

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 034**

51 Int. Cl.:

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2007 E 14180696 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2821078**

54 Título: **IL-10 pegilada para uso en el tratamiento de linfoma**

30 Prioridad:

**28.09.2006 US 848326 P**  
**02.05.2007 US 915603 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.03.2017**

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)**  
**126 East Lincoln Avenue**  
**Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**OFT, MARTIN;**  
**SHEPPARD, CATHERINE;**  
**MUMM, JOHN y**  
**WU, LINGLING**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 606 034 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**

IL-10 pegilada para uso en el tratamiento de linfoma

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a interleuquina 10 pegilada (PEG-IL-10) para uso en el tratamiento de linfoma.

**Antecedentes de la invención**

10 Los cánceres y tumores se pueden controlar o erradicar por el sistema inmunitario. El sistema inmunitario incluye varios tipos de células linfoides y mieloides, por ejemplo, monocitos, macrófagos, células dendríticas (CD), eosinófilos, células T, células B y neutrófilos. Estas células linfoides y mieloides producen proteínas de señalización secretadas conocidas como citoquinas. Las citoquinas incluyen, por ejemplo, interleuquina-10 (IL-10), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), IL-12 e IL-23. La respuesta inmunitaria incluye inflamación, es decir, la acumulación de células inmunitarias sistémicamente o en una localización particular del cuerpo. En respuesta a un agente infeccioso o sustancia exógena, las células inmunitarias secretan citoquinas que, a su vez, modulan la proliferación, desarrollo, diferenciación o migración de las células inmunitarias. La respuesta inmunitaria excesiva puede producir consecuencias patológicas, tal como trastornos autoinmunitarios, mientras que la respuesta inmunitaria alterada puede producir cáncer. La respuesta antitumoral por el sistema inmunitario incluye inmunidad innata, por ejemplo, mediada por macrófagos, células NK, y neutrófilos, e inmunidad adaptativa, por ejemplo, mediada por células presentadoras de antígeno (CPA), células T, y células B (véase, por ejemplo, Abbas, et al. (eds.) (2000) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Co., Filadelfia, PA; Oppenheim y Feldmann (eds.) (2001) *Cytokine Reference*, Academic Press, San Diego, CA; von Andrian y Mackay (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1020-1034; Davidson y Diamond (2001) *New Engl. J. Med.* 345:340-350).

Se han usado métodos de modular la respuesta inmunitaria en el tratamiento de cánceres, por ejemplo, melanoma. Estos métodos incluyen el tratamiento o bien con citoquinas tal como IL-2, IL-10, IL-12, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), IFN $\gamma$ , factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) y factor de crecimiento transformante (TGF), o con antagonistas de citoquinas (por ejemplo, anticuerpos). La interleuquina-10 se caracterizó primero como un factor inhibidor de la síntesis de citoquinas (CSIF; véase, por ejemplo, Fiorentino, et al (1989) *J. Exp. Med.* 170:2081-2095). IL-10 es una citoquina pleotrópica producida por células T, células B, monocitos, que puede funcionar tanto como un inmunosupresor y como un inmunoestimulante (véase, por ejemplo, Groux, et al. (1998) *J. Immunol.* 160:3188-3193; y Hagenbaugh, et al. (1997) *J Exp. Med.* 185:2101-2110).

Modelos animales sugieren que IL-10 puede inducir la activación de células NK y facilitar la destrucción de células diana de una manera dependiente de la dosis (véase, por ejemplo, Zheng, et al. (1996) *J. Exp. Med.* 184:579-584; Kundu, et al. (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88:536-541). Estudios adicionales indican que la presencia de IL-10 en el microentorno del tumor se correlaciona con mejor supervivencia del paciente (véase, por ejemplo, Lu, et al. (2004) *J. Clin, Oncol.* 22:4575-4583).

Desgraciadamente, la semivida en suero para IL-10 es relativamente corta, es decir, 2-6 horas (véase, por ejemplo, Smith et al. (1996) *Cellular Immunol.* 173:207-214). La presente invención aborda este problema proporcionando métodos de usar una forma manipulada de IL-10, por ejemplo, una IL-10 pegilada, para tratar el cáncer. Además de una semivida más larga en suero, la forma pegilada de IL-10 mostró sorprendentemente actividad destructora de tumores aumentada, por ejemplo, mediante reclutamiento aumentado de células T CD8 $^{+}$  al sitio del tumor, cuando se compara con IL-10 no pegilada.

**Compendio de la invención**

50 La presente invención se basa en el descubrimiento de que IL-10 pegilada es un modulador mejorado del crecimiento tumoral.

En particular, la presente invención proporciona lo siguiente:

- 55 1. Una interleuquina 10 pegilada (PEG-IL-10) para uso en tratar un sujeto que padece linfoma.
2. Uso de una PEG-IL-10 para la fabricación de un medicamento parara tratar un sujeto que padece linfoma.
- 60 3. PEG-IL-10 para uso del punto 1 o el uso del punto 2, en donde la PEG-IL-10 se coadministra con al menos un agente quimioterapéutico.
- 65 4. PEG-IL-10 para uso del punto 3 o el uso del punto 3, en donde el agente quimioterapéutico es al menos uno de los agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consiste en temozolomida en un intervalo de dosis de 5 mg a 250 mg, gemcitabina en un intervalo de dosis de 200 mg a 1 g, doxorubicina en un intervalo de dosis de 1 mg/m $^2$  a 50 mg/m $^2$  e interferón alfa en un intervalo de dosis de 1  $\mu$ g/kg a 300  $\mu$ g/kg.

5. PEG-IL-10 para uso de cualquiera de los puntos 1, 3 y 4 o el uso de cualquiera de los puntos 2 a 4, en donde el sujeto es humano.
- 5 6. PEG-IL-10 para uso del punto 5 o el uso del punto 5, en donde la PEG-IL-10 es PEG-IL-10 humana (PEG-hIL-10).
7. PEG-IL-10 para uso del punto 5 o 6 o el uso del punto 5 o 6, en donde la PEG-IL-10 comprende una molécula de PEG que tiene un peso molecular de 5 kDa a 50 kDa.
- 10 8. PEG-IL-10 para uso de cualquiera de los puntos 1 y 5 a 7 o el uso de cualquiera de los puntos 2 y 5 a 7, en donde la PEG-IL-10 comprende un enlazador metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG).
- 15 9. PEG-IL-10 para uso del punto 8 o el uso del punto 8, en donde el enlazador PALD-PEG comprende una molécula de PEG que tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en 5 kDa, 12 kDa o 20 kDa.

Se divulga un método de inhibir o reducir el crecimiento de un tumor o cáncer que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad eficaz de una interleuquina-10 pegilada (PEG-IL-10). La PEG-IL-10 puede ser mono-PEG-IL-10. La PEG-IL-10 puede comprender un enlazador SC-PEG-12K. La PEG-IL-10 puede comprender un enlazador metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG). El enlazador PALD-PEG puede comprender una molécula de PEG que tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en 5 kDa, 12 kDa o 20 kDa. La PEG-IL-10 puede inhibir el crecimiento del tumor o cáncer o la PEG-IL-10 reduce el tamaño del tumor o cáncer. La PEG-IL-10 puede aumentar la infiltración de células T CD8+ en el tumor cuando se compara con IL-10 no pegilada.

PEG-IL-10 puede aumentar la expresión de al menos una citoquina inflamatoria, que se puede seleccionar del grupo que consiste en IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10 y ligando de RANK (RANK-L). La PEG-IL-10 se puede coadministrar con al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser al menos uno de los agentes quimioterapéuticos de la tabla 16. El tumor o cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, glioblastoma y leucemia.

La presente divulgación describe un método de tratar un sujeto que padece un cáncer o tumor que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de PEG-IL-10. La PEG-IL-10 puede ser mono-PEG-IL-10. La PEG-IL-10 puede comprender un enlazador SC-PEG-12K. La PEG-IL-10 puede comprender un enlazador metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG) que puede tener un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en 5 kDa, 12 kDa o 20 kDa. La PEG-IL-10 puede inhibir el crecimiento del cáncer o tumor o puede reducir el tamaño del tumor o cáncer. La PEG-IL-10 puede aumentar la infiltración de células T CD8+ en el tumor cuando se compara con IL-10 no pegilada. PEG-IL-10 puede aumentar la expresión de al menos una citoquina inflamatoria. La citoquina inflamatoria se puede seleccionar del grupo que consiste en IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10 y RANK-L.

La PEG-IL-10 se puede coadministrar con al menos un agente quimioterapéutico. El agente quimioterapéutico puede ser al menos uno de los agentes quimioterapéuticos de la tabla 16. PEG-IL-10 puede reducir la metástasis de un cáncer o tumor. El tumor o cáncer se puede seleccionar del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, glioblastoma y leucemia. El sujeto que se trata puede ser humano y la PEG-IL-10 puede ser PEG-IL-10 humana (PEG-hIL-10).

### Descripción detallada

Como se usa en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras tales como "un", "una", "el" y "la", incluyen sus correspondientes referencias plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa.

#### I. Definiciones

"Activación", "estimulación" y "tratamiento", como se aplica a células o a receptores, pueden tener el mismo significado, por ejemplo, activación, estimulación o tratamiento de una célula o receptor con un ligando, a menos que se indique de otra manera por el contexto o explícitamente. "Ligando" puede ser ligandos naturales o sintéticos, por ejemplo, citoquinas, variantes de citoquinas, análogos, muteínas y composiciones de unión derivadas de anticuerpos. "Ligando" puede ser moléculas pequeñas, por ejemplo, peptidomiméticos de citoquinas y peptidomiméticos de anticuerpos. "Activación" se puede referir a activación celular regulada por mecanismos internos, así como por factores externos o medioambientales. "Respuesta", por ejemplo, de una célula, tejido, órgano u organismo puede ser un cambio en comportamiento bioquímico o fisiológico, por ejemplo, concentración, densidad, adhesión, o migración en un compartimento biológico, tasa de expresión génica, o estado de diferenciación, donde el cambio se correlaciona con activación, estimulación, o tratamiento, o con mecanismos internos tal como programación genética.

“Actividad” de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o un receptor, a actividad catalítica, a la capacidad de estimular expresión génica o señalización, diferenciación o maduración celular; a actividad antigénica o a la modulación de actividades de otras moléculas. “Actividad” de una molécula también se puede referir a actividad en modular o mantener interacciones célula a célula, por ejemplo, adhesión, o actividad en

5 mantener una estructura de una célula, por ejemplo, membranas celulares o citoesqueleto. “Actividad” también puede significar actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína] o [actividad inmunológica]/[mg de proteína] o concentración en un compartimento biológico. “Actividad proliferativa” puede ser una actividad que fomenta, que es necesaria para, o que está específicamente asociada con, por ejemplo, división celular normal, así como cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

10 “Administración” y “tratamiento”, como se aplica a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere a contacto de un agente farmacéutico, terapéutico, diagnóstico, compuesto o composición exógena al animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. “Administración” y “tratamiento” se puede referir, por ejemplo, a métodos terapéuticos, placebo, farmacocinéticos, diagnósticos, de

15 investigación y experimentales. “Tratamiento de una célula” puede ser el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, donde el fluido está en contacto con la célula. “Administración” y “tratamiento” también significa tratamientos *in vitro* y *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, por un reactivo, composición diagnóstica, de unión, o por otra célula. “Tratamiento” como se aplica a un sujeto humano, veterinario o de investigación, se refiere a tratamiento terapéutico, medidas profilácticas o preventivas, para aplicaciones de

20 investigación y diagnósticas. “Tratamiento” como se aplica a un sujeto humano, veterinario o de investigación, o célula, tejido u órgano puede ser el contacto de PEG-IL-10 con un sujeto humano o animal, una célula, tejido, compartimento fisiológico o fluido fisiológico. “Tratamiento de una célula” también pueden ser situaciones donde PEG-IL-10 se pone en contacto con el receptor de IL-10 (heterodímero o IL-10R1 e IL-10R2), por ejemplo, en la fase fluida o fase coloidal, así como situaciones donde un agonista o antagonista de IL-10 se pone en contacto con un

25 fluido, por ejemplo, donde el fluido está en contacto con una célula o receptor, pero donde no se ha demostrado que el agonista o antagonista entre en contacto directamente con la célula o receptor.

30 “Caquexia” es un síndrome consuntivo que implica la pérdida de músculo (atrofia muscular) y grasa, resultante de un trastorno en el metabolismo. La caquexia se produce en varios cánceres (“caquexia por cáncer”), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insuficiencia orgánica avanzada, y SIDA. La caquexia por cáncer se caracteriza por, por ejemplo, marcada pérdida de peso, anorexia, astenia y anemia. La anorexia es un trastorno resultante de la pérdida de motivación para comer, por ejemplo, aversión a la comida (véase, por ejemplo, MacDonald, *et al.* (2003) *J. Am. Coll. Surg.* 197:143-361; Rubin (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:5384-5389; Tisdale (2002) *Nature Reviews Cancer* 2:862-871; Argiles, *et al.* (2003) *Drug Discovery Today* 8:838-844; Lelli, *et al.* (2003) *J. Chemother.* 15:220-225; Argiles, *et al.* (2003) *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 6:401-406).

35 “Variantes conservadoramente modificadas de PEG-IL-10” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, las variantes conservadoramente modificadas se refieren a esos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas o, donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácido nucleico esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos puede codificar cualquier proteína determinada.

40 Respecto a las secuencias de aminoácidos, el experto en la materia reconocerá que una sustitución individual a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que sustituye un aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada para un aminoácido conservado es una “variante conservadoramente modificada”. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen bien en la técnica. Un ejemplo de una sustitución conservadora es el intercambio de un aminoácido en uno de los siguientes grupos por otro aminoácido del mismo grupo (patente en EE UU No. 5.767.063 concedida a Lee, *et al.*; Kyte y Doolittle (1982) *J. Mol. Biol.* 157: 105-132):

- 45
- (1) Hidrofóbicos: norleucina, Ile, Val, Leu, Phe, Cys o Met;
  - (2) Hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr,
  - (3) Ácidos: Asp, Glu;
  - 55 (4) Básicos: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
  - (5) Residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
  - (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe;
  - (7) Aminoácidos pequeños: Gly, Ala, Ser.

60 “Cantidad eficaz” puede ser una cantidad suficiente para aliviar o prevenir un síntoma o signo de la afección médica. Cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una cantidad eficaz para un paciente o sujeto veterinario particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trata, la salud global del paciente, el método, dosis y vía de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 5.888.530 concedida a Netti *et al.*). Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o protocolo de dosis que evita efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. El efecto producirá una mejora de una medida o parámetro diagnóstico en al menos el 5%, habitualmente en al menos el 10%, más

habitualmente al menos el 20%, lo más habitualmente al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90%, donde se define el 100% como el parámetro diagnóstico mostrado por un sujeto normal (véase, por ejemplo, Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, RU). Una cantidad eficaz de PEG-IL-10 sería una cantidad suficiente para reducir un volumen tumoral, inhibir el crecimiento del tumor, prevenir metástasis, o aumentar la infiltración de células T CD8+ en el sitio del tumor.

“Exógeno” se refiere a sustancias que se producen fuera de un organismo, célula o cuerpo humano, dependiendo del contexto. “Endógeno” se refiere a sustancias que se producen en una célula, organismo, o cuerpo humano, dependiendo del contexto.

“Afección inmunitaria” o “trastorno inmunitario” puede ser, por ejemplo, inflamación patológica, un trastorno inflamatorio, y un trastorno o enfermedad autoinmunitaria. “Afección inmunitaria” también se refiere a infecciones, infecciones persistentes, y afecciones proliferativas, tal como cáncer, tumores, y angiogénesis, incluyendo infecciones, tumores y cánceres que resisten la erradicación por el sistema inmunitario. “Estado canceroso” incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y estados precancerosos tal como displasia.

“Inhibidores” y “antagonistas” o “activadores” y “agonistas” se refiere a moléculas inhibidoras o activadoras, respectivamente, por ejemplo, para la activación de, por ejemplo, un ligando, receptor, cofactor, gen, célula, tejido u órgano. Un modulador de, por ejemplo, un gen, un receptor, un ligando, o una célula, es una molécula que altera una actividad del gen, receptor, ligando, o célula, donde la actividad se puede activar, inhibir o alterar en sus propiedades reguladoras. El modulador puede actuar solo, o puede usar un cofactor, por ejemplo, una proteína, ion metálico, o molécula pequeña. Los inhibidores son compuestos que disminuyen, bloquean, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan por disminución, por ejemplo, un gen, proteína, ligando, receptor o célula. Los activadores son compuestos que aumentan, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan, o regulan por aumento, por ejemplo, un gen, proteína, ligando, receptor, o célula. Un inhibidor también se puede definir como una composición que reduce, bloquea, o inactiva una actividad constitutiva. Un “agonista” es un compuesto que interacciona con una diana para producir o fomentar un aumento en la activación de la diana. Un “antagonista” es un compuesto que se opone a las acciones de un agonista. Un antagonista previene, reduce, inhibe, o neutraliza la actividad de un agonista. Un antagonista también puede prevenir, inhibir o reducir la actividad constitutiva de una diana, por ejemplo, un receptor diana, incluso donde no hay agonista identificado.

Para examinar el grado de inhibición, por ejemplo, se tratan muestras o ensayos que comprenden una, por ejemplo, proteína, gen, célula u organismo determinado, con un potencial activador o inhibidor y se comparan con muestras control sin el inhibidor. A las muestras control, es decir, sin tratar con el antagonista, se les asigna un valor de actividad relativa del 100%. Se logra inhibición cuando el valor de actividad relativo al control es aproximadamente el 90% o menos, típicamente el 85% o menos, más típicamente el 80% o menos, lo más típicamente el 75% o menos, generalmente el 70% o menos, más generalmente el 65% o menos, lo más generalmente el 60% o menos, típicamente el 55% o menos, habitualmente el 50% o menos, más habitualmente el 45% o menos, lo más habitualmente el 40% o menos, el 35% o menos, el 30% o menos, el 25% o menos, o menos del 25%. La activación se alcanza cuando el valor de actividad relativo al control es aproximadamente el 110%, generalmente al menos el 120%, más generalmente el menos el 140%, más generalmente al menos el 160%, con frecuencia al menos el 180%, con más frecuencia al menos 2 veces, con la mayor frecuencia al menos 2,5 veces, habitualmente al menos 5 veces, más habitualmente al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 40 veces o más de 40 veces mayor.

Los criterios de valoración en activación o inhibición se pueden seguir como sigue. La activación, inhibición y respuesta al tratamiento, por ejemplo, de una célula, fluido fisiológico, tejido, órgano y sujeto animal o humano, se pueden seguir por un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender un cantidad o porcentaje determinado de, por ejemplo, un indicio de inflamación, oncogenicidad, o desgranulación o secreción de una célula, tal como la liberación de una citoquina, oxígeno tóxico, o una proteasa. El criterio de valoración puede comprender, por ejemplo, una cantidad predeterminada de flujo o transporte de un ion; migración celular; adhesión celular; proliferación celular; potencial para metástasis; diferenciación celular; y cambio en fenotipo, por ejemplo, cambio en la expresión de un gene relacionado con inflamación, apoptosis, transformación, ciclo celular o metástasis (véase, por ejemplo, Knight (2000) *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:145-158; Hood y Cheresch (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:91-100; Timme, *et al.* (2003) *Curr. Drug Targets* 4:251-261; Robbins e Itzkowitz (2002) *Med Clin. North Am.* 86:1467-1495; Grady y Markowitz (2002) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3:101-128; Bauer, *et al.* (2001) *Glia* 36:235-243; Stanimirovic y Satoh (2000) *Brain Pathol.* 10:113-126).

Un criterio de valoración de inhibición generalmente es el 75% del control o menos, el 50% del control o menos, el 25% del control o menos, o el 10% del control o menos. Generalmente, un criterio de valoración de activación es al menos el 150% del control, al menos dos veces el control, al menos cuatro veces el control, o al menos 10 veces el control.

Una composición que está “marcada” es detectable, sea directa o indirectamente, por métodos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, isotópicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen <sup>32</sup>P,

<sup>33</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, <sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I, isótopos estables, colorantes fluorescentes, reactivos densos a los electrones, sustratos, etiquetas epítomos, o enzimas, por ejemplo, como se usan en enzimoimmunoanálisis de adsorción o fluorettes (véase, por ejemplo, Rozinov y Nolan (1998) *Chem. Biol.* 5:713-728).

5 “Ligando” se refiere, por ejemplo, a una molécula pequeña, péptido, polipéptido y molécula asociada a la membrana o unida a la membrana, o complejo de las mismas, que puede actuar como un agonista o antagonista de un receptor. “Ligando” también puede ser un agente que no sea un agonista o antagonista, sino que se puede unir al receptor sin influir significativamente sus propiedades biológicas, por ejemplo, señalización o adhesión. Además, “ligando” incluye un ligando unido a la membrana que se ha cambiado, por ejemplo, por métodos químicos o recombina-  
10 ntes, a una versión soluble del ligando unido a la membrana. Por convención, donde un ligando está unido a la membrana en una primera célula, el receptor habitualmente se produce en una segunda célula. La segunda célula puede tener la misma identidad o una diferente que la primera célula. Un ligando o receptor puede ser enteramente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, núcleo, o algún otro compartimento intracelular. El ligando o receptor puede cambiar su localización, por ejemplo, de un compartimento intracelular a la cara externa de la membrana plasmática. El complejo de un ligando y receptor se denomina un “complejo ligando receptor”. Donde un ligando y receptor están implicados en una ruta de señalización, el ligando se produce en una posición anterior y el receptor se produce en una posición posterior de la ruta de señalización.

Se divulgan “moléculas pequeñas” para el tratamiento de fisiología y trastornos de tumores y cánceres. Se define “molécula pequeña” como una molécula con un peso molecular que es menor de 10 kD, típicamente menor de 2 kD, o menor de 1 kD. Las moléculas pequeñas incluyen, pero no están limitadas a, moléculas inorgánicas, moléculas orgánicas, moléculas orgánicas que contienen un componente inorgánico, moléculas que comprenden un átomo radiactivo, moléculas sintéticas, miméticos de péptidos, y miméticos de anticuerpos. Como agente terapéutico, una molécula pequeña puede ser más permeable a células, menos susceptible a degradación, y menos apta para provocar una respuesta inmunitaria que las moléculas grandes. Se describen moléculas pequeñas, tal como peptidomiméticos de anticuerpos y citoquinas, así como toxinas de molécula pequeña (véase, por ejemplo, Casset, *et al.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:198-205; Muyldermans (2001) *J. Biotechnol.* 74:277-302; Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:1251-1256; Apostolopoulos, *et al.* (2002) *Curr. Med. Chem.* 9:411-420; Monfardini, *et al.* (2002) *Curr. Pharm. Des.* 8:2185-2199; Domingues, *et al.* (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6:652-656; Sato y Sone (2003) *Biochem. J.* 371:603-608; Patente en EE UU No. 6.326.482 concedida a Stewart, *et al.*).

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tal como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo tal como busulfán, improsulfan y piposulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolomelamima mostazas de nitrógeno tal como clorambucilo, clomafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamide, mostaza de uracilo; nitrosureas tal como carmustina, cloroziatocina, fotemustina, loniustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tal como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxombicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tal como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterin, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tal como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-suprarrenales tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reaprovisionador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbina; PSK®; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL® Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (Taxotere™, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gembcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tal como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tal como antiestrógenos incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolido, y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Se une "específicamente" o "selectivamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, anticuerpo/antígeno, u otro par de unión, indica una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros agentes biológicos. Por tanto, en las condiciones designadas, un ligando específico se une a un receptor particular y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El anticuerpo, o composición de unión derivada del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo, del método descrito en el presente documento se une a su antígeno, o una variante o muteína del mismo, con una afinidad que es al menos dos veces mayor, al menos diez veces mayor, al menos 20 veces mayor, o al menos 100 veces mayor que la afinidad con cualquier otro anticuerpo, o composición de unión derivada del mismo. El anticuerpo tendrá una afinidad que es mayor de aproximadamente  $10^9$  litros/mol, como se determina, por ejemplo, por análisis de Scatchard (Munsen, *et al* (1980) *Analyt. Biochem.* 107:220-239).

"Interleuquina-10" o "IL-10", como se usa en el presente documento, sea conjugada a un polietilenglicol, o en una forma no conjugada, es una proteína que comprende dos subunidades unidas de forma no covalente para formar un homodímero. Como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otra manera "interleuquina-10" e "IL-10" se puede referir a IL-10 humana o de ratón (No. de acceso a GenBank NP\_000563; M37897; o documento US 6.217.857) que también se denominan "hIL-10" o "mIL-10".

"IL-10 pegilada" o "PEG-IL-10" es una molécula de IL-10 que tiene una o más moléculas de polietilenglicol unidas covalentemente a uno o más residuos de aminoácidos de la proteína IL-10 a través de un enlazador, de modo que la unión es estable. Los términos "IL-10 monopegilada" y "mono-PEG-IL-10", significan que una molécula de polietilenglicol está covalentemente unida a un único residuo de aminoácido en una subunidad del dímero de IL-10 a través de un enlazador. El peso molecular medio de la fracción de PEG es preferiblemente entre 5.000 y aproximadamente 50.000 dalton. El método o sitio de unión de PEG a IL-10 no es crítico, pero la pegilación no altera, o solo altera mínimamente, la actividad de la molécula biológicamente activa. El aumento en la semivida puede ser mayor que cualquier disminución en la actividad biológica. Para PEG-IL-10, la actividad biológica se mide típicamente evaluando los niveles de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) en el suero de sujetos provocados con un antígeno bacteriano (lipopolisacárido, LPS) y tratados con PEG-IL-10, como se describe en el documento US 7.052.686.

Como se usa en el presente documento, "semivida en suero", abreviado " $t_{1/2}$ ", significa semivida de eliminación, es decir, el tiempo en que la concentración en suero de un agente ha alcanzado la mitad de su valor inicial o máximo. El término "semivida en suero aumentada" usado en el presente documento en referencia a un agente sintético significa que el agente sintético se depura a una velocidad menor que el agente no sintético endógeno o la versión recombinantemente producida del mismo.

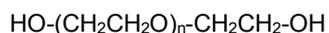
## II. General

La presente divulgación describe métodos de tratar trastornos proliferativos, por ejemplo, cáncer, tumores, etc., con IL-10 pegilada. IL-10 induce la actividad citotóxica de células T CD8, producción de anticuerpos de células B y suprime la actividad de macrófagos e inflamación fomentada por tumores (véase, Chen y Zlotnik (1991) *J. Immunol.* 147:528-534; Groux, et al. (1999) *J. Immunol.* 162:1723-1729; y Bergman, et al. (1996) *J. Immunol.* 157:231-238). La regulación de células CD8 es dependiente de la dosis, en donde dosis mayores inducen respuestas citotóxicas más fuertes, sin embargo, la utilidad de hIL-10 recombinante está limitada por su corta semivida. PEG-IL-10 mostró una propiedad inesperada de aumentar la infiltración de células T CD8+ a un tumor, así como aumentar la expresión de citoquinas inflamatorias que desempeñan un papel en la inmunidad tumoral. El tratamiento con PEG-IL-10, por tanto, debe proporcionar una mejora significativa para el tratamiento de tumores.

## III. Polietilenglicol ("PEG")

El polietilenglicol ("PEG") es una fracción química que se ha usado en la preparación de productos proteicos terapéuticos. El verbo "pegilar" significa unir al menos una molécula de PEG a otra molécula, por ejemplo, una proteína terapéutica. Por ejemplo, Adagen, una formulación pegilada de adenosina desaminasa, está aprobada para tratar enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave; la superóxido dismutasa pegilada ha estado en ensayos clínicos para tratar lesión en la cabeza; el alfa interferón pegilado se ha probado en ensayos clínicos de fase I para tratar hepatitis; se describe que la glucocerebrosidasa pegilada y la hemoglobina pegilada han estado en ensayos preclínicos. Se ha mostrado que la unión de polietilenglicol protege contra la proteólisis (véase, por ejemplo, Sada, et al., (1991) *J. Fermentation Bioengineering* 71:137-139).

En su forma más común, PEG es un poliéter lineal o ramificado terminado con grupos hidroxilo y que tiene la estructura general:



Para acoplar PEG a una molécula (polipéptidos, polisacáridos, polinucleótidos, y moléculas orgánicas pequeñas) es necesario activar el PEG preparando un derivado del PEG que tiene un grupo funcional en uno o ambos extremos.

La ruta más común para la conjugación de PEG de proteínas ha sido activar el PEG con grupos funcionales adecuados para reacción con lisina y grupos aminoácidos N-terminales. En particular, los grupos reactivos más comunes implicados en el acoplamiento de PEG a polipéptidos son los grupos alfa o épsilon amino de lisina.

5 La reacción de un enlazador de pegilación con una proteína produce la unión de la fracción PEG predominantemente en los siguientes sitios: el grupo alfa amino en el extremo N de la proteína, el grupo épsilon amino en la cadena lateral de residuos de lisina, y el grupo imidazol en la cadena lateral de residuos de histidina. Puesto que la mayoría de proteínas recombinantes poseen un único grupo alfa y un número de grupos épsilon amino e imidazol, se pueden generar numerosos isómeros posicionales dependiendo de la química del enlazador.

10 Dos monometoxi PEG (mPEG) activados de primera generación ampliamente usados eran carbonato de succinimidilo PEG (SC-PEG; véase, por ejemplo, Zalipsky, et al. (1992) *Biotechnol. Appl. Biochem* 15:100-114; y Miron y Wilcheck (1993) *Bioconjug. Chem.* 4:568-569) y carbonato de benzotriazol PEG (BTC-PEG; véase, por ejemplo, Dolence, et al. Patente en EE UU No. 5.650.234), que reaccionan preferentemente con residuos de lisina para formar un enlace carbamato, pero también se sabe que reaccionan con residuos de histidina y tirosina. Se ha mostrado que el enlace a residuos de histidina en IFN $\alpha$  es un enlace imidazolcarbamato hidrolíticamente inestable (Véase, por ejemplo, Lee y McNemar, Patente en EE UU No. 5.985.263).

15 La segunda generación de tecnología de PEGilación se ha diseñado para evitar estos enlaces inestables, así como la falta de selectividad en reactividad con residuos. El uso de un enlazador PEG-aldehído se dirige a un único sitio en el extremo N de un polipéptido mediante aminación reductora. IL-10 se puede pegilar usando diferentes tipos de enlazadores y pH para llegar a varias formas de una molécula pegilada (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.252.714, US 5.643.575, US 5.919.455, US 5.932.462, US 5.985.263, US 7.052.686).

#### 25 IV. Actividad biológica de PEG-IL-10

IL-10 humana induce el rápido desarrollo de anticuerpos neutralizantes cuando se administra a ratones inmunocompetentes. Para evitar este tipo de neutralización, se dio administración subcutánea de PEG-hIL-10 a ratones deficientes en células B, es decir, ratones incapaces de montar una respuesta de anticuerpos. Tumores 30 singénicos bien establecidos en estos ratones inmunodeficientes o bien se retrasaron significativamente en crecimiento o se rechazaron por completo por PEG-hIL-10. La restricción o inhibición del crecimiento tumoral dependía de células T tanto CD4 como CD8. Tras la eliminación de las células CD8, el efecto inhibitor de PEG-hIL-10 se anulaba por completo. Por tanto, PEG-hIL-10 induce respuestas citotóxicas mediadas por CD8.

35 El análisis adicional del tejido tumoral mostró que PEG-IL-10 aumentó la infiltración de células T CD8+ en el tumor a un nivel mayor que el de IL-10 no pegilada. El nivel de expresión de citoquinas inflamatorias por las células T CD8 infiltrantes también era mayor con tratamiento con PEG-IL-10 comparado con tratamiento con IL-10 no pegilada. El tratamiento de pacientes con tumores con PEG-IL-10 debe inducir una respuesta antitumoral significativa y conferir un beneficio terapéutico significativo.

40 Una proteína IL-10 usada en la presente divulgación contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de al menos el 75%, al menos el 85%, o al menos el 90% o más, por ejemplo, al menos el 95%, con la secuencia de una proteína IL-10 madura, es decir, que carece de cualquier secuencia líder. Véase, por ejemplo, la patente en EE UU No. 6.217.857. La homología de la secuencia de aminoácidos, o identidad de 45 secuencia, se determina optimizando coincidencias de residuos y, si es necesario, introduciendo huecos según se requiera. Se pretende que las secuencias de aminoácidos homólogas típicamente incluyan variaciones alélicas naturales, polimórficas e interespecies en cada secuencia respectiva. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán desde el 25-100% de homología (si se pueden introducir huecos) al 50-100% de homología (si se incluyen sustituciones conservadoras) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido IL-10. Véase, Needleham et al., *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); Sankoff et al. en *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, 1983, Addison-Wesley, Reading, Mass.; y los paquetes de software de IntelliGenetics, Mountain View, Calif., y the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, Wis.

55 La fracción de IL-10 en los conjugados PEG-IL-10 puede estar glucosilada o puede estar modificada con muteínas no glucosiladas u otros análogos, incluyendo la proteína BCRF1 (IL-10 vírica del virus de Epstein Barr). Se pueden hacer modificaciones de las secuencias que codifican IL-10 usando una variedad de técnicas, por ejemplo, mutagénesis dirigida [Gillman et al., *Gene* 8:81-97 (1979); Roberts et al., *Nature* 328:731-734 (1987)], y se pueden evaluar por cribado de rutina en un ensayo adecuado para actividad de IL-10. Las proteínas IL-10 modificadas, por ejemplo, variantes, pueden variar de la secuencia natural a nivel de la estructura primaria. Tales modificaciones se 60 pueden hacer por inserciones, sustituciones, deleciones y fusiones de aminoácidos. Las variantes de IL-10 se pueden preparar con varios objetivos en mente, incluyendo aumentar la semivida en suero, reducir una respuesta inmunitaria contra IL-10, facilitar la purificación o preparación, disminuir la conversión de IL-10 en sus subunidades monoméricas, mejorar la eficacia terapéutica, y disminuir la gravedad o aparición de efectos secundarios durante el uso terapéutico. Las variantes de secuencia de aminoácidos habitualmente son variantes predeterminadas no 65 encontradas en la naturaleza, aunque otras pueden ser variantes postraduccionales, por ejemplo, variantes glucosiladas. Cualquier variante de IL-10 se puede usar en esta divulgación siempre que retenga un nivel adecuado

de actividad IL-10. En el contexto tumoral, actividad IL-10 adecuada sería, por ejemplo, infiltrado de células T CD8+ en sitios tumorales, expresión de citoquinas inflamatorias tal como IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, y RANK-L, de estas células que se infiltran, niveles aumentados de TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  en muestras biológicas.

5 La IL-10 usada en esta invención puede derivar de un mamífero, por ejemplo, ser humano o ratón. Se prefiere IL-10 humana (hIL-10) para el tratamiento de seres humanos en necesidad de tratamiento con IL-10. La IL-10 descrita en el presente documento puede ser una IL-10 recombinante. Se pueden encontrar métodos que describen la preparación de IL-10 humana y de ratón en la patente en EE UU No. 5.231.012. También se incluyen variantes naturales o conservadoramente sustituidas de IL-10 humana y de ratón. IL-10 puede ser de origen vírico. La clonación y expresión de una IL-10 vírica del virus de Epstein Barr (Proteína BCRF1) se divulga en Moore et al., Science 248:1230 (1990).

15 Se puede obtener IL-10 de un número de maneras usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, aislada y purificada de medio de cultivo de células activadas capaces de secretar la proteína (por ejemplo, células T), sintetizada químicamente o técnicas recombinantes (véase, por ejemplo, Merrifield, Science 233:341-47 (1986); Atherton et al., *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, 1989, LR.L. Press, Oxford; patente en EE UU No. 5.231.012 que enseña métodos para la producción de proteínas que tienen actividad IL-10, incluyendo técnicas recombinantes y otras sintéticas). La proteína IL-10 se puede obtener de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido IL-10 usando técnicas recombinantes. La IL-10 humana recombinante está también comercialmente disponible, por ejemplo, de Pepro Tech. Inc., Rocky Hill, N.J.

20 Se puede hacer PEG-IL-10 usando métodos bien conocidos en la técnica. Se puede sintetizar polietilenglicol (PEG) como se describe, por ejemplo, en Lundblad, R.L. et al. (1988) *Chemical Reagents for Protein Modification CRC Press, Inc., vol. 1, pp. 105-125*. Se puede conjugar PEG a IL-10 mediante el uso de un enlazador como se ha descrito anteriormente. En ciertas formas de realización, la PEG-IL-10 usada en la invención es una mono-PEG-IL-10 en la que de una a nueve moléculas de PEG están covalentemente unidas a través de un enlazador al grupo alfa amino del residuo de aminoácido en el extremo N de una subunidad del dímero de IL-10.

#### 30 IV. Composiciones terapéuticas, métodos

Se puede formular PEG-IL-10 en una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la IL-10 y un soporte farmacéutico. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para proporcionar el resultado terapéutico deseado. Preferiblemente, tal cantidad tiene efectos secundarios negativos mínimos. La cantidad de PEG-IL-10 administrada para tratar una afección tratable con IL-10 se basa en la actividad IL-10 de la proteína conjugada, que se puede determinar por ensayos de actividad de IL-10 conocidos en la técnica. La cantidad terapéuticamente eficaz para un paciente particular en necesidad de tal tratamiento se puede determinar considerando varios factores, tal como la afección tratada, la salud global del paciente, el método de administración y/o la gravedad de los efectos secundarios. En el contexto de un tumor, la actividad IL-10 adecuada sería, por ejemplo, infiltrado de células T CD8+ en sitios tumorales, expresión de citoquinas inflamatorias tal como IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, y RANK-L, de estas células que se infiltran, niveles aumentados de TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  en muestras biológicas.

45 La cantidad terapéuticamente eficaz de IL-10 pegilada puede variar desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 100  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal al día. La cantidad de IL-10 pegilada puede variar desde aproximadamente 0,1 a 20  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal al día, desde aproximadamente 0,5 a 10  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal al día, o desde aproximadamente 1 a 4  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal al día. Se pueden emplear programas de administración menos frecuentes usando la PEG-IL-10 de la invención puesto que esta forma conjugada actúa durante más tiempo que IL-10. La IL-10 pegilada se formula en forma purificada y sustancialmente libre de agregados y otras proteínas. PEG-IL-10 se puede administrar por infusión continua de modo que se administre una cantidad en el intervalo de aproximadamente 50 a 800  $\mu$ g de proteína al día (es decir, aproximadamente de 1 a 16  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal al día de PEG-IL-10). La velocidad de infusión diaria se puede variar basado en el seguimiento de los efectos secundarios y recuentos de células sanguíneas.

55 Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen mono-PEG-IL-10, una cantidad terapéuticamente eficaz de PEG-IL-10 se mezcla con un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable. El soporte o excipiente puede ser inerte. Un soporte farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica adecuada para administrar las composiciones de IL-10 a un paciente. Los ejemplos de soportes adecuados incluyen solución salina normal, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. También se pueden usar soportes no acuosos tal como aceites no volátiles y oleato de etilo. Un soporte puede ser dextrosa al 5%/solución salina. El soporte puede contener cantidades minoritarias de aditivos tal como sustancias que aumentan la isotonicidad y estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes, véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* y *U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984). Las formulaciones de agentes terapéuticos y diagnósticos se pueden preparar mezclando con soportes, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables en la forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, papillas, soluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman, et al. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, NY; Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*,

Lippincott, Williams, and Wilkins, Nueva York, NY; Avis, et al. (eds.) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar por vía oral o inyectar en el cuerpo. Las formulaciones para uso oral también pueden incluir compuestos para proteger además la IL-10 de proteasas en el aparato digestivo. Las inyecciones habitualmente son intramusculares, subcutáneas, intradérmicas o intravenosas. Alternativamente, se podría usar inyección intraarticular u otras rutas en circunstancias apropiadas.

Cuando se administra por vía parenteral, IL-10 pegilada se puede formular en una forma inyectable de dosis unitaria (solución, suspensión, emulsión) en asociación con un soporte farmacéutico. Véase, por ejemplo, Avis et al., eds., *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, N.Y. (1993); Lieberman et al., eds., *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Dekker, N.Y. (1990); y Lieberman et al., eds., *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, N.Y. (1990). Alternativamente, las composiciones descritas en el presente documento se pueden introducir en el cuerpo de un paciente por un sistema de administración de fármacos implantable o inyectable, por ejemplo, Urquhart et al. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24:199-236, (1984); Lewis, ed., *Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals* Plenum Press, Nueva York (1981); y patentes en EE UU No. 3.773.919; 3.270.960. La IL-10 pegilada se puede administrar en vehículos acuosos tal como agua, solución salina o vehículos tamponados con o sin varios aditivos y/o agentes diluyentes.

Una cantidad eficaz para un paciente puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trata, la salud global del paciente, la vía método y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, et al. (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, FL; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, RU).

Sujetos veterinarios, experimentales o de experimentación típicos incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y seres humanos.

La determinación de la dosis apropiada la hace el médico, por ejemplo, usando parámetros o factores que se sabe o sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o predichos que afectan al tratamiento. Generalmente, la dosis empieza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta por pequeños incrementos después de ello hasta que se alcanza el efecto deseado u óptimo relativo a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas diagnósticas importantes incluyen esas de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o nivel de citoquinas inflamatorias producidas.

Un agente biológico que se puede usar deriva de la misma especie que el animal diana para el tratamiento, minimizando de esta manera una respuesta humoral al reactivo. Los métodos para la coadministración o tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Hardman, et al. (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10ª ed., McGraw-Hill, Nueva York, NY; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA). Una cantidad eficaz del agente terapéutico disminuirá los síntomas, por ejemplo, tamaño tumoral o inhibición de crecimiento tumoral, típicamente en al menos el 10%; habitualmente en al menos el 20%; al menos aproximadamente el 30%; al menos el 40%, o en al menos el 50%.

## VI. Usos

También se divulga en el presente documento PEG-IL-10 para uso en el tratamiento de una afección o trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer del útero, cérvix, mama, próstata, testículos, pene, aparato digestivo, por ejemplo, esófago, orofaringe, estómago, intestinos delgado o grueso, colon o recto, riñón, célula renal, vejiga, hueso, médula ósea, piel, cabeza o cuello, piel, hígado, vesícula biliar, corazón, pulmón, páncreas, glándula salivar, glándula suprarrenal, tiroides, cerebro, por ejemplo, gliomas, ganglios, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), y sistema inmunitario, por ejemplo, bazo o timo. La presente divulgación describe métodos de tratar, por ejemplo, tumores inmunogénicos, tumores no inmunogénicos, tumores durmientes, cánceres inducidos por virus, por ejemplo, cánceres de células epiteliales, cánceres de células endoteliales, carcinomas de células escamosas, papilomavirus, adenocarcinomas, linfomas, carcinomas, melanomas, leucemias, mielomas, sarcomas, teratocarcinomas, cánceres inducidos químicamente, metástasis y angiogénesis. También se divulga reducir la tolerancia a un antígeno de célula tumoral o célula cancerosa, por ejemplo, modulando la actividad de una célula T reguladora (Treg) y o una célula T CD8 (véase, por ejemplo, Ramirez-Montagut, et al. (2003) *Oncogene* 22:3180-3187; Sawaya, et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:1501-1509; Farrar, et al. (1999) *J. Immunol.* 162:2842-2849; Le, et al. (2001) *J. Immunol.* 167:6765-6772; Cannistra y Niloff (1996) *New Engl. J. Med* 334:1030-1038; Osborne (1998) *New Engl. J. Med.* 339:1609-1618; Lynch y Chapelle (2003) *New Engl. J. Med.* 348:919-932; Enzinger y Mayer (2003) *New Engl. J. Med* 349:2241-2252; Forastiere, et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 345:1890-1900; Izbicki, et al.

(1997) *New Engl. J. Med.* 337:1188-1194; Holland, *et al.* (eds.) (1996) *Cancer Medicine: Encyclopedia of Cancer*, 4ª ed., Academic Press, San Diego, CA).

5 También se divulgan métodos para tratar una afección proliferativa, cáncer, tumor o estado precanceroso tal como displasia, con PEG-IL-10 y al menos un agente terapéutico o diagnóstico adicional. El agente terapéutico adicional puede ser, por ejemplo, una citoquina o antagonista de citoquina, tal como IL-12, interferón alfa, o anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico, doxorubicina, epirubicina, un anti-folato, por ejemplo, metotrexato o fluorouracilo, irinotecano, ciclofosfamida, radioterapia, terapia hormonal o antihormonal, por ejemplo, andrógeno, estrógeno, antiestrógeno, flutamida, o dietilestilbestrol, cirugía, tamoxifeno, ifosfamida, mitolactol, un agente alquilante, por ejemplo, melfalán o cisplatino, etopósido, vinorelbina, vinblastina, vindesina, un glucocorticoide, un antagonista del receptor de histamina, un inhibidor de angiogénesis, radiación, un sensibilizador de radiación, antraciclina, alcaloide vinca, taxano, por ejemplo, paclitaxel y docetaxel; un inhibidor del ciclo celular, por ejemplo, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, un anticuerpo monoclonal contra otro antígeno tumoral, un complejo de anticuerpo monoclonal y toxina, un adyuvante de células T, trasplante de médula ósea, o células presentadoras de antígeno, por ejemplo, terapia con células dendríticas. Se pueden proporcionar vacunas, por ejemplo, como una proteína soluble o como un ácido nucleico que codifica la proteína (véase, por ejemplo, Le, *et al.*, anteriormente; Greco y Zellefsky (eds.) (2000) *Radiotherapy of Prostate Cancer*, Harwood Academic, Ámsterdam; Shapiro y Recht (2001) *New Engl. J. Med.* 344:1997-2008; Hortobagyi (1998) *New Engl. J. Med.* 339:974-984; Catalona (1994) *New Engl. J. Med.* 331:996-1004; Naylor y Hadden (2003) *Int. Immunopharmacol.* 3:1205-1215; The Int. Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group (2004) *New Engl. J. Med.* 350:351-360; Slamon, *et al.* (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Kudelka, *et al.* (1998) *New Engl. J. Med.* 338:991-992; van Netten, *et al.* (1996) *New Engl. J. Med.* 334:920-921).

25 También se divulgan métodos de tratar hematopoyesis extramedularmente (EMH) de cáncer. EMH se describe (véase, por ejemplo, Rao, *et al.* (2003) *Leuk. Lymphoma* 44:715-718; Lane, *et al.* (2002) *J. Cutan. Pathol.* 29:608-612).

## Ejemplos

### 30 I. Métodos generales

35 Se describen métodos estándar en biología molecular (Maniatis, *et al.* (1982) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). También aparecen métodos estándar en Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. Nueva York, NY, que describe la clonación en células bacterianas y mutagénesis de ADN (Vol. 1), clonación en células de mamíferos y levaduras (Vol. 2), glucoconjugados y expresión de proteínas (Vol. 3), y bioinformática (Vol. 4).

40 Se describen métodos para la purificación de proteínas incluyendo inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización (Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York). Se describen análisis químico, modificación química, modificación postraduccional, producción de proteínas de fusión, glucosilación de proteínas (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, *et al.* (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Se describe la producción, purificación, y fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales (Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow y Lane, anteriormente). Están disponibles técnicas estándar para la caracterización de interacciones ligando/receptor (véase, por ejemplo, Coligan, *et al.* (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York). Se describen métodos para hacer PEG-IL-10, por ejemplo, en la patente en EE UU No. 7.052.686.

55 Están disponibles métodos para citometría de flujo, incluyendo separación celular activada por fluorescencia (FACS) (véase, por ejemplo, Owens, *et al.* (1994) *Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice*, John Wiley and Sons Hoboken, NJ; Givan (2001) *Flow Cytometry*, 2ª ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ). Están disponibles reactivos fluorescentes adecuados para modificar ácidos nucleicos, incluyendo cebadores y sondas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos, para uso, por ejemplo, como reactivos diagnósticos (Molecular Probes (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO).

65 Se describen métodos estándar de histología del sistema inmunitario (véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986) *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, *et al.* (2000) *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Phila, PA; Louis, *et al.* (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

Se describen métodos para el tratamiento y diagnóstico de cáncer (véase, por ejemplo, Alison (ed.) (2001) *The Cancer Handbook*, Grove's Dictionaries, Inc., St. Louis, MO; Oldham (ed.) (1998) *Principles of Cancer Biotherapy*, 3ª ed., Kluwer Academic Publ., Hingham, MA; Thompson, et al. (eds.) (2001) *Textbook of Melanoma*, Martin Dunitz, Ltd., Londres, RU; Devita, et al. (eds.) (2001) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6ª ed., Lippincott, Phila, PA; Holland, et al. (eds.) (2000) *Holland-Frei Cancer Medicine*, BC Decker, Phila., PA; Garrett y Sell (eds.) (1995) *Cellular Cancer Markers*, Humana Press, Totowa, NJ; MacKie (1996) *Skin Cancer*, 2ª ed., Mosby, St. Louis; Moertel (1994) *New Engl. J. Med.* 330:1136-1142; Engleman (2003) *Semin. Oncol.* 30(3 Supl. 8):23-29; Mohr, et al. (2003) *Onkologie* 26:227-233).

Están disponibles paquetes de software y bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias líder, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glucosilación, y alineamientos de secuencia (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, et al. (2000) *Bioinformatics* 16: 741-742; Menne, et al. (2000) *Bioinformatics Applications Note* 16:741-742; Wren, et al. (2002) *Comput. Methods Programs Biomed.* 68:177-181; von Heijne (1983) *Eur. J. Biochem.* 133:17-21; von Heijne (1986) *Nucleic Acids Res.* 14:4683-4690).

## II. IL-10 pegilada

IL-10 se dializó frente a fosfato de sodio 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM. La IL-10 dializada se diluyó 3,2 veces a una concentración de 4 mg/ml usando el tampón de diálisis. Antes de la adición del enlazador, SC-PEG-12K (Delmar Scientific Laboratories, Maywood, IL), se añadió 1 volumen de tetraborato de Na 100 mM a pH 9,1 en 9 volúmenes de IL-10 diluida para subir el pH de la solución de IL-10 a 8,6. El enlazador SC-PEG-12K se disolvió en el tampón de diálisis y se añadió el volumen apropiado de la solución de enlazador (de 1,8 a 3,6 moles de enlazador por mol de IL-10) en la solución de IL-10 diluida para empezar la reacción de pegilación. La reacción se llevó a cabo a 5°C para controlar la velocidad de la reacción. La solución de reacción se agitó suavemente durante la reacción de pegilación. Cuando el rendimiento de mono-PEG-IL-10 determinado por HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC) estaba próximo al 40%, la reacción se paró añadiendo solución de glicina 1 M a una concentración final de 30 mM. El pH de la solución de reacción se ajustó lentamente a 7,0 usando una solución de HCl y la reacción se filtró a través de 0,2 micrómetros y se almacenó a -80°C.

Alternativamente, se prepara mono-PEG-IL-10 usando metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG) como enlazador (Inhale Therapeutics Systems Inc., Huntsville, Alabama). PALD-PEG puede tener pesos moleculares de 5 kDa, 12 kDa, o 20 kDa. IL-10 se dializa y diluye como se ha descrito anteriormente, excepto que el pH del tampón de reacción es entre 6,3 y 7,5. Se añade el enlazador PALD-PEG activado a la mezcla de reacción en una proporción molar de 1:1. Se añade cianoborohidruro acuoso a la mezcla de reacción a una concentración final de 0,5 a 0,75 mM. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente (18-25°C) durante 15-20 horas con agitación suave. La reacción se extingue con glicina 1 M. Se analizan los rendimientos por SE-HPLC. Se separa mono-PEG-IL-10 de IL-10 sin reaccionar, enlazador de PEG y di-PEG-IL-10 por cromatografía de filtración en gel y se caracteriza por rp-HPLC y bioensayo (por ejemplo, estimulación de células o líneas celulares que responden a IL-10).

## III. Modelos tumorales

Se inyectaron células tumorales de ratón singénicas por vía subcutánea o intradérmica a  $10^4$ ,  $10^5$  o  $10^6$  células por inoculación de tumor. Se usaron modelos de carcinoma mamario Ep2, carcinoma de colon CT26, carcinoma escamoso de la piel PDV6 y carcinoma de mama 4T1 (véase, por ejemplo, Langowski et al. (2006) *Nature* 442:461-465). Se usaron ratones Balb/C inmunocompetentes o Balb/C deficientes en células B. Se administró PEG-mIL-10 a los ratones inmunocompetentes, mientras que se usó el tratamiento con PEG-hIL-10 en ratones deficientes en células B. Se dejó que los tumores alcanzaran un tamaño de 100-250 mm<sup>3</sup> antes de empezar el tratamiento. Se administró IL-10, PEG-mIL-10, PEG-hIL-10 o tampón control por vía subcutánea en un sitio distante de la implantación del tumor. El crecimiento tumoral típicamente se siguió dos veces a la semana usando compases calibradores electrónicos.

## IV. Análisis tumoral

Se recogieron tejidos tumorales y órganos linfáticos en varios puntos finales para medir expresión de ARNm para un número de marcadores inflamatorios y para realizar inmunohistoquímica para varios marcadores celulares inflamatorios. Los tejidos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. El crecimiento tumoral primario típicamente se siguió dos veces a la semana usando compases calibradores electrónicos. El volumen del tumor se calculó usando la fórmula (anchura<sup>2</sup> x longitud/2) donde la longitud es la dimensión más larga. Se dejó que los tumores alcanzaran un tamaño de 90-250 mm<sup>3</sup> antes de empezar el tratamiento.

## V. Administración de IL-10 y/o PEG-IL-10

Se administró mL-10 o PEG-mL-10 a los ratones inmunocompetentes mientras que se usó tratamiento con PEG-hIL-10 en los ratones deficientes en células B. Se administró mL-10, PEG-mL-10, PEG-hIL-10 o vehículo control por vía subcutánea en un sitio distante de la implantación del tumor. La PEG-mL-10 usada en estos estudios se preparó con el enlazador SC-PEG-12K. Las actividades biológicas de mL-10 y PEG-mL-10 se evaluaron mediante la aplicación de un bioensayo de proliferación a corto plazo que utiliza MC/9, una línea de células cebadas de ratón que expresa receptores de IL-10 endógenos (R1 y R2). Las células MC/9 proliferan en respuesta a coestimulación con mL-4 y mL-10 (las MC/9 no proliferan con solo mL-4 o mL-10). La proliferación se midió por medios colorimétricos usando azul alamar, un colorante indicador de crecimiento basado en la detección de actividad metabólica. La actividad biológica de mL-10 recombinante o pegilada se evaluó por el valor CE50, o la concentración de proteína a la que se observa la estimulación semimáxima en una curva de dosis y respuesta (tabla 1):

Tabla 1: Bioensayo de proliferación de MC/9 para la evaluación de bioactividad de reactivos mL-10 y PEG-mL-10 usados en estos estudios

Proteína	CE50 (ng/ml) en ensayo en MC/9
mL-10	0,5711
PEG-mL-10	4,039

Basado en el bioensayo en MC/9, la actividad específica de la mL-10 pegilada usada en los experimentos es aproximadamente 7 veces menor que la actividad de la mL-10 usada (tabla 1).

Se administró PEG-mL-10 cada dos días a ratones que tenían tumores de cáncer de mama Ep2. El tratamiento era eficaz en reducir el tamaño del tumor e inducir rechazos tumorales.

Tabla 2: PEG mL-10 reduce el tamaño tumoral (mm<sup>3</sup>) en modelo de cáncer de mama Ep2 en ratones Balb/C

Días tras la inoculación	11	15	18	21	25	27	33
Control	300	450	500	750	1300	1500	2700
PEG-mL-10	300	400	310	280	250	50	0

El tratamiento con PEG-mL-10 también fue eficaz en reducir el tamaño tumoral en modelos tumorales en ratones inmunocompetentes singénicos de PDV6, CT-26 y 4T1 (véanse las tablas 3, 4 y 5).

Tabla 3: Estudio 04-M52 338: PEG mL-10 empezando el día 36 después del implante reduce el tamaño tumoral (mm<sup>3</sup>) de PDV6 en ratones C57B/6

Días tras la inoculación	36	38	42	44	46	48	52
Control	200	255	290	380	395	420	485
PEG-mL-10	210	265	200	190	155	110	55

Tabla 4: PEG mL-10 empezando el día 7 después del implante reduce el tamaño tumoral relativo a vehículo control de tumores CT26 (mm<sup>3</sup>) ratones BALB/c

Días tras la inoculación	10	15	17	20	22	24
Control	155	424	791	1274	1737	2170
PEG-mL-10	136	212	291	336	450	455

Tabla 5: IL-10 y PEG mL-10 reducen el tamaño tumoral (mm<sup>3</sup>) de carcinoma de mama 4T1

Días de tratamiento	20	24	29	33
Control	200	410	584	1000
PEG-mL-10	200	320	560	350
IL-10	200	290	575	400

Tabla 6: Estudio 05-M52-496. 2 semanas de tratamiento con mL-10 y mPEG IL-10 empezando 19 días después del implante reduce el tamaño tumoral (mm<sup>3</sup>) de carcinoma de mama 4T1.

Días tras el implante	20	24	29	33
PBS	200	410	584	1000
PEG-mL-10	200	320	560	350
mL-10	200	290	575	400

#### VI. Estudios de titulación de la dosis

En estudios de titulación de la dosis, se recogieron sangrados de la vena de la cola de ratones representativos de cada grupo en los tiempos correspondientes a los niveles de dosis pico y mínimos esperados. Se ensayó el suero recogido para concentraciones de mL-10 usando la plataforma Meso Scale Discovery que se basa en tecnología de multimatrices; una combinación de detección de electroquimioluminiscencia y matrices estampadas. Se usó una prueba de la t de Student para datos independientes bilateral para comparar el volumen tumoral medio de ratones

tratados con mL-10 o PEG-mL-10 agrupados por concentraciones en suero de mL-10 con el volumen tumoral medio de su grupo de vehículo control correspondiente. Se usó una corrección de Welch cuando dos grupos tenían varianza desigual ( $p < 0,05$  de la prueba F).

- 5 Las titulaciones de dosis de PEG-mL-10 y mL-10 en ratones que tienen carcinoma de mama 4T1 muestran que el control del tumor primario y metástasis pulmonares son de dosis valorables tanto con mL-10 como PEG-mL-10. A cualquier dosis determinada PEG-mL-10 es más eficaz que mL-10 (Tabla 7). El tratamiento de dos veces al día se empezó el día 17 después del implante, cuando los volúmenes tumorales medios eran 84-90 mm<sup>3</sup>. Los grupos de tratamiento consistían en 14 ratones por grupo mientras que los grupos control tenían 8 ratones en cada grupo. Los tampones Tris y Hepes fueron los controles para mL-10 y PEG mL-10, respectivamente.

Tabla 7: Estudio 06-M175-1103. mL-10 y PEG-mL-10 reducen el tamaño del tumor primario (mm<sup>3</sup>) de carcinoma de mama 4T1 en ratones BALB/c de una manera dependiente de la dosis.

Días tras el implante	17	21	24	27	30	34	38	42
Tris vehículo control	90	184	288	448	560	861	1126	1248
Hepes vehículo control	90	215	344	476	658	940	1261	1520
PEG-mL-10 (0,5 mg/kg)	86	107	117	129	150	165	204	195
PEG-mL-10 (0,1 mg/kg)	84	112	142	152	224	256	286	356
PEG-mL-10 (0,01 mg/kg)	85	140	200	240	288	462	627	773
PEG-mL-10 (0,001 mg/kg)	88	168	239	262	373	532	729	942
mL-10 (1,0 mg/kg)	85	117	168	207	256	350	446	497
mL-10 (0,1 mg/kg)	84	136	180	251	337	424	641	704
mL-10 (0,01 mg/kg)	86	121	165	231	331	436	631	809

- 15 Las titulaciones de dosis de PEG-mL-10 y mL-10 en ratones que tienen carcinoma de células escamosas PDV6 muestran que el control del tumor primario es de dosis valorable tanto con mL-10 como PEG-mL-10, aunque a cualquier dosis determinada PEG-mL-10 es más eficaz que mL-10 (Tabla 8). El tratamiento de PEG-mL-10 de alta dosis produjo una regresión tumoral de casi el 100% y posterior resistencia a la reexposición (Tabla 9). Se empezó el tratamiento de dos veces al día el día 23 después del implante, cuando los volúmenes tumorales medios eran 107-109 mm<sup>3</sup> y siguió hasta el día 55 para todos los grupos tratados con mL-10 y el grupo tratado con PEG m-IL10 0,01 mg/kg. El tratamiento con PEG -mL-10 0,1 mg/kg se paró el día 48 cuando se vio regresión tumoral del 100% mientras que los grupos restantes se trataron hasta el día 51. Los grupos de tratamiento consistían en 10 ratones por grupo mientras que cada vehículo control contenía 6 ratones. El tampón Tris y el tampón Hepes fueron el vehículo control para mL-10 y PEG mL-10, respectivamente. El reimplante se hizo 85 días después del implante primario y 4 semanas después del último tratamiento con PEG-mL-10. Hubo 10 ratones por grupo.

Tabla 8: Estudio 06-M52-1106. mL-10 y PEG-mL-10 reducen el tamaño del tumor (mm<sup>3</sup>) de carcinoma de células escamosas PDV6 en ratones C57Bl6/J de una manera dependiente de la dosis.

Días tras el implante	23	27	30	33	36	40	43	47	51	55
Tris vehículo control	111	179	232	318	412	493	635	848	958	
Hepes vehículo control	107	210	293	433	541	653	712	761	986	
PEG-mL-10 (0,1 mg/kg)	108	99	55	31	17	11	3	1	1	1
PEG-mL-10 (0,01 mg/kg)	107	131	92	97	95	114	119	123	183	228
PEG-mL-10 (0,001 mg/kg)	109	191	191	241	327	455	535			
mL-10 (1,0 mg/kg)	107	129	144	143	124	87	51	36	52	75
mL-10 (0,1 mg/kg)	107	85	85	88	117	121	130	143	182	217
mL-10 (0,01 mg/kg)	107	120	150	146	196	244	262	263	249	250

- 30 Tabla 9: Estudio 06-M52-1106. Ratones C57Bl6/J que habían depurado tumores de carcinoma de células escamosas PDV6 después de 3 semanas de tratamiento con PEG-mL-10 son resistentes al reimplante en ausencia de tratamiento adicional

Días tras el implante	0	16	21	28	36	49	% de ratones que son positivos para el tumor
Vehículo control	0	113	145	188	418	761	100
PEG-mL-10 (0,1 mg/kg)	0	0,3	0	7	16	47	10

#### VII. Estudios de metástasis pulmonar

- 35 Las metástasis pulmonares en el modelo de carcinoma de mama 4T1, o bien se cuantificaron macroscópicamente después de la extirpación del pulmón (tabla 10) o contando las colonias metastásicas del pulmón después de cultivo (tabla 11) como se describe en Current Protocols in Immunology (Sección 20.2.4) John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Harlow y Lane (1999). Brevemente, los pulmones recogidos de un ratón que tiene el tumor 4T1 se cortaron y digirieron con una mezcla de colagenasa/elastasa seguido por cultivo en un ensayo de dilución limitante, en medio que contenía 6-tioguanina. Solo las células de 4T1 son resistentes a 6-tioguanina y se pueden cuantificar contando el número de colonias después de 10-14 días de cultivo. El tratamiento de dos veces al día se empezó el día 17

después del implante, cuando los volúmenes tumorales medios eran 84-90 mm<sup>3</sup>. Los tampones Tris y Hepes fueron los controles para mL-10 y PEG mL-10, respectivamente. Las metástasis pulmonares se midieron como el número de colonias metastásicas cultivadas por pulmón.

- 5 Tabla 10: Estudio 05-M52-496. 2 semanas de tratamiento con mL-10 y PEG-mL-10 empezando 19 días después del implante reduce las metástasis de carcinoma de mama 4T1 (medido como el número de metástasis pulmonares por ratón)

Metástasis pulmonar 33 días después de la inoculación	Vehículo control	mL-10	PEG-mL-10
Ratón #1	7	0	0
Ratón #2	7	0	0
Ratón #3	7	0	0
Ratón #4	8	0	0
Ratón #5	20	4	0

- 10 Tabla 11: Estudio 06-M175-1103. mL-10 y PEG-mL-10 reducen las metástasis pulmonares de carcinoma de mama 4T1 en ratones BALB/c de una manera dependiente de la dosis

Ratón	Metástasis pulmonares 42-45 después del implante								
	Colonias por pulmón (x 10 <sup>3</sup> )								
	Tampón Tris vehículo control	Tampón Hepes vehículo control	mL-10 1,0 mg/kg	mL-10 0,1 mg/kg	mL-10 0,01 mg/kg	PEG-mL-10 0,5 mg/kg	PEG-mL-10 0,1 mg/kg	PEG-mL-10 0,01 mg/kg	PEG-mL-10 0,001 mg/kg
1	362	481	76	116	1064	7,1	89	0,43	366
2	2,12	533	20	5,6	150	1,0	0,7	234	212
3	152	264	28,1	8,1	67,4	0,4	0,01	377	0,6
4	0,4	218	1,2	137	18	1,5	223	315	586
5	1000	517	45,7	257	77	0,3	0,07	0,54	486
6	474	93	21,7	2,72	1,2	0,02	10,1	1,67	844
7	524	1000	4,4	364	285	0	7,6	68	6,5
8	1000	1026	128,6	772	9,7	0,002	1,85	27	265
9			13,3	348	878	0,3	0,01	139	338
10			51,2	204	45	0,03	0,01	177	824
11			9,4	49	56	0,01	2,68	597	263
12			0,1	635	17,1	240	0,01	7,4	
13			5,1	19,7	1014	0,02	2,94	0,01	
14			0,02	750	72,2	0,01	0,01	0,01	
Mediana	418,0	499,0	16,7	170,5	69,8	0,17	1,28	47,5	338,0
media	502,0	579,0	28,9	262,0	268,2	17,9	24,1	138,9	381,0
D.E.	519,0	467,0	36,5	276,9	397,1	64,0	61,8	183,7	284,0

- 15 Administrar PEG-mL-10 o IL-10 a ratones que tienen carcinoma de mama 4T1 reduce la tasa de metástasis y aumenta la infiltración de células T CD8 y la expresión de citoquinas inmunoestimuladoras, medido por RT-PCR cuantitativa (Tablas 12 y 13). El número de células T CD8+ infiltrantes se contó de secciones representativas de varios tumores teñidos por inmunohistoquímica para el marcador de superficie CD8 y se verificó por tinción con anticuerpos anti-CD3 y anti-TCRαβ.

Tabla 12: IL-10 y PEG-mL-10 inducen infiltración de células T CD8+ en carcinoma 4T1

	Control	IL-10	PEG-IL-10
Número medio de células CD8+/campo	6,4	25,8	39,2

- 20 PEG-mL-10 es más eficaz que IL-10 en la inducción de citoquinas inflamatorias. Se extrajo el ARN total de muestras tumorales homogenizadas y se hizo transcripción inversa como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, Homey, et al. (2000) *J. Immunol.* 164:3465-3470). El ADN complementario se analizó cuantitativamente para expresión de citoquinas por el ensayo de PCR 5'-nucleasa fluorogénico (véase, por ejemplo, Holland, et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88:7276-7280). Se midieron continuamente productos de PCR específicos por medio de un sistema de detección de secuencia ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) durante 40 ciclos. Los valores se normalizaron respecto a ubiquitina. Los datos transformados logarítmicamente se sometieron a análisis estadístico de Kruskal-Wallis (método de la mediana). El nivel de expresión (transformado logarítmicamente) corresponde a la cantidad de citoquina inflamatoria expresada en la muestra tumoral, de modo que cuanto mayor sea el nivel de expresión (transformado logarítmicamente), mayor la cantidad de citoquina inflamatoria expresada en la muestra tumoral.

Tabla 13: PEG-mL-10 administrada induce niveles sostenidos de citoquinas inflamatorias en carcinoma 4T1 24 h después de la administración de la dosis

Citoquina	control	IL-10	PEG-mIL-10
IFN $\gamma$	36,04	68,51	98,96
IL-4	7,77	13,13	40,32
IL-6	43,64	50,59	111,98
IL-10	9,94	41,62	106,16
ligando de RANK	19,14	36,13	46,08

V. Eliminación de células inmunitarias

5 Se eliminaron las células T CD4+ y CD8+ por eliminación mediada por anticuerpo. Se inyectaron 250 ug de anticuerpos específicos para CD4 o CD8 semanalmente para este fin. Las eliminaciones de células se verificaron usando análisis por FACS e IHC.

10 La eliminación de células T CD4+ en ratones BALB/c deficientes en células B (C.129-*Igh-6<sup>tm/Cgn</sup>*) con anticuerpos de CD4 inhibe la función de PEG-hIL-10 sobre tumores (Tabla 14).

Tabla 14: El tratamiento con PEG-hIL-10 empezando 8 días después del implante tumoral fracasa para reducir el tamaño del tumor (mm<sup>3</sup>) de carcinoma de colon CT-26 después de eliminación de CD4 en ratones BALB/c deficientes en células B (C.129-*Igh-6<sup>tm/Cgn</sup>*)

Días después del implante	8	10	13	19	27
PBS	173	322	391	841	1979
PEG-hIL-10	184	276	251	602	1332

15 La eliminación de células T CD8 inhibe completamente el efecto de PEG mIL-10 sobre tumor singénico (Tabla 15).

20 Tabla 15: El tratamiento con PEG-hIL-10 empezando 8 días después del implante tumoral fracasa para reducir el tamaño del tumor (mm<sup>3</sup>) de carcinoma de colon CT-26 después de eliminación de CD8 en ratones BALB/c deficientes en células B

Días después del implante	8	10	13	19	27
PBS	151	335	584	1434	2746
PEG-hIL-10	226	575	1047	2449	4799

VI. Terapias de combinación

25 Se administra PEG-IL-10 en combinación con agentes quimioterapéuticos conocidos antes de, al mismo tiempo que, o posterior a la administración de PEG-IL-10. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos e intervalos de dosis se proporcionan en la tabla 16.

Tabla 16: Intervalos de dosis de agentes quimioterapéuticos

Agente quimioterapéutico	Intervalo de dosis
Temozolomida	5 mg-250 mg
Gemcitabina	200 mg-1 g
Doxorrubicina	1 mg/m <sup>2</sup> -50 mg/m <sup>2</sup>
Interferón alfa	1 $\mu$ g/kg-300 $\mu$ g/kg

30 La coadministración de PEG-IL-10 puede permitir el uso de dosis menores, menos tóxicas de los agentes quimioterapéuticos, evitando de esta manera efectos secundarios conocidos.

La presente divulgación también se refiere a los siguientes puntos:

- 35 1. Un método de inhibir o reducir el crecimiento de un tumor o cáncer que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad eficaz de una interleuquina-10 pegilada (PEG-IL-10).
2. El método del punto 1, en donde la PEG-IL-10 comprende un enlazador metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG).
- 40 3. El método del punto 1, en donde la PEG-IL-10 inhibe el crecimiento del tumor o cáncer.
4. El método del punto 1, en donde la PEG-IL-10 reduce el tamaño del tumor o cáncer.
- 45 5. El método del punto 1, en donde la PEG-IL-10 aumenta la infiltración de células T CD8+ en el tumor cuando se compara con IL-10 no pegilada.
6. El método del punto 1, en donde la PEG-IL-10 aumenta la expresión de la menos una citoquina inflamatoria.

## ES 2 606 034 T3

7. El método del punto 6, en donde la citoquina inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10 y ligando de RANK (RANK-L).
- 5 8. El método del punto 1, en donde la PEG-IL-10 se coadministra con al menos un agente quimioterapéutico.
9. El método del punto 8, en donde el agente quimioterapéutico es al menos uno de los agentes quimioterapéuticos de la tabla 16.
- 10 10. El método del punto 1, en donde el tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón, glioblastoma, y leucemia.
11. Un método de tratar a un sujeto que padece un cáncer o tumor que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de PEG-IL-10.
- 15 12. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 comprende un enlazador metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG).
13. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 inhibe el crecimiento del cáncer o tumor.
- 20 14. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 reduce el tamaño del cáncer o tumor.
15. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 aumenta la infiltración de células T CD8 $^{+}$  en el tumor cuando se compara con IL-10 no pegilada.
- 25 16. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 aumenta la expresión de la menos una citoquina inflamatoria.
17. El método del punto 16, en donde la citoquina inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10 y RANK-L.
- 30 18. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 se coadministra con al menos un agente quimioterapéutico.
19. El método del punto 18, en donde el agente quimioterapéutico es al menos uno de los agentes quimioterapéuticos de la tabla 16.
- 35 20. El método del punto 11, en donde la PEG-IL-10 reduce la metástasis de un cáncer o tumor.
21. El método del punto 11, en donde el tumor o cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de colon, cáncer ovárico, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, glioblastoma, y leucemia.
- 40 22. El método del punto 11, en donde el sujeto es humano.
23. El método del punto 22, en donde la PEG-IL-10 es PEG-IL-10 humana (PEG-hIL-10).

**REIVINDICACIONES**

1. Una interleuquina 10 pegilada (PEG-IL-10) para uso en tratar un sujeto que padece linfoma.
- 5 2. Uso de una PEG-IL-10 para la fabricación de un medicamento para tratar un sujeto que padece linfoma.
3. PEG-IL-10 para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la PEG-IL-10 se coadministra con al menos un agente quimioterapéutico.
- 10 4. PEG-IL-10 para uso de la reivindicación 3 o el uso de la reivindicación 3, en donde el agente quimioterapéutico es al menos uno de los agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consiste en temozolomida en un intervalo de dosis de 5 mg a 250 mg, gemcitabina en un intervalo de dosis de 200 mg a 1 g, doxorubicina en un intervalo de dosis de 1 mg/m<sup>2</sup> a 50 mg/m<sup>2</sup> e interferón alfa en un intervalo de dosis de 1 µg/kg a 300 µg/kg.
- 15 5. PEG-IL-10 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 y 4 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el sujeto es humano.
- 20 6. PEG-IL-10 para uso de la reivindicación 5 o el uso de la reivindicación 5, en donde la PEG-IL-10 es PEG-IL-10 humana (PEG-hIL-10).
7. PEG-IL-10 para uso de la reivindicación 5 o 6 o el uso de la reivindicación 5 o 6, en donde la PEG-IL-10 comprende una molécula de PEG que tiene un peso molecular de 5 kDa a 50 kDa.
- 25 8. PEG-IL-10 para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 5 a 7 o el uso de las reivindicaciones 2 y 5 a 7, en donde la PEG-IL10 comprende un enlazador metoxi-PEG-aldehído (PALD-PEG).
- 30 9. PEG-IL-10 para uso de la reivindicación 8 o el uso de la reivindicación 8, en donde el enlazador PALD-PEG comprende una molécula de PEG que tiene un peso molecular seleccionado del grupo que consiste en 5 kDa, 12 kDa o 20 kDa.