



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 891**

51 Int. Cl.:
A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01977878 .6**

96 Fecha de presentación : **28.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1324779**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **Interleucina-10 pegilada.**

30 Prioridad: **29.09.2000 US 236596 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2011

73 Titular/es: **SCHERING CORPORATION**
Patent Department - K-6-1 1990, 2000 Galloping
Hill Road
Kenilworth, New Jersey 07033-0530, US

72 Inventor/es: **Lee, Seoju;**
Wylie, David, C. y
Cannon-Carlson, Susan, V.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 367 891 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Interleucina-10 pegilada

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a IL-10 pegilada y a procedimientos para la preparación de IL-10 pegilada según se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

10 La interleucina-10 de citosinas (IL-10) es un dímero que se hace biológicamente inactivo después de ruptura de las interacciones no covalentes que conectan sus dos subunidades monómeras. La IL-10 fue primeramente identificada como un producto del linfocito T cooperador de tipo 2 y más tarde se vio que era producida por otros tipos de linfocitos T cooperadores, incluidos linfocitos B y macrófagos. También inhibe la síntesis de varias citosinas producidas a partir de células cooperadoras T de tipo 1, tales como γ -interferón, IL-2 y factor α de necrosis tumoral (TNF- α). La capacidad de IL-10 de inhibir moduladores de respuesta inmune mediada por células y suprimir respuestas de linfocitos T dependientes de células que presentan antígeno demuestra que IL-10 tiene propiedades inmunosupresoras. Esta citosina también inhibe la producción de monocito/macrófago de otras citosinas tales como IL-1, IL-6, IL-8, factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (G-CSF) y TNF- α . Como resultado de su actividad pleiotrópica, la IL-10 es objeto de investigación para numerosas aplicaciones clínicas tales como el tratamiento de afecciones inflamatorias, sepsis bacteriana, choque letal inducido por enterotoxina y enfermedades autoinmunes, por ejemplo, la artritis reumatoide, rechazo alógrafico y diabetes.

20 IL-10 tiene en el cuerpo una semivida relativamente corta en suero. Por ejemplo, la semivida en ratones medida en un bioensayo in vitro o por eficacia en el sistema de modelo de choque séptico [véase Smith y otros, Cellular Immunology 173:207-214 (1996)] es de aproximadamente 2 a 6 horas. Una pérdida de la actividad de IL-10 puede ser debida a varios factores, incluido aclaramiento renal, degradación proteolítica y monomerización en la corriente sanguínea.

25 La pegilación de una proteína puede aumentar su semivida en suero retrasando el aclaramiento renal, puesto que el resto de PEG añade a la proteína un considerable radio hidrodinámico. Sin embargo, las metodologías de pegilación convencionales están dirigidas a proteínas monómeras y mayores, complejos unidos por disulfuro, por ejemplo anticuerpos monoclonales. La pegilación de IL-10 presenta problemas no encontrados con otras proteínas conocidas en la técnica, dado que el dímero IL-10 se mantiene unido por interacciones no covalentes. La disociación de IL-10, que puede ser intensificada durante la pegilación, dará por resultado monómeros de IL-10 pegilados (monómeros PEG-IL-10). Los monómeros PEG-IL-10 no retienen la actividad biológica de IL-10. También se señala que di-PEG-IL-10, esto es, la pegilación en dos restos de aminoácido de IL-10, no retiene significativamente la actividad biológica. Los documentos WO99/32134, WO95/06058, WO01/58950 y WO96/11953 describen diferentes IL-10 pegiladas u otras proteínas.

35 Sería una ventaja tener un producto de IL-10 que fuera más capaz de tolerar una exposición sistémica durante el tratamiento por intensificar la vida en circulación (aclaramiento demorado), la solubilidad y la estabilidad de IL-10 sin destruir la estructura dímera y afectar a la actividad de IL-10. La presente invención se dirige a esta y otras necesidades relacionadas en la técnica.

Sumario de la invención

40 La invención proporciona IL-10 pegilada (PEG-IL-10), más en particular mono-PEG-IL-10, procedimientos para producirla y composiciones farmacéuticas que contienen mono-PEG-IL-10, según se define en las reivindicaciones.

En un aspecto, la invención es una mono-PEG-IL-10 que contiene de una a nueve moléculas de PEG covalentemente unidas mediante un conector al grupo α -amino del resto de aminoácido del extremo N (extremo amino) de una subunidad de la IL-10. Así, esta mono-PEG-IL-10 de la presente invención puede expresarse por la fórmula:



en la que L es un conector que comprende un alquilo C_{2-12} ;

b representa de 1 a 9 moléculas de PEG covalentemente unidas al conector L;

n es de aproximadamente 20 a 2300, y representa las unidades repetidas de cada molécula de PEG unidas al conector L, pudiendo ser n el mismo o diferente para cada molécula de PEG, no excediendo de 2300 la suma de las unidades repetidas representadas por n para las moléculas de PEG;

50 X es H o alquilo C_{1-4} , y

N es un nitrógeno del grupo amino del resto del aminoácido del extremo N de una subunidad de la proteína de IL-10 que está covalentemente unida al conector L.

Puesto que la suma de n para todas las moléculas de PEG no excede de 2300, la masa molecular total de las moléculas de PEG unidas al conector no excede aproximadamente de 100.000 Da.

En una realización específica, el conector L de una PEG-IL-10 contiene un grupo propilo (por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) que está unido al extremo amino de la IL-10.

5 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen mono-PEG-IL-10 estable según se define en las reivindicaciones.

Esta invención proporciona además composiciones de PEG-IL-10 en las que al menos 80% de la PEG-IL-10 es la mono-PEG-IL-10 estable. La presente invención proporciona también composiciones de PEG-IL-10 en las que la población de mono-PEG-IL-10 es como mínimo en un 80% isómero posicional de mono-PEG-IL-10 que está pegilado en el extremo N de una subunidad de IL-10.

En otro aspecto más, esta invención se refiere a un procedimiento para preparar PEG-IL-10, más en particular mono-PEG-IL-10, haciendo reaccionar IL-10 con un conector de PEG-aldehído activado en presencia de un agente reductor para producir una PEG-IL-10 según se define en las reivindicaciones. Este procedimiento minimiza la ruptura de la estructura dímera de IL-10 de manera que no hay formación o sólo una pequeña formación de proteínas monómeras.

En una realización particular de un procedimiento de la presente invención, un procedimiento para preparación de PEG-IL-10 incluye hacer reaccionar IL-10 con un conector de PEG-aldehído en presencia de un cianoborohidruro sódico, en el que la proporción molar de IL-10 a cianoborohidruro sódico es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:15 formando una PEG-IL-10 a un pH de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 7,5 a una temperatura de 18°C a 25°C de manera que el conector esté unido covalentemente a un resto de aminoácido de la IL-10.

Estos y otros aspectos de la invención se explican más detalladamente en la siguiente descripción detallada de la invención.

Descripción detallada de la invención

25 Esta invención proporciona IL-10 pegilada (también designada aquí "PEG-IL-10") según se define en las reivindicaciones. Una PEG-IL-10 de la invención contiene una o varias moléculas de polietilenglicol (PEG) unidas covalentemente a sólo un resto (mono) de la proteína de IL-10 mediante un conector, de manera que la unión de PEG es estable. Así, la pegilación se produce en un resto de aminoácido individual de la IL-10 para obtener una mono-PEG-IL-10.

30 Al resto de aminoácido individual se puede unir más de una molécula de PEG a través de un conector que es capaz de acomodar más de una molécula de PEG. Un conector (para unión covalente a IL-10) usado en esta invención preferiblemente contiene un grupo aldehído que reacciona químicamente con un grupo amino o imino de un resto de aminoácido, por ejemplo, el grupo α -amino del extremo N del polipéptido, el grupo ϵ -amino de la lisina. Con el fin de obtener una mono-PEG-IL-10 estable, se une una PEG al extremo amino o a un resto de lisina de IL-10 frente a un resto de histidina. Muy preferiblemente, una mono-PEG-IL-10 de esta invención contiene una o varias moléculas de PEG unidas por covalencia mediante un conector al grupo α -amino del extremo N de una sola subunidad de IL-10. Se señala que una IL-10 que contiene una molécula de PEG es también conocida como una proteína conjugada, mientras que una proteína que carece de una molécula de PEG unida puede denominarse no conjugada.

40 Las condiciones de reacción para la pegilación se seleccionan para minimizar la ruptura de la estructura dímera de IL-10. Así, la producción de IL-10 pegiladas monómeras, que no tienen la actividad de IL-10, se reduce por un procedimiento de la invención que se describe más adelante. Preferiblemente, las condiciones de reacción usadas en un procedimiento de la invención permiten la pegilación selectiva sobre el grupo α -amino del extremo N de IL-10 (extremo N de PEG-IL-10) para minimizar la producción de otros isómeros posicionales de PEG-10, por ejemplo, His-PEG-IL-10 y Lys-PEG-IL-10. Es deseable y ventajoso tener un isómero posicional individual de un producto fármaco terapéutico por numerosas razones, incluidas aprobación de normas reguladoras, propiedades invariables, para posibilitar una mejor caracterización del producto in vivo y mejor seguridad y control del procedimiento para producirlo.

Un procedimiento de la presente invención proporciona composiciones que contienen una población de la mono-PEG-IL-10 estable, esto es, el resto de PEG de una mono-PEG-IL-10 no es hidrolizado a partir del resto de aminoácido pegilado usando un ensayo con hidroxilamina, por ejemplo, hidroxilamina 450 mM (pH 6,5) durante 8 a 16 horas a temperatura ambiente. Así, se pueden lograr poblaciones de mono-PEG-IL-10 estables (descritas antes) en composiciones de PEG-IL-10, en las que más de 80% de la composición es mono-PEG-IL-10 estable, más preferiblemente más de 90% y, muy preferiblemente, como mínimo 95%. Sin embargo, se puede alcanzar más de 98% de mono-PEG-IL-10 en una composición de PEG-IL-10, como se muestra en el Ejemplo siguiente. Además, un procedimiento de la presente invención proporciona composiciones de PEG-IL-10 que contienen una población

sustancialmente homogénea de la mono-PEG-IL-10, en las que al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, de la mono-PEG-IL-10 es un isómero posicional que está pegilado en el extremo N de IL-10.

Interleucina-10

5 Se describen procedimientos generales de biología molecular en, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook y otros, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2ª ed, (1988) y *Current Protocols in Molecular Biology*, Brent y otros, John Wiley & Sons, New York, Ausubel y otros, eds. (1988 y suplementos periódicos)

10 Una proteína "interleucina-10" o proteína "IL-10" usada en esta invención, conjugada a un polietilenglicol, esto es, PEG-IL-10, o en forma no conjugada, es una proteína que comprende dos subunidades (monómeros) unidas por interacciones no covalentes formando un dímero. Los extremos "IL-10 monómero" y "monómero IL-10" se refieren a una subunidad de IL-10 que no posee actividad biológica de la IL-10 nativa. Así, una IL-10 usada en esta invención para hacer PEG-IL-10 es un dímero que posee actividad de IL-10 nativa.

15 Una proteína IL-10 usada en esta invención contiene una secuencia de aminoácido que comparte una homología observada de al menos 75%, preferiblemente de al menos 85% y, muy preferiblemente, de al menos 90% o más, por ejemplo de al menos 95%, con la secuencia de una proteína IL-10 madura, esto es, que carece de cualesquier secuencias líder. Véase, por ejemplo, patente U.S. nº. 6.217.657. La homología de la secuencia de aminoácidos, o identidad de secuencia, se determina por optimización de pares de residuos y, si es necesario, introduciendo huecos según sea necesario. Las secuencias homólogas de aminoácidos típicamente se prevé que incluyan variaciones polimórficas alélicas naturales e interespecies en cada respectiva secuencia. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán una homología de 25-100% (si se pueden introducir brechas) a una homología de 50-100% (si están incluidas sustituciones conservadoras) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-10. Véase Needleham y otros, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); Sankoff y otros, en *Time Warps, String Edits.*; y *Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, 1983, Addison-Wesley, Reading, MA; y paquetes de software de IntelliGenetics, Mountain View, CA, y el University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI.

25 La IL-10 puede ser glucosilada o no glucosilada. También se pueden usar muteínas u otros análogos, incluida la proteína BCRF1 IL-10 viral de virus de Epstein-Barr. Se pueden hacer modificaciones de secuencias que codifican IL-10 usando una variedad de técnicas, por ejemplo mutagénesis dirigida específica de sitio [Gillman y otros, *Gene* 8:81-97 (1979); Roberts y otros, *Nature* 328:731-734 (1987), y se puede evaluar por exploración rutinaria en un ensayo adecuado la actividad de IL-10. Las proteínas de IL-10 modificadas, por ejemplo, variantes, pueden variarse desde la secuencia natural a nivel de la estructura primaria. Tales modificaciones se pueden hacer por inserciones de aminoácidos, sustituciones, supresiones y fusiones. Las variantes de IL-10 se pueden preparar con diversos objetivos en la mente, incluidos el aumento de la semivida en suero, la reducción de la respuesta inmune frente a la IL-10, la facilitación de la purificación o la preparación, la disminución de la conversión de IL-10 en sus subunidades monómeras, la mejora de la eficacia terapéutica y la disminución de la gravedad o la presencia de efectos secundarios durante el uso terapéutico. Las variantes de las secuencias de aminoácidos usualmente son variantes predeterminadas no encontradas en la especie natural, aunque otras pueden ser variantes postranslacionales, por ejemplo, variantes glucosiladas. En esta invención se puede usar cualquier variante de IL-10 con tal que que retenga un nivel adecuado de la actividad de IL-10.

40 La IL-10 usada en esta invención se puede obtener de un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un ratón. Se prefiere la IL-10 humana para tratamiento de seres humanos que lo necesiten. La IL-10 usada en esta invención preferiblemente es IL-10 recombinante.

45 Se pueden encontrar procedimientos que describen la preparación de IL-10 humana y de ratón en la patente U.S. nº. 5.231.012. En otra realización de la presente invención, la IL-10 puede ser de origen viral. La clonación y expresión de una IL-10 viral de virus de Epstein-Barr (proteína de BCRF1) se describe en Moore y otros, *Science* 248:1230 (1990).

50 La IL-10 se puede obtener por diferentes rutas usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, aislamiento y purificación de medios de cultivo de células activas capaces de secretar la proteína (por ejemplo, linfocitos T), síntesis química o técnicas recombinantes (véase, por ejemplo, Merrifield, *Science*, 233:341-47 (1986); Atherton y otros, *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, 1999, I.R.L. Press, Oxford; patente U.S. nº. 5.231.012, que enseña procedimientos para la producción de proteínas que tienen actividad de la IL-10, incluidas técnicas recombinantes y otras de síntesis). Preferiblemente, la proteína IL-10 se puede obtener de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de IL-10 usando técnicas recombinantes. También es asequible comercialmente IL-10 recombinante humana, por ejemplo, de Pepro Tech, Inc., Rocky Hill, NJ.

55 La IL-10 exhibe varias actividades biológicas que podrían formar la base de ensayos y unidades. Véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, John Willy & Sons, NY, Coligan y otros, eds., (1991 y suplementos periódicos). La actividad de IL-10 se describe en, por ejemplo, patente U.S. nº. 5.231.012 y en la publicación de Patente

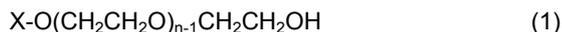
Internacional nº. WO97/42324, que proporcionan ensayos in vitro adecuados para medir tal actividad. En particular, la IL-10 inhibe la síntesis de al menos una citocina del grupo constituido por IFN- γ , linfotoxina, IL-2, IL-3 y GM-CSF en una población de células cooperadoras T inducidas para sintetizar una o varias de estas citosinas por exposición a antígeno y células que presentan antígeno (APC). La IL-10 también tiene la propiedad de estimular el crecimiento celular y midiendo la proliferación celular después de exposición a la citosina, se puede determinar la actividad de IL-10.

Como se ha descrito antes, la actividad de una mono-PEG-IL-10 de la presente invención se puede determinar usando un ensayo estándar de actividad de IL-10 conocido en la técnica. Preferiblemente, la mono-PEG-IL-10 retiene como mínimo 5% de la actividad de IL-10 no conjugada. Es alcanzable una actividad mayor que 30% de una mono-PEG-IL-10 de esta invención, como se demuestra en el Ejemplo 1. Preferiblemente, una mono-PEG-IL-10 de la invención tiene una biodisponibilidad significativamente incrementada en el cuerpo de un paciente en comparación con la IL-10 no conjugada, por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo 2.

Polietilenglicol

Los expertos en la técnica de cualificación normal apreciarán que se pueden usar varios polímeros además de PEG para unión en el extremo N de un monómero de IL-10, tales como polioximetileno, 2-metil-2-propenil metil diéter o polioxietilen alilmetil diéter, aunque es muy preferido el PEG. Así, en esta invención se usa PEG.

PEG es un polímero soluble en agua muy conocido que está disponible comercialmente o que se puede preparar por polimerización con apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, vol. 3, págs.. 138-161). El extremo "PEG" se usa extensamente para abarcar cualquier molécula de etilenglicol, sin consideración del tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y se puede representar por la fórmula:



en la que n es de 20 a 2300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo alquilo C₁₋₄.

Preferiblemente, el PEG usado en la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, esto es, X es H o CH₃ ("metoxi PEG"). Se indica que el otro extremo de PEG, que en la fórmula (1) termina en OH, se une covalentemente a un resto de conector mediante un enlace oxígeno de éter.

Cuando se usa en una estructura química, el extremo "PEG" incluye la fórmula anterior (1) sin el hidrógeno del grupo hidroxilo, dejando el oxígeno disponible para reaccionar con un átomo de carbono libre de un conector de la invención formando un enlace éter.

Se puede usar cualquier masa de molecular de PEG prácticamente como se desee, por ejemplo, de aproximadamente 1.000 daltons (Da) a 100.000 Da (n es de 20 a 2300). El número de unidades "n" repetidas en el PEG se describe aproximadamente para la masa molecular en daltons. Se prefiere que la masa molecular combinada de PEG en un conector activado sea adecuada para uso farmacéutico. Así, la masa molecular combinada de las moléculas de PEG no debe ser mayor de 100.000 Da. Por ejemplo, si a un conector están unidas tres moléculas de PEG, teniendo cada molécula de PEG una misma masa molecular de 12.000 Da (cada n es aproximadamente 270), la masa molecular total de PEG del conector es de aproximadamente 36.000 (n total es aproximadamente 820). Las masas moleculares del PEG unido al conector también puede ser diferente, por ejemplo, de tres moléculas de un conector dos moléculas de PEG pueden tener una masa molecular de 5.000 Da cada una (cada n es aproximadamente 110) y una molécula de PEG puede ser de 12.000 Da (n es aproximadamente 270).

Preferiblemente, la masa molecular combinada o total del PEG usado en una PEG-ILE-10 es de aproximadamente 3.000 daltons a 60.000 daltons (n total es de 70 a 1.400), más preferiblemente de aproximadamente 10.000 Da a 36.000 Da (n total es de aproximadamente 230 a aproximadamente 820). La más combinada más preferida para PEG es de aproximadamente 12.000 Da a 24.000 Da (n total es de aproximadamente 270 a aproximadamente 550).

Un experto en la técnica puede seleccionar una masa molecular adecuada del PEG, por ejemplo, sobre la base de cómo se usará terapéuticamente la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis, la inmunogenia y otras consideraciones. Para una discusión del PEG y su uso para intensificar las propiedades de proteínas, véase N.V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114 (1993).

PEG activado

Para conjugar PEG a IL-10 se hace reaccionar un conector activado unido covalentemente a una o varias moléculas de PEG con un grupo amino o imino de un resto de aminoácido, muy preferiblemente con un grupo α -amino en el extremo N de IL-10 formando una mono-PEG-IL-10 de la presente invención.

Un conector está "activado" si es químicamente reactivo y está preparado para unirse por covalencia a un grupo amino en un resto de aminoácido. En esta invención se puede usar cualquier conector adecuado siempre que pueda

acomodar una o varias moléculas de PEG y formar un enlace covalente con un grupo amino de un resto de aminoácido en condiciones de reacción adecuadas. Preferiblemente, el conector activado se une a un grupo α -amino de manera altamente selectiva sobre otros sitios de unión, por ejemplo, un grupo ϵ -amino de lisina o un grupo imino de histidina.

5 El PEG activado se puede representar por la fórmula:



10 en la que PEG (definido antes) se une por covalencia a un átomo de carbono del conector formando un enlace éter. b es de 1 a 9 (esto es, se pueden unir de 1 a 9 moléculas de PEG al conector) y L' contiene un grupo reactivo (un resto activado) que puede reaccionar con un grupo amino o imino de un resto de aminoácido proporcionando una unión covalente de PEG a IL-10.

Un conector activado (L') preferido de la invención contiene un aldehído de fórmula RCHO, en la que R es un alquilo C₁₋₁₁ lineal (de cadena recta) o ramificado. Después de unirse covalentemente a BL-10 un conector adecuado, el conector (designado "L" en las fórmulas estructurales dadas antes) contiene entre la IL-10 y PEG de 2 a 12 átomos de carbono.

15 El propionaldehído es un ejemplo de un conector activado preferido de esta invención. El PEG-propionaldehído, representado en la fórmula (3) se describe en la patente U.S. n.º. 5.252.714 y está disponible comercialmente en Shearwater Polymers (Huntsville, AL).



20 Si es deseable unir covalentemente más de una molécula de PEG a IL-10, se puede usar un conector ramificado activado adecuado (también conocido como "de multibrazos"). Se puede usar cualquier conector de PEG ramificado adecuado que une covalentemente dos o más moléculas de PEG a un grupo amino de un resto de aminoácido de IL-10, más preferiblemente a un grupo α -amino del extremo N. Preferiblemente, un conector ramificado usado en esta invención contiene dos o tres moléculas de PEG.

25 Por ejemplo, un conector de PEG ramificado usado en esta invención puede ser un grupo alifático lineal o ramificado que sea hidrolíticamente estable y contenga un resto activado, por ejemplo, un grupo aldehído, que reaccione con un grupo amino de un resto de aminoácido, según se ha descrito antes. Preferiblemente, el grupo alifático de un conector adecuado contiene de 2 a 12 carbonos. Por ejemplo, un grupo alifático puede ser un t-butilo que contiene tantas como tres moléculas de PEG en cada uno de los tres átomos de carbono (esto es, un total de 9 moléculas de PEG) y un resto aldehído reactivo en el cuarto carbono del t-butilo.

30 También se describen ejemplos de conectores de PEG ramificados activados en las patentes U.S. n.º. 5.643.575, n.º. 5.919.455 y n.º. 5.932.462. Un experto normal en la técnica puede preparar modificaciones de conectores de PEG según se desee, por ejemplo, añadiendo un resto aldehído reactivo.

35 Los procedimientos para la preparación de conectores para uso en la presente invención son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, patentes U.S. n.º. 5.643.575, n.º. 5.919.455 y n.º. 5.932.462. Se pueden obtener conectores de PEG activados, tales como PEG-aldehídos, de una fuente convencional, por ejemplo, Shearwater Polymers, (Huntsville, AL) o Enzon, Inc. (Piscataway, NJ).

IL-10 pegilada

40 Una mono-PEG-IL-10 de esta invención es una IL-10 según se define en las reivindicaciones, que tiene un conector que contiene una o varias moléculas de PEG, que está unido por covalencia a sólo un resto de aminoácido de la IL-10. Las moléculas de mono-PEG-IL-10 de la invención contienen un conector de PEG unido a un resto de aminoácido de la IL-10 formando un enlace hidrolíticamente estable, por ejemplo en el grupo α -amino del extremo N o en la cadena lateral de un resto de lisina. (La estabilidad de una proteína de mono-PEG-IL-10 de la invención se puede determinar por un ensayo convencional con hidroxilamina, por ejemplo, usando condiciones como se ha descrito en lo que antecede). Muy preferiblemente, el PEG está unido al extremo N de una subunidad de IL-10 sobre el átomo de nitrógeno del grupo α -amino. Así, en la proteína entera de IL-10 que contiene dos subunidades, sólo una subunidad está pegilada en un resto de aminoácido.

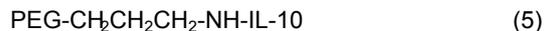
Una mono-PEG-IL-10 pegilada de la invención se representa por la fórmula estructural:



50 en la que PEG, b y L (conector) se han descrito antes y N es nitrógeno de un grupo amino o imino de un resto de aminoácido de una subunidad de IL-10. Si b es mayor que 1, L debe ser un conector adecuado que une dos o más moléculas de PEG a un resto de aminoácido de IL-10.

Por ejemplo, si el conector es un PEG-propionmaldehído y b es 1, después de la unión por covalencia del conector a

un resto de aminoácido en la IL-10, la PEG-IL-10 puede tener una fórmula estructural (5) como se muestra:

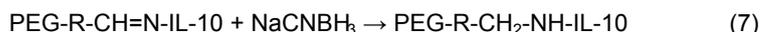


Reacción de conjugación entre PEG y IL-10

5 Aunque no se pretende limitar el alcance de la invención a una teoría cualquiera, lo que sigue ilustra esquemáticamente una reacción entre un conector PEG-aldehído activado y un grupo amino o imino de un resto de aminoácido de uno de los monómeros de IL-10:



10 en la que R es un alquilo C₁₋₁₁ y N es nitrógeno de un grupo amino reactivo de un resto de aminoácido de IL-10. En la reacción (6), el PEG activado se une covalentemente a la IL-10 formando un enlace imina. La reducción del enlace imina por el agente reductor, por ejemplo, cianoborohidruro sódico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) forma IL-10 pegilada como se muestra:



15 En vez de cianoborohidruro sódico se pueden usar en esta reacción otros agentes reductores, incluidos borohidruro sódico, t-butilaminoborano, triacetilborohidruro sódico, borato de dimetilamina, borato de trimetilamina y borato de piridina. Se prefiere el cianoborohidruro sódico porque reduce específicamente un enlace imina, que se forma entre un grupo aldehído del PEG activado y un grupo amino del amino ácido de IL-10.

20 Como se muestra en las reacciones (6) y (7), durante la preparación de mono-PEG-IL-10 se forma una base de Schiff. Había preocupación sobre si este intermedio, que es muy difícil de separar de la mono-PEG-IL-10, podría rebajar la pureza de la mono-PEG-IL-10 si el intermedio se acumulara en la reacción y no estuviera reducido en el producto. Típicamente, este problema se evita usando concentraciones más altas de agente reductor, por ejemplo, véase Kinstler y otros, Pharm. Res. 13:996-1002 (1996) y Chamow y otros, Bioconjugate Chem. 5: 133-140 (1994). Sin embargo, había preocupación además en cuanto a que concentraciones más altas de agente reductor, por ejemplo cianoborohidruro sódico, convencionalmente usado, destruyeran la estructura dímica de IL-10. Por ejemplo, una cantidad de cianobromohidruro sódico tan pequeña como 14 mM puede dar por resultado una monomerización de IL-10 de más de 10%.

30 Durante el desarrollo de un procedimiento de la presente invención se descubrió que la reacción (6) es reversible y que el equilibrio favorece mucho la hidrólisis del intermedio de reacción de la base de Schiff (esto es, la imina). Se cree que el intermedio es muy inestable y se hidroliza rápidamente en ausencia de agente reductor. Esto se demostró incubando el conector de PEG activado con IL-10 en ausencia de un agente reductor. No fue detectable IL-10 no pegilada (no reducida o reducida) por HPLC de exclusión de tamaños (ET) después de 24 horas, aunque la adición de cianoborohidruro sódico produjo instantáneamente mono-PG-IL-10 de la invención. Sobre la base de estos resultados, se usan concentraciones mucho más bajas de un agente reductor para preparar PEG-IL-10 de la presente invención en comparación con las concentraciones de agente reductor indicadas en la técnica. Esto es una ventaja sobre los procedimientos convencionales de pegilación de proteínas porque, aunque se emplea una concentración baja de agente reductor, no se reduce la pureza del producto mono-IL-10, esto es, no está presente intermedio alguno, y se controla la monomerización de IL-10.

40 La relación de IL-10 a agente reductor es de aproximadamente 1:0,5 a 1:50, más preferiblemente de aproximadamente 1:1 a 1:30. Muy preferiblemente, la relación molar de L-10 al agente reductor es de aproximadamente 1:5 a 1:15 para minimizar cualquier ruptura de la IL-10 durante la pegilación. Relaciones molares de incubación de menos de 10:1 de cianoborohidruro sódico a IL-10 en un procedimiento de la invención no rompen la estructura dímica de IL-10. La capacidad de usar cantidades menores de agente reductor para reducir la base de Schiff a una amina secundaria, realizándose así la pegilación, fue sorprendente a la luz de las enseñanzas de la técnica, esto es, es necesario tener unas relaciones molares significativamente más altas de cianoborohidruro sódico a proteína para pegilar proteínas (por ejemplo, aproximadamente de 75:1 a 350:1; véase, por ejemplo, Kinstler y otros, supra, y Chamow y otros, supra).

45 En un procedimiento de la presente invención, la relación molar del conector de PEG activado a IL-10 puede ser de aproximadamente 0,5:1 a 20:1, más preferiblemente de 2:1 a 8:1.

50 En la presente invención se pueden usar varios tampones acuosos para catalizar la adición covalente de PEG a IL-10. El pH de un tampón usado es de aproximadamente 5,5 a 7,8, más preferiblemente el pH está en el intervalo neutro, por ejemplo, de aproximadamente 6,3 a 7,5. Con el fin de no destruir las interacciones no covalentes entre las dos subunidades de IL-10, es deseable mantener la IL-10 en este intervalo de pH neutro, en particular durante la reacción de pegilación. Este intervalo de pH neutro también aumenta la pegilación específica de sitio de IL-10 en el grupo α-amino del extremo N frente a otros grupos imino o amino de otros restos de aminoácido, por ejemplo, lisina o histidina. Se prefieren tampones que tengan una pKa próxima al intervalo de pH neutro, por ejemplo, tampón

fosfato. Preferiblemente, los tampones y el pH se seleccionan de manera que no resulte la monomerización de IL-10. La monomerización de IL-10 se puede detectar y controlar usando HPLC-ET convencional.

El intervalo de temperaturas para la preparación de una mono-PEG-IL-10 de la invención es de aproximadamente 5°C a 30°C. Más preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 18°C a 25°C.

5 La reacción de pegilación puede transcurrir entre 3 y 48 horas, más preferiblemente entre 10 y 24 horas. La reacción se puede controlar usando HPLC-ET, que puede distinguir IL-10, mono-PGE-IL-10 y di-PGE-IL-10 (esto es, la pegilación se realiza en dos restos de aminoácido de IL-10, típicamente en ambas subunidades). Se señala que mono-PEG-IL-10 forma antes di-PEG-IL-10. Cuando la concentración de mono-PEG-IL-10 alcanza una meseta, esta
10 reacción se puede terminar añadiendo solución de glicina para apagar cualquier PEG activado remanente. Usando condiciones de reacción de acuerdo con un procedimiento de la invención, típicamente se forma de 5 a 10% de di-PEG-IL-10 y de 38% a 43% de mono-PEG-IL-10 (siendo el resto PEG-IL-10 no modificado).

Para purificar mono-PEG-IL-10 se pueden usar técnicas de separación y purificación convencionales tales como exclusión por tamaños (por ejemplo filtración en gel) y cromatografía de intercambio iónico, que pueden separar monómeros de IL-10 pegilada y di-PEG-IL-10 de la mono-PEG-IL-10 de la invención.

15 Puede ser deseable pulir o resolver una población de mono-PEG-IL-10 en una composición de PEG-IL-10 preparada de acuerdo con un procedimiento de la presente invención. La etapa de pulido separa mono-PEG-IL-10 menos estable (por ejemplo, His-PEG-IL-10) de mono-PEG-IL-10 estable (por ejemplo, extrem N-PEG-IL-10 o Lys-PEG-IL-10) y se puede alcanzar así una mayor homogeneidad de isómeros posicionales estables, por ejemplo, de más de, 95% de una composición de PEG-IL-10. También se pueden hidrolizar durante una etapa de pulido isómeros
20 posicionales de PEG-IL-10 menos estables, por ejemplo, histidina-PEG-IL-10, durante una etapa de pulido. La población de PEG-IL-10 se puede incubar en tampón acuoso, preferiblemente un tampón TRIS (por ejemplo, de 10 a 300 mM, más preferiblemente de aproximadamente 30 a 70 mM), a un pH de aproximadamente 5,0 a 9,0, más preferiblemente a un pH de 7,0 a 8,0, a 15-35°C durante la noche. Alternativamente, la población de PEG-IL-10 se puede tratar con sal hidrocioruro de hidroxilamina 0,05-0,4 M (pH de aproximadamente 6,5) a temperatura ambiente
25 durante de 0,5 a 10 horas. La IL-10 hidrolizada y el PEG remanentes se pueden eliminar de la población de mono-PEG-IL-10 estable por una etapa de separación/purificación usando, por ejemplo, filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico.

En la patente U.S. n°. 5.985.265, la pegilación de interferón usando un conector aldehído se realizó a pH ácido, pH 4,0, a 4°C. La pegilación de IL-10 a este pH daría por resultado su monomerización y pérdida de actividad biológica.
30 El conocimiento convencional en la técnica enseña que para el PEG más activado, a medida que se aumenta el pH de reacción en condiciones básicas, la pegilación se produce en sitios más estables de la proteína. Por ejemplo, el carbonato de succinimidilo-PEG forma aproximadamente 90% de Lys-PEG-IL-10 (más estable) y aproximadamente 10% de His-PEG-IL-10 (menos estable) a un pH de reacción de 8,8, y aproximadamente 64% de Lys-PEG-IL-10 y 36% de His-PEG-IL-10 a un pH de reacción de 6,3. No obstante, durante el descubrimiento de la presente invención
35 se determinó que a medida que se aumenta el pH de una reacción de pegilación usando un conector aldehído por encima de un intervalo de pH neutro, la pegilación se produce más frecuentemente en sitios menos estables de IL-10, por ejemplo, His-PEG-IL-10, formándose por ello una mezcla heterogénea de PEG-IL-10 inestable. Por ello fue inesperado que la pegilación de IL-10 usando un conector aldehído en un intervalo de pH neutro proporcionara una población homogénea y estable de IL-10 pegilada.

40 **Composiciones farmacéuticas que contienen PEG-IL-10**

Una PEG-IL-10 de esta invención es útil en el tratamiento de afecciones que se tratan con IL-10, por ejemplo, enfermedades asociadas con activación de linfocitos T no deseada y expansión de linfocitos. Tales como enfermedades autoinmunes y rechazo de injerto de médula espinal, enfermedad de injerto frente a hospedador, enfermedades parasitarias, granulomas, enfermedades inflamatorias, enfermedad de Crohn, colitis, pancreatitis,
45 pulmón inflamatorio, enfermedades oculares, afecciones alérgicas, asma, dermatitis atópica y rinitis.

La PEG-IL-10 se puede formular en una composición farmacéutica que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz de la IL-10 y un vehículo farmacéutico. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para proporcionar el resultado terapéutico deseado. Preferiblemente, tal cantidad tiene mínimos efectos secundarios negativos. La cantidad de PEG-IL-10 administrada para tratar una afección tratable con IL-10 está basada en la
50 actividad de IL-10 de la proteína conjugada, que puede ser determinada por ensayos de la actividad de IL-10 conocidos en la técnica. La cantidad terapéuticamente eficaz para un paciente particular que necesita tal tratamiento se puede determinar considerando diversos factores, tales como la afección a tratar, la salud global del paciente, el procedimiento de administración, la gravedad de los efectos secundarios y similares.

La cantidad terapéuticamente eficaz de IL-10 pegilada puede variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 µg de proteína por kg de peso corporal por día. Preferiblemente, la cantidad de IL-10 pegilada varía de aproximadamente 0,1 a 20 µg de proteína por kg de peso corporal por día, más preferiblemente de

aproximadamente 0,5 a 10 μg de proteína por kg de peso corporal por día y, muy preferiblemente, de aproximadamente 1 a 4 μg de peso corporal por día. Se pueden emplear pautas de administración menos frecuentes usando la PGE-IL-10 de la invención puesto que la forma conjugada es de una actividad más larga que la de IL-10. La IL-10 pegilada se formula en forma purificada y sustancialmente exenta de agregados y otras proteínas.

5 Preferiblemente, la IL-10 se administra por infusión continua de manera que se suministre por día una cantidad de aproximadamente 50 a 800 μg de proteína (esto es, aproximadamente de 1 a 16 μg de proteína por kg de peso corporal por día de PEG-IL-10). La velocidad diaria de infusión puede variar sobre la base del control de los efectos secundarios y los recuentos de células de la sangre.

10 Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen mono-PEG-IL-10, se mezcla una cantidad terapéuticamente eficaz de PEG-IL-10 con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, el vehículo o excipiente es inerte. Un vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia no tóxica compatible para suministrar las composiciones de IL-10 de la invención a un paciente. Entre los ejemplos de vehículos adecuados figuran solución salina normal, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. También se pueden usar vehículos no acuosos tales como aceites fijados y oleato de etilo. Un vehículo preferido es 5% de dextrosa/solución salina. El vehículo puede contener cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que intensifican la isotonicidad y la estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes.

15 Las composiciones de la invención se pueden administrar oralmente o inyectar en el cuerpo. Las formulaciones para uso oral pueden incluir también compuestos para proteger la IL-10 de proteasas en el tracto gastrointestinal. Usualmente las inyecciones son intramusculares, subcutáneas, intradérmicas o intravenosas. Alternativamente, en circunstancias apropiadas se puede usar la inyección intraarticular u otras vías. Cuando se administra parenteralmente, la IL-10 pegilada se formula preferiblemente en forma inyectable de monodosis (solución, suspensión, emulsión) en asociación con un vehículo farmacéutico; véase, por ejemplo, Avis y otros, eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, NY (1993); Lieberman y otros, eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, NY (1990), y Lieberman y otros, eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Dekker, NY (1990). Alternativamente, las composiciones de la invención se pueden introducir en el cuerpo del paciente por un sistema de suministro implantable o inyectable de fármacos; por ejemplo, Urquhart y otros, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:199-236, (1984); Lewis, ed., Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals, Plenum Press, New York (1981); patentes U.S. n.º. 3.773.919, n.º. 3.270.960, y similares. La IL-10 pegilada también se puede administrar en vehículos acuosos tales como agua, solución salina o vehículos tamponados con o sin diversos aditivos y/o agentes diluyentes.

20

25

30

La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocida en la técnica; véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984).

Ejemplo 1

35 En este Ejemplo se usó IL-10 (hIL-10) humana, aunque se pueden usar otras formas de IL-10, por ejemplo, de ratón, viral o una variante de IL-10 sin afectar a la reacción de pegilación.

La reacción de conjugación se realizó a pH 6,3 en un intento de maximizar la probabilidad de pegilación específica al sitio en el extremol N de una subunidad de IL-10 sin romper la estructura de IL-10. La relación molar de IL-10 a agente reductor (cianoborohidruro sódico, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fue de 1:4,5, que es mucho menor que las relaciones molares de proteína a agente reductor dadas en la técnica, por ejemplo, 1:75 a 1:350 (véase Kinstler y otros, supra, y Chamow y otros, supra). La exclusión por tamaño-HPLC demostró que menos de 1% de IL-10 era monómera al final de la reacción.

40

En un intento de determinar el efecto de la concentración de agente reductor sobre la estabilidad de IL-10, esto es, la disociación de IL-10 en sus subunidades, se incubó IL-10 0,1 mM con concentraciones variables de cianoborohidruro sódico (nada, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 y 14 mM) a pH 6,3 durante 15 horas para determinar si la monomerización de IL-10 es función de la relación de proteína a agente reductor (1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:140). Los resultados revelaron que a más altas relaciones de agente reductor a proteína había mayores niveles de monómero de IL-10 formado. Sorprendentemente, a una relación molar de menos de 1:10 de IL-10 a agente reductor, la ruptura de la estructura dímera de hIL-10 era despreciable.

45

Como resultado de este descubrimiento, se modificó consecuentemente la reacción de pegilación. Se dializó hIL-10 purificada frente a diferentes tampones de reacción a pH 6,3 y 8,6 (fosfato sódico 50 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 6,3; o fosfato sódico 50 mM, tetraborohidrato sódico 10 mM, cloruro sódico 100 mM, pH 8,6). La IL-10 se diluyó a 4 mg/ml (0,1 mM en cada tampón). A cada tampón de reacción se añadieron dos moléculas de PEG activadas, metoxi-PEG-aldehído, PM 5000 y PM 12000 (Shearwater) en aproximadamente una relación molar 1:1 de IL-10 a PEG (en estudios separados). A la mezcla de reacción se añadió cianoborohidruro sódico acuoso a una concentración final de 0,5 a 0,75 mM (aproximadamente 1:4,5 a 1:6,8 de IL-10 a agente reductor). La reacción de pegilación se realizó a temperatura ambiente (18°C a 25°C) durante 15 a 20 horas hasta alcanzar el grado deseado de monopegilación,

50

55

esto es, adición covalente de PEG a una subunidad de IL-10. La reacción se apagó con glicina. La solución de reacción final se analizó por ET-HPLC para determinar el porcentaje de mono-PEG-IL-10 sobre la base de las concentraciones de hIL-10, mono-PEF-IL-10 y di-PEG-IL-10 y por HPLC de fase inversa (fi) para determinar niveles de isómeros posicionales. Luego se purificó la mono-PEG-IL-10 de hIL-10 sin reaccionar, conector de PEG activado y di-PEG-IL-10 por cromatografía de filtración en gel y se caracterizó por HPLC (fi) y bioensayo (por ejemplo, estimulación de la proliferación de células BaMR29 α 1, que es una línea de células B de murino creada por transfección de células Ba/F3 con ADNc del receptor de IL-10 de murino).

Tres muestras purificadas (HPLC-ET) de mono-PEG-IL-10 contenían más de 98% de mono-PEG-IL-10. Contrariamente a lo esperado, (esto es, los grados de pegilación de proteínas generalmente se producen a más alto pH formando una proteína pegilada más estable), el grado de formación de mono-PEG-IL-10 estable (en la que la pegilación se produce en el grupo α -amino o en la lisina) fue mayor a pH 6,3 que a pH 8,6. Es muy importante que ET-HPLC no mostró aumento de monómero de IL-10 a ningún pH.

El análisis de HPLC en fase inversa de las mezclas de reacción finales mostraron principalmente un isómero posicional individual que demostró una selectividad incrementada para la pegilación N-terminal a pH 6,3, mientras que a pH más alto (8,6) se observaron múltiples picos que representaban diferentes isómeros posicionales de mono-PEG-IL-10. La secuenciación de aminoácido N-terminal de la mono-PEG-IL-10 purificada de la mezcla de reacción de pH 6,3 indicó que más de 40% de PEG-IL-10 estaba bloqueado N-terminalmente. A diferencia del ensayo de hidroxilamina, la secuenciación de aminoácidos mide el bloqueo por monómero. El bloqueo máximo posible para dímeros pegilados N-terminalmente que se han pegilado a una estequiometría de un conector de PEG por dímero es de 50%. Por tanto, menos del 20% de esta preparación se pegiló en sitios que no eran el extremo N de IL-10 de acuerdo con el análisis de secuencia, esto es, más de 80% de pegilación en el terminal N. Sin embargo, de acuerdo con la HPLC (fi), al menos 90% de la IL-10 se pegiló en el terminal N. Además, al menos 95% de la IL-10 pegilada era estable de acuerdo con el ensayo de hidroxilamina. La mono-PEG-IL-10 purificada era también biológicamente activa, teniendo aproximadamente 32% de la actividad biológica específica de la hIL-10 no modificada.

Así, la IL-10 se pegiló con éxito en el extremo N, usando dos moléculas de conector de PEG-aldehído que tienen moléculas de PEG de diferente peso molecular, de manera específica al sitio usando concentraciones de agente reductor inferiores a los niveles convencionales. Se puede formar mono-PEG-IL-10 estructuralmente intacta con un alto rendimiento como población homogénea, esto es, un isómero posicional sustancialmente individual usando este procedimiento.

Ejemplo 2

Estudios previos revelaron la capacidad de IL-10 recombinante humana de suprimir la producción de citocinas proinflamatorias en ratones marcados con LPS (con *C. parvum*) a los que se administró una dosis letal de lipopolisacárido (LPS). Los ratones marcados producen niveles altos de TNF- α y TNF- γ , que son mediadores importantes de citosinas de LPS letalmente. La IL-10 recombinante humana fue muy eficaz en la supresión de la producción de citosinas cuando se administró a ratones *C. parvum* simultáneamente o a lo más una hora antes de la exposición a LPS.

En este ejemplo, se usó el modelo de ratón *C. parvum* para comparar la duración y extensión del efecto supresor de dos proteínas de mono-PEG-IL-10 sobre las respuestas de citocinas desencadenadas por LPS. Demuestra que una mono-PEG-IL-10 de la presente invención mantiene actividad biológica in vivo y tiene un aclaramiento en suero reducido en comparación con IL-10 no modificada.

Se retaron ratones BDF-1 con LPS una semana después de marcar con *C. parvum*, de acuerdo con el procedimiento de Smith y otros, supra. Se sangraron ratones 1,5 horas después del reto para determinar los niveles circulantes de TNF- α y 3 horas después del reto para medir los niveles circulantes de IL-12, IL-6 y IFN- γ . Las respuestas de IFN- γ e IL-12 fueron inhibidas en la misma cuantía por IL-10, y por ello no se dan los datos de IFN- γ .

En este estudio se usaron dos diferentes PEG propionaldehídos (PALD) que contenían PEG de 12.000 o 20.000 Da. Las proteínas de mono-PE-IL-10 se administraron subcutáneamente (8×10^5 unidades) a ratones 20, 48 o 72 horas antes del reto con LPS y también se administraron a ratones simultáneamente con LPS para mostrar un nivel inicial de actividad de IL-10 sobre la base de la actividad específica que pudiera seguirse a lo largo del tiempo. La cantidad de proteína administrada a los ratones se igualó para cada IL-10 pegilada sobre la base de actividad específica, que se determinó usando un bioensayo in vitro. A los ratones de control se administró albúmina de suero de ratón como preparación inerte de proteína.

Los datos de la siguiente Tabla revelan que la PEG-IL-10 inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias in vivo cuando se administran 48 horas (para PEG-12K) y 72 horas (para PEG-20K) antes del reto con LPS. A diferencia, La IL-10 nativa fue eficaz sólo cuando se coadministró con LPS. Esto probablemente es debido a una semivida en suero de menos de 5 horas para IL-10 nativa, como se ha visto previamente en estudios farmacocinéticos (PC). Los datos de este Ejemplo demuestran que la mono-PEG-IL-10 no conduce a una monomerización rápida in vivo y se

mantiene así en el cuerpo, esto es, sin un aclaramiento renal.

Tabla

Preparación de IL-10	0 h	-20 h	-48 h	-72 h
	TNF- α (% de inhibición)			
IL-10 no pegilada (10 μ g)	62	7	8	0
PALD-12K (34 μ g)	89	93	68	17
PALD-20K (73 μ g)	61	85	96	78
	IL-12p40 (% de inhibición)			
IL-10 no pegilada (10 μ g)	68	2	0	8
PALD-12K (34 μ g)	87	94	53	20
PALD-20K (73 μ g)	84	92	91	63
	IL-6 (% de inhibición)			
IL-10 no pegilada (10 μ g)	44	15	9	15
PALD-12K (34 μ g)	58	73	73	15
PALD-20K (73 μ g)	29	91	91	82

- 5 Los ejemplos precedentes demuestran experimentos realizados para ilustrar más la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las realizaciones particulares consideradas en los Ejemplos tienen fines ilustrativos.

REIVINDICACIONES

1. Una interleucina-10 monopegilada (mono-PEG-IL-10) que comprende una o varias moléculas de polietilenglicol (PEG) unidas covalentemente mediante un conector a un resto individual de aminoácido del homodímero IL-10, en la que el conector de PEG está unido al resto de aminoácido formando una unión hidrolíticamente estable con el grupo alfa-amino en el extremo N o con la cadena lateral de un resto de lisina, en la que en una proteína IL-10 entera que comprende dos unidades, sólo una subunidad está pegilada en un resto de aminoácido.
2. La mono-PEG-IL-10 de la reivindicación 1, en la que una o dos moléculas de PEG están unidas al mencionado resto individual de aminoácido.
3. La mono-PEG-IL-10 de la reivindicación 1, en la que una subunidad de la mencionada IL-10 tiene la fórmula:
- $$(PEG)_b-L-NH-IL-10$$
- en la que b es 1-9 y L es un resto conector alquilo C₂₋₁₂ lineal unido covalentemente a un nitrógeno (N) del mencionado resto individual de aminoácido.
4. La mono-PEG-IL-10 de la reivindicación 3, en la que b es 1 y L es -CH₂CH₂CH₂-.
5. La mono-PEG-IL-10 de la reivindicación 1, en la que el PEG está unido covalentemente al nitrógeno del grupo alfa-amino del resto de aminoácido N terminal.
6. La mono-PEG-IL-10 de la reivindicación 1, en la que la mencionada IL-10 tiene la fórmula:
- $$[X-O(CH_2CH_2O)_n]_b-L-NH-IL-10$$
- en la que X es H o alquilo C₁₋₄, n es de 20 a 2300, b es de 1 a 9 y L es un resto de conector alquilo C₂₋₁₂ que está unido covalentemente al nitrógeno (N) del grupo alfa-amino en el extremo amino de una subunidad de IL-10, con tal que, cuando b es mayor que 1, la totalidad de n no exceda de 2300.
7. La mono-PEG-IL-10 de la reivindicación 6, en la que L es -CH₂CH₂CH₂-.
8. La mono-PEG-IL-10 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la mencionada mono-PEG-IL-10 tiene una actividad mayor que 30% de la actividad de IL-10 no conjugada.
9. Una composición de IL-10 pegilada que comprende la mono-PEG-IL-10 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la población de mono-PEG-IL-10 es como mínimo en un 80% un isómero posicional en el que el PEG está conjugado al aminoácido N-terminal de una subunidad de IL-10.
10. Una composición farmacéutica que comprende la mono-PEG-IL-10 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Uso de la mono-PEG-IL-10 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la fabricación de un medicamento.
12. Un procedimiento para preparar la mono-PEG-IL-10 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende la etapa de:
- hacer reaccionar IL-10 con un conector PEG-aldehído activado en presencia de un agente reductor formando la mono-PEG-IL-10, en el que la relación de IL-10 a agente reductor es de 1:0,5 a 1:50, en el que el conector está unido covalentemente a un resto individual de aminoácido de la IL-10.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que:
- (a) el agente reductor es cianoborohidruro sódico,
 - (b) el conector PEG-aldehído activado es PEG-propionaldehído,
 - (c) el PEG-es un metoxi-PEG,
 - (d) el conector es de multibrazo,
 - (e) la relación de IL-10 no conjugada al cianoborohidruro sódico es de 1:0,5 a 1:50,
 - (f) la masa molecular total de todo el PEG que comprende el conector PEG-aldehído es de 3.000 daltons a 60.000 daltons,
 - (g) la etapa de reacción se realiza a un pH de 5,5 a 7,8, o en el que
 - (h) el procedimiento comprende además una etapa seleccionada entre el grupo constituido por:
- Incubar el producto mono-PEG-IL-10 en un tampón a pH de 5,0 a 9,0 y tratar la mono-PEG-IL-10 con sal hidrocloreto de hidroxilamina 0,05 a 0,4 M)..
14. El procedimiento de la reivindicación 12, que comprende la etapa de:
- hacer reaccionar la IL-10 no conjugada con un conector PEG-propionaldehído activado en presencia de

cianoborohidruro sódico, siendo la relación molar de IL-10 a cianoborohidruro sódico de 1:5 a 1:15, a un pH de 6,3 a 7,5 y a una temperatura de 18°C a 25°C formando la mono-PEG-IL-10, estando unido el conector covalentemente a un resto de aminoácido individual de la IL-10.

- 5 15. El procedimiento de la reivindicación 14, que además comprende una etapa seleccionada entre el grupo constituido por incubar el producto mono-PEG-IL-10 en un tampón TRIS a pH de 7,0 a 8,0 y tratar el producto mono-PEG-IL-10 con sal hidrocloreto de hidroxilamina (0,05 a 0,4 M).