

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 206**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014 PCT/US2014/042399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2014 WO14204816**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014 E 14813186 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 3010527**

54 Título: **Procedimiento de evaluación de la identidad y la estabilidad de proteínas**

30 Prioridad:

17.06.2013 US 201361836034 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

31.10.2018

73 Titular/es:

**ARMO BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
575 Chesapeake Dr.
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**MUMM, JOHN, BRIAN y
VAN VLASSELAER, PETER**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 688 206 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

Procedimiento de evaluación de la identidad y la estabilidad de proteínas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, entre otras cosas, a procedimientos para evaluar la identidad y la estabilidad de composiciones que comprenden interleucina 10 pegilada y otras moléculas relacionadas con la interleucina 10 pegilada.

Introducción

10 La citocina interleucina 10 (IL-10) es una citocina pleiotrópica que regula múltiples respuestas inmunes a través de acciones en linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células presentadoras de antígenos. La IL-10 puede suprimir las respuestas inmunes al inhibir la expresión de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , GM-CSF y G-CSF en monocitos activados y macrófagos activados, y también suprime la producción de IFN - γ por células asesinas naturales. Aunque IL-10 se expresa predominantemente en macrófagos, la expresión también se ha detectado en linfocitos T activados, linfocitos B, mastocitos y monocitos. Además de suprimir las respuestas inmunes, IL-10 muestra propiedades inmunoestimuladoras, que incluyen estimular la proliferación de timocitos tratados con IL-2 e IL-4, potenciar la viabilidad de los linfocitos B y estimular la expresión de MHC clase II.

15 Como resultado de su actividad pleiotrópica, IL-10 se ha relacionado con una amplia gama de enfermedades, trastornos y afecciones, que incluyen afecciones inflamatorias, trastornos relacionados con el sistema inmune, trastornos fibróticos y cáncer. Las evaluaciones clínicas y preclínicas con IL-10 para un número de dichas enfermedades, trastornos y afecciones han solidificado su potencial terapéutico. Además, se ha demostrado que la IL-10 pegilada es más eficaz que la IL-10 no pegilada en determinados entornos terapéuticos.

20 En vista de la prevalencia y gravedad de las enfermedades, trastornos y afecciones asociados con IL-10, los agentes relacionados con IL-10 que modulan aspectos de la función de IL-10 tienen un tremendo valor terapéutico. Como tales, procedimientos precisos y reproducibles para confirmar la identidad y la estabilidad, entre otras características, de un agente terapéutico relacionado con IL-10 antes de la administración a un sujeto son de gran interés.

25 El documento US 2011/312010A1 (Manuilov Anton v [us] y col.) y Schneiderheinze J y col.: (J. Chromatography B: Biomedical Sciences & Applications, Elsevier, Amsterdam, NL, vol. 877, n.º 31, 1 de diciembre de 2009; páginas 4065-4070), and Cindric y col.: (J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol. 44, n.º 2, 9 de junio de 2007), desvela procedimientos para confirmar la integridad de proteínas pegiladas, que comprenden fragmentar una proteína pegilada que da como resultado una pluralidad de péptidos y comparar la pluralidad de péptidos de prueba con una patrón de referencia.

Sumario

35 La presente divulgación se basa, en parte, en procedimientos y otras tecnologías que pueden usarse para determinar si las composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden IL-10 pegilada cumplen especificaciones particulares relacionadas con el producto antes de ser administradas a un sujeto para el tratamiento y/o la prevención de las enfermedades, trastornos y afecciones, y/o sus síntomas, descritos en el presente documento.

40 Los términos "IL-10", "polipéptido(s) de IL-10", "agente(s) de IL-10" y "molécula(s) de IL-10" se usan indistintamente en el presente documento e incluyen seres humanos y polipéptidos no humanos relacionados con IL-10, que incluyen homólogos, variantes (incluyendo muteínas) y fragmentos de los mismos, así como polipéptidos de IL-10 que tienen, por ejemplo, una secuencia líder (p. ej., un péptido señal). A menos que se indique lo contrario, los términos anteriormente mencionados también abarcan versiones pegiladas de IL-10, en las que el resto de PEG tiene un peso molecular dentro de los intervalos descritos en el presente documento. Tal como se usa a continuación, los términos "PEG-IL-10" e "interleucina 10 pegilada" se refieren a una molécula IL-10 dimérica en la que uno o ambos monómeros están pegilados y en la que cada resto de PEG es de aproximadamente ≥ 5 kDa. En realizaciones particulares, la molécula de IL-10 está pegilada en el extremo N de uno o ambos monómeros y cada resto de PEG es de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa.

50 Debido a que los agentes biológicos son sensibles a los cambios en los materiales de partida y los procedimientos de fabricación usados en su producción, pueden ser difíciles de generar y caracterizar sistemáticamente. De hecho, la producción de compuestos biológicos requiere un control de calidad muy riguroso debido a la posibilidad de modificaciones de proteínas indeseables y las posibilidades de contaminación del producto biológico. Como resultado, la integridad de la secuencia de aminoácidos de una proteína biológica debe confirmarse para cada lote de producción con el fin de garantizar que posee, entre otras características, la identidad de aminoácidos requerida (p. ej., secuencia de aminoácidos). Esto generalmente se realiza mediante el uso de una evaluación de liberación de lote (p. ej., un ensayo de liberación de lote). La confirmación de la identidad de aminoácidos mediante el uso de un ensayo de liberación de lote generalmente proporciona una indicación de que el compuesto biológico posee la pureza, potencia, etc. requerida.

Para que sea útil, los datos generados por un ensayo de liberación de lote deben ser coherentes y reproducibles, incluyendo escenarios en los que un individuo realiza el ensayo de liberación usando un equipo diferente para lotes separados; un individuo diferente realiza el ensayo de liberación usando el mismo equipo que el primer individuo; y un individuo diferente realiza el ensayo de liberación usando un equipo diferente al del primer individuo. La metodología debe proporcionar resultados coherentes en los que la naturaleza de la molécula que se está probando no interfiere con el mecanismo intrínseco mediante el cual el procedimiento analítico genera datos. Por lo tanto, en el caso de moléculas pegiladas, el(los) sitio(s) de pegilación requieren pruebas rigurosas para determinar si la metodología de liberación es capaz de obtener datos significativos.

El mapeo de péptidos es un procedimiento poderoso empleado frecuentemente en el procedimiento de evaluación de liberación de lotes. Proporciona la determinación de la secuencia de aminoácidos primaria de una molécula y, por lo tanto, es una indicación de su identidad. El mapeo de péptidos es un procedimiento analítico indispensable para el control de calidad de las proteínas procedentes de forma recombinante, incluidas las proteínas biológicas. Un mapa de péptidos es esencialmente una "identificación genética" de una proteína que resulta de varios procedimientos químicos que proporcionan una comprensión integral de la proteína que se analiza. El mapeo peptídico implica la fragmentación de la proteína mediante digestión enzimática o escisión química, con la posterior separación y análisis de los fragmentos.

Para ser usado de manera efectiva y segura en el tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos y afecciones relacionadas con IL-10, y/o sus síntomas, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de PEG-IL-10 contempladas en el presente documento deben poseer especificaciones definidas (p. ej., mantenimiento de la estabilidad de la composición farmacéutica para la totalidad de su vida útil), como se determina, en gran parte, por la integridad de la secuencia de aminoácidos primaria a lo largo del tiempo. Además, la ubicación de la(s) modificación(es) de pegilación puede ser determinada por un distintivo de fragmento de péptido específico. En una realización, la presente divulgación se refiere a procedimientos y otras tecnologías útiles para determinar reproduciblemente si lotes particulares ("lotes") de composiciones farmacéuticas que comprenden PEG-IL-10 cumplen las especificaciones requeridas (p. ej., mantenimiento de la secuencia de aminoácidos primaria y sitio de pegilación) para fármacos a granel (BDS) y medicamentos finales (DP).

La presente divulgación contempla un procedimiento para confirmar la integridad de una proteína pegilada, que comprende proporcionar una muestra que comprende la proteína pegilada, fragmentar la proteína pegilada para producir una pluralidad de péptidos de prueba, y comparar la pluralidad de péptidos de prueba con un patrón de referencia (mediante, p. ej., el uso de un ordenador); en el que la integridad de la proteína pegilada se confirma demostrando la equivalencia de la pluralidad de péptidos de prueba y el patrón de referencia.

De acuerdo con la presente divulgación, el término "integridad", tal como se usa en el contexto de una proteína pegilada, se refiere a una característica que, si está presente en una proteína pegilada (p. ej., una proteína pegilada de prueba), indica que la proteína pegilada es equivalente a otra proteína pegilada (p. ej., una proteína pegilada de referencia). En particular, la característica es la secuencia de aminoácidos de una proteína pegilada. Por lo tanto, usando los procedimientos descritos en el presente documento, un experto en la técnica puede determinar si la secuencia de aminoácidos de una proteína pegilada es equivalente a la de otra proteína pegilada.

El patrón de referencia puede comprender una pluralidad de péptidos de referencia generados a partir de la fragmentación de una proteína de referencia o una proteína pegilada de referencia. La proteína pegilada puede ser la misma que la proteína pegilada de referencia.

La presente divulgación contempla realizaciones en las que la fragmentación se lleva a cabo poniendo en contacto la proteína pegilada con glutamil endopeptidasa (Endo Glu-C).

En particular, los miembros peptídicos anteriormente mencionados de la pluralidad de péptidos de prueba se separan por cromatografía. Determinadas realizaciones contemplan determinar la masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de péptidos de prueba mediante espectrometría de masas. Los procedimientos de espectrometría de masas incluyen, pero sin limitación, ESI-MS, ESI-MS/MS, ESI-TOF MS, MALDI MS y MALDI-TOF MS. La masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de proteínas de referencia se almacena frecuentemente en medios electrónicos tales como una base de datos.

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren a procedimientos para confirmar la identidad de una pluralidad de péptidos generados por una digestión con Endo Glu-C de una interleucina 10 humana pegilada comparando la pluralidad de péptidos con un patrón de referencia PEG-hIL-10, en el que la identidad de la pluralidad de péptidos se confirma demostrando la equivalencia con el patrón de referencia. El patrón de referencia puede comprender una pluralidad de péptidos de referencia que corresponden a los generados a partir de la digestión de una referencia hPEG-IL-10 o una referencia hIL-10.

En el contexto de la presente divulgación, la equivalencia de un grupo de péptidos (p. ej., una pluralidad de péptidos de prueba) a otro grupo de péptidos (p. ej., una pluralidad de péptidos de referencia) se puede determinar usando cualquier procedimiento aceptado en la técnica. A modo de ejemplo, la espectrometría de masas puede usarse para evaluar si los péptidos resultantes de la digestión enzimática de una proteína producen la identificación genética

esperada de la masa del péptido. Los parámetros de equivalencia pueden ser establecidos por una autoridad reguladora (p. ej., FDA o equivalente extranjero) para garantizar que un péptido biológico cumpla requisitos particulares y, por lo tanto, sea seguro y eficaz para el fin previsto.

5 La presente invención proporciona un procedimiento para confirmar la secuencia de aminoácidos de una interleucina 10 pegilada, que comprende fragmentar una PEG-IL-10 de prueba con una glutamil endopeptidasa (Endo Glu-C), para producir una pluralidad de péptidos de prueba; separar los miembros peptídicos de la pluralidad de péptidos de prueba por cromatografía;
 10 analizar dichos miembros peptídicos separados usando espectroscopía de absorción ultravioleta para proporcionar un cromatograma del PEG-IL-10 de prueba;
 15 comparar el cromatograma del PEG-IL-10 de prueba con un patrón de referencia, separando dicho cromatograma del patrón de referencia generado mediante la digestión con Endo Glu-C de un PEG-IL-10 de patrón de referencia, de los miembros peptídicos del patrón de referencia por cromatografía, y
 analizar dichos miembros peptídicos separados usando espectroscopía de absorción ultravioleta para proporcionar el cromatograma del patrón de referencia;
 en el que la secuencia de aminoácidos del PEG-IL-10 de prueba se confirma mediante la equivalencia sustancial del tiempo de retención de los picos del cromatograma del PEG-IL-10 de prueba y el cromatograma del patrón de referencia.

20 La masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de péptidos de prueba puede determinarse mediante espectrometría de masas, que incluye las siguientes tecnologías: ESI-MS, ESI-MS/MS, ESI-TOF MS, MALDI MS y MALDI-TOF MS. Con respecto a la pluralidad de péptidos de referencia, la masa absoluta de cada miembro puede determinarse mediante espectrometría de masas. Los datos con respecto a la masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de péptidos de referencia pueden almacenarse en una base de datos informática u otros medios electrónicos.

25 En aún otras realizaciones, la presente divulgación contempla procedimientos para confirmar la secuencia de aminoácidos de una interleucina 10 humana pegilada proporcionando una muestra que comprende una PEG-hIL-10 de prueba, digiriendo la hPEG-IL-10 de prueba con Endo Glu -C para producir una pluralidad de péptidos de prueba, y comparar (mediante, p. ej., un algoritmo o algún tipo de sistema informatizado) la pluralidad de péptidos de prueba con un patrón de referencia; en los que la secuencia de aminoácidos de la interleucina 10 humana pegilada se confirma demostrando la equivalencia de la pluralidad de péptidos de prueba y el patrón de referencia. En dichos procedimientos, el patrón de referencia puede ser una pluralidad de péptidos de referencia generados a partir de la digestión de una hPEG-IL-10 o una hIL-10 de referencia. La PEG-hIL-10 de prueba y la PEG-hIL-10 son las mismas que en realizaciones particulares. Como se mencionó anteriormente, digerir la PEG-hIL-10 de prueba con Endo Glu-C da como resultado fragmentos peptídicos más discretos que digerir la PEG-hIL-10 con tripsina.

35 En algunas realizaciones, los polipéptidos de IL-10 pegilados descritos en el presente documento comprenden al menos una molécula de PEG unida covalentemente a al menos un resto de aminoácido de al menos un monómero de IL-10. Dichos polipéptidos pegilados pueden comprender una mezcla de monómeros de IL-10 mono-pegilados y di-pegilados. Las referencias en el presente documento a "mono-pegilados" o "dipegilados", o equivalentes de los mismos, pretenden que se interpreten de manera más amplia que solo IL-10 mono-pegilada y di-pegilada. Para ilustrar, dos o más sitios diferentes en cada monómero de IL-10 podrían modificarse introduciendo más de una mutación en la secuencia de aminoácidos de IL-10 y luego pegilando cada uno de ellos, o un sitio en cada monómero de IL-10 puede pegilarse en combinación con la pegilación del extremo N. Ejemplos de condiciones de pegilación se describen en el presente documento. El componente de PEG puede ser cualquier PEG tolerado por los péptidos. A modo de ejemplo, el componente de PEG del péptido modificado puede tener una masa molecular de 5 kDa a 20 kDa en algunas realizaciones, una masa molecular mayor que 20 kDa en otras realizaciones, o una masa molecular de al menos 30 kDa en otras realizaciones más. Los PEG que tienen otros valores de masa molecular también se contemplan y se describen en el presente documento.

50 En realizaciones particulares, la presente divulgación contempla polipéptidos pegilados que tienen una bioactividad que se aproxima a la bioactividad de la SEQ ID NO: 2. La bioactividad se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluye un ensayo de liberación de quimiocinas o un ensayo de proliferación de células MC/9. Ejemplos de protocolos para dichos ensayos se describen en el presente documento.

También se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de IL-10 descritas en el presente documento y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el excipiente es una solución de inyección isotónica. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para la administración a un sujeto (p. ej., un ser humano), y pueden comprender uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales. En determinados casos, las composiciones farmacéuticas están contenidas en un recipiente estéril (p. ej., un vial de uno o varios usos o una jeringa). Un kit puede contener el/los recipiente(s) estéril(es), y el kit también puede contener uno o más recipientes estériles adicionales que comprenden al menos un agente profiláctico o terapéutico adicional o cualquier otro agente que pueda usarse en terapia farmacológica.

60 Además, se describe en el presente documento un procedimiento para tratar o evitar una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto (p. ej., un ser humano), que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de

una molécula de IL-10 descrita en el presente documento. En diversos casos, la enfermedad, trastorno o afección es un trastorno proliferativo, que incluye un cáncer (p. ej., un tumor sólido o un trastorno hematológico); un trastorno inmune o inflamatorio, que incluye enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y enfermedad del Alzheimer; trombotosis o una afección o trastorno trombotico, que incluye un estado de hipercoagulación; un trastorno fibrótico; un trastorno viral, que incluye, pero sin limitación, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y citomegalovirus; un trastorno cardiovascular, que incluye aterosclerosis u otros trastornos relacionados con el sistema cardiovascular en los que el sujeto puede tener colesterol elevado y/u otros parámetros anormales relacionados con los procedimientos metabólicos (p. ej., niveles de glucosa en sangre, niveles de insulina, o niveles de lípidos anormales).

En los procedimientos para tratar o evitar una enfermedad, trastorno o afección, descritos en el presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido descrito en el presente documento puede ser por cualquier vía adecuada para el polipéptido, incluida la inyección parenteral (p. ej., por vía subcutánea). Uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales pueden ser administrados (p. ej., antes, simultáneamente o después de) con el péptido, y/o pueden administrarse por separado o combinados con el péptido.

15 **Breve descripción de los dibujos**

La Fig. 1A representa la secuencia completa de IL-10 humana de 178 aminoácidos. (SEQ ID NO:1): El péptido señal de 18 aminoácidos está subrayado.

La Fig. 1B representa la secuencia de IL-10 humana madura de 160 aminoácidos. (SEQ ID NO:2):

La Fig. 2 representa la secuencia de aminoácidos de Endo Glu-C (SEQ ID NO: 3).

La Fig. 3A es una representación de cinta de estructura de cristal de proteína (vista desde arriba) del monómero de IL-10 humana. Las seis hélices están etiquetadas A-F.

La Fig. 3B es una representación de cinta de estructura de cristal de proteína (vista desde arriba) del homodímero IL-10 humano. Un monómero es gris y el otro monómero es negro. Las seis hélices están etiquetadas A-F.

La Fig. 3C es una representación de cinta de estructura de cristal de proteína (vista desde arriba) del homodímero IL-10 humano (gris) unido a dos receptores humanos IL10R1/α (negros).

La Fig. 4 es un cromatograma que representa un digesto de Endo Glu-C y un mapa de péptido detectado por UV de rhIL-10 (traza oscura) y PEG-rhIL-10 (traza ligera).

Descripción detallada

Antes de que la presente divulgación se describa adicionalmente, debe entenderse que la divulgación no está limitada a las realizaciones particulares expuestas en el presente documento.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro establecido o el valor intermedio en ese intervalo establecido, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención. A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que los que entiende comúnmente un experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

Debe observarse que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración tiene la intención de servir como base previa para el uso de dicha terminología exclusiva tal como "únicamente", "solo" y similares en relación con la enumeración de elementos de reivindicación o el uso de una limitación "negativa".

Las publicaciones tratadas en el presente documento se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, que pueden necesitar confirmación independiente.

50 **Visión de conjunto**

La producción de compuestos biológicos requiere un control de calidad muy riguroso debido a la posibilidad de modificaciones de proteínas indeseables y las numerosas posibilidades de contaminación del producto biológico. Un ensayo de liberación de lote generalmente se usa para evaluar y garantizar, por ejemplo, la integridad de la secuencia de aminoácidos del principio farmacéutico activo (API) para cada lote de producción ("lote").

La presente divulgación se refiere en general a moléculas de IL-10 pegiladas, que incluyen PEG-IL-10. En el presente documento se describen procedimientos y otras tecnologías, incluyendo evaluaciones de liberación de lotes, útiles para determinar si las composiciones (p. ej., composiciones farmacéuticas) que comprenden moléculas

de PEG-IL-10 cumplen especificaciones particulares relacionadas con el producto antes de que se administren a un sujeto para el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades, trastornos y afecciones relacionados con IL-10, y/o sus síntomas. En determinados casos, las moléculas y composiciones de PEG-IL-10 (p. ej., composiciones farmacéuticas) de la misma se usan para tratar y/o evitar trastornos relacionados con la inflamación y el sistema inmune; trastornos tromboticos, trastornos fibróticos, cáncer y trastornos relacionados con el cáncer; y trastornos cardiovasculares (p. ej., aterosclerosis). En particular, las moléculas y composiciones de PEG-IL-10 (p. ej., composiciones farmacéuticas) de la misma se pueden usar para tratar y/o evitar trastornos relacionados con el colesterol, que incluyen hipercolesterolemia.

Definiciones

10 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos pretenden tener el significado expuesto a continuación. Otros términos se definen en otra parte a lo largo de la memoria descriptiva.

Los términos "paciente" o "sujeto" se usan indistintamente para referirse a un animal humano o no humano (p. ej., un mamífero).

15 Los términos "administración", "administrar" y similares, tal como se aplican a, por ejemplo, un sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refieren al contacto de, por ejemplo, IL-10 o PEG-IL-10), un ácido nucleico (p. ej., un ácido nucleico que codifica IL-10 humana nativa); una composición farmacéutica que comprende lo anterior, o un agente de diagnóstico, para el sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. En el contexto de una célula, la administración incluye el contacto (p. ej., *in vitro* o *ex vivo*) de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula.

20 Los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares se refieren a un curso de acción (tal como la administración de PEG-IL-10 o una composición farmacéutica que comprende PEG-IL-10) iniciada después de que se ha diagnosticado, observado y similares una enfermedad, trastorno o afección, o un síntoma de la misma, para eliminar, reducir, suprimir, mitigar o mejorar, temporal o permanentemente, al menos una de las causas subyacentes de una enfermedad, trastorno o afección que afecte a un sujeto, o al menos uno de los síntomas asociados con una enfermedad, trastorno, o afección que afecte a un sujeto. Por lo tanto, el tratamiento incluye inhibir (p. ej., detener el desarrollo o desarrollo adicional de la enfermedad, trastorno o afección o asociación de síntomas clínicos con los mismos) una enfermedad activa. Los términos también pueden usarse en otros contextos, tales como situaciones en las que IL-10 o PEG-IL-10 contactan un receptor de IL-10 en, por ejemplo, la fase fluida o la fase coloidal.

30 La expresión "que necesita tratamiento" tal como se usa en el presente documento se refiere a un juicio hecho por un médico u otro cuidador de que un sujeto requiere o se beneficiará del tratamiento. Este juicio se basa en una diversidad de factores que se encuentran en el campo de experiencia del médico o cuidador.

35 Los términos "evitar", "que evita", "prevención" y similares se refieren a un curso de acción (tal como la administración de PEG-IL-10 o una composición farmacéutica que comprende PEG-IL-10) iniciada de una manera (p. ej., antes del comienzo de una enfermedad, trastorno, afección o síntoma de la misma) para evitar, suprimir, inhibir o reducir, temporal o permanentemente, el riesgo de un sujeto de desarrollar una enfermedad, trastorno, afección o similar (según se determina mediante, por ejemplo, la ausencia de síntomas clínicos) o retrasar su aparición, generalmente en el contexto de un sujeto predispuesto a tener una enfermedad, trastorno o afección particular. En determinados ejemplos, los términos también se refieren a ralentizar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección o inhibir su progresión a un estado perjudicial o de otro modo indeseado.

40 La expresión "que necesita prevención" tal como se usa en el presente documento se refiere a un juicio hecho por un médico u otro cuidador de que un sujeto requiere o se beneficiará del cuidado preventivo. Este juicio se basa en una diversidad de factores que se encuentran en el campo de experiencia de un médico o cuidador.

45 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la administración de un agente a un sujeto, ya sea solo o como parte de una composición farmacéutica y en una dosis única o como parte de una serie de dosis, en una cantidad capaz de tener cualquier efecto positivo detectable sobre cualquier síntoma, aspecto o característica de una enfermedad, trastorno o afección cuando se administra al sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz se puede determinar midiendo los efectos fisiológicos relevantes, y se puede ajustar en relación con la posología y el análisis de diagnóstico de la afección del sujeto, y similares. A modo de ejemplo, la medición de la cantidad de citocinas inflamatorias producidas después de la administración puede ser indicativa de si se ha usado una cantidad terapéuticamente eficaz.

50 La expresión "en una cantidad suficiente para efectuar un cambio" significa que hay una diferencia detectable entre el nivel de un indicador medido antes (p. ej., un nivel inicial) y después de la administración de una terapia particular. Los indicadores incluyen cualquier parámetro objetivo (p. ej., concentración sérica de IL-10) o parámetro subjetivo (p. ej., la sensación de bienestar de un sujeto).

55 El término "moléculas pequeñas" se refiere a compuestos químicos que tienen un peso molecular que es inferior a aproximadamente 10 kDa, inferior a aproximadamente 2 kDa, o inferior a aproximadamente 1 kDa. Las moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que

contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radiactivo y moléculas sintéticas. Terapéuticamente, una molécula pequeña puede ser más permeable a las células, menos susceptible a la degradación y menos propensa a provocar una respuesta inmune que las moléculas grandes.

5 El término "ligando" se refiere, por ejemplo, a péptido, polipéptido, molécula asociada a membrana o unida a membrana, o un complejo de las mismas, que puede actuar como un agonista o antagonista de un receptor. "Ligando" abarca ligandos naturales y sintéticos, p. ej., citocinas, variantes de citocinas, análogos, muteínas y composiciones de unión procedentes de anticuerpos. "Ligando" también abarca moléculas pequeñas, p. ej., miméticos de péptidos de citocinas y miméticos de péptidos de anticuerpos. El término también abarca un agente que no es ni agonista ni antagonista, pero que se puede unir a un receptor sin influir significativamente en sus propiedades biológicas, p. ej., señalización o adhesión. Además, el término incluye un ligando unido a la membrana que se ha cambiado, p. ej., por procedimientos químicos o recombinantes, a una versión soluble del ligando unido a la membrana. Un ligando o receptor puede ser completamente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, el núcleo o algún otro compartimento intracelular. El complejo de un ligando y un receptor se denomina un "complejo ligando-receptor".

15 Los términos "inhibidores" y "antagonistas", o "activadores" y "agonistas" se refieren a moléculas inhibitoras o activadoras, respectivamente, por ejemplo, para la activación de, p. ej., un ligando, receptor, cofactor, gen, célula, tejido u órgano. Los inhibidores son moléculas que disminuyen, bloquean, evitan, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan negativamente, p. ej., un gen, proteína, ligando, receptor o célula. Los activadores son moléculas que aumentan, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o regulan positivamente, p. ej., un gen, proteína, ligando, receptor o célula. Un inhibidor también se puede definir como una molécula que reduce, bloquea o inactiva una actividad constitutiva. Un "agonista" es una molécula que interactúa con un objetivo para causar o promover un aumento en la activación del objetivo. Un antagonista es una molécula que se opone a la(s) acción(es) de un agonista. Un antagonista evita, reduce, inhibe o neutraliza la actividad de una agonista, y un antagonista también puede evitar, inhibir o reducir la actividad constitutiva de un objetivo, p. ej., un receptor objetivo, incluso donde no existe ningún agonista identificado.

Los términos "modular", "modulación" y similares se refieren a la capacidad de una molécula (p. ej., un activador o un inhibidor) para aumentar o disminuir la función o la actividad de una molécula de IL-10 (o moléculas de ácido nucleico que los codifican), directa o indirectamente; o para potenciar la capacidad de una molécula para producir un efecto comparable al de una molécula de IL-10.

30 El término "modulador" pretende referirse ampliamente a moléculas que pueden realizar las actividades descritas anteriormente. A modo de ejemplo, un modulador de, p. ej., un gen, un receptor, un ligando o una célula, es una molécula que altera una actividad del gen, receptor, ligando o célula, en el que la actividad puede ser activada, inhibida, o alterado en sus propiedades regulatorias. Un modulador puede actuar solo, o puede usar un cofactor, p. ej., una proteína, un ion metálico o una molécula pequeña. El término "modulador" incluye agentes que operan mediante el mismo mecanismo de acción que la IL-10 (es decir, agentes que modulan las mismas vías de señalización que la IL-10 de una manera análoga a la misma) y son capaces de provocar una respuesta biológica comparable (o superior a) a la de IL-10.

Ejemplos de moduladores incluyen compuestos de moléculas pequeñas y otras moléculas bioorgánicas. Numerosas bibliotecas de compuestos de moléculas pequeñas (p. ej., bibliotecas combinatorias) están disponibles en el mercado y pueden servir como punto de partida para identificar un modulador. El experto en la técnica puede desarrollar uno o más ensayos (p. ej., ensayos bioquímicos o basados en células) en los que dichas bibliotecas de compuestos pueden tamizarse para identificar uno o más compuestos que tienen las propiedades deseadas; Posteriormente, el químico farmacéutico experto es capaz de optimizar dichos uno o más compuestos, por ejemplo, mediante la síntesis y evaluación de análogos y derivados de los mismos. Los estudios de modelado sintético y/o molecular también se pueden utilizar en la identificación de un activador.

La "actividad" de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor; a la actividad catalítica; a la capacidad de estimular la expresión génica o la señalización celular, la diferenciación o la maduración; a la actividad antigénica; a la modulación de actividades de otras moléculas; y similares. El término también puede referirse a la actividad en la modulación o el mantenimiento de interacciones de célula a célula (p. ej., adhesión), o la actividad en el mantenimiento de una estructura de una célula (p. ej., una membrana celular). "Actividad" también puede significar actividad específica, p. ej., [actividad catalítica]/[mg de proteína], o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], concentración en un compartimento biológico, o similar. La expresión "actividad proliferativa" abarca una actividad que promueve, que es necesaria para, o que está específicamente asociada con, por ejemplo, la división celular normal, así como el cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

Tal como se usa en el presente documento, "comparable", "actividad comparable", "actividad comparable a", "efecto comparable", "efecto comparable a", y similares son términos relativos que pueden verse cuantitativamente y/o cualitativamente. El significado de los términos depende de frecuencia del contexto en el que se usan. A modo de ejemplo, se puede ver que dos agentes que activan un receptor tienen un efecto comparable desde una perspectiva cualitativa, pero se puede ver que los dos agentes carecen de un efecto comparable desde una perspectiva cuantitativa si un agente solo puede lograr el 20 % de la actividad del otro agente según se determina en un ensayo

aceptado en la técnica (p. ej., un ensayo de respuesta a la dosis) o en un modelo animal aceptado en la técnica. Al comparar un resultado con otro (p. ej., un resultado con un patrón de referencia), "comparable" frecuentemente (aunque no siempre) significa que un resultado se desvía de un patrón de referencia en menos de 35 %, en menos de 30 %, en menos de 25 %, en menos de 20 %, en menos de 15 %, en menos de 10 %, en menos de 7 %, en menos de 5 %, en menos de 4 %, en menos de 3 %, en menos de 2 % o en menos de 1 %. En realizaciones particulares, un resultado es comparable a un patrón de referencia si se desvía en menos del 15 %, en menos del 10 % o en menos del 5 % del patrón de referencia. A modo de ejemplo, pero sin limitación, la actividad o efecto puede referirse a eficacia, estabilidad, solubilidad o inmunogenicidad. Como se indicó anteriormente, el experto en la técnica reconoce que el uso de diferentes metodologías puede dar como resultado una IL-10 que es más o menos activa, ya sea en actividad aparente debido a diferencias en el cálculo de la concentración de proteínas o en actividad real, que un patrón de referencia de hIL-10. El experto en la técnica podrá factorizar estas diferencias para determinar las bioactividades relativas de una molécula de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) frente a hIL-10.

El término "respuesta", por ejemplo, de una célula, tejido, órgano u organismo, abarca un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, p. ej., concentración, densidad, adhesión o migración dentro de un compartimento biológico, tasa de expresión de un gen o estado de diferenciación, en la que el cambio se correlaciona con la activación, estimulación o tratamiento, o con mecanismos internos como la programación genética. En determinados contextos, los términos "activación", "estimulación" y similares se refieren a la activación celular regulada por mecanismos internos, así como por factores externos o ambientales; mientras que los términos "inhibición", "regulación negativa" y similares se refieren a los efectos opuestos.

Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína", usados indistintamente en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que puede incluir aminoácidos genéticamente codificados y no codificados genéticamente, química o bioquímicamente modificados o derivatizados, y polipéptidos que tienen estructuras polipeptídicas modificadas. Los términos incluyen proteínas de fusión, que incluyen, pero sin limitación, proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga, proteínas de fusión con secuencias líder heterólogas y homólogas, con o sin restos de metionina de extremo N; proteínas marcadas inmunológicamente; y similares.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "variantes" y "homólogos" se usan indistintamente para referirse a secuencias de aminoácidos o de ADN que son similares a las secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos de referencia, respectivamente. El término abarca variantes de origen natural y variantes de origen no natural. Las variantes de origen natural incluyen homólogos (polipéptidos y ácidos nucleicos que difieren en secuencia de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, de una especie a otra), y variantes alélicas (polipéptidos y ácidos nucleicos que difieren en secuencia de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, de un individuo a otro dentro de una especie). Por lo tanto, las variantes y los homólogos abarcan las secuencias de ADN de origen natural y las proteínas codificadas de ese modo y sus isoformas, así como las variantes de empalme de una proteína o gen. Los términos también abarcan secuencias de ácido nucleico que varían en una o más bases de una secuencia de ADN de origen natural, pero que aún se traducen en una secuencia de aminoácidos que corresponde a la proteína de origen natural debido a la degeneración del código genético. Las variantes y homólogos de origen no natural incluyen polipéptidos y ácidos nucleicos que comprenden un cambio en la secuencia de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, donde el cambio en la secuencia se introduce artificialmente (p. ej., muteínas); por ejemplo, el cambio se genera en el laboratorio por intervención humana ("acción del hombre"). Por lo tanto, las variantes y homólogos de origen no natural también pueden referirse a aquellos que difieren de las secuencias de origen natural en una o más sustituciones conservadoras y/o etiquetas y/o conjugados.

El término "muteínas" tal como se usa en el presente documento se refiere ampliamente a proteínas recombinantes mutadas. Estas proteínas generalmente llevan sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples y con frecuencia se obtienen de genes clonados que se han sometido a mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o a partir de genes completamente sintéticos. A menos que se indique lo contrario, el uso de expresiones tales como "mutante de IL-10" se refiere a muteínas de IL-10.

Los términos "ADN", "ácido nucleico", "molécula de ácido nucleico", "polinucleótido" y similares se usan indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos lineales y circulares, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), polinucleótidos recombinantes, vectores, sondas, cebadores y similares.

Debe observarse que cualquier referencia a "humano" en relación con los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación no pretende ser limitante con respecto a la manera en la que se obtiene el polipéptido o ácido nucleico o la fuente, sino más bien solo con referencia a la secuencia, ya que puede corresponder a una secuencia de un polipéptido humano o molécula de ácido nucleico de origen natural. Además de los polipéptidos humanos y las moléculas de ácido nucleico que los codifican, la presente divulgación contempla polipéptidos relacionados con IL-10 y moléculas de ácido nucleico correspondientes de otras especies.

Se apreciará que a lo largo de la presente divulgación se hace referencia a aminoácidos de acuerdo con los códigos de una sola letra o de tres letras. Para comodidad del lector, los códigos de aminoácidos de una y tres letras se

proporcionan a continuación:

G	Glicina	Gly,	P	Prolina	Pro
A	Alanina	Ala	V	Valina	Val
L	Leucina	Leu	I	Isoleucina	Ile
M	Metionina	Met	C	Cisteína	Cys
F	Fenilalanina	Phe	Y	Tirosina	Tyr
W	Triptófano	Trp	H	Histidina	His
K	Lisina	Lys	R	Arginina	Arg
Q	Glutamina	Gln	N	Asparagina	Asn
E	ácido glutámico	Glu	D	Ácido aspártico	Asp
S	Serina	Ser	T	Treonina	Thr

5 Tal como se usa en el presente documento en referencia a IL-10 humana nativa o una muteína de IL-10, los términos "modificado", "modificación" y similares se refieren a uno o más cambios que potencian una propiedad deseada de IL-10 humana o una muteína IL-10. Dichas propiedades deseadas incluyen, por ejemplo, prolongar la semivida de circulación, aumentar la estabilidad, reducir el aclaramiento, alterar la inmunogenicidad o alergenicidad y permitir la elevación de anticuerpos particulares (p. ej., mediante la introducción de epítomos particulares) para su uso en ensayos de detección. Como se trata en detalle a continuación, las modificaciones en IL-10 humana o una muteína de IL-10 que pueden llevarse a cabo incluyen, pero sin limitación, pegilación (unión covalente de una o más moléculas de polietilenglicol (PEG), o derivados de la misma); glicosilación (p. ej., N-glicosilación), polisialilación y hesilación; fusión de albúmina; unión de albúmina a través de, por ejemplo, una cadena de ácido graso conjugado (acilación); Fc-fusión; y fusión con un mimético de PEG.

15 Tal como se usa en el presente documento en el contexto de la estructura de un polipéptido, "extremo N" (o extremo amino) y "extremo C" (o "extremo carboxilo") se refieren a los extremos finales amino y carboxilo del polipéptido, respectivamente, mientras que los términos "N-terminal" y "C-terminal" se refieren a posiciones relativas en la secuencia de aminoácidos del polipéptido hacia el extremo N y el extremo C, respectivamente, y pueden incluir los restos en el extremo N y el extremo C, respectivamente. "Inmediatamente N-terminal" o "inmediatamente C-terminal" se refiere a una posición de un primer resto de aminoácido con respecto a un segundo resto de aminoácido donde el primer y el segundo resto de aminoácido están unidos covalentemente para proporcionar una secuencia de aminoácidos contigua.

20 "Procedente de", en el contexto de una secuencia de aminoácidos o secuencia de polinucleótidos (p. ej., una secuencia de aminoácidos "procedente de" un polipéptido de IL-10), pretende indicar que el polipéptido o ácido nucleico tiene una secuencia que se basa en la de un polipéptido de referencia o ácido nucleico (p. ej., un polipéptido de IL-10 de origen natural o un ácido nucleico que codifica IL-10), y no pretende ser limitante en cuanto a la fuente o procedimiento en el que la proteína o ácido nucleico se fabrica. A modo de ejemplo, la expresión
25 "procedente de" incluye homólogos o variantes de aminoácidos de referencia o secuencias de ADN.

30 En el contexto de un polipéptido, el término "aislado" se refiere a un polipéptido de interés que, si se produce de forma natural, se encuentra en un entorno diferente de aquél en el que se puede producir. "Aislado" pretende incluir polipéptidos que están dentro de muestras que están sustancialmente enriquecidas para el polipéptido de interés y/o en las que el polipéptido de interés está parcial o sustancialmente purificado. Cuando el polipéptido no se produce de forma natural, "aislado" indica que el polipéptido se ha separado de un entorno en el que se fabricó por procedimientos sintéticos o recombinantes.

35 "Enriquecido" significa que una muestra no es manipulada de forma natural (p. ej., por un científico) de modo que un polipéptido de interés está presente en a) una concentración mayor (p. ej., al menos 3 veces mayor, al menos 4 veces mayor, al menos 8 veces mayor, al menos 64 veces mayor, o más) que la concentración del polipéptido en la muestra de partida, tal como una muestra biológica (p. ej., una muestra en la que el polipéptido se produce naturalmente o en la que está presente después de la administración), o b) una concentración mayor que el entorno en el que se fabricó el polipéptido (p. ej., como en una célula bacteriana).

40 "Sustancialmente puro" indica que un componente (p. ej., un polipéptido) constituye más de aproximadamente el 50 % del contenido total de la composición, y típicamente más de aproximadamente el 60 % del contenido total de polipéptido. Más típicamente, "sustancialmente puro" se refiere a composiciones en las que al menos el 75 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o más de la composición total es el componente de interés. En algunos casos, el polipéptido constituirá más de aproximadamente el 90 %, o más de aproximadamente el 95 % del contenido total de

la composición.

Las expresiones "se une específicamente" o "se une selectivamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno u otro par de unión, indican una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por lo tanto, en condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El anticuerpo, o la composición de unión procedente del sitio de unión a antígeno de un anticuerpo, del procedimiento contemplado se une a su antígeno, o una variante de mutación del mismo, con una afinidad que es al menos dos veces mayor, al menos diez veces mayor, al menos 20 veces mayor, o al menos 100 veces mayor que la afinidad con cualquier otro anticuerpo, o la composición de unión procedente del mismo. En realizaciones particulares, el anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor que aproximadamente 10^9 litros/mol, según se determina mediante, p. ej., análisis Scatchard (Munsen, y col., 1980 *Analyt. Biochem.* 107:220-239).

Los términos "modificación postraduccional" y "PTM" se refieren a etapas en la biosíntesis de proteínas por las que los polipéptidos resultantes de la traducción ribosómica experimentan modificaciones (p. ej., plegamiento y escisión) antes de convertirse en el producto proteico maduro. Después de la traducción, la PTM de aminoácidos generalmente amplía el intervalo de funciones de la proteína uniéndola a otros grupos funcionales bioquímicos (p. ej., acetato, fosfato y diversos lípidos y carbohidratos), cambiando así la naturaleza química de los aminoácidos o haciendo cambios estructurales en los mismos (p. ej., formación de enlaces disulfuro). Modificaciones como la fosforilación están implicadas en el control del comportamiento de una proteína, incluida la activación o inactivación de una enzima. Ejemplos adicionales de PTM se refieren a la escisión enzimática de la proteína (p. ej., eliminación de un propéptido) o a la escisión del resto de metionina con el que comienzan la mayoría de los polipéptidos nacientes. Las PTM se detectan con frecuencia mediante espectrometría de masas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "liberación de lote" generalmente se refiere a la(s) norma(s) biológica(s) específica(s) que deben estar presentes antes de que un agente biológico pueda administrarse a un sujeto, y la expresión "ensayo de liberación de lote" generalmente se refiere a un bioensayo que, por ejemplo, una autoridad reguladora ha concluido de manera precisa y reproducible e indica si se han cumplido las normas biológicas específicas. El grado de supervisión reguladora a la que se somete a un compuesto biológico durante la liberación del lote se asocia con su indicación y evaluación de riesgo/beneficio, y las consideraciones incluyen lo siguiente: edad de la población de interés; patología que se está tratando (p. ej., potencialmente mortal, aguda o crónica); duración anticipada del tratamiento; estado de salud general de la población de interés; objetivo de la terapia (p. ej. tratamiento, prevención o diagnóstico); y el tamaño de la población de interés.

IL-10 e IL-10 pegilada

La citocina antiinflamatoria IL-10, también conocida como factor inhibidor de la síntesis de citocinas humanas (CSIF), se clasifica como una citocina de tipo (clase) 2, un conjunto de citocinas que incluye IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (Mda-7) e IL-26, interferones (IFN- α , - β , - γ , - δ , - ϵ , - κ , - ω , y - τ) y moléculas similares al interferón (limitina, IL-28A, IL-28B e IL-29).

La IL-10 es una citocina con efectos pleiotrópicos en la inmunorregulación y la inflamación. Es producida por los mastocitos, contrarrestando el efecto inflamatorio que estas células tienen en el sitio de una reacción alérgica. Si bien es capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF α y GM-CSF, IL-10 también estimula a determinados linfocitos T y mastocitos y estimula la maduración de linfocitos B, proliferación y producción de anticuerpos. La IL-10 puede bloquear la actividad de NF- κ B y está implicada en la regulación de la vía de señalización JAK-STAT. También induce la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8 $^{+}$ y la producción de anticuerpos de los linfocitos B, y suprime la actividad de los macrófagos y la inflamación que promueve el tumor. La regulación de los linfocitos T CD8 $^{+}$ depende de la dosis, en la que las dosis más altas inducen respuestas citotóxicas más fuertes.

La IL-10 humana es un homodímero con una masa molecular de 37 kDa, en la que cada monómero de 18,5 kDa comprende 178 aminoácidos, cuyos primeros 18 comprenden un péptido señal, y dos pares de restos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro intramoleculares. Cada monómero de hIL-10 maduro comprende 160 restos de aminoácidos. El dímero IL-10 se vuelve biológicamente inactivo tras la interrupción de las interacciones no covalentes entre las dos subunidades monoméricas. La Fig. 1A representa la secuencia completa de IL-10 humana de 178 aminoácidos (el péptido señal de 18 aminoácidos está subrayado), y la Fig. 1B representa la secuencia de IL-10 humana madura de 160 aminoácidos.

La presente divulgación contempla IL-10 humana e IL-10 murina, que muestran un 80 % de homología y el uso de las mismas. Además, el alcance de la presente divulgación incluye ortólogos de IL-10, y formas modificadas de los mismos, de otras especies de mamíferos, incluyendo rata (número de registro NP_036986.2; GI 148747382); vaca (número de registro NP_776513.1; GI 41386772); oveja (número de registro NP_001009327.1, GI 57164347); perro (número de registro ABY86619.1; GI 166244598); y conejo (número de registro AAC23839.1; GI 3242896).

Los datos cristalográficos de un número de fuentes, que incluyen datos obtenidos de la estructura cristalina de IL-10 (Zdanov, A. y col., (1995) *Structure (Lond)* 3: 591-601 y Walter, M. y Nagabhushan, T., (1995) *Biochemistry* (38):

12118-25); y un modelo de la estructura cristalina de hIL-10 con su receptor soluble (Zdanov, A. y col., (1996) Protein Sci. (10): 1955-62) han sido publicados. Cada monómero de 160 aminoácidos de IL-10 humana madura (hIL-10) comprende seis hélices unidas por bucles cortos. La Fig. 3A representa una representación de cinta de estructura de cristal de proteína del monómero hIL-10, en la que sus seis hélices están etiquetadas AF, y la Fig. 3B
5 representa una representación de cinta de estructura de cristal de proteína del homodímero hIL-10, en la que las seis hélices de cada monómero están etiquetadas A-F.

El receptor de IL-10, un receptor de citocinas tipo II, comprende subunidades alfa y beta, que también se denominan R1 y R2, respectivamente. Si bien la mecánica de la unión al receptor de IL-10 no se ha elucidado minuciosamente, se ha demostrado que la señalización de IL-10 requiere contribuciones tanto de IL-10R1 como de IL-10R2. Esto
10 puede producirse a través de un homodímero IL-10 que se une independientemente a IL-10R1 e IL-10R2 combinado con algún tipo de evento de agrupación, o mediante un homodímero IL-10 que forma un único complejo con IL-10R1 e IL-10R2. La estructura cristalina del complejo IL-10/IL-10R1 ha sido publicada (Josephson, K. y col., (2001) Immunity (1): 35-46), y la Fig. 3C representa una representación de cinta de estructura de cristal de proteína del homodímero IL10 humano (gris) unido a dos receptores humanos IL10R1/α (negros).

También se abarcan en el presente documento otras moléculas de IL-10, que incluyen fragmentos de IL-10; polipéptidos basados en monómeros de IL-10; moléculas que comprenden un monómero de IL-10 complejo con una proteína heteróloga; y proteínas de fusión de IL-10 que comprenden IL-10 fusionadas, al nivel del ácido
15 nucleico, con uno o más agentes terapéuticos (p. ej., un compuesto biológico antiinflamatorio). Dichas moléculas se pueden modificar usando los enfoques descritos en el presente documento o cualquier otro enfoque conocido por los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "IL-10 pegilada" se refiere a una molécula de IL-10 que tiene una o más moléculas de polietilenglicol unidas covalentemente a al menos un resto de aminoácido de la proteína IL-10, generalmente a través de un engarce, de modo que la unión es estable. El término "IL-10 monopegilada" indica
25 que una molécula de polietilenglicol está unida covalentemente a un único resto de aminoácido en una subunidad del dímero de IL-10, generalmente a través de un engarce. En determinadas realizaciones, la IL-10 pegilada usada en la presente divulgación es una IL-10 mono-pegilada en la que de una a nueve moléculas de PEG se unen covalentemente mediante un engarce al grupo alfa-amino del resto de aminoácidos en el extremo N de una subunidad del dímero IL-10. La monopegilación en una subunidad de IL-10 generalmente da como resultado una mezcla no homogénea de IL-10 no pegilada, monopegilada y dipegilada debido a la redistribución de subunidades.
30 Además, permitir que una reacción de pegilación se complete generalmente dará como resultado una IL-10 no específica y multipegilada, reduciendo así su bioactividad. Algunas realizaciones de la presente divulgación comprenden la administración de una mezcla de IL-10 mono- y di-pegilada producida por los procedimientos descritos en el presente documento.

En realizaciones particulares, el peso molecular medio del resto de PEG está entre aproximadamente 5 kDa y
35 aproximadamente 50 kDa. Por ejemplo, el resto de PEG puede tener una masa molecular mayor que aproximadamente 5 kDa, mayor que aproximadamente 10 kDa, mayor que aproximadamente 15 kDa, mayor que aproximadamente 20 kDa, mayor que aproximadamente 30 kDa, mayor que aproximadamente 40 kDa o mayor que aproximadamente 50 kDa. En algunas realizaciones, la masa molecular es de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 5 kDa a
40 aproximadamente 20 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 15 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 20 kDa, de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 25 kDa o de aproximadamente 10kDa a aproximadamente 30kDa. Aunque la presente divulgación no requiere el uso de un procedimiento específico o sitio de unión de PEG a IL-10, con frecuencia es ventajoso que la pegilación no altere, o solo altere mínimamente, la actividad de la molécula de IL-10. En determinadas realizaciones, el aumento en la semivida logrado mediante
45 pegilación es mayor que cualquier disminución en la actividad biológica. En realizaciones particulares, la liberación de lote y la actividad biológica de PEG-IL-10 se miden usando un ensayo de proliferación de células MC/9, cuyo ejemplo se expone en la sección experimental. En algunas realizaciones, la actividad biológica de PEG-IL-10 se mide evaluando los niveles de citocinas inflamatorias (p. ej., TNF-α o IFN-γ) en el suero de sujetos expuestos a un antígeno bacteriano (lipopolisacárido (LPS)) y tratados con PEG-IL-10, como se describe en la Patente de los EE.UU. n.º 7.052.686. Los aspectos adicionales de la pegilación se describen adicionalmente a continuación.

La expresión "sustitución de aminoácidos conservativa" se refiere a sustituciones que conservan la actividad de la proteína reemplazando un(os) aminoácido(s) en la proteína con un aminoácido con una cadena lateral de acidez, basicidad, carga, polaridad o tamaño similar de la cadena lateral. Las sustituciones de aminoácidos conservativas
55 generalmente implican la sustitución de restos de aminoácidos dentro de los siguientes grupos: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; y 6) D, E. La directriz para las sustituciones, inserciones o deleciones puede basarse en alineamientos de secuencias de aminoácidos de diferentes proteínas variantes o proteínas de diferentes especies. Por lo tanto, además de cualquier polipéptido de IL-10 de origen natural, la presente divulgación contempla tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, generalmente no más de 20, 10, o 5 sustituciones de aminoácidos, en la que la sustitución es generalmente una sustitución conservativa de aminoácidos. Si se debe tener en cuenta que uno
60 o más aminoácidos no naturales se pueden introducir en la IL-10 como una forma de fomentar la conjugación específica del sitio.

La presente divulgación también contempla fragmentos activos (p. ej., subsecuencias) de IL-10 madura que contiene restos de aminoácidos contiguos procedentes de la IL-10 madura. La longitud de los restos de aminoácidos contiguos de una subsecuencia de un polipéptido o péptido varía dependiendo de la secuencia específica de aminoácidos de origen natural a partir de la cual se obtiene la subsecuencia. En general, los péptidos y polipéptidos pueden ser de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 60 aminoácidos, de aproximadamente 60 aminoácidos a aproximadamente 80 aminoácidos, de aproximadamente 80 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 120 aminoácidos, de aproximadamente 120 aminoácidos a aproximadamente 140 aminoácidos, de aproximadamente 140 aminoácidos a aproximadamente 150 aminoácidos, de aproximadamente 150 aminoácidos a aproximadamente 155 aminoácidos, de aproximadamente 155 aminoácidos hasta el péptido o polipéptido de longitud completa.

Además, los polipéptidos de IL-10 pueden tener una identidad de secuencia definida en comparación con una secuencia de referencia en una longitud definida de aminoácidos contiguos (p. ej., una "ventana de comparación"). Los procedimientos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 85: 2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, p. ej., Current Protocols en Molecular Biology (Ausubel y col., suplemento eds. 1995)).

Como ejemplo, un polipéptido de IL-10 adecuado puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de aproximadamente 20 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos, de aproximadamente 40 aminoácidos a aproximadamente 60 aminoácidos, de aproximadamente 60 aminoácidos a aproximadamente 80 aminoácidos, de aproximadamente 80 aminoácidos a aproximadamente 100 aminoácidos, de aproximadamente 100 aminoácidos a aproximadamente 120 aminoácidos, de aproximadamente 120 aminoácidos a aproximadamente 140 aminoácidos, de aproximadamente 140 aminoácidos a aproximadamente 150 aminoácidos, de aproximadamente 150 aminoácidos a aproximadamente 155 aminoácidos, de aproximadamente 155 aminoácidos hasta el péptido o polipéptido de longitud completa.

Como se trata adicionalmente a continuación, los polipéptidos de IL-10 se pueden aislar de una fuente natural (p. ej., un entorno distinto de su entorno natural) y también se pueden fabricar de forma recombinante (p. ej., en una célula huésped genéticamente modificada tal como bacterias, levaduras, *Pichia*, células de insectos y similares), en los que la célula huésped genéticamente modificada se modifica con un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Los polipéptidos IL-10 también pueden producirse sintéticamente (p. ej., mediante síntesis química libre de células).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de IL-10 también se describen en el presente documento, incluyendo sus isoformas de origen natural y de origen no natural, variantes alélicas y variantes de corte y empalme. Las secuencias de ácido nucleico que varían en una o más bases de una secuencia de ADN de origen natural, pero que aún se traducen en una secuencia de aminoácidos que corresponde a un polipéptido de IL-10 debido a la degeneración del código genético se describen adicionalmente en el presente documento.

Procedimientos de producción de IL-10

Tal como se describe en el presente documento, un polipéptido se puede producir mediante cualquier procedimiento adecuado, que incluye procedimientos no recombinantes (p. ej., síntesis química) y recombinantes.

A. Síntesis química

Cuando se sintetiza químicamente un polipéptido, la síntesis puede transcurrir a través de fase líquida o fase sólida. La síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) permite la incorporación de aminoácidos no naturales y/o la modificación de la estructura de péptidos/proteínas. Diversas formas de SPPS, tales como 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) y t-butiloxicarbonilo (Boc), están disponibles para sintetizar polipéptidos de la presente divulgación. Los detalles de las síntesis químicas son conocidos en la técnica (p. ej., Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6: 3-10; y Camarero JA y col., (2005) Protein Pept Lett. 12:723-8).

B. Producción recombinante

Se pueden encontrar procedimientos que describen la preparación de IL-10 humana (y de ratón) en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.231.012, que enseña procedimientos para la producción de proteínas que tienen actividad de IL-10, incluyendo técnicas recombinantes y otras sintéticas. IL-10 puede ser de origen viral, y la clonación y expresión de una IL-10 viral del virus *Epstein Barr* (proteína BCRF1) se desvela en Moore y col., (1990) Science 248:1230. Se puede obtener IL-10 de varias maneras usando técnicas convencionales conocidas en la

técnica, tales como las descritas en el presente documento. La IL-10 humana recombinante también está disponible en el mercado, p. ej., en PeptoTech, Inc., Rocky Hill, NJ.

La mutagénesis específica de sitio (también denominada mutagénesis dirigida a sitio y mutagénesis dirigida a oligonucleótidos) puede usarse para generar mutaciones específicas en ADN para producir proteínas diseñadas racionalmente de la presente divulgación (p. ej., muteínas de IL-10 particulares y otras versiones modificadas de IL-10, incluyendo dominios de las mismas) que tienen propiedades mejoradas o deseables. Las técnicas para la mutagénesis específica de sitio son bien conocidas en la técnica. Los procedimientos de mutagénesis específicos de sitio inicial (p. ej., el procedimiento de Kunkel; la mutagénesis en cassette, la mutagénesis dirigida al sitio de PCR; y la mutagénesis del plásmido completo, incluido SPRINP) se han reemplazado por procedimientos más precisos y eficientes, como varios procedimientos *in vivo* que incluyen Delitto perfetto (véase Storici F. y Resnick MA, (2006) *Methods in Enzymology* 409: 329-45); sustitución "pop-in pop-out"; delección directa de genes y mutagénesis específica de sitio con PCR y un marcador reciclable; delección directa de genes y mutagénesis específica de sitio con PCR y un marcador reciclable que usa regiones homólogas largas; y mutagénesis *in vivo* dirigida al sitio con oligonucleótidos sintéticos (y véase, p. ej., *Protocolos de mutagénesis in vitro* (Methods in Molecular Biology), 2ª edición, ISBN 978-0896039100). Además, las herramientas para efectuar la mutagénesis específica de sitio están disponibles en el mercado (p. ej., Stratagene Corp., La Jolla, CA).

Cuando se produce un polipéptido usando técnicas recombinantes, el polipéptido se puede producir como una proteína intracelular o como una proteína secretada, usando cualquier construcción adecuada y cualquier célula huésped adecuada, que puede ser una célula procarionta o eucariota, tal como una bacteria (p. ej., *E. coli*) o una célula huésped de levadura, respectivamente. Otros ejemplos de células eucariotas que pueden usarse como células huésped incluyen células de insecto, células de mamífero y/o células vegetales. Cuando se usan células huésped de mamífero, pueden incluir células humanas (p. ej., células HeLa, 293, H9 y Jurkat); células de ratón (p. ej., NIH3T3, células L y células C127); células de primates (p. ej., Cos 1, Cos 7 y CV 1); y células de hámster (p. ej., células de ovario de hámster chino (CHO)).

Se puede emplear una diversidad de sistemas de vector huésped adecuados para la expresión de un polipéptido de acuerdo con procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Sambrook y col., 1989 *Current Protocols in Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York; y Ausubel y col., 1995 *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Wiley and Sons. Los procedimientos para la introducción de material genético en las células huésped incluyen, por ejemplo, transformación, electroporación, conjugación, procedimientos de fosfato de calcio y similares. El procedimiento para la transferencia puede seleccionarse para proporcionar una expresión estable del ácido nucleico que codifica el polipéptido introducido. El ácido nucleico que codifica el polipéptido puede proporcionarse como un elemento episomal heredable (p. ej., un plásmido) o puede estar genómicamente integrado. Una diversidad de vectores adecuados para su uso en la producción de un polipéptido de interés están disponibles en el mercado.

Los vectores pueden proporcionar mantenimiento extracromosómico en una célula huésped o pueden proporcionar la integración en el genoma de la célula huésped. El vector de expresión proporciona secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción, y puede proporcionar una expresión inducible o constitutiva en la que la región de codificación está unida de forma operacional bajo el control transcripcional de la región de iniciación transcripcional, y una región de terminación transcripcional y traduccional. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluir, pero sin limitación, secuencias promotoras, sitios de unión ribosómica, secuencias de inicio y parada de la transcripción, secuencias de inicio y final de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles, y pueden ser un fuerte promotor constitutivo (p. ej., T7).

Las construcciones de expresión generalmente tienen sitios de restricción convenientes ubicados cerca de la secuencia promotora para proporcionar la inserción de secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas de interés. Puede estar presente un marcador seleccionable operativo en el huésped de expresión para facilitar la selección de las células que contienen el vector. Además, la construcción de expresión puede incluir elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener uno o dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga en organismos, por ejemplo, en células de mamífero o de insecto para la expresión y en un huésped procarionta para clonación y amplificación. Además, la construcción de expresión puede contener un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células huésped transformadas. Los genes seleccionables son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

El aislamiento y la purificación de una proteína se pueden lograr de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una proteína puede aislarse a partir de un lisado de células modificadas genéticamente para expresar la proteína constitutivamente y/o tras la inducción, o de una mezcla de reacción sintética mediante purificación por inmunoafinidad, que generalmente implica poner en contacto la muestra con un anticuerpo antiproteína, lavando para eliminar material no específicamente unido y eluir la proteína específicamente unida. La proteína aislada puede purificarse adicionalmente mediante diálisis y otros procedimientos normalmente empleados en la purificación de proteínas. En una realización, la proteína puede aislarse usando procedimientos de cromatografía de quelatos metálicos. Las proteínas pueden contener modificaciones para facilitar el aislamiento.

Los polipéptidos se pueden preparar en forma sustancialmente pura o aislada (p. ej., libre de otros polipéptidos). Los polipéptidos pueden estar presentes en una composición que está enriquecida para el polipéptido en relación con otros componentes que pueden estar presentes (p. ej., otros polipéptidos u otros componentes de la célula huésped). Por ejemplo, el polipéptido purificado puede proporcionarse de modo que el polipéptido esté presente en una composición que está sustancialmente libre de otras proteínas expresadas, p. ej., inferior a aproximadamente 90 %, inferior a aproximadamente 60 %, inferior a aproximadamente 50 %, inferior a aproximadamente 40 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 5 %, o inferior a aproximadamente 1 %.

Se puede generar un polipéptido de IL-10 usando técnicas recombinantes para manipular diferentes ácidos nucleicos relacionados con IL-10 conocidos en la técnica para proporcionar construcciones capaces de codificar el polipéptido de IL-10. Se apreciará que, cuando se proporciona una secuencia de aminoácidos particular, el experto en la técnica reconocerá una diversidad de diferentes moléculas de ácido nucleico que codifican dicha secuencia de aminoácidos a la vista de sus antecedentes y experiencia en, por ejemplo, biología molecular.

Modificaciones de IL-10

A. Sustituciones de enlace amida

En algunos casos, IL-10 incluye uno o más enlaces distintos de los enlaces peptídicos, p. ej., al menos dos aminoácidos adyacentes se unen a través de un enlace distinto de un enlace amida. Por ejemplo, con el fin de reducir o eliminar la proteólisis no deseada u otras fuentes de degradación, y/o aumentar la estabilidad del suero, y/o restringir o aumentar la flexibilidad conformacional, se pueden sustituir uno o más enlaces amida dentro de la estructura de IL-10.

En otro ejemplo, uno o más enlaces amida (-CO-NH-) en la IL-10 puede reemplazarse con un enlace que es un isómero de un enlace amida, tal como -CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂CH₂-, -CH=CH- (cis y trans), -COCH₂-, -CH(OH)CH₂- o -CH₂SO-. Uno o más enlaces amida en IL-10 también puede reemplazarse por, por ejemplo, un enlace pseudopeptídico isómero reducido. Véase Couder y col., (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41:181-184. Dichas sustituciones y cómo realizarlas son conocidas por los expertos en la técnica.

B. Sustituciones de aminoácidos

Se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos en un polipéptido de IL-10. Los siguientes son ejemplos no limitantes:

- a) sustitución de aminoácidos hidrófobos sustituidos con alquilo, que incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, norleucina, ácido (S)-2-aminobutírico, (S)-ciclohexilalanina u otros alfa-aminoácidos simples sustituidos por una cadena lateral alifática de carbonos C₁-C₁₀ que incluyen sustituciones alquilo, alqueno o alquino ramificadas, cíclicas y de cadena lineal;
- b) sustitución de aminoácidos hidrófobos sustituidos con aromáticos, que incluyen fenilalanina, triptófano, tirosina, sulfotirosina, bifenilalanina, 1-naftilalanina, 2-naftilalanina, 2-benzotienilalanina, 3-benzotienilalanina, histidina, incluidos amino, alquilamino, dialquilamino, aza, halogenados (fluro, cloro, bromo o yodo) o formas sustituidas con alcoxi (de C₁-C₄) de los aminoácidos aromáticos anteriormente enumerados, cuyos ejemplos ilustrativos son: 2-, 3- o 4-aminofenilalanina, 2-, 3- o 4-clorofenilalanina, 2-, 3- o 4-metilfenilalanina, 2-, 3- o 4-metoxifenilalanina, 5-amino-, 5-cloro-, 5-metil- o 5-metoxitriptófano, 2', 3'- o 4'-amino-, 2', 3'- o 4'-cloro-, 2, 3 o 4-bifenilalanina, 2', 3'- o 4'-metil-, 2-, 3- o 4-bifenilalanina, y 2- o 3-piridilalanina;
- c) Sustitución de aminoácidos que contienen cadenas laterales básicas, que incluyen arginina, lisina, histidina, ornitina, ácido 2,3-diaminopropiónico, hormoarginina, incluyendo alquilo, alqueno o derivados arílicos sustituidos (lineales o cíclicos de cadena ramificada C₁-C₁₀) de los anteriores aminoácidos, si el sustituyente está en los heteroátomos (como nitrógeno alfa, o el nitrógeno o nitrógenos distal(es), o en el carbono alfa, en la posición pro-R por ejemplo. Los compuestos que sirven como ejemplos ilustrativos incluyen: N-épsilon-isopropil-lisina, 3-(4-tetrahidropiridil)-glicina, 3-(4-tetrahidropiridil)-alanina, N,N-gamma, gamma'-dietil-homoarginina. También se incluyen compuestos tales como alfa-metil-arginina, alfa-metil-ácido 2,3-diaminopropiónico, alfa-metil-histidina, alfa-metil-ornitina en los que el grupo alquilo ocupa la posición pro-R del carbono alfa. También se incluyen las amidas formadas a partir de alquilo, ácidos carboxílicos aromáticos, heteroaromáticos (en los que el grupo heteroaromático tiene uno o más nitrógenos, oxígenos o átomos de azufre por separado o en combinación), o cualquiera de los muchos derivados activados conocidos, tales como cloruros de ácido, ésteres activos, azolidas activas y derivados relacionados, y lisina, ornitina o ácido 2,3-diaminopropiónico;
- d) sustitución de aminoácidos ácidos, que incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, tirosina, alquil, aril, arilalquil y heteroaril sulfonamidas del ácido 2,4-diaminopropiónico, ornitina o lisina y alquilaminoácidos sustituidos con tetrazol;
- e) sustitución de restos de amida de cadena lateral, que incluyen asparagina, glutamina y derivados alquílicos o aromáticos sustituidos de asparagina o glutamina; y
- f) sustitución de aminoácidos que contienen hidroxilo, que incluyen serina, treonina, homoserina, ácido 2,3-diaminopropiónico y derivados alquílicos o aromáticos sustituidos de serina o treonina.

una forma libre ($R_3 = OH$) o en la forma de una sal alcalina o alcalinotérrica fisiológicamente tolerada tal como, p. ej., una sal de sodio, potasio o calcio. El grupo carboxilo también se puede esterificar con alcoholes primarios, secundarios o terciarios, tales como, p. ej., metanol, alcoholes alquílicos C_1-C_6 ramificados o no ramificados, p. ej., alcohol etílico o terc-butanol. El grupo carboxilo también se puede amidar con aminas primarias o secundarias tales como amoníaco, alquilaminas C_1-C_6 ramificadas o no ramificadas o dialquilaminas C_1-C_6 , p. ej., metilamina o dimetilamina.

El grupo amino de la NR_1R_2 de aminoácidos en el extremo N de un polipéptido IL-10 puede estar presente en una forma libre ($R_1 = H$ y $R_2 = H$) o en la forma de una sal fisiológicamente tolerada tal como, p. ej., un cloruro o acetato. El grupo amino también se puede acetilar con ácidos tal que $R_1 = H$ y $R_2 =$ acetilo, trifluoroacetilo o adamantilo. El grupo amino puede estar presente en una forma protegida por grupos protectores de amino usados convencionalmente en química de péptidos, tales como los proporcionados anteriormente (p. ej., Fmoc, benciloxycarbonilo (Z), Boc y Alloc). El grupo amino puede ser N-alquilado en el que R_1 y/or $R_2 =$ alquilo C_1-C_6 o alqueno C_2-C_8 o aralquilo C_7-C_9 . Los restos alquílicos pueden ser de cadena lineal, ramificados o cíclicos (p. ej., etilo, isopropilo y ciclohexilo, respectivamente).

D. Pegilación y otras modificaciones para potenciar y/o imitar la función de IL-10

Con frecuencia es beneficioso, y algunas veces es imperativo, mejorar una o más propiedades físicas de las modalidades de tratamiento desveladas en el presente documento (p. ej., moléculas de IL-10) y/o la manera en la que se administran. Las mejoras de las propiedades físicas incluyen, por ejemplo, modulación de la inmunogenicidad; procedimientos para aumentar la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida en plasma; y modulación de la actividad biológica. Determinadas modificaciones también pueden ser útiles, por ejemplo, para aumentar los anticuerpos para su uso en ensayos de detección (p. ej., etiquetas epitópicas) y para facilitar la purificación de proteínas. Dichas mejoras deben transmitirse en general sin afectar negativamente a la bioactividad de la modalidad de tratamiento y/o aumentar su inmunogenicidad. Las modificaciones de las moléculas de IL-10 contempladas por la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, pegilación, glicosilación (ligada a N y a O); polisialilación; moléculas de fusión de albúmina que comprenden albúmina de suero (p. ej., albúmina de suero humano (HSA), albúmina de suero cino, o albúmina de suero bovino (BSA)); unión de albúmina a través de, por ejemplo, una cadena de ácido graso conjugado (acilación); y proteínas de fusión Fc.

Las moléculas de IL-10 se pueden modificar conjugando o uniendo una secuencia polipeptídica a cualquiera de una diversidad de polímeros no proteínicos, p. ej., polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos. Esto se realiza con frecuencia por un resto de enlace unido covalentemente tanto a la proteína como al polímero no proteínico, p. ej., un PEG. Se ha demostrado que dichas biomoléculas conjugadas con PEG poseen propiedades clínicamente útiles, que incluyen una mejor estabilidad física y térmica; protección contra la susceptibilidad a la degradación enzimática; mayor solubilidad; semivida plasmática más prolongada y disminución del aclaramiento; inmunogenicidad y antigenicidad reducidas; y toxicidad reducida.

Además de los efectos beneficiosos de la pegilación en los parámetros farmacocinéticos, la pegilación en sí misma puede potenciar la actividad. Por ejemplo, se ha demostrado que la IL-10 pegilada es más eficaz contra determinados cánceres que la IL-10 no pegilada (véase, p. ej., el documento EP 206636A2).

El valor terapéutico de las moléculas de pegilación está bien validado. Los productos farmacéuticos anteriores y/o actuales incluyen: OMONTYS (Affymax/Takeda); PEGLOTICASE (Savient); CIMZIA (Nektar/UCB Pharma); MACUGEN (Prizer); NEULASTA (Amgen); SOMAVERT (Prizer); PEGASYS (Roche); DOXIL (Ortho Biotech) y PEGINTRON (Schering-Plough).

Los PEG adecuados para la conjugación con una secuencia polipeptídica son generalmente solubles en agua a temperatura ambiente, y tienen la fórmula general $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$, en la que R es hidrógeno o un grupo protector tal como un grupo alquilo o un alcohol, y en la que n es un número entero de 1 a 1000. Cuando R es un grupo protector, generalmente tiene de 1 a 8 átomos de carbono. El PEG conjugado con la secuencia polipeptídica puede ser lineal o ramificado. Los derivados de PEG ramificados, "PEG de estrella" y PEG de múltiples brazos se contemplan en la presente divulgación. Un peso molecular (masa molecular) del PEG usado en la presente divulgación no está restringido a ningún intervalo particular. Determinadas realizaciones tienen pesos moleculares entre 5 kDa y 20 kDa, mientras que otras realizaciones tienen pesos moleculares entre 4 kDa y 10 kDa. Los PEG que tienen pesos moleculares adicionales se describen en otra parte en el presente documento.

En el presente documento también se describen composiciones de conjugados en las que los PEG tienen diferentes n valores, y por lo tanto, los diferentes PEG están presentes en proporciones específicas. Por ejemplo, algunas composiciones comprenden una mezcla de conjugados en los que $n = 1, 2, 3$ y 4. En algunas composiciones, el porcentaje de conjugados en el que $n = 1$ es de 18-25 %, el porcentaje de conjugados en el que $n = 2$ es de 50-66 %, el porcentaje de conjugados en el que $n = 3$ es de 12-16 %, y el porcentaje de conjugados en el que $n = 4$ es hasta de 5 %. Dichas composiciones se pueden producir mediante condiciones de reacción y procedimientos de purificación conocidos en la técnica. Ejemplos de las condiciones de reacción se describen a lo largo de la memoria descriptiva. La cromatografía de intercambio catiónico puede usarse para separar conjugados, y luego se identifica una fracción que contiene el conjugado que tiene, por ejemplo, el número deseado de PEG unidos, se purifica libre

de secuencias de proteínas no modificadas y de conjugados que tienen otros números de PEG unidos.

La pegilación se produce con mayor frecuencia en el grupo alfa amino en el extremo N del polipéptido, el grupo épsilon amino en la cadena lateral de restos de lisina y el grupo imidazol en la cadena lateral de restos de histidina. Dado que la mayoría de los polipéptidos recombinantes poseen un solo alfa y un número de grupos épsilon amino e imidazol, se pueden generar numerosos isómeros posicionales dependiendo de la química del engarce. Las estrategias generales de pegilación conocidas en la técnica pueden aplicarse en el presente documento. El PEG se puede unir a un polipéptido de la presente divulgación a través de un grupo reactivo terminal (un "espaciador") que media un enlace entre los grupos amino o carboxilo libres de una o más de las secuencias polipeptídicas y polietilenglicol. El PEG que tiene el espaciador que puede estar unido al grupo amino libre incluye N-hidroxisuccinilimida polietilenglicol, que puede prepararse activando éster de ácido succínico de polietilenglicol con N-hidroxisuccinilimida. Otro polietilenglicol activado que se puede unir a un grupo amino libre es 2,4-bis (O-metoxipolietilenglicol)-6-cloro-s-triazina, que se puede preparar haciendo reaccionar éter monomético de polietilenglicol con cloruro cianúrico. El polietilenglicol activado que se une al grupo carboxilo libre incluye polioxitilendiamina.

La conjugación de una o más de las secuencias polipeptídicas con PEG que tiene un espaciador se puede llevar a cabo mediante diversos procedimientos convencionales. Por ejemplo, la reacción de conjugación se puede llevar a cabo en solución a un pH de 5 a 10, a una temperatura de 4 °C a la temperatura ambiente, durante 30 minutos a 20 horas, utilizando una relación molar de reactivo a proteína de, p. ej., 1: 1; 1,5:1; 4:1 a 30:1. Las condiciones de reacción pueden seleccionarse para dirigir la reacción hacia la producción predominante de un grado deseado de sustitución. En general, baja temperatura, pH bajo (p. ej., pH = 5) y tiempo de reacción corto tienden a disminuir el número de PEG unidos, mientras que alta temperatura, pH neutro a alto (p. ej., pH ≥ 7) y tiempo de reacción más largo tienden a aumentar la cantidad de PEG unidos. Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para terminar la reacción. En algunas realizaciones, la reacción se termina acidificando la mezcla de reacción y congelando a, p. ej., -20 °C. La pegilación de diversas moléculas se trata, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. n.ºs. 5.252.714; 5.643.575; 5.919.455; 5.932.462; y 5.985.263. La IL-10 pegilada se describe, p. ej., en la Patente de los EE.UU. n.º 7.052.686. Las condiciones de reacción particulares contempladas para su uso en el presente documento se exponen en la sección experimental.

Como se indicó anteriormente, la pegilación se produce con mayor frecuencia en el extremo N, la cadena lateral de restos de lisina y el grupo imidazol en la cadena lateral de restos de histidina. La utilidad de dicha pegilación se ha potenciado por refinamiento mediante, por ejemplo, la optimización de las condiciones de reacción y la mejora de los procedimientos de purificación. Químicas específicas de restos más recientes han permitido la pegilación de arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, serina, treonina y tirosina, así como el extremo carboxi. Algunos de estos restos de aminoácidos se pueden pegilar específicamente, mientras que otros son más promiscuos o solo dan como resultado una pegilación específica de sitio bajo determinadas condiciones.

Los enfoques actuales que permiten la pegilación de restos de aminoácidos adicionales incluyen la pegilación puente (puentes disulfuro), la pegilación enzimática (glutaminas y extremo C) y la glicopegilación (sitios de O y N-glicosilación o los glucanos de una glicoproteína) y la pegilación heterobifuncional. Se incluyen enfoques adicionales para la pegilación de proteínas que contienen aminoácidos no naturales, proteínas de fusión de inteína para pegilación C-terminal, pegilación mediada por transglutaminasa, pegilación mediada por sortasa A, y pegilación liberable y no covalente. Además, la combinación de enfoques de pegilación específicos con técnicas de ingeniería genética ha permitido que el polímero de polietilenglicano se acople esencialmente en cualquier posición en la superficie de la proteína debido, por ejemplo, a la sustitución de restos de aminoácidos específicos en un polipéptido con un aminoácido natural o no natural que tiene un grupo reactivo ortogonal. Véase en general, p. ej., Pasut, G. y Veronese, FM, (2012) *J. Controlled Release* 161: 461-72; Roberts, MJ y col., (2012) *Advanced Drug Delivery Rev.* 64: 116-27; Jevsevar, S. y col., (2010) *Biotechnol. J.* 5: 113-28; y Yoshioka, Y. (2011) *Chem. Central J.* 5:25.

El uso de miméticos de PEG también se describe en el presente documento. Se han desarrollado miméticos de PEG recombinante que conservan los atributos de PEG (p. ej., semivida en suero potenciada) al tiempo que confieren varias propiedades ventajosas adicionales. A modo de ejemplo, las cadenas polipeptídicas simples (que comprenden, por ejemplo, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser y Thr) capaces de formar una conformación extendida similar a PEG pueden producirse recombinantemente ya fusionadas con el péptido o proteína fármaco de interés (p. ej., la tecnología XTEN de Amunix; Mountain View, CA). Esto obvia la necesidad de una etapa de conjugación adicional durante el procedimiento de fabricación. Además, las técnicas establecidas de biología molecular permiten el control de la composición de la cadena lateral de las cadenas polipeptídicas, permitiendo la optimización de la inmunogenicidad y las propiedades de fabricación.

Cualquiera de los componentes y moléculas anteriores usados para modificar las secuencias polipeptídicas (p. ej., polietilenglicol) se pueden conjugar opcionalmente a través de un engarce. Los engarces adecuados incluyen "engarces flexibles" que generalmente son de longitud suficiente para permitir algún movimiento entre las secuencias polipeptídicas modificadas y los componentes y moléculas unidos. Las moléculas engarzadoras tienen generalmente alrededor de 6-50 átomos de longitud. Las moléculas engarzadoras también pueden ser, por ejemplo, aril acetileno, oligómeros de etilenglicol que contienen 2-10 unidades monoméricas, diaminas, diácidos, aminoácidos o combinaciones de los mismos. Los engarces adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden tener

cualquier longitud adecuada, como 1 aminoácido (p. ej., Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 o más de 50 aminoácidos.

5 Ejemplos de engarces flexibles incluyen polímeros de glicina (G)_n, polímeros de glicina-serina (por ejemplo (GS)_n, GSGGS_n (SEQ ID NO:14) y GGGS_n (SEQ ID NO:15), en los que n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros engarces flexibles. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente desestructurados y, por lo tanto, pueden servir como un cordón neutro entre los componentes. Ejemplos de engarces flexibles incluyen, pero sin limitación, GGSG (SEQ ID NO:16), GGSGG (SEQ ID NO:17), GSGSG (SEQ ID NO:18), GSGGG (SEQ ID NO:19), GGGSG (SEQ ID NO:20), y GSSSG (SEQ ID NO:21).

Ensayos de liberación

10 Debido a que los agentes biológicos son sensibles a los cambios en los materiales de partida y los procedimientos de fabricación usados en su producción, pueden ser difíciles de producir y caracterizar sistemáticamente. Como tal, los compuestos biológicos están sujetos a requisitos reguladores y supervisión adicionales que las moléculas pequeñas, que generalmente se sintetizan mediante procedimientos químicos precisos. Las evaluaciones de liberación de lotes se usan para garantizar que los compuestos biológicos dentro de cada lote, o "lote", posean la potencia requerida (que está vinculada a, p. ej., la bioestabilidad), que contengan sistemáticamente la misma API y que sean seguros para el uso humano.

15 Como se establece en el presente documento, se evalúa un compuesto biológico basándose en parámetros que son específicos para él, que incluyen: fuente y nivel de control de las materias primas; complejidad, robustez y nivel de control del procedimiento de fabricación; complejidad química del fármaco y el medicamento; y fiabilidad y complejidad de los procedimientos usados para evaluar la identidad, la pureza y la potencia del fármaco y el medicamento.

Mapeo de péptidos

25 La producción de compuestos biológicos requiere un control de calidad muy riguroso debido a la posibilidad de modificaciones y contaminación de proteínas indeseables. Un elemento de este riguroso control de calidad implica la confirmación de la integridad de la secuencia de aminoácidos para cada lote de producción (lote) de una proteína biológica. El mapeo de péptidos (también conocido como "identificación genética de masa de péptidos") es un procedimiento poderoso para la determinación estructural y la confirmación de la identidad de secuencia de los compuestos biológicos de proteínas y es un procedimiento analítico indispensable para el control de calidad de proteínas procedentes de recombinación.

30 Un mapa de péptidos es esencialmente una "identificación genética" de una proteína que resulta de varios procedimientos químicos que proporcionan una comprensión integral de la proteína que se analiza. En su nivel más básico, el mapeo de péptidos implica la digestión enzimática o la escisión química de una proteína, la separación de los fragmentos resultantes y el análisis de los fragmentos. El procedimiento puede usarse para confirmar que una proteína es, de hecho, la proteína de interés sin la necesidad de llevar a cabo una secuenciación peptídica que consume mucho tiempo.

35 En la Tabla 1 se exponen ejemplos de agentes de digestión enzimática y de escisión química.

Tabla 1

Agente enzimático	Especificidad
Tripsina	Lado C-terminal de Arg y Lys
Quimotripsina	Lado C-terminal de restos hidrofóbicos (p. ej., Leu, Met, Ala, aromáticos)
Pepsina	Agente no específico
Lisil endopeptidasa (Lys-C endopeptidasa; Endo Lys-C)	Lado C-terminal de Lys
Glutamil endopeptidasa (de la cepa S. aureus V8; Endo Glu-C)	Lado C-terminal de Glu y Asp
Peptidil-Asp metalo endopeptidasa (Endopeptidasa Asp-N; Endo Asp-N)	Lado N-terminal de Asp
Clostripaína	Lado C-terminal de Arg

(Continuación)

Agente químico		Especificidad
	Bromuro de cianógeno	Lado C-terminal de Met
	Ácido 2-nitro-5-tio-cianobenzóico	Lado N-terminal de Cys
	Ácido o-yodobenzoico	Lado C-terminal de Trp y Tyr
	Ácido diluido	Asp y Pro
	BNPS-skatole	Trp

Las técnicas usadas para la separación de péptidos producidos por digestión y escisión incluyen: RP-HPLC; IEC; HIC; PAGE; SDS-PAGE; CE; Electroforesis PCHV; y HVPE.

5 Las masas absolutas de los fragmentos están determinadas por un espectrómetro de masa (p. ej., ESI-MS, ESI-MS/MS, ESI-TOF MS, MALDI MS y MALDI-TOF MS) y luego se comparan con masas peptídicas anteriormente determinadas para proteínas conocidas (p. ej., datos de masa peptídica específica de proteína almacenados en una base de datos informática). En el presente contexto, las masas peptídicas medidas se comparan generalmente con las anteriormente determinadas para IL-10 usando metodologías análogas a las descritas anteriormente. Al igual que con otras técnicas proteómicas analíticas basadas en espectrometría de masas, la calidad de la identificación de proteínas depende de la calidad de los propios datos de MS, la precisión de las bases de datos y el poder de los algoritmos de búsqueda y el software usado.

10 Para permitir un análisis óptimo, el intervalo de tamaño deseado de péptidos producidos por digestión enzimática fue históricamente de aproximadamente 600-5.000 Da. Sin embargo, el intervalo de tamaño ha aumentado a aproximadamente 600-20.000 Da debido a avances recientes en software y técnicas de espectrometría de masas (p. ej., disociación de transferencia de electrones (ETD) y disociación de captura de electrones (ECD)), junto con la posibilidad de combinación con la disociación activada por colisión (CAD). No obstante, algunos péptidos todavía caen por encima o por debajo del intervalo de tamaño de péptido deseado, lo que da como resultado una menor cobertura de proteínas y una recopilación de datos incompleta.

15 La digestión de proteínas con tripsina ("mapeo tríptico"; descrito adicionalmente a continuación) es el procedimiento principal para el análisis de proteínas. Con el fin de aumentar la cobertura proteica, se han introducido proteinasas alternativas. El uso de proteinasas alternativas, individualmente o en combinación con otras proteinasas, crea un mapa de péptidos particular que puede incluir secuencias de péptidos no vistas en las digestiones con tripsina. Además, la superposición de péptidos obtenidos de la digestión con proteinasas alternativas aumenta la cobertura de proteínas y la confianza global en la identificación de proteínas. Mediante el uso de enzimas alternativas, los péptidos que son demasiado grandes para su uso óptimo con una instrumentación analítica particular pueden dividirse en fragmentos más pequeños y manejables.

20 Las proteinasas alternativas también pueden ser útiles para superar la digestión incompleta causada por las PTM, que impiden que las proteinasas accedan a un sitio necesario, y para identificar los compañeros de translocación.

25 Mapeo tríptico. Tal como se indica en el presente documento, la digestión de proteínas con tripsina ("mapeo tríptico") es el procedimiento principal para la determinación estructural de proteínas (que incluye, p. ej., proteínas recientemente descubiertas). La digestión enzimática con tripsina es ventajosa porque se escinde en el lado C-terminal de los restos Lys y Arg, que generalmente es cuantitativa en condiciones adecuadas, porque tolera concentraciones de urea tan altas como 4M, y porque puede usarse para localizar sitios de glicosilación y enlaces disulfuro. El mapeo tríptico proporciona información sobre una consistencia de lote a lote, errores de expresión, sitios de mutación y deaminación, y se usa cada vez más en biotecnología para el control de calidad de proteínas recombinantes.

30 A pesar de su uso generalizado, el mapeo tríptico no está exento de limitaciones y deficiencias. Requiere un alto nivel de resolución de columna y precisión del sistema para una reproducción precisa de los mapas. Además, debido al gran número de picos en un mapa tríptico, es difícil identificar los fragmentos aportados por una proteína contaminante a un nivel de 1-5 %. Además, la digestión tríptica de determinadas proteínas pegiladas no produce datos reproducibles y/o significativos.

35 Mapeo Endoproteinasa Glu-C. Como se establece en la Tabla 1, la endoproteinasa Glu-C (Endo Glu-C) es una enzima alternativa para la digestión de proteínas. Endo Glu-C es una serina proteasa producida recombinantemente (gen *Staphylococcus aureus* proteasa V8 clonado y expresado en *Bacillus subtilis*) que escinde proteínas con alta especificidad en el extremo C de ácido glutámico y restos de ácido aspártico, y crea así fragmentos particulares de péptido disponibles para análisis de espectrometría de masas. Aunque Endo Glu-C se ha usada en la caracterización de proteínas durante varias décadas, su importancia ha aumentado recientemente debido a los

avances en técnicas de espectrometría de masas. Los reactivos Endo Glu-C están disponibles en el mercado a partir de un número de fuentes, que incluyen New England BioLabs (Ipswich, MA) y Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ).

5 La secuencia de aminoácidos Endo Glu-C se expone en la Fig. 2. Contiene una etiqueta 6-His en el extremo C de la proteína. Endo Glu-C aparece como una sola banda en SDS-PAGE, y una pequeña cantidad de la enzima puede contener dos restos de Ala adicionales en su extremo N.

10 Endo Glu-C se escinde en los restos de ácido aspártico a una velocidad de 100-300 veces más lenta que en los restos de ácido glutámico. Además, la especificidad de Endo Glu-C está influenciada por la composición tampón; en los tampones de fosfato, tanto los restos glutámicos como los aspárticos se escinden, mientras que en los tampones de bicarbonato de amonio y acetato de amonio (pH 4,0), solo se escinden los restos glutámicos.

Digestión de IL-10 e IL-10 pegilada

15 La fragmentación de IL-10, PEG-IL-10 y las otras moléculas relacionadas con IL-10 descritas en el presente documento se puede realizar por digestión enzimática y química. Los agentes expuestos anteriormente en la Tabla 1 pueden evaluarse como candidatos de fragmentación. Aunque otros factores pueden ser relevantes, una digestión de IL-10 que da como resultado un mapa peptídico que contiene menos, más discretos péptidos en comparación con los miembros peptídicos resultantes de una digestión diferente es más fácil de interpretar en diferentes lotes y condiciones.

20 Las realizaciones particulares de la presente divulgación contemplan la digestión con un agente proteolítico, Endo Glu-C. Cada monómero de la estructura dimérica de IL-10 humana tiene 17 sitios de digestión Endo Glu-C (es decir, restos de ácido glutámico y ácido aspártico) y 21 sitios de digestión con tripsina. Por lo tanto, la digestión con Endo Glu-C da como resultado menos fragmentos de péptidos y una digestión más simple de interpretar. Menos fragmentos de péptidos también se traduce en problemas potencialmente menores durante las pruebas de liberación crítica. Además, los datos resultantes de la digestión con Endo Glu-C son más robustos (p. ej., picos más distintos producidos por espectrometría de masas) que los resultantes de la digestión con, por ejemplo, tripsina.

25 El mapeo de péptidos de una proteína pegilada a menudo se asocia con consideraciones que no están presentes con el mapeo de péptidos de la proteína no pegilada correspondiente. La digestión de PEG-IL-10 con Endo-Glu-C proporciona resultados superiores a los obtenidos con tripsina. Esencialmente, el mapa tríptico PEG-IL-10 no proporcionará un "mapa" coherente de la IL-10 mixta di- y mono-pegilada para proporcionar reproducibilidad para establecer especificaciones para los criterios de liberación del fármaco a granel (BDS) y el medicamento final (DP). De particular importancia con respecto a PEG-IL-10, la digestión con Endo Glu-C produce datos coherentes y reproducibles generados por un ensayo de liberación de lotes. Dicha coherencia y reproducibilidad se observa independientemente de si un individuo realiza el ensayo de liberación usando diferentes equipos; un individuo diferente realiza el ensayo de liberación usando el mismo equipo que el primer individuo; o un individuo diferente realiza el ensayo de liberación usando una máquina diferente del primer individuo.

35 La digestión de IL-10 y PEG-IL-10 con la Endo Glu-C peptidasa proporciona datos más robustos y reproducibles que la digestión con tripsina. Usando la metodología descrita en la sección experimental, una digestión con Endo Glu-C y un mapa de péptidos detectado por UV de IL-10 y PEG-IL-10 dio como resultado picos discretos y fácilmente interpretables (véase la Fig. 4). El cromatograma expuesto en la Fig. 4 también indica que el mapa peptídico muestra trazas sustancialmente similares para rhIL-10 (traza oscura) y PEG-rhIL-10 (traza ligera). Cabe destacar que, el uso de ESI-MS/MS después de la digestión con Endo Glu-C de PEG-IL produjo un mapa peptídico que tiene picos discretos, pero de resolución insuficiente para caracterizar fácilmente el resto de PEG. El experto en la técnica podrá evaluar otros procedimientos de detección que se pueden emplear con Endo Glu-C.

40 Como se indicó anteriormente, la digestión de IL-10 con tripsina produce más fragmentos de péptido que la digestión con Endo Glu-C. Este aumento en el número de fragmentos de péptidos requiere una interpretación adicional intensiva en el tiempo. Además, la espectrometría de masas (p. ej., ESI-MS/MS) de los fragmentos peptídicos producidos con tripsina da como resultado picos que son menos discretos.

50 Por lo tanto, la Endo Glu-C peptidasa proporciona resultados robustos y coherentes en cuanto a la identidad (p. ej., secuencia de aminoácidos) y la estabilidad de las composiciones que comprenden interleucina 10 pegilada y otras moléculas relacionadas con la interleucina 10 pegilada. Como resultado, la digestión con Endo Glu-C es ideal como un ensayo de liberación de lote para PEG-rhIL-10.

Usos terapéuticos y profilácticos

En el presente documento se describe el uso de las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) en el tratamiento o prevención de una amplia gama de enfermedades, trastornos y afecciones y/o sus síntomas.

55 También se describe en el presente documento el uso de un agente de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) como un diagnóstico o como un componente del mismo.

Trastornos fibróticos y cáncer. Las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) descritas en el presente documento se pueden usar para tratar o evitar enfermedades, trastornos o afecciones proliferativas, incluyendo cánceres y enfermedades, trastornos o afecciones relacionados con el cáncer. Por ejemplo, reducir la tolerancia a una célula tumoral o antígeno de célula cancerosa, p. ej., modulando la actividad de un linfocito T regulador y/o un linfocito T CD8+ (véase, p. ej., Ramirez - Montagut, y col., (2003) Oncogene 22: 3180-87; y Sawaya, y col., (2003) New Engl. J. Med. 349:1501-09). El tumor o cáncer es cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, glioblastoma o leucemia. El uso de la(s) expresión(es) enfermedades, trastornos y afecciones relacionadas con el cáncer pretende referirse ampliamente a las afecciones que están asociadas, directa o indirectamente, con cáncer, e incluye, p. ej., angiogénesis y condiciones precancerosas como displasia.

5 Enfermedades cardiovasculares y trastornos relacionados con el colesterol. Los agentes de IL-10 (PEG-IL-10) descritos en el presente documento se pueden usar para tratar y/o evitar determinadas enfermedades, trastornos y afecciones relacionados con el metabolismo cardiovascular y/o asociado, así como a trastornos asociados a ellos.

10 Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "enfermedad cardiovascular", "enfermedad cardíaca" y similares se refieren a cualquier enfermedad que afecte al sistema cardiovascular, principalmente enfermedad cardíaca, enfermedades vasculares del cerebro y riñón, y enfermedades arteriales periféricas. La enfermedad cardiovascular es un conjunto de enfermedades que incluye enfermedad coronaria (es decir, cardiopatía isquémica o enfermedad de la arteria coronaria), aterosclerosis, cardiomiopatía, hipertensión, enfermedad cardíaca hipertensiva, cor pulmonale, disritmias cardíacas, endocarditis, enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica. Las enfermedades cardiovasculares son la causa principal de muertes en todo el mundo, y aunque generalmente afecta a los adultos mayores, los antecedentes de enfermedades cardiovasculares, especialmente la aterosclerosis, comienzan en los primeros años de vida.

15 También se describe en el presente documento el uso de polipéptidos de IL-10 para tratar y/o evitar la aterosclerosis, una afección crónica en la que una pared de la arteria se engrosa para formar placas como resultado de la acumulación de materiales grasos tales como colesterol y triglicéridos. La aterosclerosis con frecuencia implica una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias, causada principalmente por la acumulación de macrófagos y promovida por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) sin una eliminación adecuada de grasas y colesterol de los macrófagos por lipoproteínas de alta densidad funcionales. Las lesiones ateroscleróticas que se expanden crónicamente pueden provocar el cierre completo del lumen, que solo puede manifestarse cuando la estenosis del lumen es tan grave que el suministro de sangre al tejido o tejidos corriente abajo es insuficiente, lo que produce isquemia.

20 Los polipéptidos de IL-10 pueden ser particularmente ventajosos en el tratamiento y/o prevención de trastornos relacionados con el colesterol, que pueden estar asociados con, por ejemplo, enfermedad cardiovascular (p. ej., aterosclerosis), enfermedad cerebrovascular (p. ej., ictus) y enfermedad vascular periférica. A modo de ejemplo, los polipéptidos de IL-10 se pueden usar para disminuir el nivel de colesterol en sangre de un sujeto. Para determinar si un sujeto tiene hipercolesterolemia, no existe una demarcación firme entre los niveles de colesterol normal y anormal, y la interpretación de los valores debe hacerse en relación con otras condiciones de salud y factores de riesgo. No obstante, las siguientes directrices se usan generalmente en los Estados Unidos: se desea un colesterol total <200 mg/dl, 200-239 mg/dl es el límite superior, y ≥ 240 mg/dl es alto. Los niveles más altos de colesterol total aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular, y los niveles de colesterol LDL o no HDL son ambos predictores de futuras enfermedades coronarias. Al evaluar la hipercolesterolemia, con frecuencia es útil medir todas las restas de lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL y HDL). Un objetivo terapéutico particular es disminuir el LDL mientras se mantiene o aumenta el HDL.

25 Trombosis y afecciones trombóticas. Trombosis, la formación de un trombo (coágulo de sangre) dentro de un vaso sanguíneo que da como resultado la obstrucción del flujo de sangre a través del sistema circulatorio, puede ser causada por anomalías en uno o más de los siguientes (tríada de Virchow): hipercoagulabilidad, lesión de células endoteliales o flujo sanguíneo alterado (estasis, turbulencia).

30 La trombosis se clasifica generalmente como venosa o arterial, cada una de las cuales puede presentarse por varios subtipos. La trombosis venosa incluye la trombosis venosa profunda (TVP), la trombosis de la vena porta, la trombosis de la vena renal, la trombosis de la vena yugular, el síndrome de Budd-Chiari, la enfermedad de Paget-Schroetter y la trombosis del seno venoso cerebral. La trombosis arterial incluye ictus e infarto de miocardio.

Otras enfermedades, trastornos y afecciones que se consideran en el presente documento, incluyen trombosis auricular y policitemia vera (también conocida como eritema, policitemia primaria y policitemia rubra vera), un trastorno mieloproliferativo en la sangre en el que la médula ósea produce demasiados RBC, WBC y/o plaquetas.

35 Además, los vasos sanguíneos dañados, por ejemplo, por colesterol o por fumar desarrollan placas, que pueden romperse y hacer que las placas formen un coágulo. Esta respuesta se produce a pesar de que no haya sangrado.

Afecciones inmunes e inflamatorias. Tal como se usa en el presente documento, expresiones tales como "enfermedad inmune", "afección inmune", "trastorno inmune", "enfermedad inflamatoria", "afección inflamatoria", "trastorno inflamatorio" y similares pretenden abarcar ampliamente cualquier afección relacionada con la

5 inmunodeficiencia o inflamación. (p. ej., inflamación patológica y enfermedades autoinmunes). Dichas afecciones a menudo están inextricablemente interrelacionadas con otras enfermedades, trastornos y afecciones. A modo de ejemplo, una "afección inmune" puede referirse a afecciones proliferativas, tales como cáncer, tumores y angiogénesis; incluyendo infecciones (agudas y crónicas), tumores y cánceres que resisten la erradicación por el sistema inmune.

10 Una lista no limitante de enfermedades, trastornos y afecciones relacionados con la inmunodeficiencia o inflamación que pueden, por ejemplo, ser causados por citocinas inflamatorias, incluye artritis (p. ej., artritis reumatoide), insuficiencia renal, lupus, asma, psoriasis, colitis, pancreatitis, alergias, fibrosis, complicaciones quirúrgicas (p. ej., donde las citocinas inflamatorias evitan la cicatrización), anemia y fibromialgia. Otras enfermedades y trastornos que pueden estar asociados con la inflamación crónica incluyen la enfermedad de Alzheimer, insuficiencia cardíaca congestiva, ictus, estenosis de la válvula aórtica, arterioesclerosis, osteoporosis, la enfermedad de Parkinson, infecciones, enfermedad inflamatoria del intestino (p. ej., enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), dermatitis de contacto alérgica y otros eccemas, esclerosis sistémica, trasplante y esclerosis múltiple.

15 Enfermedades virales Ha aumentado el interés en el papel de la IL-10 en las enfermedades virales. Se ha postulado que IL-10 produce efectos tanto estimuladores como inhibidores dependiendo de, por ejemplo, su actividad de unión al receptor.

20 Se ha considerado el efecto de inhibir la función de IL-10 con el fin de aumentar la inmunidad antiviral y la eficacia de la vacuna (véase Wilson, E., (2011) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 350:39-65). Además, se ha estudiado el papel de la IL-10 en la función del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Además de la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), la IL-10 también puede promover la persistencia viral por inactivación de los mecanismos inmunes efectores (Naicker, D., y col., (2009) J. Infect. Dis. 200 (3): 448-452). Otro estudio ha identificado un subconjunto productor de IL-10 de linfocitos B capaces de regular la inmunidad de los linfocitos T en la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB). Se observó una estrecha correlación temporal entre los niveles observados de IL-10 y las fluctuaciones en la carga viral, y se encontró que el bloqueo *in vitro* de IL-10 rescata las respuestas de linfocitos T CD8+ específicas del virus polifuncionales (Das, A., y col., J. Immunol, 12 de septiembre de 2012 1103139 (en línea)).

30 Aunque los estudios anteriormente mencionados indican que la inhibición de IL-10 puede ser beneficiosa, las infecciones víricas particulares que comprenden un componente de linfocito T CD8+ pueden ser candidatas para el tratamiento y/o prevención mediante la administración de un agente de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10). Esto está respaldado por el papel positivo que IL-10 juega en determinados cánceres mediante la modulación de los linfocitos T reguladores y/o los linfocitos T CD8+. El uso de la terapia con IL-10 en contextos virales también se ha tratado en otra parte (véase, p. ej., J. Virol. julio de 2011, volumen 85, n.º 14, 6822-683; y Loebbermann J, y col., (2012) PLoS ONE 7 (2): e32371. doi: 10.1371/journal.pone.0032371).

35 El uso de las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) en el tratamiento y/o prevención de cualquier enfermedad, trastorno o afección viral para los que el tratamiento con IL-10 puede ser beneficioso se describe en el presente documento. Ejemplos de enfermedades, trastornos y afecciones virales que se consideran incluyen hepatitis B, hepatitis C, VIH, virus del herpes y citomegalovirus (CMV).

Vías de administración y composiciones farmacéuticas

40 Las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) descritas en el presente documento pueden estar en forma de composiciones adecuadas para la administración a un sujeto. En general, dichas composiciones son "composiciones farmacéuticas" que comprenden un agente de IL-10 como se describe en el presente documento y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. El agente de IL-10 está presente en una cantidad terapéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse en los procedimientos tratados en el presente documento; así, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse *ex vivo* o *in vivo* a un sujeto con el fin de practicar los procedimientos y usos terapéuticos y profilácticos descritos en el presente documento.

50 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden formularse para que sean compatibles con el procedimiento o vía de administración previstos. La presente divulgación considera la administración de las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) descritas en el presente documento, y composiciones de las mismas, de cualquier manera adecuada. Las vías de administración adecuadas incluyen parenteral (p. ej., intramuscular, intravenosa, subcutánea (p. ej., inyección o implante), intraperitoneal, intracisternal, intraarticular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa) e intracerebroventricular), oral, nasal, vaginal, sublingual, intraocular, rectal, tópica (p. ej., transdérmica), sublingual e inhalación. La administración parenteral se considera, en particular cuando la administración parenteral es subcutánea.

55 El experto en la técnica está familiarizado con las metodologías para preparar composiciones farmacéuticas y los diversos componentes de las mismas. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento comprenden típicamente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) y uno o más diluyentes, vehículos o excipientes farmacéutica y fisiológicamente aceptables que incluyen, pero sin limitación,

antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico y bisulfato de sodio), conservantes (p. ej., alcohol bencílico, metil parabenos, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato), agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes dispersantes, disolventes, cargas, agentes de carga, detergentes, tampones, vehículos, diluyentes y/o adyuvantes.

5 Por ejemplo, un vehículo adecuado puede ser una solución salina fisiológica o una solución salina tamponada con citrato, posiblemente complementada con otros materiales comunes en composiciones farmacéuticas para la administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son otros ejemplos de vehículos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de tampones que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación descritas en el presente documento. Los tampones típicos incluyen, ácidos débiles farmacéuticamente aceptables, bases débiles o mezclas de los mismos. Como ejemplo, los componentes del tampón pueden ser materiales solubles en agua tales como ácido fosfórico, ácidos tartáricos, ácido láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido acético, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido glutámico y sales de los mismos. Los agentes tamponadores aceptables incluyen, por ejemplo, un tampón de Tris, ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), sal sódica del ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), y ácido N-tris[hidroximetil]metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS).

Después de que se haya formulado una composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para usar, una forma liofilizada que requiere reconstitución antes del uso, una forma líquida que requiere dilución antes de su uso u otra forma aceptable. La composición farmacéutica se puede proporcionar en un recipiente de un solo uso (p. ej., un vial, ampolla, jeringa o autoinyector de un solo uso (similar, p. ej., a EpiPen®)), mientras que un recipiente de usos múltiples (p. ej., un vial multiuso) se proporciona en otros casos. Se puede usar cualquier aparato de entrega de fármacos para entregar IL-10, incluidos implantes (p. ej., bombas implantables) y sistemas de catéter, bombas y dispositivos de inyección lenta, los cuales son bien conocidos por los expertos en la técnica.

25 Inyecciones de depósito, que generalmente se administran por vía subcutánea intramuscular, se pueden utilizar para liberar las moléculas de IL-10 desveladas en el presente documento durante un período de tiempo definido. Las inyecciones de depósito generalmente están basadas en sólido o en aceite y generalmente comprenden al menos uno de los componentes de formulación expuestos en el presente documento. Un experto en la técnica está familiarizado con las posibles formulaciones y usos de las inyecciones de depósito.

30 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y los agentes de suspensión mencionados en el presente documento. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Los diluyentes, disolventes y medios de dispersión aceptables que se pueden emplear incluyen agua, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro de sodio, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS), etanol, poliol (p. ej., glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede usar cualquier aceite fijo insípido, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico, encuentran uso en la preparación de inyectables. La absorción prolongada de formulaciones inyectables particulares se puede lograr mediante la inclusión de un agente que retrase la absorción (p. ej., monoestearato de aluminio o gelatina).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de IL-10 descritas en el presente documento pueden estar en otras formas de dosificación, incluyendo formas de dosificación adecuadas para vías de administración alternativas, actualmente conocidas o desarrolladas en el futuro. Por ejemplo, las moléculas de IL-10 pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas adecuadas para la administración oral, supositorios para la administración rectal y aerosoles para uso nasal o por inhalación.

La concentración de un agente de IL-10 en una formulación puede variar ampliamente (p. ej., desde menos de aproximadamente 0,1 %, generalmente de al menos aproximadamente 2 % hasta 20 % a 50 % o más en peso) y generalmente se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluido, las viscosidades y los factores basados en el sujeto de acuerdo con, por ejemplo, el modo particular de administración seleccionado.

Terapia de combinación

El uso de moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) en combinación con uno o más agentes terapéuticos activos (p. ej., citocinas) u otras modalidades profilácticas o terapéuticas (p. ej., radiación) con el fin para tratar o evitar las enfermedades, trastornos y afecciones también se describe en el presente documento. En dicha terapia de combinación, los diversos agentes activos frecuentemente tienen mecanismos de acción complementarios diferentes. Dicha terapia de combinación puede ser especialmente ventajosa permitiendo una reducción de la dosis de uno o más de los agentes, reduciendo o eliminando de este modo los efectos adversos asociados con uno o más de los agentes. Además, dicha terapia de combinación puede tener un efecto terapéutico o profiláctico sinérgico

sobre la enfermedad, trastorno o afección subyacente.

Tal como se usa en el presente documento, "combinación" pretende incluir terapias que pueden administrarse por separado, por ejemplo, formuladas por separado para la administración separada (p. ej., como puede proporcionarse en un kit), y terapias que se pueden administrar juntas en una sola formulación (es decir, una "coformulación").

5 Los polipéptidos de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) se pueden administrar o aplicarse secuencialmente, p. ej., cuando se administra un agente antes de uno o más de otros agentes. En otros casos, los polipéptidos de IL-10 se administran simultáneamente, p. ej., cuando se administran dos o más agentes al mismo tiempo o aproximadamente al mismo tiempo; los dos o más agentes pueden estar presentes en dos o más formulaciones separadas o combinados en una única formulación (es decir, una co-formulación). Independientemente de si los dos o más agentes se administran
10 secuencialmente o simultáneamente, se consideran administrados en combinación para los fines descritos en el presente documento.

Los polipéptidos de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) descritos en el presente documento pueden usarse en combinación con al menos otro agente (activo), incluyendo sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, de cualquier manera adecuada bajo las circunstancias. En un caso, el tratamiento con al menos un agente activo y al menos un polipéptido de IL-10. Como se describe, se mantiene durante un período de tiempo. En otro caso, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe (p. ej., cuando el sujeto está estable), mientras que el tratamiento con el polipéptido de IL-10 como se describe se mantiene a una posología constante. En un caso adicional, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe (p. ej., cuando el sujeto está estable), mientras que el tratamiento con el polipéptido de IL-10 como se describe se reduce (p. ej., dosis más baja,
15 dosificación menos frecuente o régimen de tratamiento más corto). En otra situación más, el tratamiento con al menos un agente activo se reduce o se interrumpe (p. ej., cuando el sujeto está estable) y se incrementa el tratamiento con el polipéptido de IL-10 como se describe (p. ej., dosis más altas, dosificación más frecuente o un régimen de tratamiento más largo). En otra situación más, el tratamiento con al menos un agente activo se mantiene y el tratamiento con el polipéptido de IL-10 como se describe se reduce o se interrumpe (p. ej., dosis más baja, dosificación menos frecuente o régimen de tratamiento más corto). En otra situación más, el tratamiento con al menos un agente activo y el tratamiento con el polipéptido de IL-10 como se describe se reducen o se interrumpen (p. ej., dosis más baja, dosificación menos frecuente o régimen de tratamiento más corto).
20
25

El uso de moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) en combinación con una o más modalidades profilácticas o terapéuticas (ahora conocidas o desarrolladas en el futuro), incluyendo modalidades útiles en el tratamiento, prevención, y/o diagnóstico de trastornos fibróticos y cáncer (incluidas afecciones proliferativas); afecciones inmunes e inflamatorias; enfermedades virales; y trastornos trombóticos; también se describe en el presente documento.
30

Además, algunos casos están dirigidos a terapia de combinación para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de enfermedades cardiovasculares. A modo de ejemplo, se puede usar un agente de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) en combinación con modalidades para el tratamiento de la hipercolesterolemia (así como la aterosclerosis) incluyendo estatinas (p. ej., CRESTOR, LESCOL, LIPITOR, MEVACOR, PRAVACOL, y ZOCOR), que inhiben la síntesis enzimática del colesterol; resinas de ácidos biliares (p. ej., COLESTID, LO-CHOLEST, PREVALITE, QUESTRAN, y WELCHOL), que secuestran el colesterol y evitan su absorción; ezetimiba (ZETIA), que bloquea la absorción de colesterol; ácido fibrico (p. ej., TRICOR), que reduce los triglicéridos y puede aumentar modestamente el HDL; niacina (p. ej., NIACOR), que reduce modestamente el colesterol LDL y los triglicéridos; y/o una combinación de los anteriormente mencionados (p. ej., VYTORIN (ezetimiba con simvastatina). Los tratamientos alternativos del colesterol que pueden ser candidatos para su uso en combinación con los polipéptidos de IL-10 descritos en el presente documento incluyen inhibidores de proproteína convertasa subtilisina kexin 9 (PCSK9) para el tratamiento de hipercolesterolemia y patologías relacionadas. Dichas modalidades incluyen anticuerpos monoclonales (mAb), ARNi antisentido, moléculas pequeñas y el uso de adnectinas recombinantes.
35
40

45 **Dosificación**

Los polipéptidos de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) descritos en el presente documento se pueden administrar a un sujeto en una cantidad que depende, por ejemplo, del objetivo de administración (p. ej., el grado de resolución deseado); la edad, el peso, el sexo y la salud y condición física del sujeto al que se administra la formulación; la vía de administración; y la naturaleza de la enfermedad, trastorno, afección o síntoma de la misma. La posología también puede tener en cuenta la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquiera de los efectos adversos asociados con el(los) agente(s) que se administra(n). Las cantidades de dosificación efectivas y las posologías se pueden determinar fácilmente a partir de, por ejemplo, ensayos de seguridad y de escalada de dosis, estudios *in vivo* (p. ej., modelos animales) y otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.
50

En general, los parámetros de dosificación dictan que la cantidad de dosificación sea menor que una cantidad que podría ser irreversiblemente tóxica para el sujeto (la dosis máxima tolerada (DMT)) y no menor que una cantidad requerida para producir un efecto mensurable sobre el sujeto. Dichas cantidades se determinan, por ejemplo, mediante los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos asociados con ADME, teniendo en cuenta la vía de administración y otros factores.
55

Una dosis efectiva (ED) es la dosis o cantidad de un agente que produce una respuesta terapéutica o efecto deseado en alguna fracción de los sujetos que lo toman. La "dosis efectiva media" o DE50 de un agente es la dosis o cantidad de un agente que produce una respuesta terapéutica o efecto deseado en el 50 % de la población a la que se administra. Aunque la DE50 se usa comúnmente como una medida de la expectativa razonable del efecto de un agente, no es necesariamente la dosis que un médico podría considerar adecuada teniendo en cuenta todos los factores relevantes. Por lo tanto, en algunas situaciones, la cantidad efectiva es mayor que la DE50 calculada, en otras situaciones, la cantidad efectiva es menor que la DE50 calculada, y en aún otras situaciones la cantidad efectiva es la misma que la DE50 calculada.

Además, una dosis efectiva de las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) como se describe en el presente documento puede ser una cantidad que, cuando se administra en una o más dosis a un sujeto, produce un resultado deseado en relación con un sujeto saludable. Por ejemplo, para un sujeto que experimenta un trastorno particular, una dosis efectiva puede ser una que mejore un parámetro de diagnóstico, medida, marcador y similares de ese trastorno en al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 90 %, o más de un 90 %, en la que 100 % se define como el parámetro de diagnóstico, medida, marcador y similares mostrados por un sujeto normal.

La cantidad de una molécula de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) necesaria para tratar una enfermedad, trastorno o afección descrita en el presente documento se basa en la actividad de IL-10 de la proteína conjugada, que puede determinarse por ensayos de actividad de IL-10 conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, en el contexto tumoral, la actividad de IL-10 adecuada incluye, por ejemplo, la infiltración de linfocitos T CD8+ en sitios tumorales, expresión de citocinas inflamatorias, tales como IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, y RANK-L, de estas células infiltrantes, y mayores niveles de TNF- α o IFN- γ en muestras biológicas.

La cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de IL-10 puede oscilar entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 μ g de proteína/kg de peso corporal/día, entre aproximadamente 0,1 y 20 μ g de proteína/kg de peso corporal/día, entre aproximadamente 0,5 y 10 μ g de proteína/kg de peso corporal/día, o aproximadamente de 1 y 4 μ g proteína/kg de peso corporal/día. En algunos casos, una molécula de IL-10 se administra por infusión continua hasta la entrega de aproximadamente 50 a 800 μ g de proteína/kg de peso corporal/día (p. ej., aproximadamente 1 a 16 μ g de proteína/kg de peso corporal/día de molécula de IL-10). La velocidad de infusión puede variar basándose en la evaluación de, por ejemplo, los efectos adversos y los recuentos de células sanguíneas. La molécula de PEG-IL-10 puede administrarse por vía subcutánea.

Para la administración de un agente oral, las composiciones se pueden proporcionar en forma de comprimidos, cápsulas y similares que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del principio activo, particularmente 1,0, 3,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0 y 1000,0 miligramos del principio activo.

La dosificación del polipéptido de IL-10 desvelado puede contenerse en una "forma de dosificación unitaria." La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un polipéptido de IL-10 de la presente divulgación, solo o en combinación con uno o más agentes adicionales, suficiente para producir el efecto deseado. Se apreciará que los parámetros de una forma de dosificación unitaria dependerán del agente particular y del efecto a lograr.

Kits

Los kits que comprenden IL-10 (p. ej., PEG-IL10), y las composiciones farmacéuticas de los mismos también se describen en el presente documento. Los kits tienen generalmente la forma de una estructura física que contiene diversos componentes, como se describe a continuación, y pueden utilizarse, por ejemplo, para practicar los procedimientos descritos anteriormente (p. ej., la administración de una molécula de IL-10 a un sujeto que necesita restaurar homeostasis del colesterol).

Un kit puede incluir uno o más de los polipéptidos de IL-10 descritos en el presente documento (proporcionado en, p. ej., un recipiente estéril), que puede tener la forma de una composición farmacéutica adecuada para la administración a un sujeto. Los polipéptidos de IL-10 pueden proporcionarse en una forma que esté lista para su uso o en una forma que requiera, por ejemplo, reconstitución o dilución antes de la administración. Cuando los polipéptidos de IL-10 tienen una forma que necesita ser reconstituida por un usuario, el kit también puede incluir tampones, excipientes farmacéuticamente aceptables y similares, embalados con o por separado de los polipéptidos de IL-10. Cuando se contempla la terapia de combinación, el kit puede contener los diversos agentes por separado o puede que ya estén combinados en el kit. Cada componente del kit puede estar encerrado dentro de un recipiente individual, y todos los diferentes recipientes pueden estar dentro de un solo embalaje. Un kit como se describe en el presente documento se puede diseñar para las condiciones necesarias para mantener adecuadamente los componentes alojados en el mismo (p. ej., refrigeración o congelación).

Un kit puede contener una etiqueta o inserción de embalaje que incluye información de identificación para los

componentes en el mismo e instrucciones para su uso (p. ej., parámetros de dosificación, farmacología clínica del(los) principio(s) activo(s), incluyendo el mecanismo de acción, farmacocinética y farmacodinámica, efectos adversos, contraindicaciones, etc.). Las etiquetas o inserciones pueden incluir información del fabricante, como números de lote y fechas de vencimiento. La etiqueta o el inserto de embalaje pueden estar, p. ej., integrados en la estructura física que aloja los componentes, contenidos por separado dentro de la estructura física, o fijados a un componente del kit (p. ej., una ampolla, tubo o vial).

Las etiquetas o insertos pueden incluir adicionalmente, o incorporarse a, un medio legible por ordenador, tal como un disco (p. ej., disco duro, tarjeta, disco de memoria), disco óptico tal como CD o DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, cinta magnética o un medio de almacenamiento eléctrico como RAM y ROM o híbridos de estos, tales como medios de almacenamiento magnético/óptico, medios FLASH o tarjetas de memoria. En algunos casos, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan directrices para obtener las instrucciones de una fuente remota, p. ej., a través de Internet.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar la presente invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que se considera que es la invención ni pretenden representar que se realizaron los experimentos a continuación y son todos los experimentos que pueden realizarse. Debe entenderse que los ejemplos de descripciones escritas en tiempo presente no se realizaron necesariamente, sino que las descripciones se pueden realizar para generar los datos y similares descritos en este. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (p.e j., cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones.

A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular medio ponderado, la temperatura está en grados Celsius (°C), y la presión está en o cerca de la atmosférica. Se usan abreviaturas convencionales, que incluyen las siguientes: bp = par(es) de base; kb = kilobase(s); pi = picolitro(s); s o sec = segundo(s); min = minuto(s); h o hr = hora(s); aa = aminoácido(s); kb = kilobase(s); nt = nucleótido(s); ng = nanogram; µg = microgramo; mg = miligramo; g = gramo; kg = kilogramo; dl o dl = decilitro; µl o µl = microlitro; ml o ml = mililitro; l o l = litro; nM = nanomolar; µM = micromolar; mM = milimolar; M = molar; kDa = kilodalton; im = intramuscular(mente); ip = intraperitoneal(mente); sc = subcutáneo(mente); QD = diariamente; BID = dos veces al día; QW = semanalmente; QM = mensualmente; HPLC = cromatografía líquida de alta resolución; BW = peso corporal; U = unidad; ns = no estadísticamente significativo; PBS = solución salina tamponada con fosfato; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; NHS = N-hidroxisuccinimida; DMEM = modificación de Dulbecco del medio de Eagle; GC = copia del genoma; ELISA = ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; EDTA = ácido etilendiaminetetraacético; PMA = acetato de miristato de forbol; rhIL-10 = IL-10 humana recombinante; LPS = lipopolisacárido; ESI-MS = espectrometría de masas de ionización por electropulverización; ESI-MS/MS = espectrometría de masas en tándem ESI; TIC = cromatografía iónica total; ESI-TOF MS = espectrometría de masas de tiempo de vuelo ESI; MALDI = espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz; MALDI-TOF MS = espectrometría de masas de tiempo de vuelo por desorción/ionización láser asistida por matriz; RP-HPLC = cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa; IEC = cromatografía de intercambio iónico; HIC = cromatografía de interacción hidrofóbica; PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida; SDS-PAGE = dodecil sulfato de sodio-PAGE; CE = electroforesis capilar; PCHV = cromatografía en papel-electroforesis de alto voltaje; HVPE = electroforesis de papel de alto voltaje; PEG-rhIL-10DS = fármaco de interleucina 10 humana recombinante pegilada; Endo Glu-C = endoproteinasa Glu-C; DTT = ditiotreitól; UV = ultravioleta.

Materiales y procedimientos

Los siguientes materiales y procedimientos generales se pueden usar en los ejemplos a continuación.

Se describen procedimientos convencionales en biología molecular (véase, p. ej., Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; y Ausubel, y col. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, N.Y., que describe clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (Vol. 1), clonación en células de mamífero y levadura (Vol. 2), glicoconjugados y expresión de proteínas (Vol. 3) y bioinformática (Vol. 4)).

La literatura científica describe procedimientos para la purificación de proteínas, que incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización, así como análisis químicos, modificación química, modificación postraduccional, producción de proteínas de fusión y glicosilación de proteínas (véase, p. ej., Coligan, y col., (2000) *Current Protocols in Protein Science*, vols. 1-2, John Wiley and Sons, Inc., NY).

Se describe la producción, purificación y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (p. ej., Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY); se encuentran disponibles técnicas convencionales para caracterizar las interacciones ligando/receptor (véase, p. ej., Coligan y col., (2001) *Current Protocols in Immunology*, vol. 4, John Wiley, Inc., NY); se encuentran disponibles procedimientos para la citometría de flujo, incluyendo la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), (véase, p. ej.,

Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ); y se encuentran disponibles reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácidos nucleicos, polipéptidos, y anticuerpos, para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico, (catálogo de Molecular Probes (2003), Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Catálogo de Sigma-Aldrich (2003), St. Louis, MO).

- 5 Se describen procedimientos convencionales de histología del sistema inmune (véase, p. ej., Louis y col., (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

El agotamiento de las células inmunes (linfocitos T CD4+ y CD8+) se puede realizar mediante la eliminación mediada por anticuerpos. Por ejemplo, se pueden inyectar 250 µg de anticuerpos específicos para CD4 o CD8 semanalmente, y se verifican los agotamientos celulares usando análisis FACS e IHC.

- 10 Se encuentran disponibles paquetes de software y bases de datos para determinar, p. ej., fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineamientos de secuencias, (véase, p. ej., GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); y DeCypher™ (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV).

- 15 Se obtuvieron ratones Balb/C inmunocompetentes deficientes en células Balb/C o linfocitos B en Jackson Lab., Bar Harbor, ME y se usaron de acuerdo con procedimientos convencionales (véase, p. ej., Martin y col., (2001) Infect. Immun., 69 (11): 7067-73 y Compton y col., (2004) Comp. Med. 54(6):681-89). Otras cepas de ratones adecuadas para el trabajo experimental contemplado por la presente divulgación son conocidas por los expertos en la técnica y están generalmente disponibles en The Jackson Lab.

- 20 A menos que se indique lo contrario, se usó el carcinoma de células escamosas PDV6 de la piel en los experimentos descritos en el presente documento (véase, p. ej., Langowski y col., (2006) Nature 442: 461-465). Pueden usarse otros modelos y líneas celulares relacionados con la oncología, como el carcinoma de mama Ep2, el carcinoma de colon CT26 y los modelos de carcinoma de mama 4T1, (véase, p. ej., Langowski y col., (2006) Nature 442: 461-465) y son conocidos por el experto en la técnica. Los modelos y líneas celulares no relacionados con la oncología (p. ej., modelos de inflamación) también se pueden usar y son conocidos por los expertos en la técnica.

- 25 Los niveles de concentración de IL-10 en suero y los niveles de exposición se pueden determinar por procedimientos convencionales usados en la técnica. Por ejemplo, puede realizarse un ensayo de nivel de exposición sérica recogiendo sangre completa (~50 µl/ ratón) de trocitos de cola de ratón en tubos capilares lisos, separando el suero y las células sanguíneas mediante centrifugación y determinando los niveles de exposición a IL-10 mediante kits de ELISA y técnicas convencionales.

30 **Producción de IL-10 pegilada**

- La presente divulgación contempla la síntesis de IL-10 pegilada mediante cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica. La descripción a continuación de varios esquemas sintéticos alternativos para producir IL-10 mono-pegilada y una mezcla de IL-10 mono-/di-pegilada pretende ser solo ilustrativa. Si bien tanto la IL-10 mono-pegilada como una mezcla de IL-10 mono-/di-pegilada tienen muchas propiedades comparables, una mezcla de IL-10 mono y di-pegilada selectivamente pegilada mejora el rendimiento del producto final pegilado (véase, p. ej., la Patente de los EE.UU. n.º 7.052.686 y la Publicación de la Patente de los EE.UU. n.º 2011/0250163).

- 40 Además de aprovechar sus propias habilidades en la producción y uso de PEG (y otras tecnologías de entrega de fármacos) adecuadas en la práctica de la presente divulgación, el experto en la técnica también está familiarizado con muchos proveedores comerciales de tecnologías relacionadas con PEG (y otras tecnologías de entrega de fármacos). A modo de ejemplo, NOF America Corp (Irvine, CA) suministra PEG lineales monofuncionales, PEG bifuncionales, PES multibrazos, PEG ramificados, PEG heterofuncionales, PEG bifurcados y PEG liberables; y Parchem (New Rochelle, NY) es un distribuidor global de productos PEG y otras materias primas especiales.

- 45 Ejemplo de esquema sintético n.º 1 de IL-10 pegilada. La IL-10 se puede dializar frente a fosfato sódico 10 mM a pH 7,0, NaCl 100 mM. La IL-10 dializada puede diluirse 3,2 veces a una concentración de 4 mg/ml usando el tampón de diálisis. Antes de la adición del engarce, SC-PEG-12K (Delmar Scientific Labs;, Maywood, IL), se puede añadir 1 volumen de Na-tetraborato 100 mM a pH 9,1 en 9 volúmenes de IL-10 diluida para aumentar el pH de la solución de IL-10 a 8,6. El engarce SC-PEG-12K se puede disolver en el tampón de diálisis y se puede añadir el volumen adecuado de la solución de engarce (1,8 a 3,6 moles de engarce/mol de IL-10) a la solución diluida de IL-10 para comenzar la reacción de pegilación. La reacción se puede llevar a cabo a 5 °C para controlar la velocidad de la reacción. La solución de reacción puede agitarse suavemente durante la reacción de pegilación. Cuando el rendimiento de IL-10 mono-pegilada, según se determina por HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), es cercano al 40 %, la reacción se detiene añadiendo una solución de glicina 1 M a una concentración final de 30 mM. El pH de la solución de reacción se ajusta lentamente a 7,0 usando una solución de HCl, y la solución de reacción luego se filtra usando un filtro de 0,2 micrómetros y se almacena a -80 °C grados C.

- 55 Ejemplo de esquema sintético n.º 2 de IL-10 pegilada. Se prepara IL-10 mono-pegilada usando metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG) como un engarce (Inhale Therapeutic Systems Inc., Huntsville, AL; también disponible de NOF America Corp (Irvine, CA)). PALD-PEG puede tener pesos moleculares de 5 KDa, 12 KDa o 20 KDa. La IL-10

se dializa y se diluye como se describió anteriormente, excepto que el pH del tampón de reacción está entre 6,3 y 7,5. El engarce PALD-PEG activado se añade al tampón de reacción en una relación molar de 1: 1. Se añade cianoborohidruro acuoso a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 0,5 a 0,75 mM. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 15-20 horas con agitación suave. La reacción se interrumpe con glicina 1 M. Los rendimientos son analizados por SE-HPLC. La IL-10 monopegilada se separa del engarce PEG de IL-10 que no ha reaccionado y la IL-10 di-pegilada mediante cromatografía de filtración en gel y es caracterizada por RP-HPLC y bioensayo (p. ej., estimulación de células o líneas celulares sensibles a IL-10).

Ejemplo de esquema sintético n.º 3 de PEG-IL-10 pegilada. La IL-10 (p. ej., roedores o primates) se dializa frente a fosfato de sodio 50 mM, pH de cloruro de sodio 100 mM, intervalos de pH 5-7,4. Una relación molar 1:1-1:7 de 5K PEG-propiladehído se hace reaccionar con IL-10 a una concentración de 1-12 mg/ml en presencia de cianoborohidruro sódico 0,75-30 mM. Como alternativa, la reacción se puede activar con picolina borano de manera similar. La reacción se incuba a 5-30 °C durante 3-24 horas.

El pH de la reacción de pegilación se ajusta a 6,3, se hacen reaccionar 7,5 mg/ml de hIL-10 con PEG para obtener la relación de IL-10 a engarce PEG de 1: 3,5. La concentración final de cianoborohidruro es ~25 mM, y la reacción se lleva a cabo a 15 °C durante 12-15 horas. La IL-10 mono y di-pegilada son los productos más grandes de la reacción, con la concentración de cada una a -45-50 % en la terminación. La reacción puede interrumpirse usando un aminoácido tal como glicina o lisina o, como alternativa, tampones Tris. Se pueden emplear procedimientos de purificación múltiples tales como filtración en gel, cromatografías de intercambio de aniones y cationes, y HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC) para aislar las moléculas de IL-10 pegiladas deseadas.

Ejemplo de esquema sintético n.º 4 de IL-10 pegilada. La IL-10 se dializa frente a fosfato sódico 10 mM a pH 7,0, NaCl 100 mM. La IL-10 dializada se diluye 3,2 veces a una concentración de aproximadamente 0,5 a 12 mg/ml usando el tampón de diálisis. Antes de la adición del engarce, SC-PEG-12K (Delmar Scientific Laboratories, Maywood, Ill.), se añade un volumen de Na-tetraborato 100 mM a pH 9,1 en 9 volúmenes de la IL-10 diluida para elevar el pH de la solución de IL-10 a 8,6. El engarce SC-PEG-12K se disuelve en el tampón de diálisis y se añade el volumen adecuado de la solución de engarce (1,8 a 3,6 moles de engarce por mol de IL-10) a la solución diluida de IL-10 para iniciar la reacción de pegilación. La reacción se lleva a cabo a 5 °C con el fin de controlar la velocidad de la reacción, y la solución de reacción se agita suavemente. Cuando el rendimiento de IL-10 mono-pegilada, según se determina por HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), es cercano al 40 %, la reacción se detiene añadiendo una solución de glicina 1 M a una concentración final de 30 mM. El pH de la solución de reacción se ajusta lentamente a 7,0 usando una solución de HCl, y la reacción se filtra a 0,2 micrómetros y se almacena a -80 °C.

Ensayos para determinar la bioactividad de las formas modificadas de IL-10

La presente divulgación contempla el uso de cualquier ensayo y metodología conocida en la técnica para determinar la bioactividad de las moléculas de IL-10 (p. ej., PEG-IL-10) descritas en el presente documento. El ensayo de proliferación de células MC/9 descrito a continuación es representativo, y no excluyente.

Ensayo de proliferación celular MC/9. La administración de IL-10 a células MC/9 (línea celular murina con características de mastocitos disponibles de Cell Signaling Technology; Danvers, MA) causa mayor proliferación celular de una manera dependiente de la dosis.

Thompson-Snipes, L. y col., ((1991) J. Exp. Med. 173: 507-10) describen un protocolo de ensayo convencional en el que las células MC/9 se complementan con IL3 + IL10 e IL3 + IL4 + IL10. Los vendedores (p. ej., R&D Systems, EE. UU., y Cell Signaling Technology, Danvers, MA) usan el ensayo como un ensayo de liberación de lotes para rhIL10. Los expertos en la técnica podrán modificar el protocolo de ensayo convencional descrito en Thompson-Snipes, L. y col., de modo que las células solo se complementan con IL-10.

Identificación de PEG-rhIL-10DS por digestión con Endo Glu-C

Con el fin de discernir la integridad del fármaco IL-10 humano recombinante pegilado (PEG-rhIL-10DS), PEG-rhIL-10DS se digirió con Endo Glu-C, seguido de reducción con DTT y análisis usando RP-HPLC con detección UV. El PEG-rhIL-10DS comprendía una mezcla de IL-10 mono-pegilada y di-pegilada en una relación de aproximadamente 1: 1, en la que la pegilación se produce en el extremo N. El componente de PEG de la molécula de PEG-IL-10 tenía una masa molecular de aproximadamente 5 kDa.

Inicialmente, se predijo una digestión teórica de PEG-rhIL-10DS y la posterior determinación de las masas peptídicas usando un software disponible en el mercado. Se realizaron digestiones Endo Glu-C en las que se mezclaron 0,1 mg de PEG-rhIL-10 en la matriz de formulación con 40 µg de enzima durante 6 horas a 25 ± 2 °C, seguido de la adición de 37 µl de DTT 500 mM durante 1 hora a 37 ± 2 °C. La solución se resolvió luego en una columna Waters XBridge BEH300 C18, de 3,5 mm, 2,1 mm X 100 mm (Waters Corp, Milford, MA), un sistema HPLC equipado con detección UV, autoinyector, bomba analítica de gradiente, calentador de columna y un sistema adecuado de recolección de datos. Las masas peptídicas se determinaron mediante LC/MS. Las masas de digestión peptídicas teóricas eran congruentes con las masas peptídicas observadas, lo que indica una digestión del 100% y que ilustraban que el procedimiento era adecuado para una prueba de identidad.

El procedimiento de detección de péptidos anteriormente descrito se calificó luego con un procedimiento de detección basado en UV que emplea el paquete de software Empower (Empower Software Solutions; Orlando, FL). en comparación con la metodología LC/MS, el procedimiento basado en UV fue más robusto y transferible.

5 A continuación, se digirieron PEG-rhIL-10 y rhIL-10 con Endo Glu-Ct, y se generó un mapa detectado por UV. Como se representa en el cromatograma expuesto en la Fig. 4, la digestión con Endo Glu-C produjo picos discretos en los que el mapa peptídico de rhIL-10 (traza oscura) y PEG-rhIL-10 (traza ligera) produjo trazas sustancialmente similares. Por lo tanto, la Endo Glu-C peptidasa proporcionó resultados robustos en cuanto a la identidad (p. ej., secuencia de aminoácidos) y estabilidad de composiciones que comprenden interleucina 10 pegilada y otras moléculas relacionadas con interleucina 10 pegilada.

10 En el presente documento se describen realizaciones particulares de la presente invención, que incluyen el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Después de leer la descripción anterior, las variaciones de las realizaciones desveladas pueden ser evidentes para los individuos que trabajan en la técnica, y se espera que los expertos en la técnica puedan emplear dichas variaciones según sea adecuado.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> ARMO BioSciences, Inc.
Mumm, John
VAN VLASSELAER, PETER

<120> PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA IDENTIDAD Y LA ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS

<130> ARMO-008WO

20 <150> US 61/836.034
<151> 17/06/2013

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 688 206 T3

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
 20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
 35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
 50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
 85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
 100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
 115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
 130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
 145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
 165 170 175

Arg Asn

<210> 2
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

5

ES 2 688 206 T3

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 1 5 10 15

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 20 25 30

Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 35 40 45

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 50 55 60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 85 90 95

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 100 105 110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
 115 120 125

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
 130 135 140

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 145 150 155 160

<210> 3

<211> 274

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 3

ES 2 688 206 T3

Val Ile Leu Pro Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn
1 5 10 15

Gly His Tyr Ala Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly
20 25 30

Thr Phe Ile Ala Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr
35 40 45

Asn Lys His Val Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys
50 55 60

Ala Phe Pro Ser Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe
65 70 75 80

Thr Ala Glu Gln Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile
85 90 95

Val Lys Phe Ser Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val
100 105 110

Lys Pro Ala Thr Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn
115 120 125

Ile Thr Val Thr Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp
130 135 140

Glu Ser Lys Gly Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr
145 150 155 160

Asp Leu Ser Thr Thr Gly Gly Asn Ser Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu
165 170 175

Lys Asn Glu Val Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe
180 185 190

Asn Gly Ala Val Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln
195 200 205

Asn Ile Glu Asp Ile His Phe Ala Asn Asp Asp Gln Pro Asn Asn Pro
210 215 220

Asp Asn Pro Asp Asn Pro Asn Asn Pro Asp Asn Pro Asn Asn Pro Asp
225 230 235 240

ES 2 688 206 T3

Glu Pro Asn Asn Pro Asp Asn Pro Asn Asn Pro Asp Asn Pro Asp Asn
 245 250 255

Gly Asp Asn Asn Asn Ser Asp Asn Pro Asp Ala Ala His His His His
 260 265 270

His His

5 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

10 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Polipéptido sintético
 <400> 5

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
 1 5 10

20 <210> 6
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 6

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
 1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

25 <210> 7
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 7

ES 2 688 206 T3

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala
1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu
20 25 30

Ala

5 <210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 8

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

10 <210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Polipéptido sintético

<400> 9

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5

20 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 10

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg
1 5

25 <210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 11

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala
1 5 10

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 12

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

10 <210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 15 <400> 13

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5 10

20 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> los aminoácidos 1-5 pueden repetirse n veces en las que n es un número entero de al menos uno
 <400> 14

Gly Ser Gly Gly Ser
 1 5

30 <210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(4)
 <223> los aminoácidos 1-4 pueden repetirse n veces en las que n es un número entero de al menos uno
 <400> 15

40 Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 16
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 5 <400> 16

Gly Gly Ser Gly
 1

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 17

Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5

<210> 18
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Polipéptido sintético
 <400> 18

Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5

<210> 19
 <211> 5
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 19

Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5

<210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Polipéptido sintético
 <400> 20

ES 2 688 206 T3

Gly Gly Gly Ser Gly
1 5

5 <210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 21

Gly Ser Ser Ser Gly
1 5

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para confirmar la secuencia de aminoácidos de una interleucina 10 pegilada, que comprende fragmentar una PEG-IL-10 de prueba con una glutamil endopeptidasa (Endo Glu-C), para producir una pluralidad de péptidos de prueba; separar los miembros peptídicos de la pluralidad de péptidos de prueba por cromatografía; analizar dichos miembros peptídicos separados usando espectroscopía de absorción ultravioleta para proporcionar un cromatograma del PEG-IL-10 de prueba; comparar el cromatograma del PEG-IL-10 de prueba con un patrón de referencia, separando dicho cromatograma del patrón de referencia generado mediante la digestión con Endo Glu-C de un PEG-IL-10 de un patrón de referencia, de los miembros peptídicos del patrón de referencia por cromatografía, y analizar dichos miembros peptídicos separados usando espectroscopía de absorción ultravioleta para proporcionar el cromatograma del patrón de referencia; en el que la secuencia de aminoácidos del PEG-IL-10 de prueba se confirma mediante la equivalencia sustancial del tiempo de retención de los picos del cromatograma del PEG-IL-10 de prueba y el cromatograma del patrón de referencia.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la PEG-IL-10 es PEG-hIL-10.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se confirma la secuencia de aminoácidos de la interleucina 10 pegilada; la interleucina 10 pegilada es una interleucina 10 humana pegilada (PEG-hIL-10), y el procedimiento comprende:
 - a) digerir una hPEG-IL-10 de prueba con Endo Glu -C para producir una pluralidad de péptidos de prueba, y
 - b) comparar la pluralidad de péptidos de prueba a un patrón de referencia; en el que la secuencia de aminoácidos de la interleucina 10 humana pegilada se confirma demostrando la equivalencia de la pluralidad de péptidos de prueba y el patrón de referencia, y en el que el patrón de referencia es PEG-hIL-10.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el patrón de referencia comprende una pluralidad de péptidos de referencia generados a partir de la fragmentación de una PEG-IL-10 de referencia o una IL-10 de referencia.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cromatografía es cromatografía líquida de alta presión de fase inversa.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar la masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de péptidos de prueba mediante espectrometría de masas, opcionalmente el que la espectrometría de masas se selecciona de entre el grupo que consiste en ESI-MS, ESI-MS/MS, ESI-TOF MS, MALDI MS y MALDI-TOF MS.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de péptidos de referencia se ha determinado mediante espectrometría de masas.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la masa absoluta de cada miembro de la pluralidad de péptidos de referencia se almacena en una base de datos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la etapa b) se realiza usando un ordenador.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la PEG-IL-10 de prueba comprende al menos una molécula de PEG unida covalentemente a al menos un resto de aminoácido de al menos una subunidad de IL-10, o comprende una mezcla de IL-10 mono-pegilada y di-pegilada.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el componente de PEG de la PEG-IL-10 tiene (i) una masa molecular de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 20 kDa; (ii) una masa molecular mayor que aproximadamente 20 kDa, o (iii) una masa molecular de al menos aproximadamente 30 kD.

FIG. 1A

Completa de IL-10 humana (NP_000563)

MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMK
DQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLK
TLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKI
RN

FIG. 1B

IL-10 humana madura (BC104252)

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGY
LGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTTLRLRLRRCHRFLPCENK
KAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

Secuencia de proteínas de endoproteínasa GluC:

1 VILPNNDRHQITDITTINGHYAPVTYIQVEAPTGTFFIASGVVVGKDTLLTNKHVVVDATHGDP
61 HALKAFPSAINQDNYPNGGFTAEQITKYSGEGDLAIVKFSPNEQNKHIGE VVKPATMSNN
121 AETQVNQNI TVTGYPGDKPVATMWESKGI TYLKGEAMQYDLSTTGGNSGSPVFNEKNEV
181 IGIHWGGVPNEFNGAVFINENVRNFLKQNI EDIHFANDDQPNPDNDPNPNNPDNPNPD
241 EPNNPDNPNPDNDNGDNNNSDNDPDAHHHHH

FIG. 2

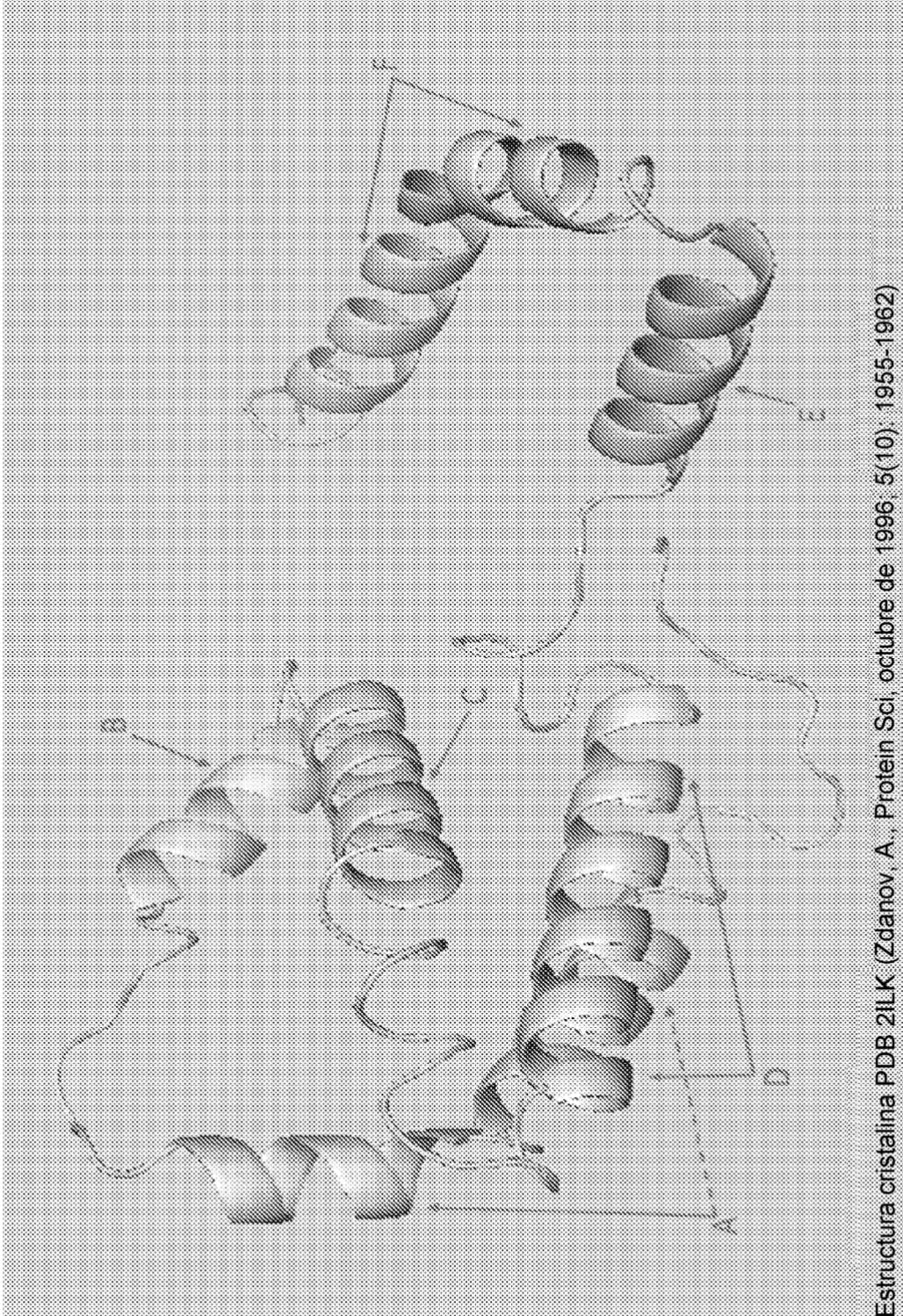


FIG. 3A

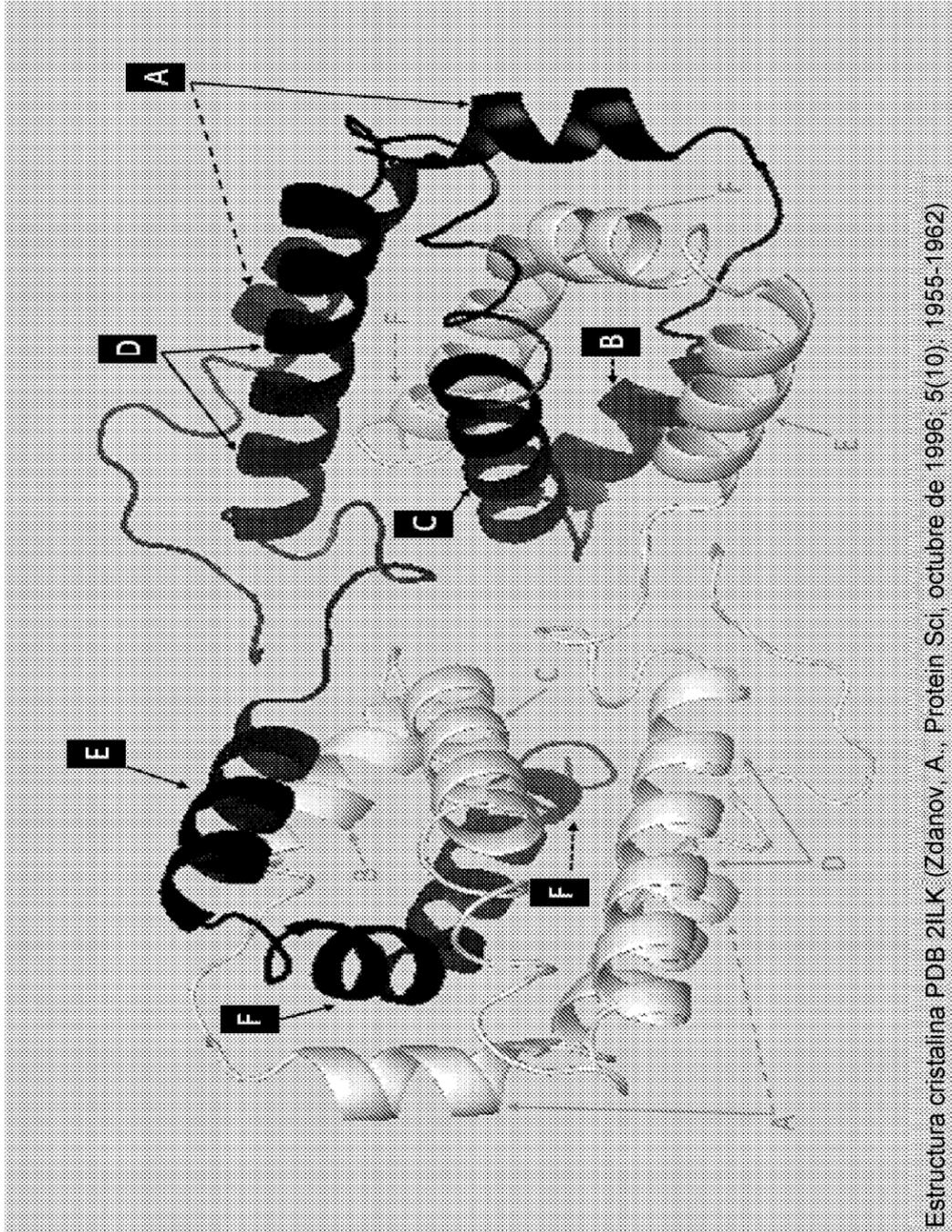


FIG. 3B

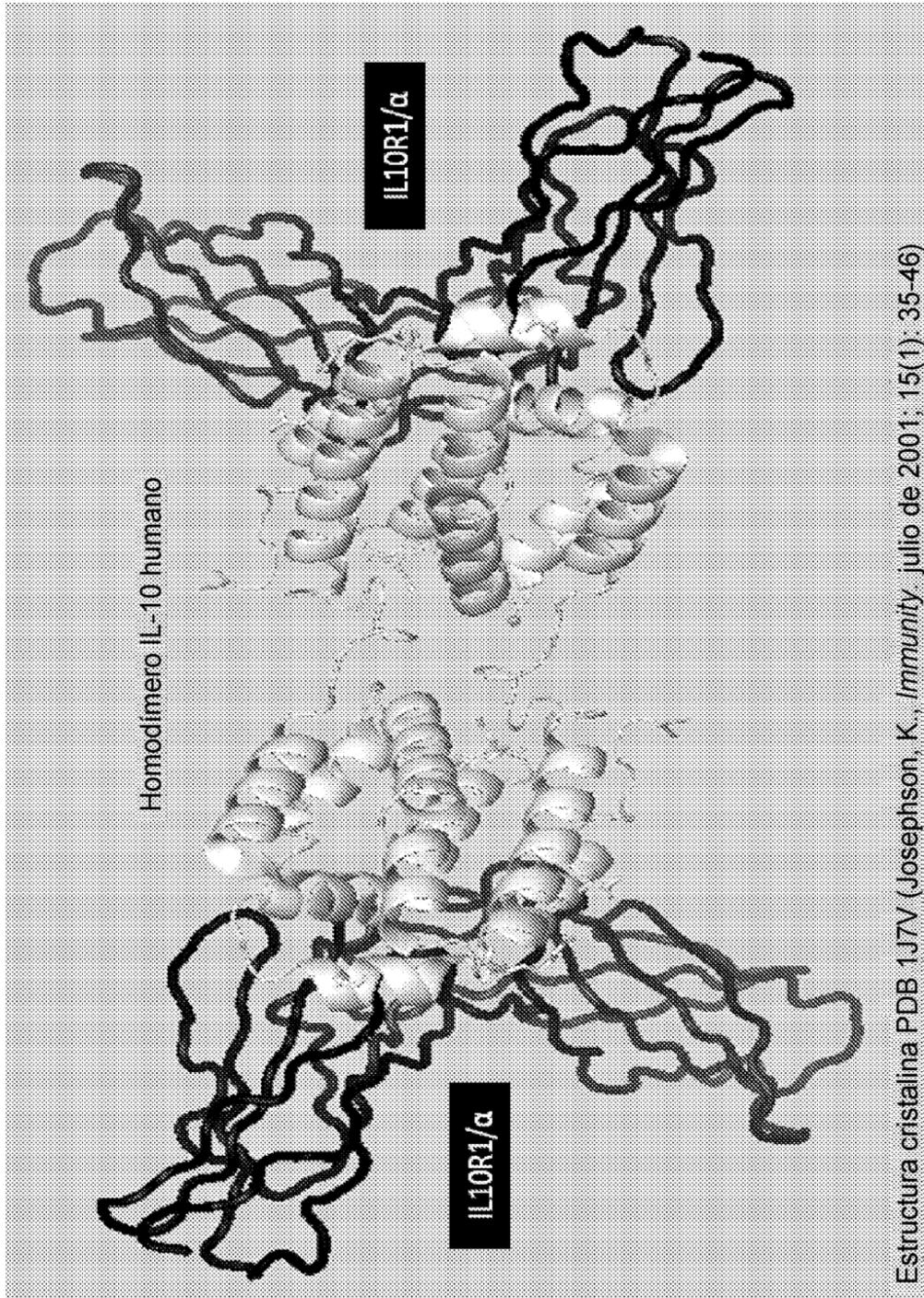


FIG.3C

Nombre del conjunto de muestra: KC_EndoGluC_NB13_017_38
id del conjunto de muestra 4260

Cromatogramas:

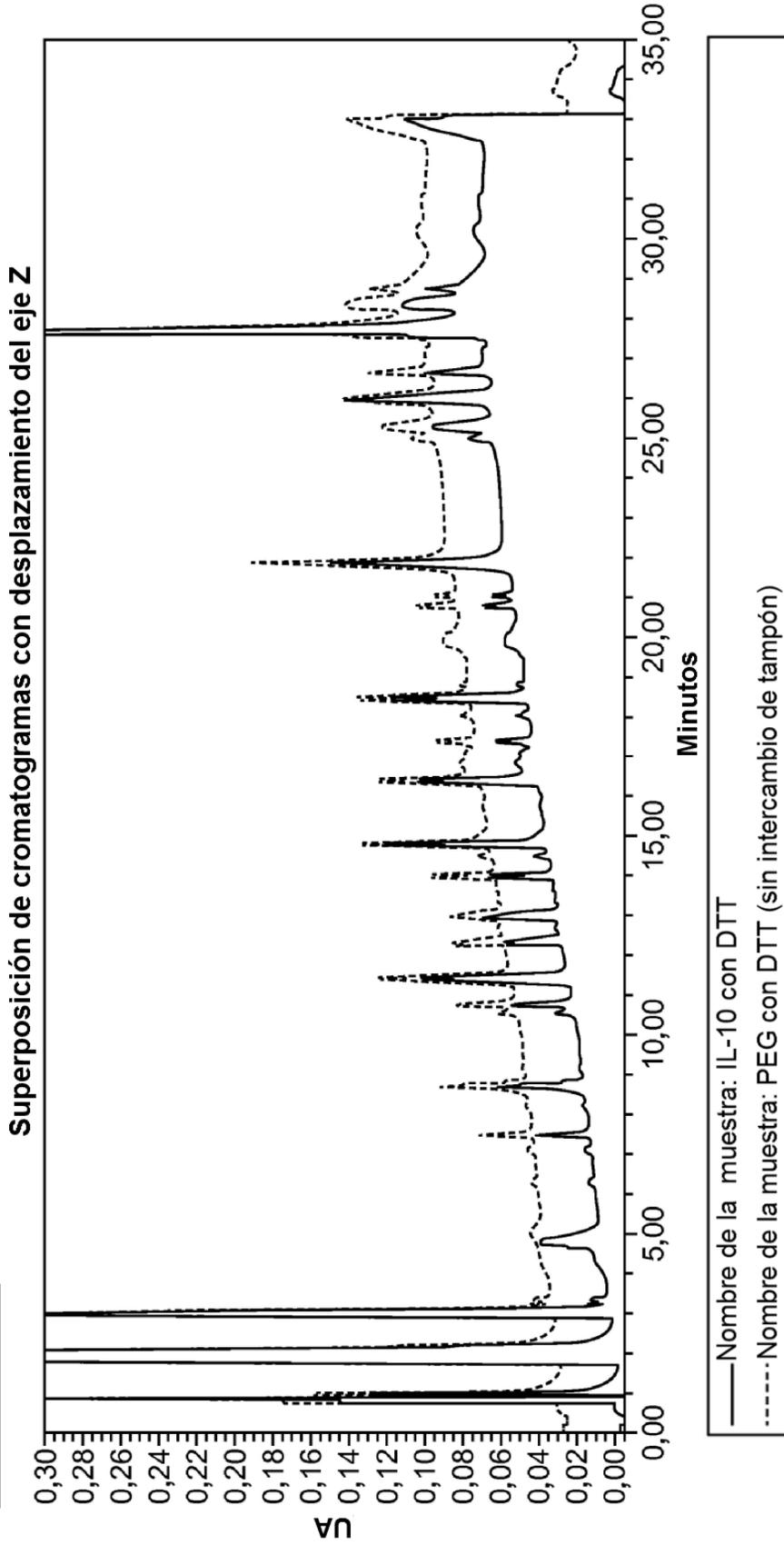


FIG. 4