante inspección. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo ClustalW (Higgins y otros (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680). ClustalW compara

las secuencias y alinea la totalidad de la secuencia de aminoácidos o ADN, y por lo tanto puede proporcionar los datos sobre la conservación de secuencias de la secuencia de aminoácidos total. El algoritmo ClustalW se usa en varios paquetes de programas informáticos para el análisis de ADN/aminoácidos disponibles, tales como el módulo ALIGNX del Vector NTI Program Suite (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Después de la alineación de las secuencias de aminoácidos con ClustalW, puede evaluarse el por ciento de identidad de aminoácidos. Unos ejemplos no limitantes de un programa informático útil para el análisis de las alineaciones por ClustalW es GENEDOCTM o JalView (<http://www.jalview.org/>). GENEDOCTM permite la evaluación de similitud e identidad de aminoácidos (o ADN) entre múltiples proteínas. Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, (1988) CABIOS 4:11–17. Tal algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0), que es parte del Paquete de Programas Informáticos de GCG Wisconsin Genetics, Versión 10 (disponible de Accelrys, Inc., 9685 Scranton Rd., San Diego, CA, Estados Unidos). Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, puede usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud de interrupción de 12, y una penalización de interrupción de 4.

El polipéptido comprende, deseablemente, un extremo amino y un extremo carboxilo. El polipéptido puede comprender D-aminoácidos, L-aminoácidos o una mezcla de D- y L-aminoácidos. La forma D de los aminoácidos, sin embargo, se prefiere particularmente, ya que se espera que un polipéptido comprendido por D-aminoácidos tenga una mayor retención de su actividad biológica *in vivo*.

El polipéptido puede prepararse mediante cualquier número de técnicas convencionales. El polipéptido puede aislarse o purificarse a partir de una fuente de origen natural o a partir de una fuente recombinante. Se prefiere la producción recombinante. Por ejemplo, en el caso de los polipéptidos recombinantes, un fragmento de ADN que codifica un péptido deseado puede subclonarse en un vector adecuado mediante el uso de técnicas de genética molecular bien conocidas (ver, p. ej., Maniatis y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da edición (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982); Sambrook y otros, Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2da edición (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). El fragmento puede transcribirse y el polipéptido puede traducirse posteriormente *in vitro*. Los kits comercialmente disponibles pueden emplearse (p. ej., tales como los fabricados por Clontech, Palo Alto, Calif.; Amersham Pharmacia Biotech Inc.,

Piscataway, N.J.; InVitrogen, Carlsbad, Calif., y lo similar). La reacción en cadena de la polimerasa puede emplearse, opcionalmente, en la manipulación de ácidos nucleicos.

El término "sustitución conservadora" como se usa en la presente descripción, se refiere al reemplazo de un aminoácido presente en la secuencia nativa en el péptido con un aminoácido de origen natural o no natural o un peptidomimético que tiene propiedades estéricas similares. Cuando la cadena lateral del aminoácido nativo a reemplazar es polar o hidrófoba, la sustitución conservadora debería ser con un aminoácido de origen natural, un aminoácido de origen no natural o con una porción de peptidomimético que es, además, polar o hidrófoba (además de tener las mismas propiedades estéricas que las de la cadena lateral del aminoácido reemplazado).

Las tablas de las sustituciones conservadoras de aminoácidos que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien por los expertos en la técnica. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que pueden considerarse sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Como los aminoácidos de origen natural se agrupan, típicamente, de acuerdo con sus propiedades, las sustituciones conservadoras por aminoácidos de origen natural pueden determinarse teniendo en cuenta el hecho de que el reemplazo de los aminoácidos cargados, por aminoácidos no cargados estéricamente similares, se consideran como sustituciones conservadoras. Para producir las sustituciones conservadoras por aminoácidos de origen no natural es posible, además, usar análogos de aminoácidos (aminoácidos sintéticos) bien conocidos en la técnica. Un peptidomimético del aminoácido de origen natural se documenta bien en la bibliografía conocida por el experto y los aminoácidos no naturales o poco naturales se describen adicionalmente más adelante. Cuando se afectan las sustituciones conservadoras el aminoácido sustituyente debería tener el mismo o un grupo funcional similar en la cadena latera que el aminoácido original.

La frase "sustitución no conservadora" o un "residuo no conservador" como se usa en la presente descripción se refiere al reemplazo del aminoácido presente en la secuencia progenitora por otro aminoácido de origen natural o no natural, que tiene diferentes propiedades electroquímicas y/o estéricas. Por lo tanto, la cadena lateral del aminoácido sustituyente puede ser significativamente

más larga (o más pequeña) que la cadena lateral del aminoácido nativo que se sustituye y/o puede tener grupos funcionales con propiedades electrónicas significativamente diferentes que las del aminoácido que se sustituye. Los ejemplos de sustituciones no conservadoras de este tipo incluyen la sustitución de fenilalanina o ciclohexilmetilglicina por alanina, isoleucina por glicina, o -NH-CH[(-CH₂)₅-COOH]-CO- por ácido aspártico. La sustitución no conservadora incluye cualquier mutación que no se considera conservadora.

Una sustitución no conservadora de aminoácido puede producirse a partir de cambios en: (a) la estructura de la cadena principal de aminoácidos en el área de la sustitución; (b) la carga o la hidrofobicidad del aminoácido; o (c) el volumen de una cadena lateral de aminoácidos.

Generalmente, las sustituciones que se espera que produzcan los cambios más grandes en las propiedades de las proteínas son aquellas en las que: (a) un residuo hidrófilo se sustituye por (o por) un residuo hidrófobo; (b) una prolina se sustituye por (o por) cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, se sustituye por (o por) uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo, o histadilo, se sustituye por (o por) un residuo electronegativo, p. ej., glutamilo o aspartilo.

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos nativa para producir polipéptidos mutantes, tales como mediante inserción, delección y/o sustitución, pueden realizarse mediante una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones específicas de sitio mediante la ligación en un vector de expresión de un oligonucleótido sintetizado que comprende el sitio modificado. Alternativamente, pueden usarse los procedimientos de mutagénesis específica de sitio dirigida por oligonucleótidos, tales como los descritos en Walder y otros, *Gene* 42: 133 (1986); Bauer y otros, *Gene* 37: 73 (1985); Craik, *Biotechniques*, 12-19 (enero de 1995); y las patentes de los Estados Unidos núms. 4,518,584 y 4,737,462). Un medio preferido para introducir mutaciones es el kit de Mutagénesis Dirigida a Sitio QuikChange (Stratagene, LaJolla, Calif.).

Cualquier vector de expresión adecuado (p. ej., como se describe en Pouwels y otros, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual* (Elsevier, N.Y.: 1985)) y el huésped correspondiente adecuado pueden emplearse para la producción de polipéptidos recombinantes. Los huéspedes de expresión incluyen, pero no se limitan a, especies bacterianas dentro del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, mamíferos o sistemas de células huéspedes de insectos que incluyen sistemas de baculovirus (p. ej., como se describe por Luckow y otros, *Bio/Technology* 6: 47 (1988)),

y líneas celulares establecidas tales como las líneas celulares COS-7, C127, 3T3, CHO, HeLa, y BHK, y lo similar. El experto es consciente de que la elección del huésped de expresión tiene ramificaciones para el tipo de polipéptido producido. Por ejemplo, la glicosilación de polipéptidos producidos en levadura o células de mamíferos (p. ej., células COS-7) será diferente de la de los polipéptidos producidos en células bacterianas, tales como *Escherichia coli*.

Alternativamente, un polipéptido de la invención puede sintetizarse mediante el uso de técnicas estándar de síntesis de péptidos bien conocidas por el experto en la técnica (p. ej., como se resume en Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis* (Springer-Verlag, Heidelberg: 1984)). En particular, el polipéptido puede sintetizarse mediante el uso del procedimiento de síntesis en fase sólida (ver, p. ej., Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-54 (1963); Barany y otros, *Int. J. Peptide Protein Res.* 30: 705-739 (1987); y patente de los Estados Unidos núm. 5,424,398). Si se desea, esto puede realizarse mediante el uso de un sintetizador de péptidos automático. La eliminación de los grupos de bloqueo de aminoácidos t-butiloxicarbonilo (t-BOC) o 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y la separación del polipéptido de la resina puede lograrse, por ejemplo, mediante el tratamiento ácido a baja temperatura. La mezcla que contiene polipéptido puede extraerse después, por ejemplo, con dimetil éter, para eliminar compuestos orgánicos no peptídicos, y el polipéptido sintetizado puede extraerse del polvo de resina (p. ej., con aproximadamente 25 % p/v de ácido acético). Después de la síntesis del polipéptido, puede realizarse, opcionalmente, una purificación adicional (p. ej., mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)) para eliminar algunos polipéptidos incompletos o aminoácidos libres. El análisis de aminoácidos y/o HPLC puede realizarse en el polipéptido sintetizado para validar su identidad. Para otras solicitudes de acuerdo con la invención, puede ser preferible producir los polipéptidos como parte de una proteína de fusión más grande, tal como mediante los métodos descritos en la presente descripción u otro medio genético, o como parte de un conjugado más grande, tal como mediante la conjugación física o química, como es conocido por los expertos en la técnica y se describe en la presente descripción.

Un polipéptido de la invención también puede modificarse, conjugarse o fusionarse a otra porción para facilitar la purificación, o el aumento de la vida media *in vivo* de los polipéptidos, o para el uso en inmunoensayos que usan métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede modificarse mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etcétera.

Un “peptidomimético” es un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente la misma estructura y/o características funcionales de un polipéptido de la invención, el último se describe adicionalmente en la presente descripción. Típicamente, un peptidomimético tiene la misma estructura o similar que un polipéptido de la invención, por ejemplo, la misma secuencia o similar de la sec. con núm. de ident.: 1 o un fragmento de la misma que tiene una capacidad reducida para formar un dímero. Un peptidomimético contiene, generalmente, al menos un residuo que no se sintetiza naturalmente. Los componentes no naturales de los compuestos peptidomiméticos pueden ser de acuerdo con uno o más de: a) grupos de enlace de residuos distintos de los enlaces del enlace amida natural ('enlace peptídico'); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácido de origen natural; o c) residuos que inducen mimetismo estructural secundario, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, p. ej., un giro beta, giro gamma, lámina beta, conformación hélice alfa, y lo similar.

Los peptidomiméticos pueden sintetizarse mediante el uso de una variedad de procedimientos y metodologías descritos en la bibliografía científica y de patentes, p. ej., Organic Syntheses Collective Volumes, Gilman y otros (Eds) John Wiley & Sons, Inc., NY, al-Obeidi (1998) Mol. Biotechnol. 9:205-223; Hruby (1997) Curr. Opin. Chem. Biol. 1:114-119; Ostergaard (1997) Mol. Divers. 3:17-27; Ostresh (1996) Methods Enzymot. 267:220-234

Las modificaciones contempladas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, modificación a las cadenas laterales, mediante la incorporación de aminoácidos no naturales y/o sus derivados durante la síntesis de polipéptidos y el uso de agentes de reticulación y otros métodos que imponen restricciones conformacionales en los polipéptidos de la invención. Cualquier modificación, incluyendo la modificación postraducciona, que reduce la capacidad de la molécula para formar un dímero se contempla en la presente. Un ejemplo incluye la modificación incorporada mediante química clic como se conoce en la técnica. Las modificaciones ilustrativas incluyen PEGilación y glicosilación.

Los ejemplos de modificaciones de cadenas laterales contempladas por la presente invención incluyen modificaciones de grupos amino tales como mediante alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido por la reducción con NaBH_4 ; amidinación con metilacetimidato; acilación con anhídrido acético; carbamoilación de grupos amino con cianato; trinitrobencilación de grupos amino con 2, 4, 6-trinitrobenceno sulfónico (TNBS); acilación de grupos amino con anhídrido succínico y anhídrido tetrahidroftálico; y piridoxilación de lisina con piridoxal-5-fosfato seguido por la reducción con NaBH_4 .

El grupo guanidina de los residuos de arginina pueden modificarse mediante la formación de productos de condensación heterocíclica con reactivos tales como 2,3-butanodiona, fenilgloxal y glioal.

El grupo carboxilo puede modificarse mediante la activación de carbodiimida a través de la formación de O-acilisourea seguido por la derivatización posterior, por ejemplo, a una amida correspondiente.

Los grupos sulfhidrilos pueden modificarse mediante métodos tales como carboximetilación con ácido yodoacético o yodoacetamida; oxidación de ácido perfórmico a ácido cisteico; formación de disulfuros mixtos con otros compuestos tiol; reacción con maleimida, anhídrido maleico u otra maleimida sustituida; formación de derivados mercuriales mediante el uso de 4-cloromercuribenzoato, ácido 4-cloromercurifenilsulfónico, cloruro de fenilmercurio, 2-cloromercuri-4-nitrofenol y otros mercuriales; carbamoilación con cianato a pH alcalino.

Los residuos de triptófano pueden modificarse, por ejemplo, mediante la oxidación con N-bromosuccinimida o la alquilación del anillo indol con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo o haluros de sulfenilo. Los residuos de tirosina por otro lado, pueden alterarse mediante la nitración con tetranitrometano para formar un derivado de 3-nitrotirosina.

La modificación del anillo de imidazol de un residuo de histidina puede lograrse mediante la alquilación con derivados de ácido yodoacético o N-carboetoxilación con dietilpirocarbonato.

Los ejemplos para incorporar aminoácidos no naturales y derivados durante la síntesis de proteínas incluyen, pero no se limitan a, el uso de norleucina, ácido 4-amino butírico, ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico, ácido 6-aminohexanoico, t-butilglicina, norvalina, fenilglicina, ornitina, sarcosina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico, 2-tienil alanina y/o D-isómeros de aminoácidos. Una lista de aminoácidos no naturales contemplados en la presente descripción se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
aminociclopropano-	Cpro	L-N-metilasparagina	Nmasn

	carboxilato		ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
	ácido aminoisobutírico	Aib	L-N-metilcisteína	Nmcys
	aminonorborno-	Norb	L-N-metilglutamina	Nmgln
	carboxilato		ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
5	ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilhistidina	Nmhis
	ciclopentilalanina	Cpen	L-N-metilisoleucina	Nmile
	D-alanina	Dal	L-N-metilleucina	Nmleu
	D-arginina	Darg	L-N-metillisina	Nmlys
	ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilmetionina	Nmmet
10	D-cisteína	Dcys	L-N-metilnorleucina	Nmnle
	D-glutamina	Dgln	L-N-metilnorvalina	Nmnva
	ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilornitina	Nmorn
	D-histidina	Dhis	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
	D-isoleucina	Dile	L-N-metilprolina	Nmpro
15	D-leucina	Dleu	L-N-metilserina	Nmser
	D-lisina	Dlys	L-N-metiltreonina	Nmthr
	D-metionina	Dmet	L-N-metilriptófano	Nmtrp
	D-ornitina	Dorn	L-N-metiltirosina	Nmtyr
	D-fenilalanina	Dphe	L-N-metilvalina	Nmval
20	D-prolina	Dpro	L-N-metiletilglicina	Nmetg
	D-serina	Dser	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
	D-treonina	Dthr	L-norleucina	Nle
	D-triptófano	Dtrp	L-norvalina	Nva
	D-tirosina	Dtyr	α -metil-aminoisobutirato	Maib
25	D-valina	Dval	α -metil- γ -aminobutirato	Mgab
	D- α -metilalanina	Dmala	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
	D- α -metilarginina	Dmarg	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
	D- α -metilasparagina	Dmasn	α -metil- α -naftilalanina	Manap
	D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metilpenicillamina	Mpen
30	D- α -metilcisteína	Dmcys	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
	D- α -metilglutamina	Dmgln	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
	D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(3-aminopropil)glicina	Norn

	D- α -metilisoleucina	Dmile	N-amino- α -metilbutirato	Nmaabu
	D- α -metilleucina	Dmleu	α -naftilalanina	Anap
	D- α -metillisina	Dmlys	N-bencilglicina	Nphe
	D- α -metilmetionina	Dmmet	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
5	D- α -metilornitina	Dmorn	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
	D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
	D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carboximetil)glicina	Nasp
	D- α -metilserina	Dmser	N-ciclobutilglicina	Ncbut
	D- α -metiltreonina	Dmthr	N-cicloheptilglicina	Nchep
10	D- α -metiltriptófano	Dmtrp	N-ciclohexilglicina	Nchex
	D- α -metiltirosina	Dmtty	N-ciclodecilglicina	Ncdec
	D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclododecilglicina	Ncdod
	D-N-metilalanina	Dnmala	N-ciclooctilglicina	Ncoct
	D-N-metilarginina	Dnmarg	N-ciclopropilglicina	Ncpro
15	D-N-metilasparagina	Dnmasn	N-cicloudecilglicina	Ncund
	D-N-metilaspartato	Dnmasp	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
	D-N-metilcisteína	Dnmecys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
	D-N-metilglutamina	Dnmglu	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
	D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
20	D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
	D-N-metilisoleucina	Dnmile	N-(imidazolietil)glicina	Nhis
	D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indolietil)glicina	Nhtrp
	D-N-metillisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
	N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmet
25	D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
	N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
	N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
	N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
	N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
30	D-N-metiltriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nval
	D-N-metiltirosina	Dnmttyr	N-metila-naftilalanina	Nmanap
	D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicillamina	Nmpen

	ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(<i>p</i> -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
	L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
	L-etilglicina	Etg	penicillamina	Pen
	L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
5	L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparagina	Masn
	L- α -metilaspartato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
	L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
	L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
	L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
10	L- α -metilisoleucina	Mile	N-(2-metiltioetil)glicina	Nmet
	L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metillisina	Mlys
	L- α -metilmetionina	Mmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
	L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Morn
	L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
15	L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
	L- α -metilriptófano	Mtrp	L- α -metiltirosina	Mtyr
	L- α -metilvalina	Mval	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhpe
	N-(N-(2,2-difeniletil) carbamilmetil)glicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropilo) carbamilmetil)glicina	Nnbhe
20	1-carboxi-1-(2,2-difenil- etilamino)ciclopropano	Nmbc		

Pueden usarse agentes de reticulación, por ejemplo, para estabilizar conformaciones 3D, mediante el uso de agentes de reticulación homobifuncionales tales como los ésteres imido
25 bifuncionales que tienen grupos espaciadores (CH₂)_n con n=1 a n=6, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida y reactivos heterobifuncionales que contienen, usualmente, una porción de reactivo amino tal como N-hidroxisuccinimida y otra porción del reactivo específica de grupo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de los polipéptidos de la invención se encuentran, además, dentro del alcance de la invención. Los ácidos nucleicos son útiles, por
30 ejemplo, en la producción de los polipéptidos de la presente invención y como agentes terapéuticos. Los mismos pueden administrarse a células en cultivo o *in vivo* y pueden incluir una señal secretora que dirige o facilita la secreción del polipéptido de la invención a partir de la célula. Además, dentro

del alcance de la invención se encuentran vectores de expresión y células huésped que contienen o incluyen los ácidos nucleicos de la invención (descritos adicionalmente más adelante). Aunque los ácidos nucleicos de la invención pueden referirse como “aislados”, por definición, los polipéptidos de la invención no son polipéptidos tipo silvestres y, como tal, no podrían codificarse por los ácidos nucleicos de origen natural. Por lo tanto, aunque los polipéptidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden “purificarse”, “purificarse sustancialmente”, “aislarse”, “ser recombinantes” o “sintéticos” no necesitan serlo para distinguirse de materiales de origen natural.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia normalmente en la fuente natural de ácido nucleico que codifica polipéptidos, típicamente IL-37. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o el entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen, por lo tanto, de la molécula de ácido nucleico como la que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye moléculas de ácido nucleico contenidas en células que normalmente expresan IL-37 donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una ubicación cromosómica diferente a la de las células naturales.

Los términos “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de estos. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de gen, ARN mensajero (ARNm), ADNc, polinucleótidos recombinantes, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido de la invención puede proporcionarse en forma aislada o purificada. Una secuencia de ácido nucleico que “codifica” un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras adecuadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de inicio en el extremo terminal 5' (amino) y un codón de parada de la traducción en el extremo terminal 3' (carboxi). Para los propósitos de la invención, tales secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, ADNc de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN viral o procariota, e incluso secuencias de ADN sintéticas. Una secuencia de terminación de la transcripción puede ubicarse 3' a la secuencia codificante.

Los polinucleótidos de la invención pueden sintetizarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a manera de ejemplo en Sambrook y otros (1989, Molecular Cloning—a Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Press).

5 Las moléculas de polinucleótidos de la presente invención pueden proporcionarse en forma de un casete de expresión que incluye secuencias control unidas operativamente a la secuencia insertada, lo que permite por lo tanto la expresión del polipéptido de la invención *in vivo* en un sujeto objetivo. Estos casetes de expresión, en cambio, se proporcionan, típicamente, dentro de los vectores (p. ej., plásmidos o vectores virales recombinantes) que son adecuados para el uso como reactivos para la inmunización de ácidos nucleicos. Tal casete de expresión puede administrarse directamente
10 a un sujeto huésped. Alternativamente, un vector que comprende un polinucleótido de la invención puede administrarse a un sujeto huésped. Preferentemente, el polinucleótido se prepara y/o se administra mediante el uso de un vector genético. Un vector adecuado puede ser cualquier vector que es capaz de portar una cantidad suficiente de información genética, y que permite la expresión de un polipéptido de la invención.

15 La presente invención incluye, por lo tanto, vectores de expresión que comprenden tales secuencias de polinucleótidos. Por lo tanto, la presente invención proporciona un vector para el uso en evitar o tratar una enfermedad o afección inflamatoria que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la invención y, opcionalmente, una o más secuencias de polinucleótidos adicionales que codifican diferentes polipéptidos como se define en la presente
20 descripción.

Además, se apreciará que las composiciones y productos de la invención pueden comprender una mezcla de polipéptidos y polinucleótidos. En consecuencia, la invención proporciona una composición o producto como se define en la presente descripción, en donde en lugar de cualquiera de los polipéptidos se encuentra un polinucleótido capaz de expresar dicho polipéptido.

25 Los vectores de expresión se construyen rutinariamente en la técnica de biología molecular y puede implicar, por ejemplo, el uso de ADN plasmídico e iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos adecuados, tales como, por ejemplo, las señales de poliadenilación que pueden ser necesarias, y que se ubican en la orientación correcta, para permitir la expresión de un péptido de la invención. Otros vectores adecuados podrían ser evidentes para los expertos en la técnica. A modo
30 de ejemplo adicional en este sentido se hace referencia a Sambrook y otros.

Por lo tanto, puede proporcionarse un polipéptido de la invención mediante el suministro de dicho vector a una célula y que permite que se produzca la transcripción del vector. Preferentemente,

un polinucleótido de la invención o para el uso en la invención en un vector se une operativamente a una secuencia control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión.

5 “Unido operativamente” se refiere a una disposición de elementos en donde los componentes descritos se configuran de modo que realizan su función usual. Por lo tanto, una secuencia reguladora dada, tal como un promotor, unido operativamente a una secuencia de ácido nucleico es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia cuando se encuentran las enzimas adecuadas. El promotor no necesita ser contiguo a la secuencia, siempre que funcione para dirigir la expresión de esta. Por lo tanto, por ejemplo, las secuencias transcritas aún sin traducir que intervienen pueden encontrarse
10 entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico y la secuencia promotora todavía puede considerarse “unida operativamente” a la secuencia codificante.

Una serie de sistemas de expresión se han descrito en la técnica, cada uno que consiste típicamente en un vector que contiene un gen o una secuencia de nucleótidos de interés unida operativamente a las secuencias control de expresión. Estas secuencias control incluyen secuencias
15 promotoras transcripcionales y secuencias de inicio y de terminación transcripcionales. Los vectores de la invención pueden ser, por ejemplo, vectores plasmídicos, virales o de fago proporcionados con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y, opcionalmente, un regulador del promotor. Un “plásmido” es un vector en la forma de un elemento genético extracromosómico. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores
20 seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a ampicillina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a neomicina para un vector fúngico. Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ADN o ARN o usarse para transfectar o transformar una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero. Los vectores pueden adaptarse para el uso *in vivo*, por ejemplo, para permitir la expresión *in vivo* del polipéptido.

25 Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que inicia y regula la transcripción de un polinucleótido que codifica polipéptidos. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente al promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etcétera), promotores reprimibles (donde la expresión de una secuencia de polinucleótidos unida operativamente al promotor se reprime por un analito,
30 cofactor, proteína reguladora, etcétera), y promotores constitutivos. Se pretende que el término “promotor” o “elemento control” incluye regiones promotoras en toda su extensión y segmentos funcionales (p. ej., controles de transcripción o traducción) de estas regiones.

Un polinucleótido, casete de expresión o vector de acuerdo con la presente invención puede comprender, adicionalmente, una secuencia de péptido señal. La secuencia de péptido señal se inserta, generalmente, en un enlace operativo con el promotor de manera que el péptido señal se expresa y facilita la secreción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante también en un enlace operativo con el promotor.

Típicamente, una secuencia de péptido señal codifica un péptido de 10 a 30 aminoácidos, por ejemplo, 15 a 20 aminoácidos. A menudo, los aminoácidos son predominantemente hidrófobos. En una situación típica, un péptido señal se dirige a una cadena polipeptídica en crecimiento que lleva el péptido señal al retículo endoplasmático de la célula de expresión. El péptido señal se escinde en el retículo endoplasmático, lo que permite la secreción del polipéptido a través del aparato de Golgi. Por lo tanto, un péptido de la invención puede proporcionarse a un individuo mediante la expresión a partir de células dentro del individuo, y la secreción a partir de estas células.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere, generalmente, a una cantidad de uno o más polipéptidos o polinucleótidos de la invención que (i) trata la enfermedad, afección, o trastorno particular, (ii) atenúa, mejora, o elimina uno o más síntomas de la enfermedad, afección, o trastorno particular, o (iii) retrasa la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad, afección, o trastorno particular descrito en la presente descripción.

La invención encuentra aplicación en el tratamiento de varias enfermedades o afecciones inflamatorias. Como se usa en la presente descripción, ‘enfermedad o afección inflamatoria’ incluye inflamación aguda o crónica y trastornos inflamatorios tales como inflamación asociada con enfermedades autoinmunitarias, inflamación cardiovascular (p. ej., aterosclerosis, derrame), inflamación gastrointestinal, trastornos inflamatorios hepáticos, inflamación pulmonar (p. ej. asma, lesión de pulmón inducida por ventilador), inflamación de riñón, inflamación ocular (p. ej., uveítis), inflamación pancreática, inflamación genitourinaria, trastornos neuroinflamatorios (p. ej., esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer), alergia (p. ej., rinitis/sinusitis alérgica, alergias y trastornos de la piel (p. ej., urticaria/ronchas, angioedema, dermatitis atópica, dermatitis por contacto, psoriasis), alergias por alimentos, alergias por fármacos, alergias por insectos, mastocitosis), inflamación esquelética (p. ej., artritis, osteoartritis, artritis reumatoide, espondiloartropatías), infección (p. ej., infecciones bacterianas o virales ; trastornos inflamatorios orales (es decir, periodontis, gingivitis o somatitis); y trasplante (p. ej., rechazo de aloinjerto o xenoinjerto, tolerancia materno-fetal, enfermedad huésped contra injerto).

La invención encuentra aplicación en el tratamiento de varias enfermedades o afecciones inflamatorias para las que se ha sugerido el tratamiento con IL-37 tipo silvestre recombinante, por ejemplo, las enfermedades o afecciones referidas en Dinarello y otros Eur. J. Immunol. (2016) 46: 1067-1081, particularmente, Tabla 3.

5 La enfermedad o afección inflamatoria contemplada para el tratamiento en un método o uso de la invención, o por un polipéptido o composición farmacéutica de la invención, incluidas las mediadas predominantemente por la activación del receptor tipo Toll (TLR) 2, 4, 7, 8 y/o 9. Un sumario de esas enfermedades y afecciones asociadas a la activación de TLR puede encontrarse en la Figura 1 y la Tabla 1 en Connolly y otros, Current Opinion in Pharmacology 2012,12:510-518.

10 Las indicaciones ilustrativas contempladas para el tratamiento mediante un método o uso de la invención, o mediante un polipéptido o composición farmacéutica de la invención, y el TLR que media predominantemente la inflamación de esta indicación son:

- Lesión por isquemia/reperfusión, isquemia cardíaca, función retardada del injerto (TLR 2);
- Artritis reumatoide (TLR 2);
- 15 • Lupus eritematoso sistémico (TLR7, 8 y/o 9);
- Sepsis (TLR 4 entre otros TLR); e
- Inflamación aguda y crónica (TLR 4).

Un método o uso de la invención, o mediante un polipéptido o composición farmacéutica de la invención, encuentra aplicación para reducir, inhibir o evitar la inflamación inducida por otros
20 mediadores tales como otras citocinas (IL-1, IFN γ etcétera), otros mediadores (p. ej. complemento, leucotrienos, etcétera) y agresiones químicas y físicas.

Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA, que es una enfermedad viral con un componente autoinmunitario), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolipídico, enfermedad
25 autoinmunitaria de Addison, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad autoinmunitaria del oído interno (AIED), síndrome autoinmunitario linfoproliferativo (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, dermatitis hepatoformis-esprúe celíaco; síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunológica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), penfigoide cicatricial,
30 enfermedad de aglutininas frías, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar

idiopática, trombocitopenia púrpura idiopática (ITP), nefropatía por IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta de tejido conectivo, esclerosis múltiple, miastenia gravis, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndrome poliglandular, polimialgia reumática, 5 polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, escleroderma (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerativas, uveítis, 10 vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Preferentemente, la enfermedad o afección inflamatoria es esclerosis múltiple, artritis reumatoide, hipersensibilidad de la piel tal como dermatitis atópica, dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino, uveítis, enfermedad del ojo seco, Esclerosis sistémica (escleroderma), enfermedad periodontal, vitiligo, SLE/Lupus Discoide/enfermedad de 15 Grave, aterosclerosis, asma, o hipersensibilidad de tipo retardada.

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria que implica la desmielinización de las vainas de mielina que rodean los axones del cerebro y de la médula espinal. Los síntomas de MS incluyen, pero no se limitan a cicatrización de la materia blanca en el cerebro y/o la médula espinal y una amplia variedad de síntomas neurológicos, que incluyen pero no se limitan a cambios 20 en la sensación tales como pérdida de sensibilidad u hormigueo, escozor o entumecimiento (hipoestesia y parestesia), debilidad muscular, clonus, espasmos musculares o dificultad en el movimiento; dificultades con la coordinación y balance (ataxia); problemas en el habla (disartria) o deglución (disfagia), problemas visuales (nistagmo, neuritis óptica, etcétera), fatiga, dolor agudo/crónico, y dificultades en la vejiga y el intestino. El deterioro cognitivo de diversos grados y 25 la depresión también son comunes. Los síntomas de MS aparecen, usualmente, en periodos agudos episódicos de empeoramiento en un deterioro gradualmente progresivo de la función neurológica, o en una combinación de ambos.

La artritis reumatoide es un trastorno inflamatorio sistémico crónico que puede afectar muchos tejidos y órganos, pero que ataca principalmente las uniones sinoviales. El proceso implica 30 una respuesta inflamatoria de la cápsula sinovial alrededor de las uniones secundarias a la hiperplasia de células sinoviales, exceso de fluido sinovial, y el desarrollo de tejido fibroso en la sinovia. La patología del proceso de la enfermedad conduce, frecuentemente, a la destrucción del cartílago

articular y la anquilosis de las uniones. La artritis reumatoide también puede producir inflamación difusa en los pulmones, pericardio, pleura pulmonar, esclera, y lesiones nodulares, más comunes en el tejido subcutáneo.

5 Otras enfermedades o afecciones inflamatorias incluyen inflamación aguda con derrame, infarto del miocardio, lesión por isquemia-reperfusión y trasplante. Además, la inflamación crónica se asocia con enfermedades autoinflamatorias o enfermedades autoinmunitarias, tales como la esclerosis múltiple descrita anteriormente y la diabetes (diabetes tipo 1 o tipo 2).

10 Una enfermedad o afección inflamatoria adicional es la sepsis, shock séptico o shock endotóxico. La sepsis o shock endotóxico puede ser provocada por bacterias, hongos, virus, o parásitos. El agente causante de las bacterias puede ser los lipopolisacáridos (LPS), conocidos también como lipoglicanos y endotoxinas, que son moléculas grandes que consisten en un lípido y un polisacárido compuesto de O-antígeno, núcleo externo y núcleo interno unidos por un enlace covalente; los mismos se encuentran en la membrana externa de bacterias Gram-negativas, y provocan fuertes respuestas inmunológicas en los animales.

15 Para cualquiera de las enfermedades o afecciones inflamatorias descritas en la presente descripción, cuando el polipéptido de la presente invención se administra tópicamente a un humano, la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto corresponde, preferentemente, a entre aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 % (p/p), o entre aproximadamente 0.1 a 10 % (p/p), o entre aproximadamente 1.0 a aproximadamente 10 % (p/p), entre aproximadamente 0.1 a
20 aproximadamente 5 % (p/p), o entre aproximadamente 1.0 a aproximadamente 5 % (p/p). En cualquiera de las enfermedades inflamatorias o afecciones inflamatorias descritas en la presente descripción, cuando el polipéptido de la presente invención se administra oralmente a un sujeto, la cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto corresponde, preferentemente, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, o entre aproximadamente 1 a 25 mg/kg, o entre
25 aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 5 a aproximadamente 25 mg/kg, o entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/kg.

En una composición de la invención, la proporción de polipéptido de la invención presente como un monómero puede ser al menos aproximadamente un 0.5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % del polipéptido total
30 presente en la composición, almacenado típicamente en solución durante un periodo de tiempo adecuado bajo condiciones adecuadas. Los periodos de tiempo y condiciones adecuados incluyen los intervalos de tiempo y condiciones bajo los que un profesional experto podría esperar

razonablemente mantener un polipéptido en solución antes de su uso. Por ejemplo, los periodos de tiempo de aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, o aproximadamente 72 horas son típicos, aunque algunas soluciones pueden mantenerse por periodos más largos, por ejemplo, al menos una semana, un mes, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años o más. Las condiciones de almacenamiento pueden ser, típicamente, temperatura ambiente y humedad relativa, o típicamente 25° C y 60 % de humedad relativa, pero podrían incluir cualquiera de las condiciones estándar de almacenamiento encontradas por el experto, por ejemplo, aproximadamente 4° C, -20° C, o -80° C.

La frecuencia de administración puede ser una vez al día, o 2 o 3 veces al día. El periodo de tratamiento puede ser por la duración de la enfermedad detectable.

Típicamente, una dosificación terapéuticamente eficaz se formula para que contenga una concentración (en peso) de al menos aproximadamente 0.1 % hasta aproximadamente 50 % o más, y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos dentro de la misma. Las composiciones pueden formularse para contener uno o más polipéptidos de la invención en una concentración de desde aproximadamente 0.1 a menos de aproximadamente 50 %, por ejemplo, aproximadamente 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41 o 40 %, con concentraciones de desde más de aproximadamente 0.1 %, por ejemplo, aproximadamente 0.2, 0.3, 0.4 o 0.5 %, a menos de aproximadamente 40 %, por ejemplo, aproximadamente 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 o 30 %. Las composiciones ilustrativas pueden contener de aproximadamente 0.5 % a menos de aproximadamente 30 %, por ejemplo, aproximadamente 29, 28, 27, 26, 25, 25, 24, 23, 22, 21 o 20 %, con concentraciones de desde más de aproximadamente 0.5 %, por ejemplo, aproximadamente 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 o 1 %, a menos de aproximadamente 20 %, por ejemplo, aproximadamente 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 %. Las composiciones pueden contener desde más de aproximadamente 1 % por ejemplo, aproximadamente 2 %, a menos de aproximadamente 10 %, por ejemplo, aproximadamente 9 o 8 %, que incluyen concentraciones de más de aproximadamente 2 %, por ejemplo, aproximadamente 3 o 4 %, a menos de aproximadamente 8 %, por ejemplo, aproximadamente 7 o 6 %. El agente activo puede encontrarse, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 5 %. En todos los casos, las cantidades pueden ajustarse para compensar las diferencias en las cantidades de ingredientes activos suministradas realmente a las células o tejidos tratados.

Aunque la invención encuentra aplicación en seres humanos, la invención también es útil para propósitos veterinarios terapéuticos. La invención es útil para animales domésticos o de granja

tales como ganado vacuno, oveja, caballos y aves de corral; para animales de compañía tales como gatos y perros; y animales de zoológico.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para cualquier vía de administración adecuada que incluye, por ejemplo, la administración tópica (por ejemplo, transdérmica u ocular),
5 oral, bucal, nasal, vaginal, rectal o parenteral. El término parenteral como se usa en la presente descripción incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (por ejemplo, intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal, intraocular, periocular, intraorbital, intrasínovial e intraperitoneal, así como también cualquier técnica de inyección o infusión similar. En ciertas modalidades, se prefieren composiciones en una forma adecuada para el uso oral o el uso parenteral.
10 Las formas orales adecuadas incluyen, por ejemplo, tabletas, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Aún dentro de otras modalidades, las composiciones proporcionadas en la presente descripción pueden formularse como un liofilizado.

Cada una de las varias unidades de dosificación se proporciona, preferentemente, como una
15 tableta, cápsulas, pastilla, gragea, goma, de dosificación discreta, o cualquier otro tipo de formulación sólida. Las cápsulas pueden encapsular un polvo, líquido, o gel. La formulación sólida puede tragarse, o puede ser de un tipo que puede succionarse o masticarse (ya sea frangible o similar a goma). La presente invención contempla los dispositivos que mantienen las unidades de dosificación diferentes de los empaques tipo burbuja; por ejemplo, empaques tales como botellas,
20 tubos, botes, paquetes. Las unidades de dosificación pueden incluir, además, excipientes convencionales bien conocidos en la práctica de las formulaciones farmacéuticas, tales como agentes aglutinantes, gelificantes, rellenos, lubricantes comprimidos, desintegrantes, tensoactivos, y colorantes; y para formulaciones que pueden succionarse o masticarse.

Las composiciones destinadas para el uso oral pueden comprender, además, uno o más
25 componentes tales como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y/o agentes conservantes para proporcionar preparaciones tentadoras y agradables al paladar. Las tabletas contienen el ingrediente activo en la mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas. Tales excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico, agentes de
30 granulación y de desintegración tales como almidón de maíz o ácido algínico, agentes aglutinantes tales como almidón, gelatina o acacia, y agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Las tabletas pueden ser no recubiertas o recubiertas por técnicas conocidas para

retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto proporcionan una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retraso tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

5 Las formulaciones para uso oral pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en donde el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte tal como carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio de aceite tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

10 Las suspensiones acuosas contienen el(los) ingrediente(s) activo(s) en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen agentes de suspensión tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; y agentes dispersantes o humectantes tales como fosfátidos de origen natural (por ejemplo, lecitina), productos de condensación de un óxido de alquilenos con ácidos grasos tales como estearato de polioxietileno, productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena
15 larga tales como heptadecaetilenooxicetanol, productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tales como polioxietileno sorbitol monooleato, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol tales como monooleato de sorbitán polietileno. Las suspensiones acuosas también pueden comprender uno o más conservantes, por ejemplo, etil, o n-
20 propil p-hidroxibenzoato, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las suspensiones oleosas pueden formularse mediante la suspensión de los ingredientes activos en un aceite vegetal tal como aceite de araquís, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un
25 agente espesante tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Los agentes edulcorantes, tales como los mencionados anteriormente, y/o agentes aromatizantes se pueden añadir para proporcionar preparaciones orales agradable al paladar. Tales suspensiones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

30 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión se ilustran por aquellos ya mencionados anteriormente. Los

excipientes adicionales, tales como los agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes, también pueden encontrarse.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse, además, en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal tal como aceite de oliva o aceite de araquís, un aceite mineral tal como parafina líquida, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural tales como goma acacia y goma de tragacanto; fosfátidos de origen natural tales como lecitina de soya, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol con óxido de etileno tales como monooleato de sorbitán polioxietileno. Una emulsión también puede comprender uno o más agentes edulcorantes y/o aromatizantes.

Los jarabes y elixires pueden formularse con agentes edulcorantes, tales como glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden comprender uno o más agentes emolientes, conservantes, aromatizantes y/o agentes colorantes.

Los polipéptidos de la invención pueden formularse para la administración local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel. Las formulaciones para administración tópica comprenden, típicamente, un vehículo tópico combinado con agente(s) activo(s), con o sin componentes opcionales adicionales.

Los vehículos tópicos adecuados y los componentes adicionales se conocen bien en la técnica, y será evidente que la elección de un vehículo dependerá de la forma física particular y el modo de suministro. Los vehículos tópicos incluyen solventes orgánicos tales como alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropil alcohol o glicerina), glicoles tales como butileno, isopreno o propilenglicol, alcoholes alifáticos tales como lanolina, mezclas de agua y solventes orgánicos y mezclas de solventes orgánicos tales como alcohol y glicerina, materiales basados en lípidos tales como ácidos grasos, acilgliceroles que incluyen aceites tales como aceite mineral, y grasas de origen natural o sintético, fosfoglicéridos, esfingolípidos y ceras, materiales basados en proteínas tales como colágeno y gelatina, materiales basados en silicona (ambos no volátiles y volátiles), y materiales basados en hidrocarburos tales como microesponjas y matrices poliméricas.

Una composición también puede incluir uno o más componentes adaptados para mejorar la estabilidad o efectividad de la formulación aplicada, tales como agentes estabilizantes, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, ajustadores de la viscosidad, agentes gelificantes, conservantes, antioxidantes, potenciadores de la penetración en la piel, humectantes y materiales de liberación

sostenida. Los ejemplos de tales componentes se describen en Martindale – The Extra Pharmacopoeia (Pharmaceutical Press, Londres 1993) y Martin (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences. Las formulaciones pueden comprender microcápsulas, tales como microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas o nanocápsulas.

Una formulación tópica puede prepararse en una variedad de formas físicas que incluyen, por ejemplo, sólidos, pastas, cremas, espumas, lociones, geles, polvos, líquidos acuosos, emulsiones, pulverizadores y parches para la piel. La apariencia física y la viscosidad de tales formas pueden determinarse por la presencia y la cantidad de emulsionante(s) y ajustador(es) de la viscosidad presente(s) en la formulación. Los sólidos generalmente son firmes y no pueden verterse y se formulan, comúnmente, como barras o bastoncillos, o en una forma particulada. Los sólidos pueden ser opacos o transparentes, y opcionalmente pueden contener solventes, emulsionantes, humectantes, emolientes, fragancias, tintes/colorantes, conservantes y otros ingredientes activos que aumentan o potencian la eficacia del producto final. Las cremas y lociones son, frecuentemente, similares entre sí, pero difieren principalmente en su viscosidad. Tanto las lociones como las cremas pueden ser opacas, translúcidas o transparentes y contienen, frecuentemente, emulsionantes, solventes, y agentes de ajuste de la viscosidad, así como también humectantes, emolientes, fragancias, tintes/colorantes, conservantes y otros ingredientes activos que aumentan o potencian la eficacia del producto final. Los geles pueden prepararse con un intervalo de viscosidades, desde espesos o de alta viscosidad hasta delgados o de baja viscosidad. Estas formulaciones, como las de las lociones y cremas, también pueden contener solventes, emulsionantes, humectantes, emolientes, fragancias, tintes/colorantes, conservantes y otros ingredientes activos que aumentan o potencian la eficacia del producto final. Los líquidos son más finos que las cremas, lociones, o geles, y frecuentemente no contienen emulsionantes. Los productos tópicos líquidos contienen, frecuentemente, solventes, emulsionantes, humectantes, emolientes, fragancias, tintes/colorantes, conservantes y otros ingredientes activos que aumentan o potencian la eficacia del producto final.

Los emulsionantes para el uso en formulaciones tópicas incluyen, pero no se limitan a, emulsionantes iónicos, cetearil alcohol, emulsionantes no iónicos como polioxietileno oleil éter, PEG-40 estearato, cetareth-12, cetareth-20, cetareth-30, cetareth alcohol, estearato de PEG-100 y estearato de glicerilo. Los agentes de ajuste de viscosidad adecuados incluyen, pero no se limitan a, coloides protectores o gomas no iónicas tales como hidroxietilcelulosa, goma de xantano, silicato de magnesio y aluminio, sílice, cera microcristalina, cera de abejas, parafina, y palmitato de cetilo.

Una composición en gel puede formarse mediante la adición de un agente gelificante tal como quitosano, metilcelulosa, etilcelulosa, polivinil alcohol, policuaturnios, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbómero o glicirricinato amoniacal. Los agentes tensoactivos incluyen, pero no se limitan a, agentes tensoactivos no iónicos, anfotéricos, iónicos y aniónicos. Por ejemplo, uno o más de dimeticona copoliol, polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 80, lauramida DEA, cocamida DEA, y cocamida MEA, oleil betaína, cloruro de cocamidopropil fosfatidil PG-dimonio, y lauret sulfato de amonio pueden usarse dentro de formulaciones tópicas.

Los conservantes incluyen, pero no se limitan a, antimicrobianos tales como metilparabeno, propilparabeno, ácido sórbico, ácido benzoico, y formaldehído, así como también estabilizantes y antioxidantes físicos tales como vitamina E, ascorbato sódico/ácido ascórbico y galato de propilo. Los humectantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido láctico y otros hidroxiácidos y sus sales, glicerina, propilenglicol, y butilenglicol. Los emolientes adecuados incluyen alcohol de lanolina, lanolina, derivados de lanolina, colesterol, petrolato, isostearil neopentanoato y aceites minerales. Las fragancias y colores adecuados incluyen, pero no se limitan a, FD&C Red núm. 40 y FD&C Yellow núm. 5. Otros ingredientes adecuados adicionales que pueden incluirse en una formulación tópica incluyen, pero no se limitan a, abrasivos, absorbentes, agentes antiapelmazantes, agentes antiespumantes, agentes antiestáticos, astringentes (tales como hamamelis de Virginia), alcohol y extractos de hierbas tales como extracto de manzanilla, aglutinantes/excipientes, agentes amortiguadores, agentes quelantes, agentes formadores de películas, agentes acondicionadores, propelantes, agentes opacificantes, ajustadores de pH y protectores.

Los modos típicos de suministro de composiciones tópicas incluyen la aplicación mediante el uso de los dedos, la aplicación mediante el uso de un aplicador físico tal como una tela, tejido, hisopo, bastoncillo o brocha, pulverización que incluye pulverización de neblina, aerosol o espuma, aplicación de gotero, rociadura, remojo, y enjuague. También pueden usarse vehículos de liberación controlada, y las composiciones pueden formularse para la administración transdérmica (por ejemplo, como un parche transdérmico).

Una composición farmacéutica puede formularse como formulaciones inhaladas, que incluyen pulverizaciones, neblinas, o aerosoles. Esto puede ser particularmente preferido para el tratamiento de ciertas enfermedades o afecciones inflamatorias. Para formulaciones de inhalación, la composición o combinación proporcionada en la presente descripción puede suministrarse a través de cualquiera de los métodos de inhalación conocidos por un experto en la técnica. Tales métodos y

dispositivos de inhalación incluyen, pero no se limitan a, inhaladores de dosis medida con propelantes tales como CFC o HFA o propelantes que son aceptables fisiológicamente y ambientalmente. Otros dispositivos adecuados son inhaladores accionados por respiración, inhaladores de polvo seco multidosis y nebulizadores de aerosol. Las formulaciones en aerosol para el uso en el presente método incluyen, típicamente, propelantes, agentes tensoactivos y cosolventes y pueden llenarse en recipientes de aerosol convencionales que se cierran mediante una válvula dosificadora adecuada.

Las composiciones inhalantes pueden comprender composiciones líquidas o en polvo que contienen el ingrediente activo que son adecuadas para la nebulización y el uso intrabronquial, o composiciones en aerosol administradas a través de una unidad de aerosol que dispensa dosis medidas. Las composiciones líquidas adecuadas comprenden el ingrediente activo en un solvente inhalante acuoso, farmacéuticamente aceptable tal como solución salina isotónica o agua bacteriostática. Las soluciones se administran mediante una bomba o dispensador de pulverización nebulizado accionado por compresión, o mediante cualquier otro medio convencional para provocar o permitir que la cantidad de dosis requerida de la composición líquida se inhale en los pulmones del paciente. Las formulaciones adecuadas, en donde el portador es un líquido, para la administración, como por ejemplo, de un pulverizador nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas u oleosas del ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas también pueden prepararse en forma de supositorios tales como para la administración rectal. Tales composiciones pueden prepararse mediante la mezcla del fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es sólido a temperaturas habituales pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, manteca de cacao y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse como formulaciones de liberación sostenida tales como una cápsula que crea una liberación lenta del modulador después de la administración. Tales formulaciones pueden prepararse, generalmente, mediante el uso de tecnología bien conocida y administrarse, por ejemplo, mediante implantación oral, rectal o subcutánea, o mediante implantación en el sitio objetivo deseado. Los portadores para el uso dentro de tales formulaciones son biocompatibles, y también pueden ser biodegradables. Preferentemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación del modulador. La cantidad de modulador contenido dentro de una formulación de liberación sostenida depende de, por ejemplo,

el sitio de implantación, la velocidad y la duración esperada de la liberación y la naturaleza de la afección a tratar o evitar.

En otra modalidad se proporciona un kit o artículo de fabricación que incluye uno o más polipéptidos o polinucleótidos de la invención y/o composición farmacéutica como se describió anteriormente.

En otras modalidades se proporciona un kit para el uso en una aplicación terapéutica o profiláctica mencionada anteriormente, el kit que incluye:

- un recipiente que contiene un polipéptido, polinucleótido o composición farmacéutica de la invención;

- una etiqueta o prospecto con instrucciones para el uso.

En ciertas modalidades el kit puede contener uno o más principios activos adicionales o ingredientes para el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias.

El kit o “artículo de fabricación” puede comprender un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociados al recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, empaques tipo burbuja, etcétera. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición terapéutica que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). La etiqueta o prospecto indica que la composición terapéutica se usa para tratar la afección de elección. En una modalidad, la etiqueta o prospecto incluye las instrucciones para el uso e indica que la composición terapéutica o profiláctica puede usarse para tratar una enfermedad o afección inflamatoria descrita en la presente descripción.

El kit puede comprender (a) una composición terapéutica o profiláctica; y (b) un segundo recipiente con un segundo principio o ingrediente activo contenido en el mismo. El kit en esta modalidad de la invención también puede comprender un prospecto que indica que la composición y otro principio activo pueden usarse para tratar un trastorno o evitar una complicación derivada de una enfermedad o afección inflamatoria descrita en la presente descripción. Alternativamente, o adicionalmente, el kit también puede comprender un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluyen otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, y jeringas.

En ciertas modalidades la composición terapéutica puede proporcionarse en forma de un dispositivo, desechable o reutilizable, que incluye un receptáculo para que contenga la composición terapéutica, profiláctica o farmacéutica. En una modalidad, el dispositivo es una jeringa. El dispositivo puede contener 1-2 mL de la composición terapéutica. La composición terapéutica o
5 profiláctica puede proporcionarse en el dispositivo en un estado que es fácil para su uso o en un estado que requiere la mezcla o la adición de componentes adicionales.

Un polipéptido o composición de la invención puede usarse como un revestimiento antiinflamatorio para materiales y dispositivos implantables, p. ej., endoprótesis. El polipéptido o composición de la invención puede revestirse, o integrarse con, el material o dispositivo implantable.

10 El polipéptido o composición de la invención puede ser parte de un revestimiento polimérico.

Se comprenderá que la invención descrita y definida en esta descripción se extiende a todas las combinaciones alternativas de dos o más de las características individuales mencionadas o evidentes a partir del texto o las figuras. Todas estas diferentes combinaciones constituyen varios aspectos alternativos de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonación y purificación de proteínas

La IL-37 optimizada con codón (46-218) se clonó en una versión escindible por proteasas
20 del virus del grabado del tabaco modificado de pGEX-4T-1 (GE Healthcare)(7). La proteína recombinante se expresó en células BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) mediante la inducción con IPTG a 18 °C. Las células que expresan las variantes de GST-IL-37 se lisaron mediante cavitación a altas presiones (10-15 K psi) en Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 3 mM, con dos tabletas completas de inhibidores de proteasas libres de EDTA
25 (Roche). Las células se clarificaron mediante centrifugación, se filtraron a través de una membrana de 0.45 μ m, y se unieron a una resina de glutatión Sepharose 4B (GE Healthcare) durante 1 h a 4 °C. La resina se lavó con 500 ml de Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), NaCl 200 mM, y β -mercaptoetanol 3 mM. La proteína se liberó de la etiqueta GST mediante la incubación durante la noche con proteasa His-TEV a 4 °C. La proteína se purificó adicionalmente en una columna de grado de preparación
30 HiLoad Superdex75 16/60 (GE Healthcare) en Hepes 20 mM (pH 7.2), NaCl 100 mM, DTT 2 mM, y EDTA 1 mM.

Cristalización y determinación de la estructura

Los cristales de IL-37 se cultivaron a 20 °C mediante difusión por vapor en gota colgante en sulfato amónico 2.1 M y acetato sódico 0.1 M (pH 4.5) a una relación de gota 1:1. Los cristales se enfriaron inmediatamente en nitrógeno líquido en licor madre que contiene glicerol al 20 % (v/v). Los datos por rayos X se recolectaron en la línea de luz MX2 (microfoco) del Australian Synchrotron a una longitud de onda de 0.9537 Å con oscilaciones de 1°. Los datos se procesaron y se escalaron mediante el uso de XDS y programas dentro del paquete CCP4 (8). La estructura se resolvió por reemplazo molecular mediante el uso de IL-F5 murina (código 1MD6 de PDB (9)) como el modelo de búsqueda en PHENIX mediante el uso de MRage y Phaser (10, 11). La estructura se construyó automáticamente en PHENIX AutoBuild (11). Los ciclos iterativos de refinamiento se llevaron a cabo mediante el uso de Buster (12) con la reconstrucción local en COOT (13), lo que resulta en un modelo con un factor *R* de 18.22 % (*R*_{libre} de 21.74 %) y excelente geometría (Tabla 3). La estructura no tuvo valores de Ramachandran atípicos con 98.64 % de los residuos en regiones favorecidas y una puntuación final de MolProbity de 0.95 (100^{mo} percentil) (14).

Cromatografía de exclusión por tamaño y dispersión de luz multiangular (SEC-MALS)

Las mediciones de SEC-MALS se llevaron a cabo en una columna Superdex75 10/300 (GE Healthcare) equilibrada en HEPES 10 mM (pH 7.3), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 2 mM. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C a un régimen de flujo de 0.4 mL/min en el amortiguador anterior. Se inyectó un volumen de 110 µL de proteína a 6 mg/mL para cada corrida. Se usaron inyecciones de prueba de 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (Thermo Scientific Pierce) para los propósitos de calibración. El sistema SEC-MALS comprendía un desgasificador Shimadzu DGU-20A₅, un cromatógrafo líquido LC-20AD, un muestreador automático SIL-20A_{HT}, un módulo bus de comunicaciones CBM-20A, un detector UV/VIS SPD-20A y un horno de columna CTO-20AC, que se acopló a un detector de dispersión de luz multiangular DAWN HELEO-II fijado con un detector de índice de refracción Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Las masas molares se calcularon mediante la medición de la intensidad de la luz dispersa a 18 diferentes ángulos de dispersión. Los cálculos de la masa molecular se realizaron mediante el uso del programa informático Astra 6.1 (Wyatt Technology).

Cultivo y transfecciones de células.

Los experimentos en PBMC fueron aprobados por el Comité B de Ética en Investigaciones para la Salud Humana de Monash, y se realizaron con el consentimiento escrito explícito de todos los voluntarios. Las PBMC se aislaron a partir de sangre venosa periférica de voluntarios sanos mediante centrifugación por gradiente de densidad como se describió (15). Las PBMC se sembraron

en placas en medio RPMI que contenía suero humano al 1 % v/v y MycoZap PR 1:500, después se trataron previamente durante 30 min ya sea con vehículo o IL-37 rec como se indicó, antes de la estimulación con 50 pg/ml de LPS, o HKLM, imiquimod, CpG-A o ssARN40 a concentraciones descritas en la presente descripción, durante 20 h. Los sobrenadantes se sometieron después a análisis de citocinas. Las células THP-1 se obtuvieron de la ATCC. Las mismas se cultivaron siempre en presencia de MycoZap Plus-CL (Lonza), que contiene un antibiótico, un antifúngico, y un agente anti-micoplásmico.

Las células THP 1 se transfectaron con constructos que codifican la proteína IL-37b natural o la variante D73K monomérica como se describió en (16, 1 y 5). Brevemente, cada variante de IL 37b se insertó en un vector pIRES con una secuencia de expresión de GFP y un promotor CMV constitutivamente activo, y el C-terminal de IL 37b se ligó a FLAG. Las células se transfectaron mediante el uso del Kit V de Amaxa Nucleofector (THP 1) y el programa V001, seguido por una recuperación durante la noche. Veinte horas después de la transfección, las células se contaron y se sembraron en placas. Las células THP 1 transfectadas se diferenciaron en macrófagos mediante la incubación con 50 ng/ml de PMA durante 24 h. A continuación, el medio se cambió a RPMI con penicilina/estreptomicina y suero humano al 1 % y se añadieron los estímulos. Después del periodo de incubación indicado en la leyenda de las figuras, los sobrenadantes se recolectaron y se almacenaron a -80°C hasta el análisis. La recolección y el análisis de muestras se realizaron de forma ciega.

ELISA y ELISA múltiples.

Las citocinas se midieron mediante los ELISA convencionales (BD, elisakit.com). Ambos métodos de ELISA se realizaron como lo recomiendan los fabricantes.

Análisis estadístico.

Los conjuntos de datos (datos primarios) se probaron primero para normalidad y varianza igual (valor P a rechazar = 0.05) mediante el uso de SigmaPlot 12.5 (Systat Software Inc.). A continuación, se aplicó la prueba estadística adecuada, que incluye las pruebas t desapareadas (dos colas, $\alpha = 0.05$), pruebas de suma de rangos de Mann-Whitney, ANOVA de una vía, o ANOVA de una vía en rangos.

Experimentos con animales.

Todos los procedimientos que implican ratones fueron aprobados por el Comité de Ética de Salud Animal de Monash. Los ratones C57Bl/6 tipo silvestre recibieron inyecciones intraperitoneales de 40 μ g/kg de las variantes recombinantes de IL-37 o vehículo, seguido 60 min

después por la inyección intraperitoneal de LPS (10 mg/kg). Los ratones homocigóticos transgénicos para IL-37b (1, 5) se trataron, además, con LPS (10 mg/kg) o vehículo para comparación directa. La temperatura ambiente y la humedad se monitorearon continuamente. La temperatura corporal se midió como se describió en (1). 24 h después de las inyecciones de LPS, los ratones se anestesiaron y el plasma se obtuvo mediante el sangrado orbital en tubos heparinizados.

Reactivos

ELISA de IL-1 β (beta) humana: Cat#, 557953, ELISA de IL-6 humana, Cat#: 555220, ELISA de IL-1 β (beta) murina, Cat#: 559603 (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos), LPS de *E. coli* 055:85, #L4005-100mg (Sigma, St Louis MO, Estados Unidos), CpG-A ODN 2216 Innaxon #INAX-200-005 (Adipogen, Suiza), imiquimod VacciGrade #vac-img, HKLM #Tlrl-hklm, (Invivogen, San Diego, CA, Estados Unidos).

Ejemplo 2

La IL-37 precursora y madura forman homodímeros en solución.

El análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) de la IL-37 precursora purificada mediante bacterias (isoforma b, referida en la presente descripción como IL-37) indicó que la proteína forma un homodímero en solución (Figura 1A y 1B, eje izquierdo). Para confirmar que la proteína era un homodímero, se llevó a cabo la dispersión de luz multiangular (MALS) acoplada a SEC (Figura 1B, eje derecho). La IL-37 precursora (residuos 1-218) tenía un peso molecular medido de 43.9 kDa consistente con el peso molecular teórico de 48 kDa de un dímero de IL-37. Los datos se correlacionan con los estudios anteriores que detectaron IL-37 dimerica (~45 kDa) en las PBMC humanas y mediante ultracentrifugación de la IL-37 recombinante (1, 2). En la Figura 1B, la IL-37 (1-218) eluye a 9.8 ml, la IL-37 (21-218) eluye a 10 ml, la IL-37 (46-218) eluye a 11 ml y la IL-18 (37-193) eluye a 12.6 ml.

Para investigar si el truncamiento N-terminal del precursor a la forma madura evitaba la dimerización, la IL-37 (residuos 21-218) y la IL-37 (residuos 46-218) se purificaron a partir de células bacterianas y se llevó a cabo el análisis MALS (Figura 1A y 1B). La IL-37 (21-218) y la IL-37 (46-218) maduras formaron cada una dímeros en solución con pesos moleculares de 40.7 kDa y 37.3 kDa, respectivamente. En comparación con la IL-37, la IL-18 madura (residuos 37-193) tenía un peso molecular medido de 17.3 kDa consistente con una estructura monomérica (Figura 1B) (3).

Estructura cristalina del homodímero de IL-37

Para resolver la base molecular de dimerización de IL-37, la IL-37 madura (residuos 46-218) se cristalizó mediante la difusión de vapor en gota colgante. La estructura se resolvió mediante el reemplazo molecular y se refinó a una resolución de 2.3 Å con una $R_{\text{trabajo}}/R_{\text{libre}}$ de 18.22 % y 21.74 % respectivamente, y excelente geometría (Tabla 3). La unidad asimétrica contiene dos copias de IL-37, denominadas IL-37A e IL-37B, que forman un homodímero simétrico de cabeza a cabeza (Figura 1C). Se entiende que esta disposición de las subunidades de IL-37 en un homodímero simétrico es única entre las estructuras de las citocinas de la familia IL-1 resueltas hasta la fecha. Las dos subunidades tienen un alto grado de homología estructural con una desviación r.m.s. de 0.70 Å sobre 142 átomos Ca. La IL-37A es la subunidad más completa, que contiene los residuos 48-207, sólo con el residuo 126 ausente del mapa final. La IL-37B global tiene factores *B*- superiores y es menos completa, que comprende los residuos 49-206 con los residuos 125-128, 161, y 194-196 que faltan en las regiones bucle. La estructura secundaria del pliegue β-trébol comienza en Lys58, y los residuos 48-57 del N-terminal se encuentran en gran parte desestructurados con ausencia de densidad electrónica para los residuos 46-48. Se han identificado dos sitios de escisión potenciales de la IL-37 madura en los residuos 21 y 46, y basado en la estructura cada uno es compatible con el mantenimiento del pliegue β-trébol de IL-37 después de la escisión.

Cada subunidad de IL-37 se compone de 12 cadenas β y tres α-hélices que forman el pliegue β-trébol característico de la superfamilia IL-1 (Figura 1C). Tres pseudorrepeticiones de cuatro cadenas β se juntan, con dos cadenas de cada repetición lo que contribuye a un barril β de seis cadenas y las dos cadenas restantes a una región de cubierta de seis cadenas. Las interacciones de las cadenas N- y C-terminal, β1 y β12, en el barril β antiparalelo cierran el pliegue β-trébol. Tres α hélices decoran el exterior del pliegue β-trébol, con hélices α1 y α2 ubicadas entre la cadena β7 y β8 con una hélice 3₁₀ corta localizada después de la cadena β11.

Tabla 3. Recolección de datos y análisis estadísticos de refinamiento

	IL-37(46-218)
Recolección de datos	
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2
Dimensiones celulares	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	59.58, 103.5, 77.53
<i>A</i> , <i>β</i> , <i>γ</i> (°)	90.0, 90.0, 90.0

Resolución (Å)	39.07-2.25 (2.37-2.25)*
R_{mezcla}	12.6 (134.1)
$I / \sigma I$	9.3 (1.3)
Completamiento (%)	99.2 (99.9)
Redundancia	5.5 (5.6)
Refinamiento	
Resolución (Å)	34.89-2.25
Núm. de reflexiones	23157
$R_{\text{trabajo}} / R_{\text{libre}}$	18.22/21.74
Núm. de átomos	
Proteína	2386
Ligando/ion	25
Agua	158
<i>Factores B</i>	
Proteína	59.17
Ligando/ion	93.70
Agua	58.03
Desviaciones r.m.s.	
Longitudes de enlace (Å)	0.010
Ángulos de enlace (°)	1.09

*Los valores entre paréntesis son para la estructura a la resolución más alta y el conjunto de datos es de un único cristal.

El homodímero de IL-37 tiene una interfase simétrica y altamente organizada cabeza a cabeza

5 La interfase del dímero de IL-37 cabeza a cabeza simétrica entierra un total de 487 Å² de área superficial y se forma por los bucles β3-β4, y la lámina β de tres cadenas (β2-β3-β11) de cada subunidad (Figura 2A). La interfase del dímero parece altamente organizada, con varias interacciones especulares que se forman a través del eje de simetría C₂ situado centralmente entre el bucle β3-β4 de cada subunidad de IL-37. Dentro del núcleo de la interfase, se forman dos enlaces de

10 hidrógeno de cadena principal entre Tyr85 y Arg87 de cada monómero de IL-37 (Figura 2B). La cadena lateral de Tyr85 parcialmente hidrófoba de cada subunidad se entierra en un bolsillo

hidrófobo formado en la superficie de la lámina β β 2- β 3- β 11. El núcleo hidrófobo de la interfase se protege por las interacciones iónicas entre Lys83 y Asp73 en los bordes expuestos al solvente. Los enlaces de hidrógeno se forman, además, por el grupo carbonilo de la cadena principal de Ile86 y la cadena lateral de Arg87 de cada molécula, lo que refuerza la interfase del bucle β 3- β 4 (Figura 2C).

Para validar los detalles moleculares de la interfase, y para generar la IL-37 monomérica, se diseñaron una variedad de mutaciones guiadas a estructura dirigidas para que interfieran con la dimerización de IL-37. Asp73 forma interacciones iónicas con Lys83 dentro de la interfase, y una mutación de carga conmutada en Asp73 (D73K) disipa eficazmente la interfase, con una masa molecular de 18.8 kDa que corresponde a un monómero de IL-37 (Figura 2D). Tyr85 se sitúa en el núcleo hidrófobo y aporta una gran área superficial enterrada a la interfase, y la mutación a alanina (Y85A) también interrumpió la interfase del dímero con un peso molecular medido de 18.2 kDa mediante SEC-MALS (Figura 2D; IL-37 WT eluye a 11 ml, IL-37 D73A eluye a 11.6 ml, IL-37 D73K eluye a 12.7 ml y IL-37 Y85A eluye a 12.6 ml). Debido a la simetría de la interfase del dímero de IL-37, cada mutación puntual se dirige eficazmente a dos sitios de interacción en la interfase y es probable que además ayude en la interrupción de la interfase del dímero.

Para evaluar las alteraciones en la interfase monómero-dímero se han analizado actualmente cinco mutantes de IL-37 mediante SEC-MALS (Figura 3; IL-37 D73A + K83A eluye a 11.1 ml, IL-37 K83E eluye a 11.6ml, la elución de otros mutantes y de tipo silvestre mencionados anteriormente en relación con la Figura 2D) ubicadas en el núcleo de la interfase y la mutación a alanina (Y85A) convierte IL-37 en un monómero. Asp73 se ubica en el límite de la interfaz y forma interacciones iónicas con Lys83. La mutación de Asp73 a alanina (D73A) interrumpe parcialmente la interfase del dímero mediante el desplazamiento del equilibrio hacia el monómero. La mutación de carga conmutada de Asp73 (D73K) disipa la interfase del dímero supuestamente por repulsión de cargas con Lys83. La mutación de carga conmutada de Lys83 (K83E) desplaza el equilibrio hacia el monómero, pero no fue tan eficaz como D73K en disipar la interfase. De manera interesante, la eliminación completa de la interacción iónica que apantalla la interfase (D73A/K83A) parece tener solamente efectos menores sobre el equilibrio. Estas mutaciones sugieren que no se requieren las interacciones iónicas de apantallamiento para la formación de la interfase. En cambio, la cadena lateral enterrada de Tyr85 y el enlace de hidrógeno de la región bucle β 3- β 4 son probablemente más críticos.

Ejemplo 3

Se usaron dos enfoques para evaluar las implicaciones funcionales de la monomerización de IL-37. Primero, las PBMC humanas frescas se trataron con diferentes variantes de IL-37 recombinante (rec), que incluyen la proteína natural (tipo silvestre), que dimeriza espontáneamente incluso a muy bajas concentraciones, y la variante en la que esta dimerización se evita por la mutación D a K del aminoácido 73. Ambas variantes se analizaron truncadas en el N-terminal en el aminoácido 21 y 46.

Como se espera de los estudios anteriores, natIL-37 (recIL-37 tipo silvestre) confirió una reducción moderada en la proteína IL-1 β inducida por LPS (hasta 40 % por natIL-37 (21-218) y hasta 52 % por natIL-37 (46-218); Figura 5, grupo de la izquierda). De manera interesante, el aumento de la concentración de natIL-37 a más de 10 ng/ml, por ejemplo 100 ng/ml, redujo fuertemente la eficacia de natIL-37 (Figura 5); de hecho, en tres donores, 100 ng/ml de natIL-37 (46-218) indujo una respuesta proinflamatoria (aumento de hasta un 36 % en IL-1 β).

La monomerización de IL-37 aumenta marcadamente estas actividades antiinflamatorias. MonoIL-37 (D73K) fue considerablemente más eficaz en bloquear la liberación de IL-1 β a partir de las células PBMC tratadas con LPS que natIL-37 en todas las concentraciones analizadas (Figura 5). A 10 pg/ml, monoIL-37b (46-218) redujo IL-1 β en un 59 %, una mejora de casi 2 veces con respecto a natIL-37 (46-218), y a 100 ng/ml monoIL-37 (46-218) fue más de 5 veces más eficaz que natIL-37b (46-218). Además, monoIL-37b mantuvo su actividad antiinflamatoria a mayores concentraciones; por lo tanto, la formación de dímeros contribuye probablemente a reducir la actividad de IL-37 a tales concentraciones o de hecho convertirla en una actividad proinflamatoria, como fue el caso con las variantes 21-218 a 100 ng/ml (reducción en un 21 % en IL-1 β por monoIL-37b en comparación con el aumento en un 26 % en IL-1 β por natIL-37). Para monoIL-37 (46-218), el intervalo de concentración se extendió más aún, observándose antiinflamación a 1 pg/ml (reducción en un 52 % en IL-1 β) y también a 1 μ g/ml. Además, la pérdida de las funciones antiinflamatorias se produce a una concentración 10 veces mayor (1 μ g/ml) que la de natIL-37. Sorprendentemente, en el extremo inferior del intervalo de concentración a 1 pg/ml, recIL-37b 46-218 monomérica fue todavía 1.6 veces más activa que 10 pg/ml de recIL-37 natural, dimérica (Figura 5). El truncamiento N-terminal afecta también la función de IL-37: la variante 46-218 fue considerablemente más eficaz en bloquear la producción de IL-1 β que la variante 21-218 cuando se comparan tanto la natural como el mutante D73K con sus contrapartes (Figura 5, grupo 1 en función de grupo 3 y grupo 2 en función de grupo 4; los grupos se designan 1 a 4 de izquierda a derecha).

Para tener en cuenta el mecanismo intracelular de acción de IL-37, se evaluó el efecto de la monomerización de IL 37 sobre su potencia antiinflamatoria mediante la transfección en macrófagos THP-1. En consecuencia, se realizó una primera comparación de la actividad antiinflamatoria de IL-37b (natIL-37) natural dimérica con la de la IL-37b monomérica mutante (D73K, monoIL-37) en macrófagos THP-1 (Figura 6). La transfección de natIL-37 en toda su extensión redujo la abundancia de la proteína IL-1 inducida por LPS β en un 71 % en comparación con la transfección control (271 a 80 pg/ml). La actividad antiinflamatoria de monoIL-37 fue 2.7 veces más fuerte, lo que reduce IL-1 β en un 89 % (271 a 30 pg/ml). A diferencia de natIL-37, monoIL-37 también disminuyó IL-1 β en los cultivos tratados con vehículos. Estos datos demuestran que la actividad antiinflamatoria de monoIL-37 es mayor que la de natIL-37 dimérica, y que la dimerización no es necesaria para la bioactividad de IL-37.

La abundancia proteica de TNF se evaluó, además, en los sobrenadantes de los cultivos de PBMC y THP-1, lo que revela que IL-37 también bloquea esta citocina proinflamatoria, aunque con una eficacia algo menor que IL-1 β (datos no mostrados).

Ejemplo 4

Modelo *in vivo* de shock endotóxico

Para añadir la dimensión *in vivo* a estos hallazgos, se empleó un modelo de ratón de shock endotóxico. Los ratones C57Bl/6 tipo silvestre recibieron inyecciones intraperitoneales de las variantes recombinantes de IL-37 (40 μ g/kg) o vehículo, seguido por la inyección intraperitoneal de LPS. Los ratones transgénicos para IL-37 se trataron, además, con LPS o vehículo para la comparación directa. Mientras que cada variante de IL-37 mejora el shock endotóxico (reduciendo hipotermia e IL-1 β plasmática, Figuras 7 y 8), la actividad antiinflamatoria de ambas proteínas IL-37 monoméricas fue mayor que las de sus contrapartes natIL-37 diméricas. Sorprendentemente, la protección proporcionada por monoIL-37 (46-218) fue casi tan fuerte como la conferida por el transgen de IL-37. De hecho, la diferencia entre la temperatura corporal y la IL-1 β plasmática en el grupo monoIL-37 (46-218) y la de los ratones que no recibieron LPS fue mínima.

Ejemplo 5

La mutación de tirosina a alanina en la posición 85 es otro enfoque (además de la mutación D73K) para interrumpir la interfase del dímero de IL-37. El residuo de tirosina parcialmente

hidrófobo en la posición 85 de cada subunidad se entierra en un bolsillo hidrófobo formado por la interfase del dímero. La mutación de este residuo a alanina disminuye significativamente estas interacciones e interrumpe la interfase del dímero. Como tal, recIL-37 Y85A es incapaz de formar homodímeros. De acuerdo con el concepto de la IL-37 monomérica que posee mayor actividad biológica que la IL-37b dimérica, los efectos antiinflamatorios de recIL-37 Y85A aumentaron en comparación con recIL-37 D73K y particularmente en comparación con recIL-37b natural *in vitro* en PBMC estimulada con *Listeria monocytogenes* destruida por calor agonista de TLR2 (HKLM, Figura 9) e *in vivo* en ratones inyectados con LPS agonista de TLR4 (Figura 7). Sin embargo, en las PBMC estimuladas con los ligandos de TLRs7 y 9, imiquimod y CpG-A respectivamente, hubo una pequeña diferencia en la actividad biológica entre recIL-37 D73K y Y85A.

En general, los datos en la variante Y85A apoyan el concepto de que, cuando se usa como un tratamiento extracelular, desplazando el equilibrio de monómero a dímero de IL-37 hacia el monómero aumenta las propiedades antiinflamatorias de IL-37.

Ejemplo 6

Efecto de recIL-37 y variantes monoméricas en la inflamación inducida por agonistas de TLR distintos de LPS

La IL-37 actúa como un poderoso amortiguador de la inflamación desencadenada por un amplio espectro de agresiones inflamatorias. *In vitro*, los inventores han demostrado que además de LPS, tales agresiones incluyen el agonista de TLR1 Pam₃CSK₄ (Figura 1 en Nold y otros, Nat Immunol 2010), IL-1β (Figuras 3&4 en Nold y otros, Nat Immunol 2010), LPS+IL-12, TNF e IL-12+IL-18 (Figura 7 en Nold y otros, Nat Immunol 2010 y Figura 4 en Nold-Petry y otros, Nat Immunol 2015). Además, IL-37 ejerce efectos protectores en una gran variedad de modelos animales de enfermedad; además del modelo de shock endotóxico, estos incluyen colitis DSS, ictiosis arlequín, hipersensibilidad por contacto y otros.

Tal actividad contra un amplio intervalo de desencadenantes inflamatorios es de alta relevancia traduccional, ya que puede esperarse, por lo tanto, que IL-37 sea eficaz para mejorar la inflamación en un espectro de enfermedades igualmente amplio, en el intervalo desde resfriado común hasta psoriasis, infarto del miocardio, derrame y muchos otros.

Sin embargo, los datos descritos en Nold y otros, Nat Immunol 2010 y Nold-Petry y otros, Nat Immunol 2015 se generaron mediante el uso ya sea de células transfectadas para expresar IL-37 o la cepa de ratón transgénica para IL-37. Ya que IL-37 posee un mecanismo de acción doble, que

incluye una vía de señalización intracelular y una extracelular, es importante establecer que el tratamiento con recIL-37, que probablemente actúa casi exclusivamente a través de la vía extracelular, mediada por el receptor de IL-37, es igualmente eficaz en bloquear no solo la inflamación desencadenada por LPS, sino también por otros agentes inflamatorios. Los datos descritos en la presente descripción muestran que este es de hecho el caso.

En las PBMC humanas estimuladas con HKLM agonista de TLR2, recIL-37 confirió hasta un 51 % de reducción en IL-1 β y hasta un 36 % de reducción de la abundancia de la proteína IL-6 (Figura 9). La abundancia de citocinas proinflamatorias también fue inferior en cultivos tratados con el ligando de TLR7 imiquimod + recIL-37b (hasta un 36 % menos de IL-1 β , Figura 10), el agonista de TLR9 CpG-A + recIL-37b (hasta un 30 % menos de IL-6, Figura 11), y ssARN40 (hasta un 49 % menos de IL-1 β , Figura 12), el ligando de TLR8.

Además, los datos en la presente descripción sugieren fuertemente que el efecto antiinflamatorio de recIL-37 monomérica es mayor que el de recIL-37 que es capaz de formar homodímeros. La Figura 5 muestra que en las PBMC estimuladas con el ligando LPS de TLR4, la variante D73K monomérica es significativamente más activa que su contraparte dimérica natural. En las PBMC estimuladas con ligandos de los TLR 2 y 7, 8 y 9, existen observaciones similares: La variante Y85A fue significativamente más activa que la recIL-37 natural en el bloqueo de IL-1 β o IL-6 inducida por HKLM (ligando de TLR 2) e imiquimod (ligando de TLR 7) (Figura 9 y 10, respectivamente). Además, la inhibición de IL-1 β e IL-6 conferida tanto por D73K como Y85A fue significativa en cultivos estimulados con imiquimod y CpG-A (ligando de TLR 9), mientras que la conferida por natIL-37b no (Figuras 10 y 11, respectivamente). Aunque el análisis estadístico no fue posible para el ligando de TLR8, ssARN40, ya que sólo se investigaron dos donores, D73K fue marcadamente más potente en bloquear IL-1 β que natIL-37 en cada una de las concentraciones analizadas (Figura 12).

Las variantes monoméricas de IL-37 serán clínicamente eficaces como el ingrediente activo de fármacos que bloquean la inflamación en una amplia variedad de enfermedades provocadas por un amplio espectro de agresiones inflamatorias.

REFERENCIAS

1. Nold, M. F., Nold-Petry, C. A., Zepp, J. A., Palmer, B. E., Bufler, P., and Dinarello, C. A. (2010) IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat. Immunol.* **11**, 1014–1022
2. Kumar, S., Hanning, C. R., Brigham-Burke, M. R., Rieman, D. J., Lehr, R., Khandekar, S.,

- Kirkpatrick, R. B., Scott, G. F., Lee, J. C., Lynch, F. J., Gao, W., Gambotto, A., and Lotze, M. T. (2002) Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine*. **18**, 61–71
- 5 3. Kato, Z., Jee, J., Shikano, H., Mishima, M., Ohki, I., Ohnishi, H., Li, A., Hashimoto, K., Matsukuma, E., Omoya, K., Yamamoto, Y., Yoneda, T., Hara, T., Kondo, N., and Shirakawa, M. (2003) The structure and binding mode of interleukin-18. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 966–971
4. Tsutsumi, N., Kimura, T., Arita, K., Ariyoshi, M., Ohnishi, H., Yamamoto, T., Zuo, X., Maenaka, K., Park, E. Y., Kondo, N., Shirakawa, M., Tochio, H., and Kato, Z. (2014) The
10 structural basis for receptor recognition of human interleukin-18. *Nat Commun.* **5**, 5340
5. Nold-Petry, C. A., Lo, C. Y., Rudloff, I., Elgass, K. D., Li, S., Gantier, M. P., Lotz-Havla, A. S., Gersting, S. W., Cho, S. X., Lao, J. C., Ellisdon, A. M., Rotter, B., Azam, T., Mangan, N. E., Rossello, F. J., Whisstock, J. C., Bufler, P., Garlanda, C., Mantovani, A., Dinarello, C. A., and Nold, M. F. (2015) IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry
15 out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat. Immunol.* **16**, 354–365 (2015).
6. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797
7. Matsuura, Y., and Stewart, M. (2004) Structural basis for the assembly of a nuclear export
20 complex. *Nature*. **432**, 872–877
8. Collaborative Computational Project, Number 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **50**, 760–763
9. Dunn, E. F., Gay, N. J., Bristow, A. F., Gearing, D. P., O'Neill, L. A. J., and Pei, X. Y. (2003) High-resolution structure of murine interleukin 1 homologue IL-1F5 reveals unique loop
25 conformations for receptor binding specificity. *Biochemistry*. **42**, 10938–10944
10. Bunkóczi, G., Echols, N., McCoy, A. J., Oeffner, R. D., Adams, P. D., and Read, R. J. (2013) Phaser.MRage: automated molecular replacement. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2276–2286
11. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure
30

solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221

12. BUSTER version 2.10.0
13. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
- 5 14. Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21
15. Nold M., et al. IL-18BPα:Fc cooperates with immunosuppressive drugs in human whole
10 blood. *Biochem Pharmacol* 66, 505-510 (2003).
16. Nold M.F., et al. Endogenous IL-32 Controls Cytokine and HIV-1 Production. *J Immunol* 181, 557-565 (2008).