



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 340 494**

51 Int. Cl.:
C07K 14/54 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04759472 .6**
96 Fecha de presentación : **13.04.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1613274**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

54 Título: **Mutantes de sustitución de IL-18 humana y sus conjugados.**

30 Prioridad: **15.04.2003 US 462947 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.06.2010

73 Titular/es: **GlaxoSmithKline L.L.C.**
One Franklin Plaza 200 North 16th Street
Philadelphia, Pennsylvania 19102, US

72 Inventor/es: **Bam, Narendra, B.;**
Bongers, Jacob, S.;
Kirkpatrick, Robert, B.;
Janson, Cheryl, A.;
Johanson, Kyung, O.;
Jonak, Zdenka, Ludmila;
Qiu, Xiayang y
Yeh, Ping-Yang

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 340 494 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

Mutantes de sustitución de IL-18 humana y sus conjugados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la conjugación de proteínas con especificidad de sitio. Más específicamente, la presente invención se refiere a la conjugación de polímeros solubles en agua con mutantes de sustitución de polipéptidos de la interleucina-18 humana (en el presente documento "IL-18").

10

Antecedentes de la invención

La unión covalente de compuestos biológicamente activos a polímeros solubles en agua es un procedimiento para la alteración y el control de la biodistribución, farmacocinética y, con frecuencia, toxicidad de estos compuestos (Duncan, R. y Kopecek, J. (1984) *Adv. Polym. Sci.* 57: 53-101). Para conseguir estos efectos se han usado muchos polímeros solubles en agua tales como poli(ácido siálico), dextrano, poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (PHP-MA), poli(N-vinilpirrolidona) (PVP), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(etilenglicol-co-propilenglicol), poli(N-acrilolil morfolina) (PACM) y poli(etilenglicol) (PEG) (Powell, G. M. (1980) *Polyethylene glycol*. En R.L. Davidson (Ed.) *HANDBOOK OF WATER SOLUBLE GUMS AND RESINS*: McGraw-Hill, New York, capítulo 18). El PEG posee una serie ideal de propiedades: una toxicidad muy baja (Pang, S. N. J. (1993) *J. Am. Coll. Toxicol.* 12: 429-456) excelente solubilidad en solución acuosa (Powell, mencionado anteriormente), baja inmunogenicidad y antigenicidad (Dreborg, S. y Akerblom, E. B. (1990) *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6: 315-365). En la bibliografía científica se han descrito agentes terapéuticos constituidos por una proteína conjugada con PEG o "PEGilados", que contienen una sola o múltiples cadenas de polietilenglicol en la proteína (Clark, R., y col. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 21969-21977; Hershfield, M. S. (1997) *Biochemistry and immunology of poly(ethylene glycol)-modified adenosine deaminase (PEG-ADA)*. In J. M. Harris y S. Zalipsky (Eds) *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, p145-154; Olson, K., y col. (1997) *Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)ylated human growth hormone antagonist*. En J. M. Harris y S. Zalipsky (Eds) *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, p170-181).

Las proteínas conjugadas tienen numerosas ventajas con respecto a sus homólogos no modificados. Por ejemplo, la modificación con PEG ha prolongado la semivida plasmática de muchas proteínas (Francis, G.E., y col. (1992) *PEG-modified proteins*. En: *STABILITY OF PROTEIN PHARMACEUTICALS: in vivo PATHWAYS OF DEGRADATION AND STRATEGIES FOR PROTEIN STABILIZATION* (ed. por T.J. Ahern y M. Manning). Plenum Press, New York). En la base de este aumento están implicados varios factores. El mayor tamaño del conjugado modificado con PEG reduce la filtración glomerular cuando se excede el umbral de 70 kD (Futertges, F. y Abuchowski, A. (1990) *J. Controlled Release* 11: 139-148). También se reduce la eliminación por el sistema reticuloendotelial a través de receptores de carbohidrato e interacciones proteína-receptor (Beauchamp, C.O., y col. (1983) *Anal. Biochem.* 131: 25-33). La reducción de la proteólisis (Chiu, H.C., y col. (1994) *J. Bioact. Comp. Polym.* 9: 388-410) también puede contribuir a una mayor semivida. También se reducen la antigenicidad e inmunogenicidad (Nucci, M. L., y col. (1991) *Adv. Drug Del. Rev.* 6: 133-151) y esto explica la reducción de las reacciones que ponen en peligro la vida después de una dosificación repetida. La combinación de todos estos factores conduce a una mayor biodisponibilidad *in vivo* (Katre, N. V., y col. (1987) *PNAS USA* 84: 1487-1491; Hershfield, M. S., y col. (1987) *New England Journal of Medicine* 316: 589-596) y esto podría ser muy importante en el uso de aductos de PEG-citocina como agentes farmacológicos. La dosis puede reducirse (para aliviar la toxicidad) y puede desarrollarse un programa de dosificación más conveniente.

La IL-18 es un monómero no glicosilado de 18 Kd con una estructura primaria relacionada muy estrechamente con la IL-1 α de la subfamilia IL-1 β -trefoil. El ADNc de la IL-18 murina y humana codifica una proteína precursora constituida por 192 y 193 aminoácidos, respectivamente. La homología entre la IL-18 humana y murina es del 65%. La Pro-IL-18 requiere procesamiento por caspasas, tales como ICE (caspasa-1) o caspasa-4, para dar la proteína madura bioactiva (157 aminoácidos) para mediar la actividad biológica. La actividad de la IL-18 está mediada por un complejo de receptor de IL-18 (IL-18R) (constituido por una cadena de unión (IL-18R α) y una cadena de señalización (IL-18R β)). Las actividades biológicas de la IL-18 que respaldan su potencial terapéutico para inmunoterapia de tumores incluyen la inducción y producción de IFN γ y GM-CSF, la potenciación y promoción de la actividad citolítica de las células NK y la diferenciación de células T vírgenes en células Th1. En respuesta a la IL-18, se generan linfocitos T citotóxicos (CTL) y células de memoria que presentan una potente actividad antitumoral. Otras funciones reguladoras incluyen la regulación positiva de la expresión del ligando Fas funcional (FasL) en células NK y T (lo que sugiere que la actividad antitumoral de la IL-18 está mediada en parte por la interacción de Fas-FasL, que induce la apoptosis tumoral); la activación de monocitos/macrófagos y células B y anti-angiogénesis.

La proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) es una proteína circulante soluble natural que se ha descrito recientemente como antagonista de la IL-18. La IL-18BP no tiene homología significativa con el receptor de IL-18, ya que contiene un solo supuesto dominio de Ig que tiene una homología muy limitada con el tercer dominio de Ig del receptor de IL-1 de tipo II. Puede encontrarse una homología mucho mayor con IL-18BP en una familia de proteínas codificadas por varios poxvirus (virus de la viruela porcina, virus de la viruela bovina, virus variola, virus del *molluscum contagiosum* y virus

de la ectromelia). Los poxvirus codifican receptores señuelo de muchas citocinas y estos receptores son instrumentales en la elusión viral de respuestas inmunes. Como la IL-18 es una de las primeras señales que conducen a la producción de IFN γ por células Th I, el bloqueo de la actividad de la IL-18 por IL-18BP puede estar implicado en la regulación negativa de una de las primeras fases de la respuesta inmune. Los niveles elevados de IL-18BP podrían ser perjudiciales para la eficacia de la terapia con IL-18 recombinante.

Como único agente, una forma recombinante de la IL-18 murina estimuló el sistema inmune murino, dando como resultado regresiones tumorales parciales y completas y/o la inducción de memoria inmunológica en diversos modelos tumorales establecidos. En combinación con agentes quimioterapéuticos usados comúnmente en situación clínica, tal como el topotecan, la IL18 murina demostró un efecto sinérgico que daba como resultado mayor eficacia a nivel local y/o sistémico en diversos modelos de tumor establecidos. Se investigaron posibles biomarcadores de la actividad de IL-18 para correlacionarlos con acontecimientos tempranos de la activación inmune mediada por IL-18, junto con estudios de envergadura sobre la toxicología y farmacocinética de las formas recombinantes de IL-18 murina e IL-18 humana de la IL-18. Estos datos preclínicos respaldan el desarrollo clínico de la IL-18 humana como una nueva forma de inmunoterapia, o como un adyuvante para vacunas para cánceres, o un adyuvante de agentes citotóxicos y otros agentes biológicos tales como el topotecan y la IL-2 respectivamente, para el tratamiento de pacientes que padecen diferentes tipos de cánceres.

El documento EP-A-845 530 desvela un mutante de IL-18 que tiene al menos uno de los restos de cisteína en las posiciones 36, 68, 76 y 127 sustituidas por preferentemente un resto de serina o un resto de alanina.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un mutante de sustitución de IL-18 humana, en el que dicho mutante comprende de tres a cinco sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la SEC ID N°: 1, siendo dichas sustituciones de tres a cinco restos aminoácidos elegidos del grupo de: la cisteína en el resto 38, la cisteína en el resto 68, la cisteína en el resto 76, la asparagina en el resto 78, el ácido glutámico en el resto 121, la cisteína en el resto 127, la leucina en el resto 144 y el ácido aspártico en el resto 157, y en el que dicho mutante contiene al menos:

- (a) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de asparagina en el resto 78 (SEC ID N°: 5),
- (b) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de ácido glutámico en el resto 121 (SEC ID N°: 6),
- (c) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de leucina en el resto 144 (SEC ID N°: 7) o
- (d) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de ácido aspártico en el resto 157 (SEC ID N°: 8).

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición biológicamente activa que comprende un polipéptido conjugado con un polímero soluble en agua, en la que el polipéptido es un mutante de sustitución de IL-18 humana elegido entre el grupo de: la SEC ID N°: 5, la SEC ID N°: 6, la SEC ID N°: 7, la SEC ID N°: 8, la SEC ID N°: 9 y la SEC ID N°: 10.

En otro aspecto, se proporciona el uso de una composición de acuerdo con la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cánceres.

En otro aspecto, se proporciona una composición de acuerdo con la invención para uso en el tratamiento de cánceres.

El cáncer puede ser un tumor inmunosensible elegido entre el grupo de: carcinoma de células renales, mieloma, linfoma y melanoma.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-18 humana nativa (SEC ID N°: 1).

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-18 murina (SEC ID N°: 2).

La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de His Pro IL-18 humana (SEC ID N°: 3).

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S (SEC ID N°: 4).

ES 2 340 494 T3

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S, C68D, N78C (SEC ID N°: 5).

La Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S, C68D, E121C (SEC ID N°: 6).

La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7).

La Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8).

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S, C68S, L144C (SEC ID N°: 9).

La Figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos del mutante de sustitución, IL-18 humana C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 10).

La Figura 11 muestra un cromatograma de RP-HPLC típico de una mezcla de reacción después de la PEGilación de un mutante de sustitución de IL-18 humana (C38S, C68S, D157C) (SEC ID N°: 10).

La Figura 12 muestra un mapa tríptico de RP-HPLC para la IL-18 humana de tipo silvestre que muestra picos marcados para péptidos indicados en la Tabla 2. Los péptidos se identificaron por CL/EM de ionización por electronebulización. Detección a 215 y 280 nm.

La Figura 13 muestra el mapeo tríptico del mutante de sustitución de IL-18 humana C38S, C68S, L144C (SEC ID N°: 9).

La Figura 14 muestra el mapeo tríptico de la IL-18 humana de tipo silvestre (SEC ID N°: 1) y el producto mono-PEGilado (20K) purificado.

La Figura 15 muestra el mapeo tríptico del mutante de sustitución de IL-18 humana monoPEG^{20k} C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 10).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de IL-18 humana, en las que el polipéptido está conjugado con un polímero soluble en agua. El presente polipéptido conjugado demuestra propiedades biológicas inesperadas en comparación con el polipéptido no conjugado correspondiente.

La inmunoterapia puede representar una adición valiosa al arsenal de tratamientos de la oncología, con la posibilidad de mostrar un efecto antitumoral asociado con menos efectos secundarios y para mejorar la calidad de vida de los pacientes. La interleucina-18 (IL-18) se está estudiando actualmente como una nueva forma de inmunoterapia tumoral para el carcinoma de células renales y el melanoma.

Estos dos tipos de tumores se consideran inmunosensibles y pueden responder a la IL-18 como un solo agente. La combinación de IL-18 con fármacos citotóxicos y otros agentes biológicos ampliará el uso clínico de la IL-18 en diferentes tipos de tumores hematológicos y sólidos.

Las moléculas de IL-18 pegiladas de la invención son variantes de IL-18 que pueden contener de tres a cinco sustituciones de aminoácidos. Estas moléculas tienen mejor farmacocinética (PK), pero lo más importante es que tienen mayores marcadores farmacodinámicos (PD), medidos por inducción y expresión de diferentes citocinas y proteínas solubles. El término "farmacocinética", como se usa en el presente documento, se refiere a la cinética de absorción, distribución y eliminación de fármacos (es decir, el metabolismo y excreción). El término "farmacodinámica", como se usa en el presente documento, se refiere a la relación entre la concentración de fármaco en el sitio o sitios de acción (en el caso de IL-18, el receptor) y la respuesta farmacológica. Los marcadores PD importantes incluyen cambios, tales como una potenciación y/o aumento del perfil fenotípico de células (por ejemplo, linfocitos) y marcadores de la superficie celular. Las moléculas de IL-18 pegiladas mostraban menor capacidad de formar complejos con la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP). La prevención de la formación de complejos con IL-18BP puede tener un efecto beneficioso en situación clínica, porque la IL-18BP puede ser un posible inhibidor de la actividad de la IL-18. Bufler, y col., PNAS, 99(21): 13723-13728 (2002). Las moléculas de IL-18 pegiladas pueden administrarse con una frecuencia de dosificación reducida, lo cual podría ser muy beneficioso en terapias combinadas con otros agentes biológicos, vacunas o agentes citotóxicos. Lo más importante es que la pegilación podría reducir o eliminar la inmunogenicidad en pacientes tratados.

Algunos ejemplos de los efectos beneficiosos mencionados anteriormente se presentan más adelante en los Ejemplos 7, 8, 9 y 10. El mutante de sustitución de IL-18 que contiene 3 mutaciones (C38S, C68S, D157C) (SEC ID N°: 10)

y un solo PEG 20K con especificidad de sitio unido covalentemente al resto de cisteína C-terminal (posición C157), mostró mejor PK, pero lo más importante es que mostró un aumento de marcadores PD como se mide por la inducción y expresión de CD64 y neopterinina en monos *Cynomolgus* e inducción de IFN γ en ratones. Se hizo un ejemplo de la menor frecuencia de dosificación con igual eficacia antitumoral y con conservación de la memoria inmunológica en el modelo de tumor murino MOPC-315 usando IL-18 pegilada murina (datos no mostrados).

Otros polipéptidos modificados que son útiles en la presente invención son variantes o fragmentos de estas proteínas que comparten la actividad biológica de la proteína IL-18 humana madura (es decir, no modificada). Como se define en la presente memoria, estas variantes incluyen proteínas modificadas también caracterizadas por alteraciones realizadas en la secuencia amino conocida de las proteínas. Estas variantes se caracterizan por tener una secuencia de aminoácidos que difiere de la de la proteína madura en cinco o menos restos. En una realización de la invención, cualquier diferencia en las secuencias de aminoácidos de las proteínas implica sólo sustituciones de aminoácidos conservativas. Se producen sustituciones de aminoácidos conservativas cuando un aminoácido tiene sustancialmente la misma carga que el aminoácido al que sustituye y la sustitución no tiene ningún efecto significativo sobre la conformación local de la proteína o su actividad biológica. Como alternativa, pueden preferirse ciertos cambios tales como la introducción de un cierto aminoácido en la secuencia que puede alterar la estabilidad de la proteína, o permitir que se exprese en una célula huésped deseado. Además, en esta técnica se conoce la variación en la secuencia de aminoácidos primaria sin ningún cambio sustancial en la estructura y función de la proteína. Estas variantes se detectan fácilmente y se predicen por algoritmos usados por los expertos en esta materia. Por ejemplo, el algoritmo BLAST bien conocido (Altschul, S. F., y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410; véase también <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) utiliza una matriz de sustitución de aminoácidos para predecir y evaluar sustituciones de aminoácidos tolerables en restos de la secuencia problema. Por consiguiente, el experto en la materia aprecia el ámbito y significado del término “variante” cuando se usa para describir realizaciones equivalentes de una secuencia polipeptídica dada. La expresión “mutante de sustitución”, como se usa en el presente documento, significa una proteína en la que un resto aminoacídico se reemplaza por otro resto aminoacídico. Un “mutante de sustitución” de IL-18 humana, como se usa en el presente documento, significa un mutante que comprende de tres a cinco sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la SEC ID N°: 1, realizándose dichas sustituciones en un resto aminoacídico elegido del grupo de: la cisteína en el resto 38, la cisteína en el resto 68, la cisteína en el resto 76, la asparagina en el resto 78, el ácido glutámico en el resto 121, la cisteína en el resto 127, la leucina en el resto 144 y el ácido aspártico en el resto 157, como se define en la reivindicación 1.

La cisteína es, con mucho, el más reactivo químicamente de los veinte aminoácidos comunes. Los restos de cisteína juegan papeles clave en la estructura y función de las proteínas incluyendo la formación de puentes disulfuro, la química de sitios activos, la coordinación con iones metálicos, la unión a óxido nítrico (NO), etc. Por lo tanto, las cisteínas se encuentran entre los aminoácidos más conservados en la secuencia del genoma. La IL-18 humana contiene cuatro sulfhidrilos de cisteína sin funciones estructurales evidentes u otras funciones biológicas. Las cisteínas 38 y 68 se exponen con disolvente en la superficie de la molécula de IL-18 como se muestra por muchas observaciones experimentales. Estas observaciones incluyen: aductos de disulfuro mixtos con 2-mercaptoetanol durante la purificación (pero, por supuesto, sin ditiotretitol), biotinizaciones muy selectivas y PEGilaciones de estas dos cisteínas, y su tendencia a experimentar oxidación por el aire y a formar un puente disulfuro intramolecular 36-38 además de “dímeros” unidos por puentes disulfuro intermoleculares a mayores concentraciones de IL-18. Estas reacciones de formación de puentes disulfuro pueden acelerarse por piridil disulfuro, glutatión y otros catalizadores de intercambio de disulfuro. Las cisteínas 76 y 127, por otra parte, son relativamente inertes desde el punto de vista químico en comparación con las cisteínas 38 y 68. De esta manera, las cisteínas 76 y 127 no se exponen con disolvente, sino que están escondidas dentro de la molécula de IL-18 plegada de forma similar a las dos cisteínas escondidas en IL-1beta y están localizadas en posiciones de la secuencia similares a otros miembros de la familia de la IL-1 (Kumar, y col., *J. Biol. Chem.*, 275: 10308 (2000); Smith, y col., *J. Biol. Chem.*, 275: 1169-1175 (2000)).

Las disposiciones y reactividades de las cuatro cisteínas en IL-18 tienen un parecido sorprendente con las cuatro cisteínas presentes en la citocina β -trefoil, el factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF-2). Los FGF son una familia de mitógenos homólogos de proteína de unión a heparina que se han estudiado considerablemente y se han desarrollado para la curación de heridas y otras indicaciones terapéuticas (Ortega, y col., *J. Biol. Chem.*, 266: 5842-5846 (1991); Tsai, y col., *Pharm. Res.*, 10: 649-659 (1993)). Tanto la hIL-18 como el hFGF-2 son proteínas β -trefoil; estas dos proteínas contienen dos cisteínas expuestas con disolvente y dos cisteínas escondidas; las dos tienen bajas temperaturas de fusión justo por encima de la temperatura fisiológica ($T_m = 40-50^\circ\text{C}$) característica de muchas β -trefoils, y las dos proteínas muestran una rápida eliminación PD/PK de actividad. Como se ha indicado por un investigador (Estape, y col., *Biochem. J.*, 335: 343-349 (1998)), “hFGF-2 se conoce como una proteína con fama de ser inestable”. La semivida *in vivo* de FGF-1 aumenta hasta 10 veces por unión específica a heparina, un polisacárido sulfatado polianiónico. Además de estabilizar al FGF, la heparina también juega un papel clave en la unión de FGF al receptor de FGF (Pellegrini, y col., *Nature*, 407: 1029-1034 (2000)). No se sabe si las otras citocinas β -trefoil tienen “ligandos estabilizadores” similares, aunque Kobata y colaboradores recientemente informaron sobre interacciones de unión específicas de IL-1beta con polisacáridos sulfatados (Tandai-Hiruma, y col., *J. Biol. Chem.*, 274: 459-4466 (1999)).

Las cisteínas presentes en FGF se han estudiado a fondo por cristalografía y técnicas biofísicas tanto con respecto al FGF nativo como a las muteínas de cisteína-a-serina. La modificación química de las dos cisteínas expuestas por disolvente en hFGF-2 o el reemplazo de estas cisteínas por serinas por mutagénesis dirigida elimina la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares y aumenta en gran medida la estabilidad de la actividad mitogénica de

ES 2 340 494 T3

FGF (Seno, y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151: 701-708 (1988)). Recientemente, los investigadores han propuesto que las cisteínas en los FGF están conservadas en la secuencia precisamente para formar puentes disulfuro, con lo que se inactiva irreversiblemente la proteína y se limita la duración *in vivo* de estas potentes citocinas (Culajay, y col., *Biochemistry*, 39: 7153-7158 (2000)). Culajay, y col., mencionado anteriormente, describe datos preliminares *in vitro* que sugieren un mecanismo regulador de acumulación similar para la IL-18 en el que está implicada la química de sulfhidrilo de cisteínas.

Las soluciones de hIL-18 tamponadas (fosfato sódico 0,10 M, pH 7,0) muestran una acumulación inicial de una forma con puentes disulfuro intermoleculares 38-68 de IL-18 seguida de la aparición de una forma con dobles puentes 38-68, 76-127 después del reposo durante una noche a temperatura ambiente y a 5°C. Los datos muestran una acumulación inicial de una forma con puente disulfuro intramolecular 38-68 de IL-18 seguida de la aparición de una forma con dobles puentes 38-68, 76-127. La evolución en el tiempo inicial de estas reacciones de oxidación con aire es coherente con una reacción secuencial del tipo A→B→C, es decir, una acumulación inicial de la IL-18 con puentes 38-68 seguida de su conversión en la IL-18 con puentes dobles 38-68, 76-127. Los emparejamientos disulfuro en los productos de reacción se determinaron por mapeo triptico y espectrometría de masas de los picos aislados. Es interesante que la forma inicial de 38-68 sea más estable a 5°C que a temperatura ambiente. La acumulación de este producto intermedio es mucho mayor a 5°C, mientras que las proporciones de reducción del material de partida de IL-18 son aproximadamente equivalentes a las dos temperaturas. Excluyendo las posibles influencias de las concentraciones ambientales de oxígeno disuelto a estas dos temperaturas, los datos indican que la forma con puentes 38-68 es térmicamente inestable con respecto al producto con puentes dobles. Los productos pueden convertirse de nuevo en el material de partida por reducción con ditioneitol (DTT).

El polipéptido del presente documento también puede aparecer como una forma multimérica de la proteína madura y/o modificada útil en la presente invención, por ejemplo, un dímero, trímero, tetrámero u otra forma agregada. Estas formas multiméricas pueden prepararse por asociación física, síntesis química o expresión recombinante y pueden contener citocinas producidas por una combinación de técnicas sintéticas y recombinantes como se detalla más adelante. Pueden formarse multímeros de forma natural tras la expresión o pueden construirse en estas formas múltiples. Las citocinas multiméricas pueden incluir multímeros de la misma citocina modificada. Otro multímero puede formarse por la agregación de diferentes proteínas modificadas. Otro multímero se forma por la agregación de una citocina modificada de la presente invención y una citocina madura conocida. Preferentemente, un dímero o multímero útil en la invención contendría al menos una proteína desamino citocina y al menos otra citocina u otra proteína caracterizada por tener el mismo tipo de actividad biológica. Esta otra proteína puede ser una desamino citocina adicional u otra proteína conocida.

Los mutantes de sustitución de IL-18 humana de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por cualquiera de varios procedimientos descritos más adelante. Estos restos polipeptídicos pueden prepararse por la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida de Merrifield ((1964) *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149). Como alternativa, pueden emplearse de forma satisfactoria procedimientos de síntesis de péptidos en solución conocidos en la técnica. Pueden usarse los procedimientos de síntesis de péptidos expuestos en términos generales en J. M. Stewart y J. D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Company, Rockford, IL (1984) o M. Bodansky, Y. A. Klausner y M. A. Ondetti, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Inc., New York, NY (1976) para producir los péptidos de la presente invención.

Pueden obtenerse polipéptidos de IL-18 humana modificados a partir de la IL-18 madura por digestión enzimática de la IL-18 madura con una enzima adecuada (véase, por ejemplo, Oravec, T. y col. (1997) *J. Exp. Med.* 186: 1865; Proost, P. y col. (1998) *FEBS Letters* 432: 73; Shioda, T. y col. (1998) *PNAS USA* 95: 6331; y Walter, R. y col. (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 30: 111). Además, pueden incorporarse aminoácidos modificados en la cadena polipeptídica en crecimiento durante la síntesis de péptidos (M. Hershfield, M. y col. (1991) *PNAS* 88: 7185-7189; Felix, A. M. (1997) En J. M. Harris y S. Zalipsky (Eds) *Poly(ethylene glycol): Chemistry and Biological Applications*. American Chemical Society, Washington, DC, p218-238). Estos restos aminoacídicos modificados pueden elegirse para facilitar la conjugación covalente de polímeros solubles en agua. Además, pueden sintetizarse polipéptidos variantes en los que se eligen adición, sustitución o delección de aminoácidos para facilitar la posterior conjugación con polímeros. Estos polipéptidos variantes pueden prepararse por síntesis química o por expresión recombinante. Por ejemplo, puede ser deseable la incorporación de restos de cisteína adicionales (por sustitución de restos existentes que no son cisteínas o por adición a uno o los dos extremos) para facilitar el acoplamiento de polímeros a través de los grupos sulfhidrilo (por ejemplo, Kuan, C. T., y col. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 7610-7616; Chilkoti, A., y col. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5: 504-507).

Preferentemente, los polipéptidos de IL-18 humana que son útiles en la presente invención pueden producirse por otras técnicas conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, técnicas de ingeniería genética. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., en *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989). Se conocen sistemas para la clonación y expresión de una proteína seleccionada en un microorganismo o célula deseada, incluyendo, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, células de mamífero, células de insecto y células de levadura, y están disponibles en depósitos y laboratorios privados y públicos y también se pueden obtener a partir de vendedores comerciales.

En una realización de la invención, los polipéptidos de IL-18 humana de la invención se producen por expresión recombinante directa de IL-18. Por ejemplo, la proteína IL-18 humana puede expresarse de forma recombinante por

ES 2 340 494 T3

inserción de su secuencia de ADN codificante en un vector de expresión plasmídico convencional bajo el control de secuencias reguladoras capaces de dirigir la replicación y expresión de la proteína en una célula huésped seleccionada. Rosenberg, A.H., Gene 56, 125-135 (1987).

5 Para la producción recombinante, pueden obtenerse por ingeniería genética células huésped para incorporar sistemas de expresión o partes de los mismos para polipéptidos de IL-18 útiles en la presente invención. La introducción de polinucleótidos que codifican IL-18 humana en células huésped puede realizarse por procedimientos descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales tales como Davis y col. BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1986) y Sambrook, y col., en MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2ª edición, 10 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989). Estos procedimientos incluyen, pero sin limitación: transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, transferencia de amarillo Lucifer por raspado (scrape loading), introducción balística o infección.

15 Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas tales como estreptococos, estafilococos, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insecto tales como células *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK 293 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales.

20 Puede usarse una gran diversidad de sistemas de expresión, por ejemplo, sistemas cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, vaccinia virus, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos 25 de plásmidos y bacteriófagos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan también la expresión de la construcción. Generalmente puede usarse cualquier sistema o vector que pueda mantener, propagar o expresar un polinucleótido para producir un polipéptido en un huésped. La secuencia de nucleótidos apropiada puede insertarse en un sistema de expresión por cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas y rutinarias tales como, por ejemplo, las indicadas en Sambrook y col., mencionado anteriormente. 30 Pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido deseado para permitir la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el medio extracelular. Estas señales pueden ser endógenas para el polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

35 Si el polipéptido se secreta en el medio, el medio puede recuperarse para recuperar y purificar el polipéptido. Si se produce intracelularmente, primero deben lisarse las células antes de recuperar el polipéptido.

Los polipéptidos útiles en la presente invención pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por procedimientos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de 40 interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Más preferentemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución para la purificación. Pueden emplearse técnicas bien conocidas para el repliegamiento de proteínas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o purificación.

45 Los polímeros solubles en agua que son útiles en la presente invención son sustancialmente no antigénicos para evitar una reactividad inmune indeseada hacia la composición de la presente invención. Estos polímeros solubles en agua pueden incluir, pero sin limitación: homopolímeros de polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, poli(N-vinilpirrolidona) poli(alcohol vinílico), poli(etilenglicol-co-propilenglicol), poli(N-2-(hidroxipropil)metacrilamida), poli(ácido siálico), poli(N-acrilil morfolina) y dextrano. Los polímeros adecuados pueden ser de cualquier peso molecular. En una realización de la invención, los polímeros tienen un peso molecular medio comprendido entre aproximadamente 1000 daltons y aproximadamente 100.000 daltons. En una 50 realización alternativa de la invención, los polímeros solubles en agua tienen un peso molecular medio comprendido entre aproximadamente 4000 daltons y aproximadamente 40.000 daltons. En otra realización de la invención, el peso molecular de los polímeros funcionalizados mencionados anteriormente es un miembro elegido entre el grupo de: aproximadamente 20.000 daltons a aproximadamente 30.000 daltons. En una realización adicional de la invención, el polímero funcionalizado mencionado anteriormente tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons.

60 Estos polímeros pueden estar sin sustituir o sustituidos en un extremo con un grupo alquilo. Por ejemplo, pueden ser composiciones de la invención aquéllas en las que el polímero soluble en agua es un homopolímero de polietilenglicol. Los polímeros adecuados para su uso en la presente invención pueden ser ramificados, no ramificados, con forma de estrella o lineales. En una realización de la invención, estas composiciones comprenden un homopolímero lineal de polietilenglicol. En otra realización de la invención, estas composiciones comprenden un homopolímero ramificado de polietilenglicol. Se desvelan polímeros que pueden ser adecuados para su uso en la 65 presente invención en las siguientes patentes, solicitudes de patente y publicaciones: Patentes de Estados Unidos N° 4.097.470, 4.847.325, 5.037.883, 5.252.714, 5.580.853, 5.643.575, 5.672.662, 5.739.208, 5.747.446, 5.824.784, 5.846.951, 5.880.255, 5.919.455, 5.919.758, 5.932.462, 5.985.263, 5.951.974, 5.990.237, 6.042.822, 6.046.30, 6.107.272 y 6.113.906; Publicación de Patente Mundial N° WO 92/16555; Publicaciones de Patente Europea N° EP

ES 2 340 494 T3

727.437, EP 727.438, EP 439.508 y EP 714.402; Zalipsky, S. (1995) *Bioconjugate Chem* 6: 150-165; Gregoriadis, G., y col. (1999) *Pharma Sciences* 9: 61-66. Además, otros polímeros derivatizados o funcionalizados que se han modificado para facilitar la conjugación con polipéptidos y otras sustancias biológicas son adecuados para uso en la presente invención. Por ejemplo, son deseables modificaciones de los polímeros para facilitar la conjugación a través de grupos sulfhidrilo libres presentes en restos de cisteína, o restos carbohidrato. Los polímeros útiles también pueden incluir derivados monometoxi de polietilenglicol (mPEG). Los polímeros funcionalizados que pueden usarse en la presente invención pueden incluir, pero sin limitación: succinimidil propionato de metoxi polietilenglicol; succinimidil butanoato de metoxi polietilenglicol; succinimidil éster de metoxi polietilenglicol carboximetilado; aldehído de metoxi polietilenglicol; hidrazida de metoxi polietilenglicol, yodoacetamida de metoxi polietilenglicol; maleimida de metoxi polietilenglicol; y tresilato de metoxi polietilenglicol.

Las proteínas de IL-18 humana descritas anteriormente pueden conjugarse con el polímero a través de uno o más grupos sulfhidrilo libres que están presentes de forma natural o se introducen por ingeniería genética en la molécula de citocina y permanecen libres después del repliegamiento. El número de moléculas de polímero que se han conjugado con la proteína puede determinarse por diversos procedimientos, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en gel de SDS-PAGE, o cromatografía de exclusión molecular con marcadores moleculares apropiados, espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz (MALDI-MS) (Bullock, J., y col. (1996) *Anal. Chem.* 68: 3258-3264), electroforesis capilar (Kemp, G. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27: 9-17; Robert, M. J. y Harris, J.M. (1998) *J. Pharm. Sci.* 87: 1440-1445). El sitio de unión del polímero puede determinarse por digestión de la proteína en pequeños fragmentos mediante una enzima (por ejemplo tripsina, Glu-C) y separación por cromatografía líquida de fase inversa. Podría compararse un mapa peptídico de la proteína antes y después de la modificación con el polímero y secuenciarse el fragmento con tiempos de elución alterados para determinar la localización o localizaciones de las uniones de los polímeros. Como alternativa, el polímero puede marcarse con fluorescencia o con radiactividad antes del acoplamiento para determinar cuántos moles de polímero marcado se unen por mol de la proteína.

El resto o restos a conjugar pueden ser grupos sulfhidrilo libres en restos de cisteína que normalmente están presentes o se introducen por ingeniería genética en la proteína.

Las condiciones de reacción para realizar la conjugación incluyen además realizar las reacciones de unión anteriores a un pH de aproximadamente 6-9, más preferentemente a pH 6-7 si el grupo reactivo de la proteína es un grupo tiol libre presente en la cisteína o el grupo tioéter presente en la metionina. Usando la estrategia anterior, la proteína está conjugada a través de al menos un grupo reactivo con tiol terminal añadido al polímero. Estos grupos reactivos con tiol incluyen, pero sin limitación: haloacetilo, maleimida, derivados de piridil disulfuro, aziridinas, derivados de acrililo y agentes de arilación. La cantidad de polímero activado intacto empleado es generalmente un exceso de 1 a 10 veces del polímero activado con respecto a la proteína que está en forma monomérica o multimérica (preferentemente dimérica). Generalmente, el procedimiento de reacción implica hacer reaccionar el polímero activado con la proteína en una relación 2 a 1 (entre polímero y proteína). Típicamente, la reacción se realiza en tampón fosfato pH 6,2, NaCl 100 mM a 4°C durante un periodo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 10 horas. Después de la conjugación, la proteína conjugada deseada se recupera y se purifica por cromatografía líquida o similar.

Previamente se ha descrito la conjugación satisfactoria de polímeros solubles en agua con polipéptidos terapéuticos en los documentos US 4.487.325, US 5.824.784 y US 5.951.974.

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de la presente invención, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estos vehículos incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La invención también se refiere a envases y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones mencionadas anteriormente de la invención. Las composiciones de la presente invención pueden emplearse solas o junto con otros compuestos tales como compuestos terapéuticos.

La composición farmacéutica se adaptará a la vía de administración, por ejemplo, por una vía sistémica u oral. Las formas de administración sistémica incluyen inyección, típicamente por inyección intravenosa. Pueden usarse otras vías de inyección tales como subcutánea, intramuscular o intraperitoneal. Los medios alternativos para la administración sistémica incluyen la administración transmucosa y transdérmica usando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Además, si una composición de la presente invención puede formularse en una formulación entérica o encapsulada, también puede ser posible la administración oral. La administración de estas composiciones también puede ser tópica y/o localizada en forma de pomadas, pastas, geles y similares. Otras vías de administración podrían incluir la administración pulmonar o nasal, usando una formulación en solución o en polvo seco.

El intervalo de dosificación requerido depende de la composición precisa de la presente invención, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza del estado del sujeto y el criterio del especialista a cargo del caso. Sin embargo, las dosificaciones adecuadas están en el intervalo de 0,1 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del sujeto. Sin embargo, son de esperar amplias variaciones en la dosificación necesaria en vista de la diversidad de composiciones disponibles y las diferentes eficacias de las diversas rutas de administración. Por ejemplo, sería de esperar que la administración oral

requiriera dosificaciones superiores que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para la optimización, como es bien sabido en la técnica.

5

Ejemplos¹⁾

Ejemplo 1

10 *Predicción de sitios de PEGilación basándose en las estructuras cristalinas de IL-18 humana y murina*

La pegilación de IL-18 humana (SEC ID N°: 1) en la Cys38 y Cys68 (las dos cisteínas nativas expuestas en la superficie) produjo moléculas con baja actividad. Por lo tanto, los presentes inventores intentaron identificar sitios en la IL-18 humana para realizar una mutación a Cys con la posterior pegilación, sin interferir con la actividad biológica deseada.

Se ha resuelto la estructura cristalina de la IL-18 de ratón (Solicitud de Estados Unidos N° 10/640.524, presentada el 13 de agosto de 2003). Es evidente que la IL-18 y la IL-1 β son similares en sus estructuras nucleares aunque difieren en sus bucles superficiales. Es de esperar que la estructura de la IL-18 humana sea muy similar a la estructura de la IL-18 murina debido a la alta homología de secuencia (65% de identidad). Usando la estructura cristalina de la IL-18 murina, pueden mapearse los restos de superficie y de bucles en la IL-18 humana.

Los presentes inventores intentaron pegilar un resto en la punta de un bucle de superficie flexible de la IL-18 que no está implicado en interacciones con el receptor de IL-18. Los presentes inventores suponen que la IL-18 interaccionará con su receptor de forma similar a la interacción de IL-1 β :receptor de IL-1 β . Se superpusieron las coordenadas de la IL-18 de ratón sobre las coordenadas de la IL-1 β humana del complejo de IL-1 β humana con el receptor de IL-1 β (Vigers, y col. en Nature 386: 190, 1997; PDB code 1ITB) en un solapamiento tridimensional. También se usaron las coordenadas del complejo del receptor de IL-1 β humana con el antagonista del receptor de IL-1 β (Schreuder, y col., en Nature 386: 194, 1997; PDB code 1IRA) para modelar el modo de unión de IL-18 a su receptor. A partir de estos solapamientos, los presentes inventores seleccionaron Asn78, Glu121, Leu144 y el extremo C como los sitios que tenían menos probabilidad de interaccionar con el receptor y, por lo tanto, como buenos sitios para la mutación a cisteína y la posterior unión de polietilenglicol para obtener la IL-18 pegilada. El aminoácido C-terminal (D157) y la Leu144 de la IL-18 humana se mutaron por separado a Cys y después se pegilaron. Las dos moléculas de IL-18 modificadas resultantes presentaron actividad.

35

¹⁾ Se presentan ejemplos no relacionados con la materia reivindicada con fines ilustrativos.

Ejemplo 2

40

Diseños de mutación de sustitución

Basándose en la estructura cristalina de la IL-18 murina (Solicitud de Estados Unidos N° 10/640.524, presentada el 13 de agosto de 2003) y confirmada posteriormente por la estructura cristalina de la IL-18 humana nativa (Solicitud PCT WO 03/089.653 publicada el 30 de octubre de 2003) se ideó una estrategia de pegilación por la que se une monoPEG a cisteínas libres alejadas de las regiones de unión al receptor previstas, para minimizar los efectos negativos sobre la actividad biológica. La IL-18 humana nativa contiene cuatro cisteínas, C38, C68, C76 y C127, subrayadas en la secuencia de aminoácidos de la IL-18 humana madura mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 1). Dos de éstas, C38 y C68 son accesibles para la pegilación como se predice por la estructura cristalina. La IL-18 humana nativa pegilada se pegila doblemente tanto en C38 como en C68 y presenta una actividad biológica *in vitro* reducida (Tabla 1). La monopegilación se consigue por sustitución de una de las cisteínas nativas por un aminoácido no reactivo y pegilación en la cisteína reactiva restante, o por sustitución de las dos cisteínas nativas y sustitución de una cisteína libre en otro sitio de la molécula.

55

Se generó una serie de mutantes de sustitución de IL-18 humana por mutagénesis dirigida (T.A. Kunkel (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-492.). Todos éstos se expresaron en *E. coli* en la forma pro con un marcador de purificación de seis histidinas N-terminal (Figura 3) (SEC ID N°: 3). Posteriormente se activó la proIL-18 a la forma madura *in vitro* usando la caspasa-5 purificada por separado. Todas las mutaciones de IL-18 expresan eficazmente y se purificaron con rendimientos equivalentes usando este procedimiento. En el documento PCT WO 01/098455 publicado el 27 de diciembre de 2001 se han descrito con detalle procedimientos alternativos para producir IL-18 activa *in vitro* o intracelularmente con caspasas 1, 4 y 5, y proteasa específica de ubiquitina. Todos estos procedimientos son adecuados para la producción de cualquiera de los diseños de mutante de IL-18 desvelados en esta solicitud.

65

Los diseños de mutación de sustitución, junto con los sitios correspondientes para la monopegilación dentro de éstos, y la actividad *in vitro* de las formas pegiladas y no pegiladas se resumen más adelante en la Tabla 1. La monopegilación de la IL-18 nativa se consiguió en la cisteína 38 o en la cisteína 68 (Figura 1, las dos primeras subrayadas) (SEC ID N°: 1). La monopegilación dentro de la molécula de IL-18 nativa conduce a una reducción de aproximada-

ES 2 340 494 T3

mente cinco veces en la potencia biológica en los ensayos de secreción de KG-1 IFN en comparación con la IL-18 nativa no pegilada. Por otra parte, la monopegilación en la cisteína 68 nativa libre se consigue por sustitución de C38 por serina (Figura 4, subrayada) (SEC ID N°: 4). La monopegilación en la cisteína 68 dentro de esta molécula conduce a una reducción de aproximadamente dos veces en la potencia biológica en los ensayos de secreción de KG-1 IFN en comparación con la IL-18 nativa no pegilada. Por el contrario, la actividad de la forma no pegilada de esta sustitución no se redujo significativamente a partir de la IL-18 nativa (Tabla 1A).

Se realizaron diseños de sustitución adicionales basándose en el modelo cristalino de la IL-18 humana para pegilación en bucles expuestos de la estructura trefoil, lejos de los sitios de interacción de unión al receptor previstos. Se eligieron cuatro sitios, N78, E121, L144 y D157 para sustituciones de cisteína. Puede haber otros restos adecuados para mutaciones de sustitución a lo largo de la proteína hIL-18, pero estos cuatro restos fueron los que se eligieron primero. Para conseguir monopegilación en estos sitios, la cisteína 38 libre se sustituyó por serina y la cisteína 68 se sustituyó por serina o ácido aspártico. Se usó serina debido a sus propiedades neutras y a su pequeño tamaño comparable al de la cisteína. Se eligió ácido aspártico debido a la presencia de ácido aspártico en la IL-18 de otras especies en una localización relativa a la cisteína en seres humanos. Las Figuras 5-10 muestran las secuencias de aminoácidos (SEC ID N°: 5-10, respectivamente) de cada uno de estos diseños racionales. Cada mutación de sustitución está subrayada. Se observó una reducción de actividad en el ensayo de potencia biológica para todas las mutaciones después de la pegilación. Basándose en las actividades relativas de las formas pegilada y monopegilada, se eligieron dos sitios de pegilación, L144 y D157, y se ensayaron en ensayos posteriores *in vitro* e *in vivo*. Además, se eligió la sustitución C68S debido a las propiedades neutras de esta sustitución de restos sobre C68D. Por lo tanto, se usaron diseños de mutación C38S, C68S, L144C y C38S, C68S, D157C para monopegilación en C144 y C157, respectivamente (Figuras 9 y 10) (Tablas 1A y 1B) (SEC ID N°: 9 y 10, respectivamente).

TABLA 1A

Sustitución	Sitio(s) de Pegilación	Potencia*/ no pegilada	Potencia*/pegilada - 20K
Nativa (SEC ID N°: 1)	C38 y C68	5,3	46
C38S (SEC ID N°: 4)	C68	9,6	24
C38S, C68D, N78C (SEC ID N°: 5)	C78	183	18
C38S, C68D, E121C (SEC ID N°: 6)	C121	10	26
* potencia <i>in vitro</i> (CE ₅₀) detectada en un ensayo de secreción de KG-1 IFN γ			

TABLA 1B

Sustitución	Sitio(s) de Pegilación	Potencia*/ no pegilada	Potencia*/pegilada - 20K
C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7)	C144	20	492
C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8)	C157	26	666
C38S, C68S, L144C (SEC ID N°: 9)	C144	40	632
C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 10)	C157	40	572
* potencia <i>in vitro</i> (CE ₅₀) detectada en un ensayo de secreción de KG-1 IFN γ			

ES 2 340 494 T3

Ejemplo 3

Procedimientos de Purificación

5 a. *Purificación de mutantes de sustitución de cisteína de IL-18*

Todos los mutantes descritos anteriormente en el Ejemplo 2 se expresaron como una proforma soluble en *E. coli* con un marcador hexahis N-terminal para facilitar la detección del nivel de expresión y la purificación. Se suspendieron células *E. coli* que expresaban hexahis/proIL-18 (SEC ID N°: 3) en un tampón de lisis a 10 ml/g de células. El tampón de lisis contenía Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol al 5%, 2-mercaptoetanol 10 mM (Tampón A), pepstatina A a 1 µg/ml y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,4 mM. Las células se homogeneizaron en el tampón de lisis y se lisaron por dos pases a través de un microfluidizador (M110-Y, Microfluidics) a 12.000 psi (82,71 MPa). El lisado de células se centrifugó a 30.000 g durante 30 minutos para retirar los restos celulares y el sobrenadante se aplicó a una columna de NiNTA agarosa que se lavó con tres volúmenes de columna de Tampón A. La columna se lavó adicionalmente con tres volúmenes de columna de Tampón A que contenía imidazol 30 mM para retirar las impurezas unidas de forma no específica y la hexahis/proIL-18 se eluyó con imidazol 300 mM en Tampón A. El conjunto se dializó frente a HEPES 25 mM pH 7,5 que contenía NaCl 100 mM y 2-mercaptoetanol 10 mM (Tampón B). El Tampón B era un tampón óptimo para la reacción de caspasa. Al conjunto en Tampón B se le añadió caspasa 5 a 1:100 p/p (caspasa 5 frente a proIL-18) y la mezcla se incubó durante una noche a temperatura ambiente para completar la reacción de escisión. La mezcla de reacción se ajustó a NaCl 0,5 M que se aplicó a una columna de NiNTA agarosa. La IL-18 madura fluyó a través de la columna, mientras que el hexahis/prodominio se unió de nuevo a la columna. Algunas proteínas de *E. coli* (impurezas), que se unieron y eluyeron de la primera columna de Ni NTA agarosa también se volvieron a unir a la columna produciendo una IL-18 madura mucho más pura. La proteína no unida se ajustó en DTT 25 mM y se incubó durante una hora para restaurar todas las cisteínas en estado reducido, reduciendo los aductos de BME y enlaces disulfuro formados durante la purificación. La solución de IL-18 madura reducida se ajustó a pH 6,0 añadiendo ácido fosfórico 2 M para evitar la oxidación de cisteína y se concentró con una membrana YM10. La muestra concentrada se aplicó a una columna Superdex 75 equilibrada con NaFosfato 10 mM pH 6,0 que contenía NaCl 0,15 y EDTA 1 mM para cambiar el tampón, para retirar cualquier agregado y para retirar la endotoxina adecuada en estudios *in vivo*. La IL-18 madura se eluyó como un monómero de la columna Superdex 75 y el peso molecular por análisis de CL/EM era el esperado por la forma monomérica calculada a partir del ADNc. La titulación con DTNB mostró que las cuatro cisteínas son la forma reducida.

35 b. *Purificación de IL-18 PEGilada*

La mezcla de reacción de PEGilación que contenía IL-18 PEGilada, sin PEG, e IL-18 no modificada, inmediatamente después de la reacción, se diluyó con un volumen igual de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 M en MES 25 mM pH 6,2 (Tampón C). La mezcla de reacción diluida se aplicó a una columna Source 15 Phenyl (Farmacia) que se lavó con 1,5 volúmenes de columna de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M en Tampón C. La columna se eluyó con 5 volúmenes de columna de un gradiente lineal hasta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M en Tampón C. La IL-18 libre eluyó en primer lugar seguida del PEG libre y la IL-18 PEGilada eluyó en último lugar. Las fracciones que contenían la IL-18 PEGilada se reunieron y se concentraron con membrana YM10 y se aplicaron a una columna de exclusión molecular, Superdex 200 de calidad preparativa (Farmacia), que se preequilibró y eluyó con Tampón B. Superdex 200 retiró toda la IL-18 libre restante, el PEG libre y cualquier agregado, y la endotoxina. Las fracciones que contenían la IL-18 PEGilada se reunieron y se concentraron a 5-6 mg/ml.

Ejemplo 4

50 *Preparación de IL-18 PEGilada*

A continuación se describe el procedimiento general para la preparación de IL-18 PEGilada. Se añadió una cantidad apropiada de maleimida de metoxi polietilenglicol (MAL MPEG) con un peso molecular medio de 20.000, 30.000 ó 40.000 Daltons (como un sólido o predisoluto en un disolvente acuoso u orgánico) a una solución de 2,5 mg/ml de la IL-18 en un tampón fosfato de pH 6,0-6,5. Se añadió MAL MPEG a la solución de proteína con una cantidad en exceso molar de MAL MPEG. La reacción se dejó continuar a 5°C durante 1-12 horas. Al final de la reacción, se añadió una cantidad en exceso (por ejemplo, 20x) de cisteína (0,5 M) para inactivar la reacción. En esta fase, se descubrió que la mezcla de reacción consistía principalmente en IL-18 mono-, di- y no PEGilada cuando se usó la IL-18 humana de tipo silvestre para la PEGilación. En caso de usar el mutante de sustitución de IL-18 humana (como se ha analizado en las secciones previas), se observó que la mezcla de reacción consistía principalmente en proteínas IL-18 mono-PEGiladas y no PEGiladas (véase la Figura 11).

65 a. *Caracterización Físicoquímica*

Se realizaron cuatro análisis para caracterizar cada muestra: (1) SDS-PAGE, (2) cromatografía líquida de fase inversa (RP-HPLC), (3) determinación de peso molecular (CL/EM) y (4) mapeo de péptidos.

ES 2 340 494 T3

b. Grado de PEGilación

El grado de PEGilación (es decir, el número de moléculas de PEG unidas a una sola proteína) se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico o RP-HPLC. Se procesaron muestras de mezcla de reacción de PEGilación de IL-18 humana o IL-18 murina en condiciones reducidas a una carga de 10,0 µg por calle en geles profundos en gradiente del 4 al 12% de Bis-Tris poliacrilamida. Las proteínas se detectaron y se cuantificaron después de tinción con Coomassie R-250. La cuantificación se realizó por densitometría láser.

El grado de PEGilación también pudo analizarse usando un procedimiento de RP-HPLC. Las muestras de la mezcla de reacción se procesaron bajo un caudal de 1 ml/min y un gradiente del 8,6%/min de fase móvil B (fase móvil A: ácido trifluoroacético al 0,1% en agua, fase móvil B: TFA al 0,1% en acetonitrilo al 80%/agua) usando una columna POROS R2/H con una temperatura de la columna de 40°C.

c. Sitio de PEGilación - Desarrollo de procedimiento de mapas de péptidos tripticos

Para verificar la localización de la unión del PEG a la localización exacta en la proteína, se analizaron muestras de IL-18 PEGilada purificada por mapeo de péptidos. El mapeo triptico de la IL-18 se adaptó a partir de un procedimiento previo (J. Bongers, y col., J. Pharm. Biomed Anal., 21: 1099-1128 (2000)) y emplea una S-carboximetilación directa de las cisteínas (sulfhidrilos libres) en IL-18: Las muestras (2,5 mg) se evaporaron a sequedad al vacío, se disolvieron en 0,5 ml de yodoacetato sódico 20 mM preparado recientemente en guanidina 6 M.HCl, tampón Tris/HCl 1,2 M (pH 8,4), se pusieron a TA en la oscuridad durante 40 min y después se sometieron a intercambio de tampón inmediatamente en tampón de digestión de Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM (pH 8,1) en columnas de gel Bio-Gel P-6DG (BioRad Econ-Pac10DG). Las digestiones proteolíticas con tripsina (Worthington tratado con TPCK), Lys-C (Wako) y Glu-C (Worthington) fueron a 100/1 p:p S/E para 2 mg/ml de sustrato de CM-Cys IL-18 a 37°C durante 2 horas. Mapeo por RP-HPLC: columna Vydac 218MS52 C18 (2,1 x 250 mm); 55°C; del 0 al 32% de CH₃CN (TFA al 0,05%) en 60 min; 0,2 ml/min, detección a 215/280 nm con matriz de diodos y detector de EM Agilent G1946A (MSD) con fuente. Las muestras más pequeñas (50-300 µg) se procesaron por una versión semi-micro del procedimiento anterior empleando columnas de gel Bio-Rad Micro Bio-Spin Bio-Gel P-6DG.

Los procedimientos actuales de mapeo de péptidos típicamente emplean reducción con DTT de puentes disulfuro de cisteína seguido de S-carboximetilación de las cisteínas resultantes (reducción/alquilación). Esta etapa de desplegamiento (desnaturalización) con frecuencia es necesaria para una proteólisis satisfactoria ("digestión"). Sin embargo, a diferencia de las "semi-cisteínas" oxidadas (que forman puentes) en la mayoría de las proteínas, los 4 restos de cisteína presentes en hIL-18 ya están reducidos. Por lo tanto, los presentes inventores han aplicado una S-carboximetilación directa en su procedimiento de mapeo de péptidos para IL-18 para reemplazar el procedimiento de reducción/alquilación más habitual. Se descubrieron rendimientos cuantitativos de IL-18 completamente S-carboximetilada (4 x CM-Cys) por CL/EM de ionización por electronebulización (PM teórico 18449 Da, encontrado 18453 Da). Esto es una buena prueba de la validez de la alquilación directa y confirma la existencia de 4 equivalentes mol de tioles de cisteína intactos. La ventaja de la alquilación directa es que conserva información sobre la "integridad química" de las cisteínas presentes en IL-18 que se perdería por el procedimiento habitual de reducción/alquilación. Por ejemplo, este procedimiento de mapeo de péptidos con carboximetilación directa de las cisteínas permite detectar no sólo la pegilación en restos de cisteína, sino también pequeñas cantidades de oxidación por aire de cisteínas para formar enlaces disulfuro de cisteína.

Como resultado de la digestión con tripsina, pudieron generarse veinte fragmentos peptídicos previstos (véase la Tabla 2 presentada a continuación), y el fragmento peptídico individual puede separarse e identificarse por RP-HPLC y CL/EM (Figura 12). La estrategia de mapeo de péptidos se está usando para identificar el sitio de PEGilación, es decir, el resto o restos aminoacídicos a los que se unen las moléculas de polietilenglicol. La Figura 12 muestra una comparación de "gráfico de espejo" de los mapas tripticos de la IL-8 de tipo silvestre humana monoPEG (20K) frente a un control de IL-18 de tipo silvestre humana no modificada. Los cuatro péptidos tripticos que contienen cisteína (14-39), (68-70), (71-79) y (113-129) correspondientes a las cisteínas 38, 68, 76 y 127, respectivamente, están marcados para el control. La gran reducción en el área del pico frente al control para el pico (14-39) en el mapa triptico de IL-18 humana monoPEG indica una PEGilación considerable en la cisteína 38 (aproximadamente el 90%). El pico de elución posterior denominado "PEG-Cys38 (14-39)" se aisló y se observó que contenía un 90% de PEG-Cys38 (14-39) y un 10% de PEG-Cys68 (68-70) por secuenciación N-terminal (Figura 12). La detección se realizó a 215 nm. Este resultado demostró que IL-18 humana mono-PEGilada se PEGilaba predominantemente a través de la cisteína en posición 38. Este resultado es sorprendente e inesperado, debido al hecho de que hay otras tres cisteínas libres disponibles en la proteína.

ES 2 340 494 T3

TABLA 2

*Péptidos trípticos previstos y encontrados por CL-EM para IL-18 de tipo silvestre S-carboximetilada.
Los cuatro péptidos que contienen cisteína se indican en negrita*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Nº	Péptido	t _{ret} ^a (min)	PM teórico (Da)	PM encontrado ^b (Da)	Secuencia y Número de Identificador de Secuencia Correspondiente, si se requiere
1	(1-4)	22,0	513,3	513,2	YFGK (SEC ID Nº: 11)
2	(5-8)	6,5	475,3	475,3	LESK (SEC ID Nº: 12)
3	(9-13)	31,8	586,4	586,5	LSVIR (SEC ID Nº: 13)
4	(14-39)	56,8	3113,4	3113,4	NLNDQVLFIDQGNRPLFEDMTDS DCR (SEC ID Nº: 14)
5	(40-44)	7,1	571,3	571,3	DNAPR (SEC ID Nº: 15)
6	(45-53)	54,4	1114,6	1114,7	TIFIISMYK (SEC ID Nº: 16)
7	(54-58)	5,4	601,3	601,3	DSQPR (SEC ID Nº: 17)
8	(59-67)	40,2	904,5	904,5	GMAVTISVK (SEC ID Nº: 18)
9	(68-70)	3,4	436,2	436,1	CEK
10	(71-79)	27,0	1051,5	1051,5	ISTLSCENK (SEC ID Nº: 19)
11	(80-84)	35,5	606,4	606,4	IISFK (SEC ID Nº: 20)
12	(85-93)	29,3	1056,5	1056,5	EMNPPDNIK (SEC ID Nº: 21)
13	(94-96)	3,4	362,2	362,2	DTK
14	(97-104)	47,5	1024,5	1024,5	SDIIFQQR (SEC ID Nº: 22)
15	(105-112)	14,6	852,4	852,4	SVPGHDNK (SEC ID Nº: 23)
16	(113-129)	49,9	2076,8	2076,8	MQFESSSYEGYFLACEK (SEC ID Nº: 24)
17	(130-131)	3,4	303,2	303,3	ER
18	(132-135)	31,2	521,3	521,3	DLFK (SEC ID Nº: 25)
19	(136-139)	32,1	485,4	485,4	LILK (SEC ID Nº: 26)
20	(140-140)	ne	146,1	ne	K
21	(141-147)	20,3 ^c	832,4	832,5	EDELGDR (SEC ID Nº: 27)
22	(148-157)	42,8	1182,5	1182,5	SIMFTVQNEK (SEC ID Nº: 28)

^a Tiempos de retención (t_{ret}) se refiere al mapa tríptico de RP-HPLC en la Figura 12.

^b Pesos moleculares (PM) determinados por mapeo tríptico de CL/EM de ionización por electronebulización.

^c También se encontró una cantidad aproximadamente igual de péptido 140-147 (KEDELGDR) (SEC ID Nº: 29) por "escisión incompleta", que eluyó a 19,8 min.

d. Mapeo tríptico de IL-18 humana de tipo silvestre monoPEGilada purificada

65

Los datos del mapa tríptico en la Figura 14 para el producto de hIL-18 de tipo silvestre monoPEGilado purificado muestra PEGilación exclusivamente en las cisteínas accesibles por disolvente 38 y 68, en las medidas aproximadas del 65 y 35 ± 5% en moles, respectivamente, basándose en la reducción en el área del pico relativa frente al control para el pico de péptido 14-39 que eluye a 56 min. No se produjo PEGilación detectable en las cisteínas escondidas 76 y 127, como se demuestra por las recuperaciones cuantitativas de los péptidos trípticos 71-79 y 113-

ES 2 340 494 T3

129 en el mapa. Estos resultados se basan en las reducciones observadas, o su ausencia, en las áreas de pico relativas para los péptidos trípticos que contienen cisteína en el mapa de hIL-18 monoPEGilada frente al mapa de control de hIL-18 no PEGilada con la aparición concurrente de un pico hidrófobo de elución posterior que contiene el conjunto de péptidos PEGilados. La distribución aproximada del 65 al 35% en moles de PEG en las cisteínas 38 y 68 se confirmó adicionalmente por gráficos de corriente iónica extraídos a partir de los datos de CL/EM/EM-EM.

10 e. *Secuenciación N-terminal de péptidos Trípticos PEGilados a partir de muteínas de IL-18 humana monoPEGilada purificada C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7) y C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8)*

15 Además de determinar los sitios y grados de PEGilación por diferencias frente al control en áreas de picos para los péptidos no PEGilados en cromatogramas de mapas trípticos de RP-HPLC, los presentes inventores también realizaron análisis directos de los fragmentos peptídicos PEGilados liberados a partir de la proteína. Esta información directa sobre los péptidos PEGilados se relacionaría por “equilibrio de masas” con las pruebas indirectas complementarias procedentes de las diferencias en áreas de picos para los péptidos no PEGilados. Como se ha mencionado anteriormente, todos esos péptidos PEGilados diferentes coeluyen en el mapa tríptico de RP-HPLC como un solo pico de elución posterior que contiene el conjunto sin resolver entero de especies de péptidos PEGilados. Como los péptidos PEGilados no son susceptibles a la espectrometría de masas de electronebulización en línea con analizadores de masas de trampa iónica o cuadrupolo, los presentes inventores inventaron una secuenciación N-terminal microquímica de Edman para analizar el conjunto de péptidos PEGilados recogidos a partir del mapa tríptico de RP-HPLC.

20 Los datos de secuenciación N-terminal de Edman para los picos de elución tardía de RP-HPLC aislados (conjunto de péptidos PEGilados) para la hIL-18 monoPEG20k C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7) indicó un 98,3% en moles de PEG en la cisteína 144 del bucle de la superficie y un 1,3% en moles de PEG en la cisteína 127 parcialmente escondida. La secuenciación de Edman para el conjunto de péptidos trípticos PEGilados de hIL-18 monoPEG20k C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8) produjo >99,5% en moles de PEG en la cisteína 157 C-terminal expuesta por disolvente y no produjo PEG detectable en la cisteína 127 parcialmente escondida ni en ningún otro sitio adicional.

25 De esta manera, para la hIL-18 monoPEG20k C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7), los datos de secuenciación revelan aproximadamente un 1-2% de PEGilación competitiva en la cisteína 127 parcialmente escondida además de la PEGilación deseada en la cisteína 144. Por otra parte, no fue detectable esta PEGilación competitiva en la cisteína 127, ni en ningún otro sitio, para hIL-18 monoPEG20k C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8). Estos datos de secuenciación son coherentes con una cisteína ligeramente más nucleófila (reactiva) en el resto 157 en lugar de en el resto 144. La reactividad ligeramente más favorable hacia la PEGilación para la cisteína 157 C-terminal en la proteína plegada frente a la de la cisteína 144 en el bucle interno quizás podría reflejar alguna combinación de un grado ligeramente mayor de accesibilidad al disolvente para este resto, y/o movilidad térmica, diferente entorno electrostático local y mayor acidez del tiol.

30 f. *Mapeo tríptico de mutante de sustitución de IL-18 humana (mutantes de sustitución C38S, C68S, L144C (SEC ID N°: 9) y C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 10) y mutantes de sustitución monoPEGilados purificados*

35 Los datos del mapeo tríptico (Figuras 13 y 15) confirman las estructuras químicas esperadas para los mutantes de sustitución de IL-18 humana C38S, C68S, L144C (SEC ID N°: 9) y C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 10) y los conjugados monoPEGilados purificados respectivos. Los datos de RP-HPLC son coherentes con una PEGilación cuantitativa con especificidad de sitio >95% en las cisteínas de la superficie introducidas por ingeniería genética en los restos 144 y 157, respectivamente. Y, en los dos mutantes de sustitución, los péptidos trípticos carboximetilados que contienen las cisteínas escondidas en los restos 76 y 127 se recuperaron en rendimientos casi cuantitativos frente a un mapa tríptico de control del patrón de referencia de IL-18 humana de tipo silvestre, y prácticamente no se observó ninguna otra modificación química significativa (reacciones secundarias) en los productos finales.

Ejemplo 5

35 *Mediciones de afinidad (análisis cinético de unión de IL-18 a la cadena IL-18R α e IL-18BP)*

Los efectos biológicos de la IL-18 humana están relacionados con la unión a su receptor de la superficie celular y, posiblemente, por medio de su unión al antagonista natural IL-18BP. Se desarrollaron ensayos de unión para IL-18 y la cadena alfa del receptor o IL-18BP usando el instrumento BIAcore[®], un biosensor basado en resonancia de plasmón superficial. Esta tecnología implica inmovilizar una biomolécula en una microplaca sensora y controlar su interacción con un segundo componente en solución a tiempo real.

ES 2 340 494 T3

Los mutantes de sustitución de IL-18 tenían menores afinidades por el receptor (de 6 a 16 veces). Sin embargo, no se vio afectada la afinidad de unión a IL-18 BP. Por el contrario, la pegilación redujo significativamente las afinidades tanto por el receptor (13-114 veces) como por IL-18 BP (10-176 veces) (Tabla 3).

TABLA 3

Resumen de afinidades (M) de IL-18 en la unión a IL-18 R α e IL-18 BP

EL-18s	IL-18 R α	IL-18 BP
IL-18 de tipo silvestre (SEC ID N ^o : 1)	$3,2 (\pm 0,1) \times 10^{-8}$	$1,35 (\pm 0,06) \times 10^{-10}$
IL-18 C144 (C38S, C68D, L144C) (SEC ID N ^o : 7)	$2,22 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$	$1,01 (\pm 0,12) \times 10^{-10}$
IL-18 C144PEG20K	$2,69 (\pm 0,07) \times 10^{-6}$	$1,16 (\pm 0,03) \times 10^{-9}$
IL-18 C144PEG30K	$4,26 (\pm 0,03) \times 10^{-6}$	$1,51 (\pm 0,05) \times 10^{-9}$
IL-18 C144PEG40K	$5,35 (\pm 0,09) \times 10^{-6}$	$4,71 (\pm 0,09) \times 10^{-9}$
IL-18 C157 (C38S, C68D, D157C) (SEC ID N ^o : 8)	$1,96 (\pm 0,12) \times 10^{-7}$	$1,34 (\pm 0,08) \times 10^{-10}$
IL-18 C157PEG20K	$5,16 (\pm 0,03) \times 10^{-6}$	$5,53 (\pm 0,21) \times 10^{-9}$
IL-18 C157PEG30K	$5,33 (\pm 0,15) \times 10^{-6}$	$4,91 (\pm 0,45) \times 10^{-9}$
IL-18 C157PEG40K	$2,29 (\pm 0,1) \times 10^{-5}$	$2,36 (\pm 0,2) \times 10^{-8}$
IL-18 C144 (C38S, C68S, L144C) (SEC ID N ^o : 9)	$5,34 (\pm 0,11) \times 10^{-7}$	$1,56 (\pm 0,16) \times 10^{-10}$
IL-18 C144PEG20K	$5,19 (\pm 0,13) \times 10^{-6}$	$1,56 (\pm 0,08) \times 10^{-9}$
IL-18 C144PEG30K	$8,26 (\pm 0,16) \times 10^{-6}$	$1,51 (\pm 0,04) \times 10^{-9}$
IL-18 C157 (C38S, C68S, D157C) (SEC ID N ^o : 10)	$4,1 (\pm 0,11) \times 10^{-7}$	$1,63 (\pm 0,04) \times 10^{-10}$
IL-18 C157PEG20K	$5,5 (\pm 0,4) \times 10^{-6}$	$1,27 (\pm 0,05) \times 10^{-9}$
IL-18 C157PEG30K	$6,34 (\pm 0,16) \times 10^{-6}$	$1,29 (\pm 0,06) \times 10^{-9}$

Ejemplo 6

Señalización de NF-κB

5 El efecto de la IL-18 está mediado por la unión a un receptor de la superficie heterodimérico compuesto de cadenas α y β . Aunque la cadena α sola se puede unir a IL-18, se necesitan las dos subunidades para formar el receptor de IL-18 funcional de alta afinidad que puede activar rutas de señalización intracelulares y mediar los efectos biológicos de la IL-18 sobre células diana. El factor de transcripción NF-κB es un mediador clave de los efectos inmunomoduladores de la IL-18. La señalización del receptor de la IL-18 induce la activación de proteína quinasas IKK que, a su vez, fosforilan el inhibidor de NF-κB conocido como IκBα. El IκBα fosforilado se degrada, permitiendo la liberación NF-κB libre que se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes. En este ensayo se evaluaron múltiples muteínas de IL-18. A partir de estos estudios, las muteínas de IL-18 que contenían C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7), C38S, C68S L144C (SEC ID N°: 9), C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8) y C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 10) se identificaron como las más potentes.

15 Los datos de la Tabla 4 resumen los resultados del bioensayo de NF-κB con varias moléculas diferentes. Con respecto a la IL-18 nativa (SEC ID N°: 1), los mutantes de sustitución de IL-18, C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7) y C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8) tenían aproximadamente una reducción de potencia de 10 veces. Se observaron reducciones adicionales en potencia con las moléculas pegiladas. En general, las muteínas PEG de 20 K y 30 K eran más potentes que las versiones de PEG de 40 K.

TABLA 4

Inducción de la actividad de NF-κB por IL-18, muteínas de IL-18 y sus derivados pegilados

IL-18	Pegilación	NF-κB KG-1 EX ₅₀ (ng/ml)	Media
HIL-18 (SEC ID N°: 1) (ensayo KG-1)	Ninguna	0,06, 0,07, 0,08, 0,21, 0,32, 0,4, 0,8	0,3
C38S, C68D, L144C (SEC ID N°: 7)	Ninguna	1,6, 3,5	2,6
	144C-20K	58, 66, 42	: 55,3
	144C-30K	38	38
	144C-40K	271, 330	300,5
C38S, C68S, L144C (SEC ID N°: 7)	Ninguna	1,1, 4,3, 2,5	2,6
	144C-20K	71, 92	81,5
	144C-30K	44	44
C38S, C68D, D157C (SEC ID N°: 8)	Ninguna	4,0	4,0
	157C-20K	30, 65, 17	37,3
	157C-30K	94, 43	68,5
	157C-40K	144, 61, 628	277,7
C38S, C68S, D157C (SEC ID N°: 8)	Ninguna	0,8, 3,2	2
	157C-20K	49, 59	54
	157C-30K	47	47

*Valores de CE₅₀ determinados en la línea celular IL-18R-KG-1 murina.

Ejemplo 7

Datos farmacodinámicos (PD) murinos para PEG IL-18 humana (inducción de IFNγ)

65 El tratamiento de ratones BALB/c con una sola inyección de IL-18 murina aumentó la producción de citocinas. Se observaron los aumentos más sólidos con IFNγ y GM-CSF. Como la respuesta del IFNγ era muy rápida y extensa, se usó este biomarcador para comparar la potencia de la IL-18 pegilada con la molécula de IL-18 nativa. Se administraron

ES 2 340 494 T3

IL-18 humana (SEC ID N°: 1) e IL-18 humana pegilada (SEC ID N°: 18) a dosis de 10 ó 100 μ g por inyección SC. Se recogieron sueros a 2, 4, 6, 8, 12 y 16 horas después del tratamiento y se analizaron con respecto a la producción de IFN γ . Una dosis equimolar de IL-18 pegilada indujo mayores niveles circulantes de IFN γ que IL-18 no pegilada. Los niveles máximos de IFN γ para la IL-18 pegilada se encontraron entre 4-16 horas, mientras que la IL-18 no pegilada produjo un pico entre las 2-4 horas. A pesar de la menor afinidad por el receptor de cadena α de IL-18 (como se muestra en la Tabla 3), o de la menor actividad en el ensayo basado en células de NF- κ B (como se muestra en la Tabla 4), la IL-18 humana pegilada (SEC ID N°: 1) mostró un aumento de IFN γ , un importante marcador PD para moléculas de IL-18 (Tabla 5).

TABLA 5

Inducción de IFN γ murina por IL-18 humana pegilada y no pegilada

	pg/ml de IFN- γ medios					
	2 horas	4 horas	6 horas	8 horas	12 horas	16 horas
PEG-IL-18	37	595	830	1150	489	59
IL-18	374	342	187	0		

Ejemplo 8

Citotoxicidad de NK de IL-18 pegilada y no pegilada (SEC ID N°: 1) (sistema murino ex vivo)

La IL-18 es una citocina dominante en relación con Th1 que activa células NK. En este estudio, los presentes inventores intentaron medir la citotoxicidad de NK en respuesta a IL-18 humana pegilada y no pegilada (SEC ID N°: 1). Este ensayo es una medida directa de la actividad antitumoral.

La actividad de las células NK se midió por ensayos de liberación de europio usando células YAC-1 murinas (linfoma de células T sensible a NK) como dianas y células bazo BALB/c procedentes de animales tratados como efectores. Los ratones recibieron una sola inyección de concentraciones (equimolares) de IL-18 humana pegilada y no pegilada. Los ratones se sacrificaron 18-24 horas después del tratamiento. Los esplenocitos de los animales tratados (y controles) se combinaron con células diana YAC-1 marcadas con europio y se midió la liberación de europio.

La IL-18 pegilada indujo citotoxicidad por NK en ratones (Tabla 6). Todas las formas de IL-18 pegiladas humanas mostraron capacidad de inducir citotoxicidad por NK (datos no mostrados). La IL-18 pegilada 20K mostró mejor actividad que la IL-18 no pegilada a todas las relaciones de efector:diana examinadas (Tabla 6). De nuevo, a pesar de la menor afinidad para el receptor de cadena α de IL-18 (como se muestra en la Tabla 3) o de la menor actividad en el ensayo basado en células NF- κ B (como se muestra en la Tabla 4), la pegilación ni redujo ni eliminó la activación de NK *in vivo* dependiente de IL-18.

TABLA 6

Citotoxicidad de NK en ratones

Muestras	Relaciones de Efector : Diana*			
	200:1	100:1	50:1	25:1
IL-18 no pegilada	46	41	24	13
IL-18 pegilada	66	62	53	37
Vehículo	6	7	7	5
*Números expresados como porcentaje de lisis específica				

ES 2 340 494 T3

Ejemplo 9

Formación de complejos con proteína de unión a IL-18

5 Se creó un inmunoensayo para la detección de un complejo entre IL-18 (SEC ID N°: 1) y la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) usando el sistema IGEN®. Este ensayo usa un mAb no neutralizador contra la IL-18 humana (mAb 16D10, un conjugado con rutenio) y un mAb no bloqueante contra IL-18BP humana (mAb 36, biotinilado). La IL-18BP humana a 125 ng/ml se combinó con 125 ng/ml de IL-18 no pegilada o IL-18 pegilada.

10 Las moléculas de IL-18 pegiladas tenían menor capacidad de formar un complejo con IL-18BP (Tabla 7), lo cual está en contraste con la IL-18 no pegilada que formó un complejo.

15 TABLA 7

Formación de complejo con IL-18BP

Moléculas de IL-18 pegiladas/no pegiladas	Unidades De ECL
IL-18	1101269
C144 no PEG	561129
C144 20K PEG	153831
C157 no PEG	376830
C157 20K PEG	63476
mutante individual C38S	746054
C68 20K PEG	49104

Ejemplo 10

40 *Datos Farmacodinámicos (PD) y Farmacocinéticos (PK) en mono para PEG IL-18 y mutantes de Sustitución de la misma*

45 En respuesta a IL-18 pegilada e IL-18 no pegilada, se evaluaron marcadores PD en monos Cynomolgus. Los monos Cynomolgus (3 machos/grupo) recibieron una sola inyección intravenosa de 1 mg/kg de IL-18 no pegilada o IL-18 pegilada. Se recogieron muestras de sangre antes de la dosificación y en múltiples puntos de tiempo durante un periodo de 10 días después de la dosificación. El plasma se analizó con respecto a la concentración de fármaco y neopterinina; y después los leucocitos se analizaron por citometría de flujo con respecto a la expresión del marcador CD64.

a. *Farmacodinámica de Mono (PD)*

55 Se evaluaron leucocitos de mono Cynomolgus con respecto a los cambios en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD64. La IL-18 pegilada y la IL-18 no pegilada aumentaron la expresión de CD64 entre 1 y 3 días después de la dosificación. La expresión elevada de CD64 en los leucocitos totales alcanzó un máximo el Día 3 y persistió hasta el Día 10. La IMF de CD64 de leucocitos fue mayor (hasta 2 veces mayor) en respuesta a la IL-18 pegilada en comparación con la IL-18 no pegilada en todos los puntos de tiempo después de la dosificación (Tabla 8). En los leucocitos totales, la IMF de CD64 fue significativamente mayor desde el punto de vista estadístico para la IL-18 pegilada que para la IL-18 no pegilada.

65 La IL-18 pegilada y la IL-18 no pegilada indujeron la producción de neopterinina entre 1 y 4 días después de la dosificación, con la respuesta máxima a 24 ó 48 horas. Las veces que aumentó la inducción y las concentraciones medias de grupos de neopterinina generalmente fueron mayores en respuesta a la IL-18 pegilada (15-21 µg/ml el Día 2) que en respuesta a la IL-18 no pegilada (13 µg/ml el Día 2) (Tabla 9). Sin embargo, las diferencias no alcanzaron el significado estadístico.

ES 2 340 494 T3

El marcador CD64 en leucocitos aumentó significativamente en expresión en respuesta a la IL-18 pegilada en comparación con la IL-18 no pegilada. Este marcador se expresa en células del linaje mielóide, monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD) y neutrófilos. Estas células juegan un papel en la respuesta inmune inducida por IL-18 y por lo tanto son una medida relevante de la actividad de IL-18 pegilada. La inducción de neopterina no fue estadísticamente significativa, pero el aumento de expresión confirma la ventaja *in vivo* de la IL-18 pegilada con respecto a la IL-18 no pegilada.

TABLA 8

Intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD64 sobre leucocitos de monos cynomolgus tratados con 1 mg/kg de IL-18 pegilada o no pegilada

Candidato		IMF de CD64 en Leucocitos Tiempo					
		(horas)					
		Día 0 (Pre-dosis)	Día 1 (24)	Día 2 (48)	Día 3 (72)	Día 7 (168)	Día 10 (240)
IL-18	2001	80,8	164,2	163,7	285,7	170,4	151,6
Pegilada	2002	84,8	216,7	220,2	366,6	229,6	175,4
	2003	56,7	98,9	117,9	159,6	116,7	88,5
	Media ± ETM	74,1 ± 8,8	159,9 ± 34,1	167,3 ± 29,6	270,6 ± 60,2	172,2 ± 32,6	138,5 ± 25,9
IL-18	3001	57,6	91,4	101,4	136,9	87,6	91,7
No pegilada	3002	56,2	87,1	98,2	107,8	76,7	71,1
	3003	58,6	86,6	92,4	145,8	102,1	93,1
	Media ± ETM	57,5 ± 0,7	88,4 ± 1,5	97,3 ± 2,6	130,2 ± 11,5	88,8 ± 7,4	85,3 ± 7,1

TABLA 9

Producción de neopterina en monos cynomolgus tratados con 1 mg/kg de IL-18 pegilada o IL-18 no pegilada

Candidato		ID Mono						Concentración de Neopterina (nmol/l)			
		Tiempo (horas)									
		Día 1 (Pre-dosis)	Día 0,3 (8)	Día 1 (24)	Día 2 (48)	Día 3 (72)	Día 4 (96)	Día 7 (168)	Día 9 (216)	Día 11 (264)	Día 14 (336)
IL-18	2001	6,9	10,1	21,7	18,3	14,6	12,7	10,0	9,0	9,1	7,5
Pegilada	2002	3,8	4,7	13,2	13,7	9,9	7,9	5,0	4,9	4,3	3,9

ES 2 340 494 T3

Candidato	ID Mono	Concentración de Neopterina (nmol/l)									
		Tiempo (horas)									
		Día 1 (Pre-dosis)	Día 0,3 (8)	Día 1 (24)	Día 2 (48)	Día 3 (72)	Día 4 (96)	Día 7 (168)	Día 9 (216)	Día 11 (264)	Día 14 (336)
	2003	7,4	7,3	17,1	12,1	9,2	9,3	7,8	7,1	7,7	5,8
Media ± ETM		6,0± 1,1	7,4± 1,6	17,4± 2,5	14,7± 1,8	11,3± 1,7	10,0± 1,4	7,6± 1,4	7,0± 1,2	7,0± 1,4	5,7± 1,0
IL-18	3001	8,3	10,6	18,4	15,7	12,8	10,9	8,1	7,5	7,0	8,4
No pegilada	3002	7,4	9,1	15,9	15,9	13,5	12,2	12,0	11,1	11,6	11,1
	3003	4,6		6,1 9,3	10,3	8,3	6,8	5,9	4,6	4,7	4,3
Media ± ETM		6,0± 1,1	7,6± 1,3	12,6± 2,7	13,1± 1,9	10,9± 1,6	9,5± 1,6	9,0± 1,8	7,8± 1,9	8,1± 2,0	7,7± 2,0

* Los valores en **negrita** indican la respuesta máxima

b. Farmacocinética (PK) en Mono

Los datos PK para la IL-18 humana pegilada y no pegilada en mono Cynomolgus se resumen en la Tabla 10. El área bajo la curva (AUC) para la IL-18 pegilada del periodo de 0-8 horas fue ~7 veces mayor que el AUC de la IL-18 no pegilada para el curso de tiempo total de 336 horas. Para IL-18 pegilada, el t_{1/2} aparente de la fase de 0-8 horas fue ~0,5 horas, mientras que el t_{1/2} de la fase inicial de la IL-18 no pegilada (-43% del AUC total) fue ~7 minutos. El valor de C_{máx} para la IL-18 pegilada fue 4 veces mayor que el valor de C_{máx} para IL-18 no pegilada y fue coherente con que el fármaco se distribuyera inicialmente en el compartimento plasmático.

TABLA 10
Farmacocinética (PK) en Mono

Compuesto	C _{máx} (ng/ml)	AUC ⁻¹ ₋₁ (ng.h/ml)	T _{1/2} ⁻¹ ₁ (min)	AUC _(0-inf) (ng.h/ml)	Term. T _{1/2} (h)
IL-18 Pegilada	22193 ± 3119	18950 ± 3659	36 ± 3	111619 ± 7809*	53 ± 14*
IL-18 no pegilada	5752 ± 582	1209 ± 126	7 ± 1	2840 ± 224	31 ± 7

REIVINDICACIONES

1. Un mutante de sustitución de IL-18 humana, en el que dicho mutante comprende de tres a cinco sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la SEC ID N°: 1, estando dichas sustituciones en tres a cinco restos aminoácidos elegidos entre el grupo de: la cisteína en el resto 38, la cisteína en el resto 68, la cisteína en el resto 76, la asparagina en el resto 78, el ácido glutámico en el resto 121, la cisteína en el resto 127, la leucina en el resto 144 y el ácido aspártico en el resto 157, y en el que dicho mutante contiene al menos:
- (a) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de asparagina en el resto 78 (SEC ID N°: 5),
 - (b) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de ácido glutámico en el resto 121 (SEC ID N°: 6),
 - (c) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de leucina en el resto 144 (SEC ID N°: 7) o
 - (d) una serina en lugar de cisteína en el resto 38, un ácido aspártico en lugar de cisteína en el resto 68 y una cisteína en lugar de ácido aspártico en el resto 157 (SEC ID N°: 8).
2. Una composición biológicamente activa que comprende un polipéptido conjugado con un polímero soluble en agua, en la que el polipéptido es un mutante de sustitución de IL-18 humana elegido entre el grupo de la SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la conjugación entre el polipéptido y el polímero es covalente.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 2 ó 3, en la que el polímero soluble en agua es un miembro elegido entre el grupo de: homopolímeros de polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, poli(N-vinilpirrolidona) poli(alcohol vinílico), poli(etilenglicol-co-propilenglicol), poli(N-2-(hidroxipropil)metacrilamida), poli(ácido siálico), poli(N-acrilóil morfolina) y dextrano.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el polímero soluble en agua no está sustituido.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el polímero soluble en agua está sustituido en un extremo con un grupo alquilo.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el polímero soluble en agua es un homopolímero de polietilenglicol.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el homopolímero de polietilenglicol es monometoxi-polietilenglicol.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el monometoxi-polietilenglicol se elige entre el grupo de monometoxi-polietilenglicol lineal y monometoxi-polietilenglicol ramificado.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el homopolímero de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 daltons.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el homopolímero de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el homopolímero de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el homopolímero de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 40.000 daltons.
14. Uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 10 en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que el cáncer comprende un tumor inmunosensible elegido entre el grupo de carcinoma de células renales, mieloma, linfoma y melanoma.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de cáncer.

ES 2 340 494 T3

17. Una composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el cáncer comprende un tumor inmunosensible elegido entre el grupo de: carcinoma de células renales, mieloma, linfoma y melanoma.

5 18. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante de sustitución de IL-18 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 5, y en la que el mutante está conjugado con el polímero soluble en agua en la cisteína del resto 78.

10 19. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante de sustitución de IL-18 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 6, y en la que el mutante está conjugado con el polímero soluble en agua en la cisteína del resto 121.

15 20. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante de sustitución de IL-18 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 7, y en la que el mutante está conjugado con el polímero soluble en agua en la cisteína del resto 144.

20 21. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante de sustitución de IL-18 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 8, y en la que el mutante está conjugado con el polímero soluble en agua en la cisteína del resto 157.

25 22. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante de sustitución de IL-18 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 9, y en la que el mutante está conjugado con el polímero soluble en agua en la cisteína del resto 144.

30 23. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18, 19, 20, 21 ó 22, en la que el polímero soluble en agua se elige entre el grupo de: homopolímero de polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 daltons y homopolímero de polietilenglicol ramificado que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 daltons.

35 24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23, en la que el homopolímero de polietilenglicol lineal tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons.

40 25. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el mutante de sustitución de IL-18 humana tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 10 y en la que el mutante está conjugado con el polímero soluble en agua en la cisteína del resto 157.

45 26. La composición de acuerdo con la reivindicación 25, en la que el polímero soluble en agua es homopolímero de polietilenglicol lineal que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 daltons.

50 27. La composición de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el homopolímero de polietilenglicol lineal tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons.

45

50

55

60

65

Figura 1

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDCRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKCEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMVF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150
FTVQN ED 157

Figura 2

NFGRL HCTTA VIRNI NDQVL FVDKR QPVFE DMTDI DQSAS EPQTR LIIYM 50
YKDSE VRGLA VTL SV KDSKM STLSC KNKII SFEEM DPPEN IDDIQ SDLIF 100
FQKRV PGH NK MEFES SLYEG HFLAC QKEDD AFKLI LKKKD ENGDK SVMFT 150
LTNLH QS 157

Figura 3

MHHHH HHTRG MAAEP VEDNC INFVA MKFID NTLYF IAEDD ENLES DYFGK 50
LESKL SVIRN LNDQV LFIDQ GNRPL FEDMT DSDCR DNAPR TIFII SMYKD 100
SQPRG MAVTI SVKCE KISTL SCENK IISFK EMNPP DNIKD TKSDI IFFQR 150
SVPGH DNKMQ FESSS YEGYF LACEK ERDLF KLILK KEDEL GDRSI MFTVQ 200
NED 203

Figura 4

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKCEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150
FTVQN ED 157

Figura 5

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKDEK ISTLS CECKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150
FTVQN ED 157

Figura 6

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKDEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY CGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150
FTVQN ED 157

Figura 7

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKDEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDECG DRSIM 150
FTVQN ED 157

Figura 8

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKDEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150
FTVQN EC 157

Figura 9

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKSEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKMQF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDECG DRSIM 150
FTVQN ED 157

Figura 10

YFGKL ESKLS VIRNL NDQVL FIDQG NRPLF EDMTD SDSRD NAPRT IFIIS 50
MYKDS QPRGM AVTIS VKSEK ISTLS CENKI ISFKE MNPPD NIKDT KSDII 100
FFQRS VPGHD NKM^QF ESSSY EGYFL ACEKE RDLFK LILKK EDELG DRSIM 150
FTVQN EC 157

Figura 11

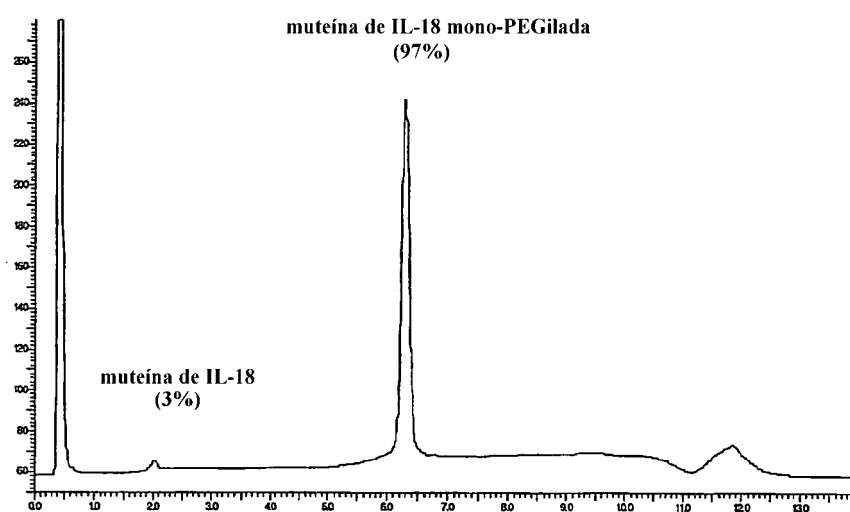


Figura 12

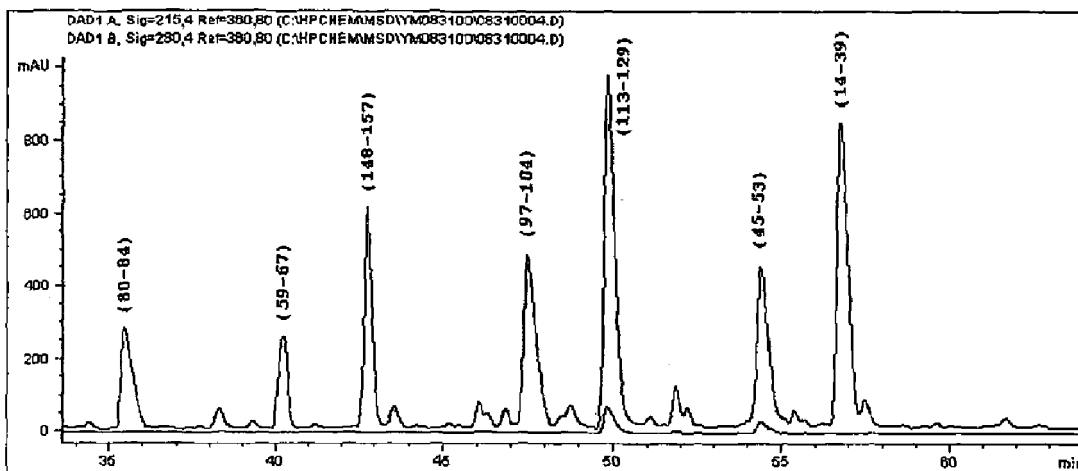
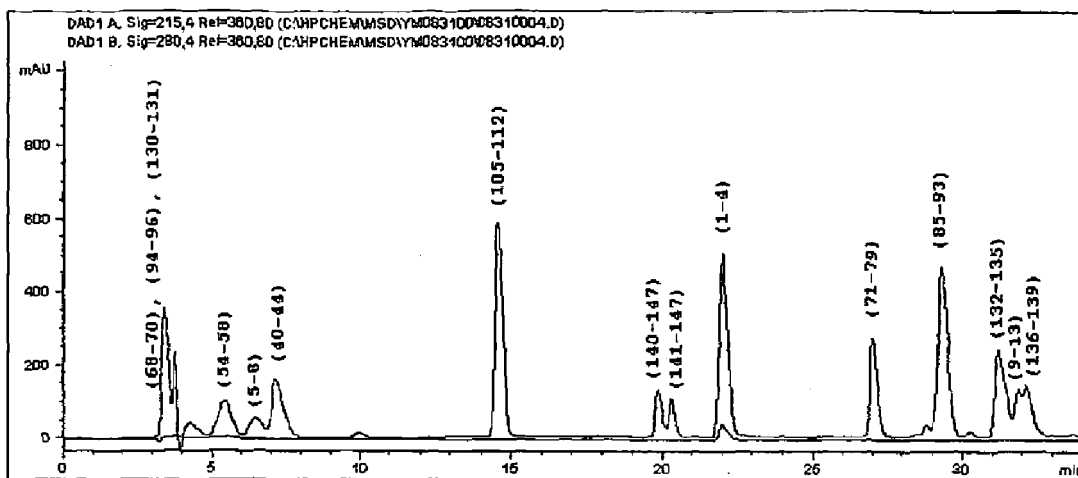


Figura 13

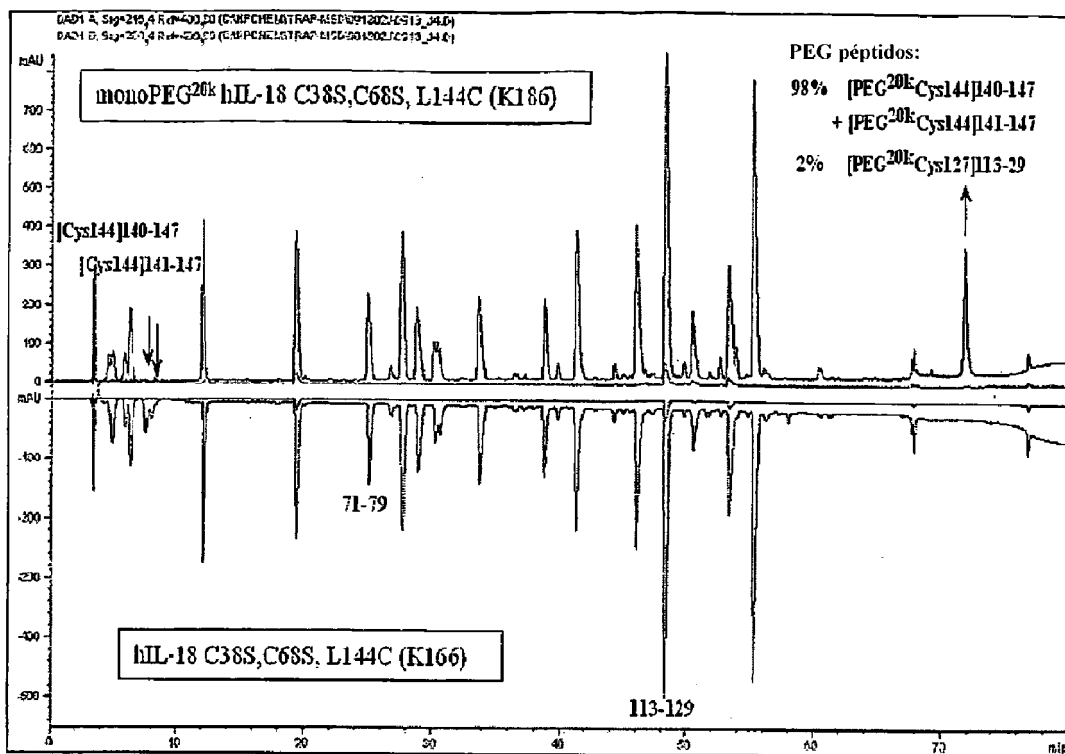


Figura 14

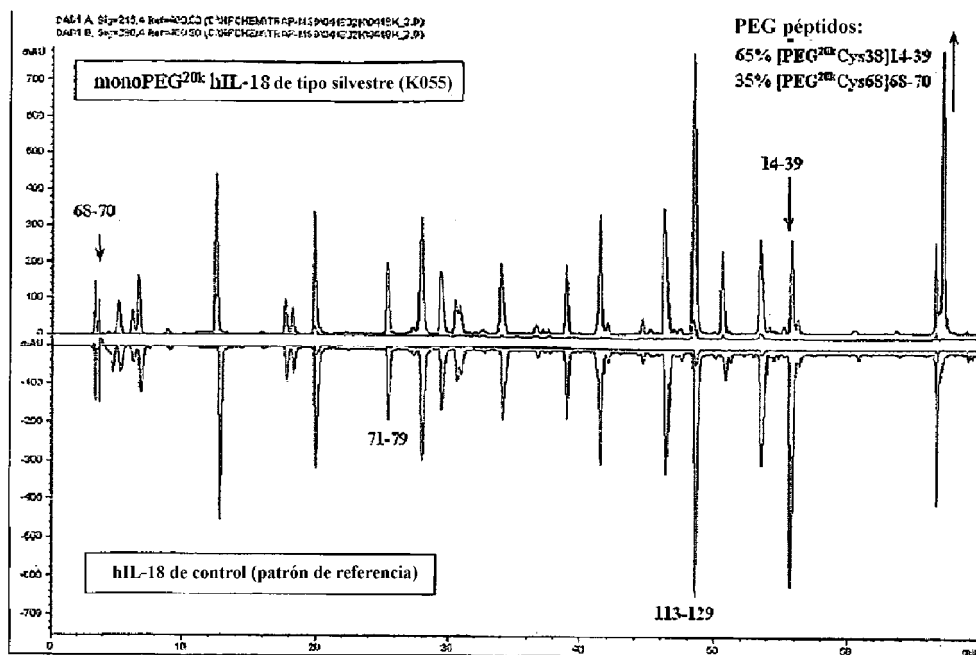
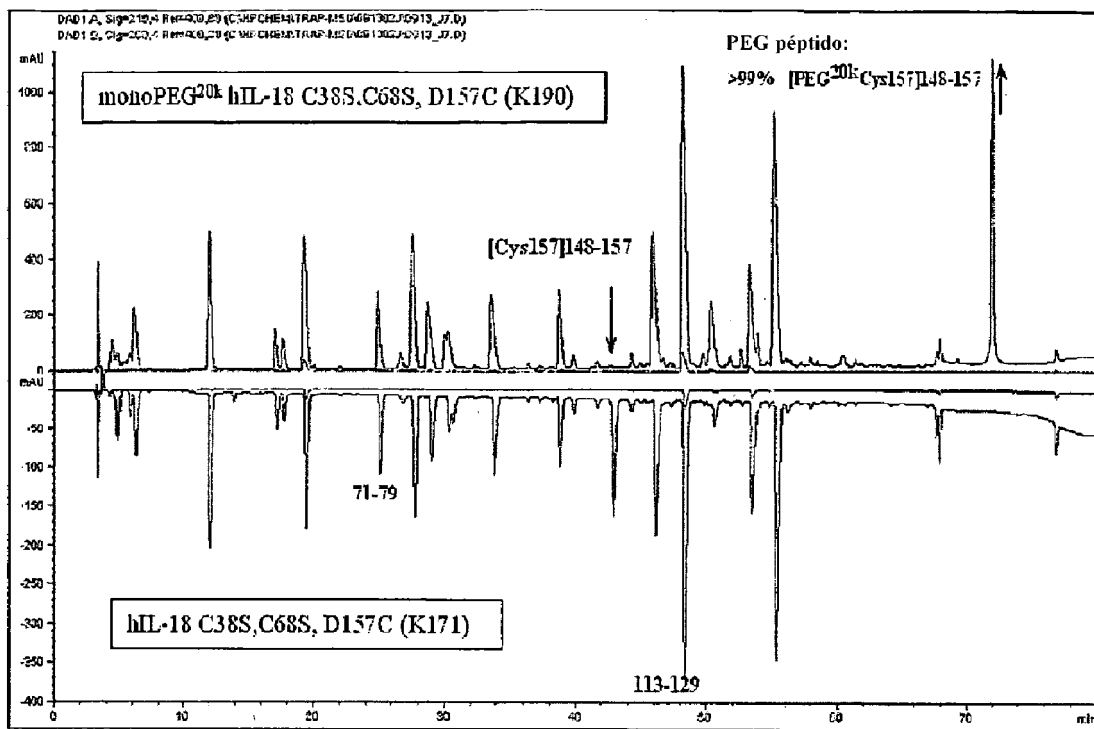


Figura 15



ES 2 340 494 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> BAM, NARENDRA
 BONGERS, JACOB
 5 KIRKPATRICK, ROBERT B.
 JANSON, CHERYL A.
 JOHANSON, KYUNG
 QIU, XIANYANG
 YEH, PING
 10

<120> CONJUGADOS QUE COMPREDEN IL-18 HUMANA Y MUTANTES DE SUSTITUCIÓN DE LOS MIS-
 MOS

15 <130> PU60053

<140> SIN ASIGNAR
 <141> 13-04-2004
 20

<150> 60/462.947
 <151> 15-04-2003

25 <160> 28

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

30 <210> 1
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35

<400> 1

40 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 45 Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 50 55 60
 Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 55 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 60 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 65 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

ES 2 340 494 T3

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 2

10

Asn Phe Gly Arg Leu His Cys Thr Thr Ala Val Ile Arg Asn Ile Asn
1 5 10 15

15

Asp Gln Val Leu Phe Val Asp Lys Arg Gln Pro Val Phe Glu Asp Met
20 25 30

Thr Asp Ile Asp Gln Ser Ala Ser Glu Pro Gln Thr Arg Leu Ile Ile
35 40 45

20

Tyr Met Tyr Lys Asp Ser Glu Val Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu Ser
50 55 60

25

Val Lys Asp Ser Lys Met Ser Thr Leu Ser Cys Lys Asn Lys Ile Ile
65 70 75 80

Ser Phe Glu Glu Met Asp Pro Pro Glu Asn Ile Asp Asp Ile Gln Ser
85 90 95

30

Asp Leu Ile Phe Phe Gln Lys Arg Val Pro Gly His Asn Lys Met Glu
100 105 110

Phe Glu Ser Ser Leu Tyr Glu Gly His Phe Leu Ala Cys Gln Lys Glu
115 120 125

35

Asp Asp Ala Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Lys Asp Glu Asn Gly Asp
130 135 140

Lys Ser Val Met Phe Thr Leu Thr Asn Leu His Gln Ser

40

145

150

155

45

<210> 3

<211> 203

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 340 494 T3

<400> 3

```

5      Met His His His His His His Thr Arg Gly Met Ala Ala Glu Pro Val
      1          5          10          15
      Glu Asp Asn Cys Ile Asn Phe Val Ala Met Lys Phe Ile Asp Asn Thr
      20          25          30
10     Leu Tyr Phe Ile Ala Glu Asp Asp Glu Asn Leu Glu Ser Asp Tyr Phe
      35          40          45
      Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn Asp Gln
15     50          55          60
      Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp Met Thr
      65          70          75          80
20     Asp Ser Asp Cys Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile Ile Ser
      85          90          95
      Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val
25     100         105         110
      Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile Ile Ser
      115         120         125
      Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys Ser Asp
30     130         135         140
      Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys Met Gln
      145         150         155         160
35     Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu Lys Glu
      165         170         175
      Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu Gly Asp
40     180         185         190
      Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
      195         200

```

45 <210> 4

<211> 157

<212> PRT

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

55 <223> Con lo que la Cisteína en la posición 38 de la secuencia de la IL-18 humana se ha reemplazado por Serina.

60

65

ES 2 340 494 T3

<400> 4

```

5      Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
      1              5              10              15
      Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
      20              25              30
10     Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
      35              40              45
      Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
15     50              55              60
      Ser Val Lys Cys Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
      65              70              75              80
20     Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
      85              90              95
      Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
25     100             105             110
      Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
      115             120             125
      Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
30     130             135             140
      Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
      145             150             155

```

35

<210> 5

<211> 157

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Con lo que la Cisteína en la posición 38 de la secuencia de la IL-18 humana se ha reemplazado por Serina, la Cisteína en la posición 68 se ha reemplazado por ácido Aspártico y la Asparagina en la posición 78 se ha reemplazado por Cisteína.

50

55

60

65

ES 2 340 494 T3

<400> 5

5 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 10 Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 15 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 20 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 25 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 30 130 135 140
 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
 145 150 155

35

<210> 6

<211> 157

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Con lo que la Cisteína en la posición 38 de la secuencia de la IL-18 humana se ha reemplazado por Serina, la Cisteína en la posición 68 se ha reemplazado por ácido Aspártico y el ácido Glutámico en la posición 121 se ha reemplazado por Cisteína.

50 <400> 6

55 Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

60

65

ES 2 340 494 T3

```

                20                25                30
Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
      35                40                45
5  Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
      50                55                60
Ser Val Lys Asp Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
10 65                70                75                80
Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
      85                90                95
15 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
      100                105                110
Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Cys Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
20 115                120                125
Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
      130                135                140
25 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp
      145                150                155

```

30 <210> 7

<211> 157

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Con lo que la Cisteína en la posición 38 de la secuencia de la IL-18 humana se ha reemplazado por Serina, la Cisteína en la posición 68 se ha reemplazado por ácido Aspártico y la Leucina en la posición 144 se ha reemplazado por Cisteína.

40

<400> 7

45

```

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
  1                5                10                15

```

```

Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp

```

50

20

25

30

```

Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
      35                40                45

```

55

```

Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
      50                55                60

```

60

65

ES 2 340 494 T3

<400> 10

Tyr Phe Gly Lys Leu Glu Ser Lys Leu Ser Val Ile Arg Asn Leu Asn
 5 1 5 10 15
 Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu Phe Glu Asp
 20 25 30
 10 Met Thr Asp Ser Asp Ser Arg Asp Asn Ala Pro Arg Thr Ile Phe Ile
 35 40 45
 Ile Ser Met Tyr Lys Asp Ser Gln Pro Arg Gly Met Ala Val Thr Ile
 50 55 60
 15 Ser Val Lys Ser Glu Lys Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys Ile
 65 70 75 80
 Ile Ser Phe Lys Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys Asp Thr Lys
 85 90 95
 20 Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys
 100 105 110
 25 Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
 115 120 125
 Lys Glu Arg Asp Leu Phe Lys Leu Ile Leu Lys Lys Glu Asp Glu Leu
 130 135 140
 30 Gly Asp Arg Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Cys
 145 150 155

35 <210> 11

<211> 4

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre S-carboximetilada

45 <400> 11

Tyr Phe Gly Lys

1

50

<210> 12

<211> 4

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre S-carboximetilada

<400> 12

65 Leu Glu Ser Lys

1

ES 2 340 494 T3

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 13

15 Leu Ser Val Ile Arg
 1 5

<210> 14

20 <211> 26

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 14

30 Asn Leu Asn Asp Gln Val Leu Phe Ile Asp Gln Gly Asn Arg Pro Leu
 1 5 10 15
35 Phe Glu Asp Met Thr Asp Ser Asp Cys Arg
 20 25

<210> 15

40 <211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 15

50 Asp Asn Ala Pro Arg
 1 5

55 <210> 16

<211> 9

<212> PRT

60 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

65

ES 2 340 494 T3

<400> 16

Thr Ile Phe Ile Ile Ser Met Tyr Lys
5 1 5

<210> 17
<211> 5
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 17

20 Asp Ser Gln Pro Arg
1 5

<210> 18
<211> 9
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

35 <400> 18

Gly Met Ala Val Thr Ile Ser Val Lys
40 1 5

<210> 19
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 19

55 Ile Ser Thr Leu Ser Cys Glu Asn Lys
1 5

<210> 20
60 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

ES 2 340 494 T3

<400> 20

Ile Ile Ser Phe Lys

5 1 5

<210> 21

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 21

Glu Met Asn Pro Pro Asp Asn Ile Lys

20 1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

35 <400> 22

Ser Asp Ile Ile Phe Phe Gln Arg

40 1 5

<210> 23

<211> 8

45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 23

Ser Val Pro Gly His Asp Asn Lys

55 1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

ES 2 340 494 T3

<400> 24

Met Gln Phe Glu Ser Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Phe Leu Ala Cys Glu
5 1 5 10 15
Lys

10 <210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

20 <400>

Asp Leu Phe Lys
25 1

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

<400> 26

40 Leu Ile Leu Lys

1

45 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

55 <400> 27

Glu Asp Glu Leu Gly Asp Arg
60 1 5

<210> 28
<211> 10
65 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 340 494 T3

<220>

<223> Péptidos trípticos previstos para la IL-18 de tipo silvestre *S*-carboximetilada

5 <400> 28

Ser Ile Met Phe Thr Val Gln Asn Glu Asp

1 5 10

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65