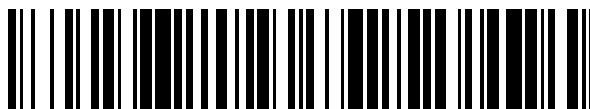


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 364**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/60** (2007.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2009 PCT/US2009/068012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2010 WO10077853**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2009 E 09774794 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2379115**

54 Título: **Producción de IL-10 mono- y dipegilada y sus usos**

30 Prioridad:

**17.12.2008 US 138421 P**  
**23.09.2009 US 245182 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**19.02.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BLAISDELL, STEVEN, J.;**  
**CUTLER, COLLETTE, M.;**  
**PAPORELLO, BRITTANY, C. y**  
**AMBROGELLY, ALEXANDRE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 655 364 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

Producción de IL-10 mono- y dipegilada y sus usos

**Campo de la invención**

La presente invención incluye composiciones de IL-10 monopegilada (PEG) y di-PEG, y procedimientos de uso.

**5 Antecedentes de la invención**

La citoquina interleuquina-10 (IL-10) es un dímero que se convierte en biológicamente inactivo tras la ruptura de las interacciones no covalentes que conectan sus dos subunidades de monómeros. La IL-10 se identificó en primer lugar como un producto de la célula T auxiliar de tipo 2 y, después, se demostró que es producida por otros tipos celulares, que incluyen las células B y los macrófagos. También inhibe la síntesis de varias citoquinas producidas por las células T auxiliares de tipo 1, tales como  $\gamma$ -interferón, IL-2, el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). La capacidad de la IL-10 para inhibir los moduladores de la respuesta inmunológica mediada por células y para suprimir las respuestas de células T dependientes de células presentadoras de antígeno demuestra que la IL-10 tiene propiedades inmunosupresoras. Esta citoquina también inhibe la producción por monocitos/macrófagos de otras citoquinas, tales como IL-1, IL-6, IL-8, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), y TNF- $\alpha$ . Como resultado de su actividad pleiotrópica, la IL-10 se está investigando para numerosas aplicaciones clínicas, tales como para tratar trastornos inflamatorios, la sepsis bacteriana, el choque letal inducido por enterotoxinas y enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, rechazo de aloinjertos y diabetes.

Los cánceres y los tumores pueden ser controlados o erradicados por el sistema inmunológico. El sistema inmunológico 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 segregadas conocidas como citoquinas. Las citoquinas incluyen, por ejemplo, interleuquina-10 (IL-10), gamma-interferón (IFN $\gamma$ ), IL-12 e IL-23. La respuesta inmunológica incluye la inflamación, es decir, la acumulación de células inmunológicas a nivel sistémico o en un emplazamiento concreto del cuerpo. En respuesta a un agente infeccioso o a una sustancia extraña, las células inmunológicas segregan citoquinas que, a su vez, modulan la proliferación, el desarrollo, la diferenciación o la migración de células inmunológicas. Una respuesta inmunológica excesiva puede producir consecuencias patológicas, tales como trastornos autoinmunitarios, mientras que una respuesta inmunológica alterada puede provocar cáncer. La respuesta antitumoral del sistema inmunológico incluye la inmunidad innata, por ejemplo, mediada por macrófagos, células NK y neutrófilos, y la inmunidad adaptativa, por ejemplo, mediada por células presentadoras de antígenos (CPA), células T y células B (véase, por ejemplo, Abbas, y col. (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 empleado procedimientos para modular la respuesta inmunológica en el tratamiento de cánceres, por ejemplo, melanoma. Estos procedimientos incluyen el tratamiento con citoquinas, tales 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 del crecimiento transformante (TGF), o con antagonistas de citoquinas (por ejemplo, anticuerpos). La interleuquina-10 fue caracterizada primero como un factor inhibidor de la síntesis de citoquinas (FISC; véase, por ejemplo, Fiorentino, y col. (1989), J. Exp. Med., 170:2081-2095). La IL-10 es una citoquina pleiotrópica producida por células T, células B, monocitos, que puede actuar como inmunosupresor y como inmunoestimulante (véase, por ejemplo, Groux, y col. (1998), J. Immunol., 160:3188-3193; y Hagenbaugh, y col. (1997), J. Exp. Med., 185:2101-2110).

Los modelos animales sugieren que la 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, y col. (1996), J. Exp. Med., 184:579-584; Kundu, y col. (1996), J. Natl. Cancer Inst., 88:536-541). Otros estudios indican que la presencia de IL-10 en el microentorno del tumor se correlaciona con una mejor supervivencia del paciente (véase, por ejemplo, Lu, y col. (2004), J. Clin. Oncol., 22:4575-4583).

Debido a su semivida relativamente corta, la IL-10 se ha conjugado con diversos compañeros, que incluyen el polietilenglicol. El documento US2002044921 divulga un procedimiento para producir IL-10 monopegilada. Otras citoquinas también se han pegilado, en general a través de una monopegilación, por ejemplo, moléculas de PEG unidas a un único resto en la proteína de citoquina. Por desgracia, la monopegilación en una subunidad de IL-10 conduce a una mezcla no homogénea de moléculas de IL-10 dipegiladas, monopegiladas y no pegiladas debido al reordenamiento de las subunidades. Si se deja que la reacción de pegilación se desarrolle hasta completarse también produciría proteínas diana no específicas y multipegiladas, lo cual reduce la bioactividad de estas

proteínas. Así, es necesario producir de modo más eficaz IL-10 correctamente pegilada con mayores rendimientos de producción. La presente invención satisface esta necesidad proporcionando procedimientos para producir una mezcla de IL-10 mono- y dipegilada.

### **Breve descripción de los dibujos**

- 5 La figura 1 muestra la cinética de la reacción que produce mono- y di-PEG-IL-10.  
La figura 2 muestra la eficacia de diversos prototipos de mono- y diPEG-IL-10 (murina) en carcinomas de células escamosas PDV6 implantados.

### **Sumario de la invención**

- 10 La presente invención se basa en el descubrimiento de que una reacción controlada producirá una mezcla de mono- y di-PEG-IL-10 selectivamente pegiladas que, a su vez, mejora el rendimiento del producto pegilado final y tiene una eficacia comparable a la de otras especies de PEG-IL-10.

- La presente invención proporciona un procedimiento para producir una mezcla de IL-10 mono- y dipegilada, en el que al menos una molécula de PEG se une covalentemente al menos a un resto aminoácido de al menos una subunidad de IL-10, que comprende: a) hacer reaccionar de 1 mg/ml a 12 mg/ml de proteína de IL-10 con un conector-PEG activado, de modo que la proporción de IL-10 a conector-PEG es de 1:1 a 1:7,7, en presencia de 25 mM o 35 mM de un agente reductor, a un pH de aproximadamente 5,0 a 7,4 y una temperatura de 5 °C a 30 °C, durante 3-24 horas; y b) purificar la mezcla de IL-10 mono- y dipegilada. En ciertas realizaciones, el conector-PEG se selecciona del grupo que consiste en succinimidilcarbonato-PEG, PEG-butilaldehído, PEG-pentaldehído, PEG-amido-propionaldehído, PEG-uretano-propionaldehído, y PEG-propilaldehído, el conector-PEG es de 5.000 daltons a 12.000 daltons, o el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en borohidruro, cianoborohidruro de sodio, amina borano, y picolina borano. En otra realización, la mezcla de mono- y di-PEG se purifica mediante una cromatografía seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, de exclusión molecular y de interacción hidrófoba. También se incluye una composición farmacéutica que comprende la mono- y di-PEG-IL-10 producida mediante este procedimiento de reacción, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- La presente invención incluye un procedimiento para producir una mezcla de IL-10 mono- y dipegilada, en el que al menos una molécula de PEG se une covalentemente al menos a un resto aminoácido de al menos una subunidad de IL-10, que comprende: a) hacer reaccionar 7,5 mg/ml de IL-10 con un conector-PEG activado, de modo que la proporción de IL-10 a conector-PEG es de 1:3,5, en presencia de 25 mM de un agente reductor, a un pH de 6,3 y una temperatura de 15 °C, durante 15 horas; y b) purificar la mezcla de IL-10 mono- y dipegilada. En ciertas realizaciones, el conector-PEG se selecciona del grupo que consiste en succinimidilcarbonato-PEG, PEG-butilaldehído, PEG-pentaldehído, PEG-amido-propionaldehído, PEG-uretano-propionaldehído, y PEG-propilaldehído. La masa molecular de PEG que comprende el conector-PEG es de 5.000 daltons a 20.000 daltons, el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en borohidruro, cianoborohidruro de sodio, amina borano, y picolina borano, o la mezcla de mono- y di-PEG se purifica mediante una cromatografía seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, de exclusión molecular y de interacción hidrófoba. También se incluye una composición farmacéutica que comprende la mono- y di-PEG-IL-10 producida mediante este procedimiento de reacción, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

### **Descripción detallada**

- 40 Tal como se emplea en el presente documento, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular de palabras tales como "un/una" y "el/la" incluyen sus correspondientes referentes en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

#### **I. Definiciones**

- La "activación," la "estimulación" y el "tratamiento", cuando se aplica a células o receptores, pueden tener el mismo significado, por ejemplo, la activación, la estimulación o el tratamiento de una célula o un receptor con un ligando, a menos que el contexto indique claramente lo contrario o se mencione explícitamente. Un "ligando" incluye ligandos naturales y sintéticos, por ejemplo, citoquinas, variantes de citoquinas, análogos, muteínas, y composiciones de unión derivadas de anticuerpos. Un "ligando" también incluye moléculas pequeñas, por ejemplo, miméticos peptídicos de citoquinas y miméticos peptídicos de anticuerpos. La "activación" puede indicar la activación celular regulada por mecanismos internos, así como por factores externos o ambientales. La "respuesta", por ejemplo, de una célula, un tejido, un órgano o un organismo, incluye un cambio en el comportamiento bioquímico o fisiológico, por ejemplo, concentración, densidad, adhesión, o migración dentro de un compartimento biológico, tasa de expresión génica, o estado de diferenciación, en los que el cambio se correlaciona con la activación, la estimulación o el tratamiento, o con mecanismos internos, tales como la programación genética.

La "actividad" de una molécula puede describir o referirse a la unión de la molécula a un ligando o a un receptor; a una actividad catalítica; a la capacidad para estimular la expresión génica o la señalización, diferenciación o maduración celular; a una actividad antigénica, a la modulación de actividades de otras moléculas y similares. La "actividad" de una molécula también puede indicar la actividad para modular o mantener las interacciones entre células, por ejemplo, la adhesión, o la actividad para mantener una estructura de una célula, por ejemplo, membranas celulares o citoesqueleto. La "actividad" también puede significar la actividad específica, por ejemplo, [actividad catalítica]/[mg de proteína], o [actividad inmunológica]/[mg de proteína], la concentración en un compartimento biológico o similares. La "actividad proliferativa" incluye una actividad que estimula, que es necesaria, o que está específicamente asociada, por ejemplo, con la división normal de las células, así como con cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

La "administración" y el "tratamiento", aplicados a un animal, ser humano, sujeto experimental, célula, tejido, órgano o fluido biológico, se refiere al contacto de un producto farmacéutico, producto terapéutico, agente de diagnóstico, compuesto o composición exógenos con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. La "administración" y el "tratamiento" pueden referirse, por ejemplo, a procedimientos terapéuticos, de placebo, de farmacocinética, de diagnóstico, de investigación y experimentales. El "tratamiento de una célula" incluye el contacto de un reactivo con la célula, así como el contacto de un reactivo con un fluido, estando el fluido en contacto con la célula. La "administración" y el "tratamiento" también indican tratamientos *in vitro* e *ex vivo*, por ejemplo, de una célula, por medio de un reactivo, producto de diagnóstico, composición de unión, o por medio de otra célula. El "tratamiento", aplicado a un sujeto humano, veterinario o de investigación, se refiere a un tratamiento terapéutico, a medidas profilácticas o preventivas, y a aplicaciones de investigación y diagnóstico. El "tratamiento", aplicado a un sujeto humano, veterinario o de investigación, o a una célula, tejido u órgano, incluye poner en contacto PEG-IL-10 con un sujeto humano o animal, con una célula, tejido, compartimento fisiológico o fluido fisiológico. El "tratamiento de una célula" también incluye situaciones en las que PEG-IL-10 se pone en contacto con un receptor de IL-10 (heterodímero de IL-10R1 y IL-10R2), por ejemplo, en la fase fluida o la fase coloidal, así como situaciones en las que un agonista o antagonista de IL-10 se pone en contacto con un fluido, por ejemplo, cuando el fluido está en contacto con una célula o un receptor, pero en donde no se ha demostrado que el agonista o antagonista se ponga en contacto directamente con la célula o el receptor.

La "caquexia" es un síndrome debilitante que implica la pérdida de músculo (debilitamiento muscular) y grasa, que se produce como resultado de un trastorno en el metabolismo. La caquexia aparece en diversos cánceres ("caquexia por cáncer"), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la insuficiencia de órganos avanzada y el SIDA. La caquexia por cáncer se caracteriza, por ejemplo, por una pérdida marcada de peso, anorexia, astenia, y anemia. La anorexia es un trastorno que surge de la falta de motivación para comer, por ejemplo, aversión a los alimentos (véase, por ejemplo, MacDonald, y col. (2003), J. Am. Coll. Surg., 197:143-161; Rubin (2003), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 100:5384-5389; Tisdale (2002), Nature Reviews Cancer, 2:862-871; Argiles, y col. (2003), Drug Discovery Today, 8:838-844; Lelli, y col. (2003), J. Chemother. 15:220-225; Argiles, y col. (2003), Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 6:401-406).

Los "variantes modificados conservativamente de PEG-IL-10" se aplican a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos concretas, los variantes modificados conservativamente se refieren a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o fundamentalmente idénticas o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias de ácidos nucleicos fundamentalmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos pueden codificar cualquier proteína concreta.

Con respecto a las secuencias de aminoácidos, los expertos en la técnica reconocerán que una sustitución individual en un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteína que sustituye un aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada para un aminoácido conservado es un "variante modificado conservativamente". Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son muy conocidas en la técnica. Un ejemplo de una sustitución conservativa es el intercambio de un aminoácido en uno de los siguientes grupos por otro aminoácido del mismo grupo (patente de EE. UU. n.º 5.767.063, expedida a Lee, y col.; Kyte y Doolittle (1982), J. Mol. Biol., 157:105-132):

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

Una "cantidad eficaz" incluye una cantidad suficiente para mejorar o prevenir un síntoma o una señal del trastorno médico. Una cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. Una

cantidad eficaz para un paciente o sujeto veterinario concreto puede variar dependiendo de factores tales como el trastorno que se está tratando, la salud global del paciente, la vía y dosis de administración del procedimiento, y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.888.530, expedida a Netti, y col.). Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el protocolo de dosificación que evita la aparición de efectos secundarios significativos o efectos tóxicos. El efecto producirá una mejora en un parámetro o medida de diagnóstico en al menos 5%, habitualmente en al menos 10%, más habitualmente en al menos 20%, del modo más habitual en al menos 30%, preferentemente en al menos 40%, más preferentemente en al menos 50%, lo más preferentemente en la menos 60%, de modo ideal en al menos 70%, de modo más ideal en al menos 80%, y del modo más ideal en al menos 90%, definiéndose 100% como el parámetro de diagnóstico que muestra un sujeto normal (véase, por ejemplo, Maynard, y col. (1996), A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001), Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido). Una cantidad eficaz de PEG-IL-10 sería una cantidad suficiente para reducir el volumen de un tumor, inhibir el crecimiento de un tumor, prevenir la metástasis, o aumentar la infiltración de células T CD8+ al 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 dentro de una célula, organismo o cuerpo humano, dependiendo del contexto.

Un "trastorno inmunológico" o "afección inmunológica" comprende, por ejemplo, una inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o enfermedad autoinmunitario. Un "trastorno inmunológico" también se refiere a infecciones, infecciones persistentes y trastornos proliferativos, tales como cánceres, tumores y angiogénesis, que incluyen infecciones, tumores y cánceres que resisten a la irradiación por el sistema inmunológico. Un "trastorno canceroso" incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y trastornos precancerosos, tales como displasia.

Los "inhibidores" y "antagonistas" o "activadores" y "agonistas" se refieren a moléculas inhibidoras o activadoras, respectivamente, por ejemplo, para la activación, por ejemplo, de un ligando, un receptor, un cofactor, un gen, una célula, un tejido o un órgano. Un modulador, por ejemplo, de un gen, un receptor, un ligando o una célula, es una molécula que altera una actividad del gen, receptor, ligando o célula, y esta actividad puede ser activada, inhibida o se pueden alterar sus propiedades reguladoras. El modulador puede actuar por sí solo o puede emplear un cofactor, por ejemplo, una proteína, un ion metálico o una molécula pequeña. Los inhibidores son compuestos que disminuyen, bloquean, previenen, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan o infrarregulan, por ejemplo, un gen, una proteína, un ligando, un receptor o una célula. Los activadores son compuestos que aumentan, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan o sobrerregulan, por ejemplo, un gen, una proteína, un ligando, un receptor o una célula. Un inhibidor también puede definirse como una composición que reduce, bloquea o inactiva una actividad constitutiva. Un "agonista" es un compuesto que interacciona con una diana para provocar o estimular 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 si no se ha identificado un agonista.

Para estudiar el grado de inhibición, por ejemplo, muestras o ensayos que comprenden, por ejemplo, una proteína, un gen, una célula o un organismo concretos, se tratan con un activador o inhibidor potencial y se comparan con muestras control sin el inhibidor. A las muestras control, es decir, no tratadas con el antagonista, se les asigna un valor de actividad relativa de 100%. La inhibición se logra cuando el valor de actividad con relación al control es aproximadamente 90% o menor, típicamente 85% o menor, más típicamente 80% o menor, lo más típicamente 75% o menor, generalmente 70% o menor, más generalmente 65% o menor, lo más generalmente 60% o menor, típicamente 55% o menor, habitualmente 50% o menor, más habitualmente 45% o menor, lo más habitualmente 40% o menor, preferentemente 35% o menor, más preferentemente 30% o menor, aún más preferentemente 25% o menor, y lo más preferentemente menor que 25%. La activación se logra cuando el valor de actividad con relación al control es aproximadamente 110%, generalmente al menos 120%, más generalmente al menos 140%, más generalmente al menos 160%, a menudo al menos 180%, más a menudo al menos 2 veces, lo más a menudo al menos 2,5 veces, habitualmente al menos 5 veces, más habitualmente al menos 10 veces, preferentemente al menos 20 veces, más preferentemente al menos 40 veces, y lo más preferentemente más de 40 veces mayor.

Los criterios de valoración en la activación o la inhibición pueden controlarse como sigue. La activación, la inhibición y la respuesta al tratamiento, por ejemplo, de una célula, un fluido fisiológico, un tejido, un órgano y un sujeto animal o humano pueden controlarse por medio de un criterio de valoración. El criterio de valoración puede comprender una cantidad predeterminada o porcentaje, por ejemplo, unos indicios de inflamación, oncogenicidad, o desgranulación o secreción de células, tales 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 iones; migración de células; adhesión de células; proliferación de células; potencial para la metástasis; diferenciación celular; y cambio en el fenotipo, por ejemplo, cambio en la expresión de un gen relacionado con la inflamación, la

apoptosis, la transformación, el ciclo celular, o la metástasis (véase, por ejemplo, Knight (2000), *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 30:145-158; Hood y Cheresch (2002), *Nature Rev. Cancer*, 2:91-100; Timme, y col. (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, y col. (2001), *Glia* 36:235-243; Stanimirovic y Satoh (2000), *Brain Pathol.*, 10:113-126).

Un criterio de valoración de la inhibición es, en general, 75% del control o menor, preferentemente 50% del control o menor, más preferentemente 25% del control o menor, y lo más preferentemente 10% del control o menor. En general, un criterio de valoración de la activación es al menos 150% del control, preferentemente al menos dos veces el control, más preferentemente al menos cuatro veces el control, y lo más preferentemente al menos 10 veces el control.

Una composición que está "marcada" puede detectarse, de modo directo o indirecto, mediante procedimientos espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, isotópicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ , isótopos estables, tintes fluorescentes, reactivos densos a electrones, sustratos, marcadores de epitopo, o enzimas, por ejemplo, tal como se emplean en inmunoensayos ligados a enzimas, o fluorettes (véase, por ejemplo, Rozinov y Nolan (1998), *Chem. Biol.*, 5:713-728).

Un "ligando" se refiere, por ejemplo, a una molécula pequeña, un péptido, un polipéptido y una molécula asociada a membrana o unida a membrana, o un complejo de estos, que puede actuar como agonista o antagonista de un receptor. Un "ligando" también incluye un agente que no es un agonista o antagonista, pero que puede unirse al receptor sin influir significativamente en sus propiedades biológicas, por ejemplo, señalización o adhesión. Además, un "ligando" incluye un ligando unido a membrana que ha sido cambiado, por ejemplo, mediante procedimientos químicos o recombinantes, a una versión soluble del ligando unido a membrana. Por convención, cuando un ligando está unido a una membrana sobre una primera célula, el receptor habitualmente aparece en una segunda célula. La segunda célula puede ser igual o diferente a la primera célula. Un ligando o un receptor puede ser totalmente intracelular, es decir, puede residir en el citosol, el núcleo o en algún otro compartimento intracelular. El ligando o el receptor pueden cambiar su localización, por ejemplo, desde un compartimento intracelular hacia la cara externa de la membrana plasmática. El complejo de un ligando y un receptor se denomina "complejo de ligando-receptor". Cuando un ligando y un receptor están implicados en una vía de señalización, el ligando aparece en una posición cadena arriba y el receptor aparece en una posición cadena abajo de la vía de señalización.

Se proporcionan "moléculas pequeñas" para el tratamiento de la fisiología y los trastornos de tumores y cánceres. Una "molécula pequeña" se define como una molécula con un peso molecular menor que 10 kD, generalmente menor que 2 kD, y preferentemente menor que 1 kD. Las moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan 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 producto terapéutico, una molécula pequeña puede ser más permeable a células, menos susceptible a la degradación y menos apta para suscitar una respuesta inmunológica que las moléculas grandes. Se han descrito moléculas pequeñas, tales como miméticos peptídicos de anticuerpos y citoquinas, así como toxinas de molécula pequeña (véase, por ejemplo, Casset, y col. (2003), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 307:198-205; Muyldermans (2001), *J. Biotechnol.*, 74:277-302; Li (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18:1251-1256; Apostolopoulos, y col. (2002), *Curr. Med. Chem.*, 9:411-420; Monfardini, y col. (2002), *Curr. Pharm. Des.*, 8:2185-2199; Domingues, y col. (1999), *Nat. Struct. Biol.*, 6:652-656; Sato y Sone (2003) *Biochem. J.*, 371:603-608; patente de EEUU n.º 6.326.482, expedida a Stewart, y col.).

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas, tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno, tales como cloranbucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalano, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, muestra de uracilo; nitrosureas, tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido microfenólico, nogalamina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos, tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico, tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina, tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxiluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona;

antiadrenales, tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores del ácido fólico, tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; 5 pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procabazina; PSK®; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina; 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; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como 10 cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; Xeloda® Roche, Suiza; ibandronato; CPT11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácido o derivados de cualquiera de los anteriores. En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas 15 sobre tumores, tales como antiestrógenos, que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, queoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y las sales farmacéuticamente aceptables, ácido o derivados de cualquiera de los anteriores.

"Que se une específicamente" o "que se une selectivamente", cuando se refiere a un ligando/receptor, 20 anticuerpo/antígeno u otra pareja de unión, indica una reacción de unión que determina la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Así, bajo condiciones indicadas, un ligando especificado se une a un receptor concreto y no se une en cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. El anticuerpo, o la composición de unión derivada del sitio de unión al antígeno de un anticuerpo del procedimiento contemplado, se une a su antígeno, o uno de sus variantes o muteínas, con una afinidad que es al 25 menos dos veces mayor, preferentemente al menos diez veces mayor, más preferentemente al menos 20 veces mayor, y lo más preferentemente al menos 100 veces mayor que la afinidad con cualquier otro anticuerpo o composición de unión derivada de este. En una realización preferida, el anticuerpo tendrá una afinidad mayor que aproximadamente  $10^9$  litros/mol, según se determina, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard (Munsen, y col. (1980), *Analyt. Biochem.*, 107:220-239).

30 Una "interleuquina-10" o "IL-10", tal como se emplea en la presente, tanto conjugada con un polietilenglicol como en una forma no conjugada, es una proteína que comprende dos subunidades unidas de modo no covalente para formar un homodímero. Tal como se emplea en la presente, a menos que se indique lo contrario, "interleuquina-10" e "IL-10" pueden indicar la IL-10 humana o de ratón (n.ºs de registro de Genbank NP\_000563; M37897; o documento US 6.217.857), que también se denominan "hIL-10" o "mIL-10".

35 Una "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 a más de un resto aminoácido de la proteína de IL-10 a través de un conector, de modo que la unión es estable. Las expresiones "IL-10 monopegilada" y "mono-PEG-IL-10" significan que al menos una molécula de polietilenglicol está unida covalentemente a un único resto aminoácido en una subunidad del dímero de IL-10 a través de un conector. Las expresiones "IL-10 dipegilada" y "di-PEG-IL-10" significan que al 40 menos una molécula de PEG está unida a un único resto en cada subunidad del dímero de IL-10 a través de un conector. El peso molecular promedio del resto PEG preferentemente es entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 50.000 daltons. El procedimiento o sitio de unión de PEG a IL-10 no es crítico, pero preferentemente la pegilación no altera, o solo altera mínimamente, la actividad de la molécula biológicamente activa. Preferentemente, el aumento en la semivida es mayor que cualquier disminución en la actividad biológica. 45 Para PEG-IL-10, la actividad biológica generalmente se mide evaluando los niveles de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) en el suero de sujetos expuestos a un antígeno bacteriano (lipopolisacárido, LPS) y tratado con PEG-IL-10, según se describe en el documento US 7.052.686.

Tal como se emplea en la presente, "semivida en suero", abreviada como " $t_{1/2}$ ", significa la semivida de eliminación, es decir, el momento en el cual la concentración en suero de un agente ha alcanzado la mitad de su valor inicial o 50 máximo. La expresión "mayor semivida en suero" empleada en la presente con relación a un agente sintético significa que el agente sintético se elimina a una velocidad menor que el agente endógeno no sintético o que la versión producida de modo recombinante de este.

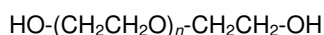
## II. Generalidades

55 La presente invención proporciona procedimientos para producir una mezcla de mono- y di-PEG. La IL-10 pegilada ha demostrado ser más eficaz en un entorno tumoral; véase, por ejemplo, el documento US20080081031. La presente invención proporciona un procedimiento para aumentar los rendimientos de IL-10 pegilada purificando IL-10 monopegilada (al menos una molécula de PEG en una subunidad del homodímero de IL-10) y dipegilada (al menos una molécula de PEG en cada subunidad del homodímero de IL-10).

### III. Polietilenglicol ("PEG")

El polietilenglicol ("PEG") es un resto químico que se ha empleado para la preparación de productos de proteínas 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 la enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave; la superóxido dismutasa pegilada se ha sometido a ensayos clínicos para tratar lesiones en la cabeza; el alfa-interferón pegilado se ha ensayado en ensayos clínicos de fase I para tratar la hepatitis; se ha indicado que la glucocerebrosidasa pegilada y la hemoglobina pegilada se han sometido a ensayos preclínicos. Se ha demostrado que la unión del polietilenglicol protege frente a la proteólisis (véase, por ejemplo, Sada, y col. (1991), *J. Fermentation Bioengineering*, 71:137-139).

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



- 15 Para acoplar PEG a una molécula (polipéptidos, polisacáridos, polinucleótidos, y moléculas orgánicas pequeñas) es necesario activar el PEG preparando un derivado del PEG que presente un grupo funcional en uno o ambos extremos terminales. La vía más habitual para la conjugación de PEG a proteínas ha sido activar el PEG con grupos funcionales adecuados para la reacción con lisina y grupos aminoácidos N-terminales. En particular, los grupos reactivos más habituales implicados en el acoplamiento de PEG a polipéptidos son los grupos alfa- o épsilon-amino de la lisina.

- 20 La reacción de un conector de pegilación con una proteína conduce a la unión del resto PEG predominantemente en los siguientes sitios: el grupo alfa-amino en el N-terminal de la proteína, el grupo épsilon-amino en la cadena lateral de los restos lisina, y el grupo imidazol en la cadena lateral de los restos histidina. Puesto que la mayoría de las proteínas recombinantes poseen un único grupo alfa-amino y una serie de grupos épsilon-amino e imidazol, pueden generarse numerosos isómeros posicionales dependiendo de la química del conector.

- 25 Dos monometoxi-PEG (mPEG) activados de primera generación que se emplean mucho son el carbonato de succinimidilo-PEG (SC-PEG; véase, por ejemplo, Zalipsky, y col. (1992), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15:100-114; y Miron y Wilcheck (1993), *Bioconjug. Chem.*, 4:568-569) y el carbonato de benzotriazol-PEG (BTC-PEG; véase, por ejemplo, Dolence, y col., patente de EE. UU. n.º 5.650.234), que reaccionan preferentemente con restos lisina para formar un enlace carbamato, pero se sabe que también reaccionan con restos histidina y tirosina. Se ha demostrado que el enlace con restos histidina en IFN $\alpha$  es un enlace imidazolcarbamato hidrolíticamente inestable (véase, por ejemplo, Lee y McNemar, patente de EE. UU. n.º 5.985.263).

- 30 Se ha diseñado una tecnología de pegilación de segunda generación para evitar estos enlaces inestables, así como la falta de selectividad en la reactividad del resto. El uso de un conector de PEG-aldehído se dirige a un único sitio sobre el N-terminal de una subunidad de polipéptido y/o proteína a través de una aminación reductora. La IL-10 puede pegilarse empleando diferentes tipos de conectores y pH para lograr diversas formas de moléculas pegiladas (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).

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

- 40 La IL-10 humana induce el rápido desarrollo de anticuerpos neutralizantes cuando se administra a ratones inmunocompetentes. Para evitar este tipo de neutralización, se administró por vía subcutánea PEG-hIL-10 a ratones deficientes en células B, es decir, ratones incapaces de producir una respuesta de anticuerpos. Los tumores singeneicos bien establecidos en estos ratones inmunodeficientes retrasaron significativamente su crecimiento o fueron completamente rechazados por PEG-hIL-10. La restricción o inhibición del crecimiento tumoral depende de células T CD4 y CD8. Tras una merma de células CD8, el efecto inhibitorio de PEG-hIL-10 fue completamente abrogado. Así, PEG-hIL-10 induce respuestas citotóxicas mediadas por CD8.

- 45 Otros análisis en tejidos tumorales demostraron que PEG-IL-10 aumenta la infiltración de células T CD8+ hacia el tumor a un nivel mayor que la IL-10 no pegilada. El nivel de expresión de citoquinas inflamatorias en las células CD8 infiltrantes también fue mayor con el tratamiento con PEG-IL-10, comparado con el tratamiento con IL-10 no pegilada. El tratamiento de pacientes con tumores con PEG-IL-10 debería inducir una respuesta antitumoral significativa y conferir un beneficio terapéutico significativo (véase, por ejemplo,

- 50 Una proteína de IL-10 empleada en la presente invención contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de al menos 75%, más preferentemente al menos 85%, y lo más preferentemente al menos 90% o más, por ejemplo, al menos 95%, con la secuencia de una proteína IL-10 madura, es decir, que carece de cualquier secuencia conductora. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.217.857. La homología de secuencia de aminoácidos, o identidad de secuencia, se determina optimizando los apareamientos de restos y,



si es necesario, introduciendo huecos según se requiera. Las secuencias de aminoácidos homólogas generalmente pretenden incluir variaciones alélicas, polimórficas e interespecíficas naturales en cada secuencia respectiva. Las proteínas o péptidos homólogos típicos tendrán de 25-100% de homología (si se introducen huecos) a 50-100% de homología (si se incluyen sustituciones conservativas) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de IL-10.

5 Véase Needleham y col., *J. Mol. Biol.*, 48:443-453 (1970); Sankoff y col., en *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison*, 1983, Addison-Wesley, Reading, Mass.; y los paquetes informáticos de IntelliGenetics, Mountain View, Calif, y the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, Wis.

El resto IL-10 en los conjugados de PEG-IL-10 puede glicosilarse o puede modificarse con muteínas no glicosiladas u otros análogos, que incluyen la proteína BCRF1 (IL-10 vírica del virus de Epstein Barr). Pueden realizarse modificaciones de secuencias que codifican IL-10 empleando una diversidad de técnicas, por ejemplo, la mutagénesis específica dirigida a sitio [Gillman y col., *Gene*, 8:81-97 (1979); Roberts y col., *Nature*, 328:731-734 (1987)], y puede evaluarse mediante selección habitual en un ensayo adecuado para la actividad IL-10. Las proteínas de IL-10 modificadas, por ejemplo, variantes, pueden variar con respecto a la secuencia natural al nivel de

10 estructura primaria. Estas modificaciones pueden realizarse mediante inserciones, sustituciones, delecciones y fusiones de aminoácidos. Los variantes de IL-10 pueden prepararse teniendo en cuenta diversos objetivos, que incluyen aumentar la semivida en suero, reducir una respuesta inmunológica contra la IL-10, facilitar la purificación o la preparación, disminuir la conversión de IL-10 en sus subunidades monoméricas, mejorar la eficacia terapéutica, y disminuir la gravedad o la aparición de efectos secundarios durante el uso terapéutico. Los variantes de

15 secuencia de aminoácidos habitualmente son variantes predeterminados que no se encuentran en la naturaleza, aunque otros pueden ser variantes postraduccionales, por ejemplo, variantes glicosilados. Cualquier variante de IL-10 puede emplearse en esta invención, con la condición de que conserve un nivel adecuado de actividad IL-10. En el contexto tumoral, una actividad IL-10 adecuada sería, por ejemplo, la infiltración de células T CD8+ en los sitios tumorales, la expresión de citoquinas inflamatorias, tales como IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, y RANK-L, desde estas

20 células infiltrantes, el aumento de los niveles de TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  en muestras biológicas.

La IL-10 empleada en esta invención puede provenir de un mamífero, por ejemplo, un ser humano o un ratón. Se prefiere la IL-10 humana (hIL-10) para el tratamiento de seres humanos que necesitan un tratamiento con IL-10. La IL-10 empleada en esta invención es preferentemente una IL-10 recombinante. Pueden encontrarse procedimientos que describen la preparación de IL-10 humana y de ratón en la patente de EE. UU. n.º 5.231.012. También se

30 incluyen los variantes naturales o sustituidos de modo conservativo de la IL-10 humana y de ratón. En otra realización de la presente invención, la IL-10 puede tener origen vírico. La clonación y la expresión de una IL-10 vírica procedente del virus de Epstein Barr (proteína BARF1) se describe en Moore y col., *Science*, 248:1230 (1990).

La IL-10 puede obtenerse mediante una serie de formas empleando técnicas convencionales conocidas en la

35 técnica, por ejemplo, puede aislarse y purificarse a partir de un medio de cultivo de células activadas capaces de segregar la proteína (por ejemplo, células T), puede sintetizarse de modo químico o por medio de técnicas recombinantes (véase, por ejemplo, Merrifield, *Science*, 233:341-47 (1986); Atherton y col., *Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, 1989, I.R.L. Press, Oxford; la patente de EE. UU. n.º 5.231.012 que divulga procedimientos para la producción de proteínas que tienen actividad IL-10, que incluyen técnicas recombinantes y

40 otras técnicas sintéticas). Preferentemente, la proteína de IL-10 se obtiene a partir de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido de IL-10 empleando técnicas recombinantes. La IL-10 humana recombinante también está disponible en el mercado, por ejemplo, en PeproTech, Inc., Rocky Hill, N.J.

La PEG-IL-10 también puede fabricarse empleando técnicas muy conocidas en la técnica. El polietilenglicol (PEG) puede sintetizarse como se describe, por ejemplo, en Lundblad, R.L. y col. (1988), *Chemical Reagents for Protein Modification*, CRC Press, Inc., vol. 1, pp. 105-125. El PEG puede conjugarse con IL-10 a través del uso de un

45 conector, como se describió anteriormente. En ciertas realizaciones, la mono-PEG-IL-10 comprende de una a nueve moléculas de PEG unidas covalentemente a través de un conector al grupo alfa-amino del resto aminoácido en el N-terminal de una subunidad del dímero de IL-10.

#### IV. Composiciones terapéuticas, procedimientos

La PEG-IL-10 puede formularse en una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente

50 eficaz de la IL-10 y un vehículo farmacéutico. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para proporcionar el resultado terapéutico deseado. Preferentemente, dicha cantidad tiene efectos secundarios negativos mínimos. La cantidad de PEG-IL-10 administrada para tratar un trastorno que puede tratarse con IL-10 se basa en la actividad IL-10 de la proteína conjugada, que puede determinarse mediante ensayos de actividad IL-10

55 conocidos en la técnica. La cantidad terapéuticamente eficaz para un paciente concreto que necesita dicho tratamiento puede determinarse considerando diversos factores, tales como el trastorno que se va a tratar, la salud global del paciente, el procedimiento de administración, la gravedad de los efectos secundarios y similares. En un contexto tumoral, una actividad IL-10 adecuada podría ser, por ejemplo, la infiltración de células T CD8 hacia los

sitios tumorales, la expresión de citoquinas inflamatorias, tales como IFN $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, y RANK-L, desde estas células infiltrantes, el aumento de los niveles de TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  en muestras biológicas.

La cantidad terapéuticamente eficaz de IL-10 pegilada puede variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal diarios. Preferentemente, la cantidad de IL-10 pegilada varía de aproximadamente 0,1 a 20  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal diarios, más preferentemente de aproximadamente 0,5 a 10  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal diarios, y lo más preferentemente de aproximadamente 1 a 4  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal diarios. Pueden emplearse unos programas de administración menos frecuentes utilizando la PEG-IL-10 de la invención, puesto que esta forma conjugada tiene una acción más a largo plazo que la IL-10. La IL-10 pegilada se formula en forma purificada y está sustancialmente exenta de agregados y otras proteínas. Preferentemente, la PEG-IL-10 se administra mediante infusión continua de modo que se administra una cantidad de aproximadamente 50 a 800  $\mu$ g de proteína diarios (es decir, de aproximadamente 1 a 16  $\mu$ g de proteína por kg de peso corporal diarios de PEG-IL-10). La tasa de infusión diaria puede variar basándose en el control de los efectos secundarios y los recuentos de células sanguíneas.

Para preparar composiciones farmacéuticas que contienen mono-PEG-IL-10, se mezcla una cantidad terapéuticamente eficaz de PEG-IL-10 con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el vehículo o excipiente es inerte. Un vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible no tóxica adecuada para administrar las composiciones de IL-10 de la invención a un paciente. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen disolución salina normal, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, y disolución de Hank. También pueden emplearse vehículos no acuosos, tales como aceites no volátiles y oleato de etilo. Un vehículo preferido es dextrosa al 5%/disolución salina. El vehículo puede contener cantidades pequeñas de aditivos, tales como sustancias que potencian la isotonicidad y la 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 de diagnóstico pueden prepararse mediante un mezclado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables en forma, por ejemplo, de polvos liofilizados, suspensiones espesas, disoluciones o suspensiones acuosas (véase, por ejemplo, Hardman, y col. (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, y col. (eds.) (1993), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y col. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y col. (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Dispense Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000), Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY).

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral o inyectarse en el cuerpo. Las formulaciones para un uso oral también pueden incluir compuestos para proteger aún más a la IL-10 frente a las proteasas en el tracto gastrointestinal. Las inyecciones son habitualmente intramusculares, subcutáneas, intradérmicas o intravenosas. Como alternativa, puede emplearse la inyección intraarticular u otras vías en circunstancias apropiadas.

Cuando se administra por vía parenteral, la IL-10 pegilada preferentemente se formula en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión, emulsión) en asociación con un vehículo farmacéutico. Véase, por ejemplo, Avis y col., eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Dekker, N.Y. (1993); Lieberman y col., eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Dekker, N.Y. (1990); y Lieberman y col., eds., Pharmaceutical Dosage Forms: Dispense Systems, Dekker, N.Y. (1990). Como alternativa, las composiciones de la invención pueden introducirse en el cuerpo del paciente mediante un sistema de administración de fármacos implantable o inyectable, por ejemplo, Urquhart y col., Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.. 24:199-236, (1984); Lewis, ed., Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals, Plenum Press, Nueva York (1981); patentes de EE. UU. n.ºs 3.773.919; 3.270.960; y similares. La IL-10 pegilada puede administrarse en vehículos acuosos, tales como agua, disolución salina o vehículos tamponados con o sin diversos aditivos y/o agentes diluyentes.

Una cantidad eficaz para un paciente concreto puede variar dependiendo de factores, tales como el trastorno que se está tratando, la salud global del paciente, la vía y dosis de administración del procedimiento, y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, y col. (1996), A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Ratón, FL; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., Londres, Reino Unido).

Los sujetos veterinarios, experimentales o de investigación típicos incluyen monos, perros, gatos, ratas, ratones, conejos, cobayas, caballos y seres humanos.

El médico determina la dosis apropiada, por ejemplo, empleando parámetros o factores conocidos o sospechosos en la técnica por afectar o que puedan afectar al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y aumenta después en pequeños incrementos hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con relación a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen los

síntomas, por ejemplo, de inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas. Preferentemente, un producto biológico que se va a utilizar procede de la misma especie que el animal previsto para el tratamiento, minimizando con ello la respuesta humoral al reactivo. Los procedimientos de coadministración o tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citoquina, un esteroide, un agente quimioterapéutico, un antibiótico o radiación, son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hardman, y col. (eds.) (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, Filadelfia, PA; Chabner y Longo (eds.) (2001), Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA). Una cantidad eficaz de producto terapéutico disminuirá los síntomas, por ejemplo, el tamaño tumoral o la inhibición del crecimiento tumoral, generalmente en al menos 10%; habitualmente en al menos 20%; preferentemente en al menos aproximadamente 30%; más preferentemente en al menos 40%, y lo más preferentemente en al menos 50%.

## VI. Usos

La presente invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar un trastorno o afección proliferativo, por ejemplo, cáncer de útero, cervix, mama, próstata, testículo, pene, tracto gastrointestinal, por ejemplo, esófago, orofaringe, estómago, intestino grueso o delgado, colon o recto, riñón, células renales, vejiga, hueso, médula ósea, piel, cabeza o cuello, piel, hígado, vesícula biliar, corazón, pulmón, páncreas, glándulas salivares, glándulas adrenales, tiroides, cerebro, por ejemplo, gliomas, ganglios, sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP), y sistema inmunológico, por ejemplo, bazo o timo. La presente invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar, por ejemplo, tumores inmunogénicos, tumores no inmunogénicos, tumores latentes, 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 por productos químicos, metástasis, y angiogénesis. La invención también contempla 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, y col. (2003), *Oncogene*, 22:3180-3187; Sawaya, y col. (2003), *New Engl. J. Med.*, 349:1501-1509; Farrar, y col. (1999), *J. Immunol.*, 162:2842-2849; Le, y col. (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, y col. (2001), *New Engl. J. Med.*, 345:1890-1900; Izbicke, y col. (1997), *New Engl. J. Med.*, 337:1188-1194; Holland, y col. (eds.) (1996), *Cancer Medicine Encyclopedia of Cancer*, 4ª ed., Academic Press, San Diego, CA).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar un trastorno proliferativo, cáncer, tumor o trastorno precanceroso, tal como displasia, con PEG-IL-10 y al menos otro agente terapéutico o de diagnóstico. El agente terapéutico adicional puede ser, por ejemplo, una citoquina o antagonista de citoquina, tal como IL-12, alfa-interferón, o anti-receptor del factor del crecimiento epidérmico, doxorubicina, epirubicina, un antifolato, por ejemplo, metotrexato o fluoruracilo, irinotecano, ciclofosfamida, radioterapia, terapia de hormonas o antihormonas, por ejemplo, andrógeno, estrógeno, antiestrógeno, flutamida, o dietilestilbestrol, cirugía, tamoxifeno, ifosfamida, mitolactol, un agente alquilante, por ejemplo, melfalano o cis-platino, etopósido, vinorelbina, vinblastina, vindesina, un glucocorticoide, un antagonista del receptor de histamina, un inhibidor de la angiogénesis, radiación, un sensibilizante a la radiación, antraciclina, vinca alcaloides, 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 antígenos, por ejemplo, terapia con células dendríticas. Las vacunas pueden proporcionarse, por ejemplo, como una proteína soluble o como un ácido nucleico que codifica la proteína (véase, por ejemplo, Le, y col., supra; Greco y Zellefsky (eds.) (2000), *Radiotherapy of Prostate Cancer*, Harwood Academic, Amsterdam; 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, y col. (2001), *New Engl. J. Med.*, 344:783-792; Kudelka, y col. (1998), *New Engl. J. Med.*, 338:991-992; van Netten, y col. (1996), *New Engl. J. Med.*, 334:920-921).

También se proporcionan composiciones para su uso en procedimientos para tratar la hematopoyesis extramedular (HEM) del cáncer. La HEM se ha descrito (véase, por ejemplo, Rao, y col. (2003), *Leuk. Lymphoma*, 44:715-718; Lane, y col. (2002), *J. Cutan. Pathol.*, 29:608-612).

El alcance pleno de esta invención se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

### I. Procedimientos generales

Los procedimientos convencionales en biología molecular han sido descritos (Maniatis, y col. (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 procedimientos convencionales en Ausubel, y col. (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 la mutagénesis de ADN (vol. 1), la clonación en células de mamífero y levaduras (vol. 2), glicoconjugados y expresión de proteínas (vol. 3), y bioinformática (vol. 4).

Los procedimientos para la purificación de proteínas, que incluyen inmunoprecipitación, cromatografía, electroforesis, centrifugación y cristalización, han sido descritos (Coligan, y col. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York). Los análisis químicos, la modificación química, la modificación postraduccional, la producción de proteínas de fusión, la glicosilación de proteínas han sido descritos (véase, por ejemplo, Coligan, y col. (2000), *Current Protocols in Protein Science*, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., Nueva York; Ausubel, y col. (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). La producción, la purificación y la fragmentación de anticuerpos policlonales y monoclonales han sido descritas (Coligan, y col. (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, *supra*). Están disponibles técnicas convencionales para caracterizar interacciones de ligando/receptor (véase, por ejemplo, Coligan, y col. (2001), *Current Protocols in Immunology*, vol. 4, John Wiley, Inc., Nueva York). Se describen procedimientos para fabricar PEG-IL-10, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 7.052.686.

Están disponibles procedimientos para la citometría de flujo, que incluyen la clasificación de células activada por fluorescencia ("fluorescence activated cell sorting", FACS) (véase, por ejemplo, Owens, y col. (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, que incluyen cebadores y sondas de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos, para su uso, por ejemplo, como reactivos de diagnóstico (*Molecular Probes* (2003), catálogo, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003), catálogo, St. Louis, MO).

Se han descrito procedimientos convencionales de histología del sistema inmunológico (véase, por ejemplo, Muller-Harmelink (ed.) (1986), *Human Thymus: Histopathology and Pathology*, Springer Verlag, Nueva York, NY; Hiatt, y col. (2000), *Color Atlas of Histology*, Lippincott, Williams, and Wilkins, Filadelfia, PA; Louis, y col. (2002), *Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, Nueva York, NY).

Se han descrito procedimientos para el tratamiento y el diagnóstico del 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, y col. (eds.) (2001), *Textbook of Melanoma*, Martin Dunitz, Ltd., Londres, Reino Unido; Devita, y col. (eds.) (2001), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 6ª ed., Lippincott, Filadelfia, PA; Holland, y col. (eds.) (2000), *Holland-Frei Cancer Medicine*, BC Decker, Filadelfia, 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, y col. (2003), *Onkologie* 26:227-233).

Están disponibles paquetes informáticos y bases de datos para determinar, por ejemplo, fragmentos antigénicos, secuencias conductoras, plegamiento de proteínas, dominios funcionales, sitios de glicosilación y alineamientos de secuencia (véase, por ejemplo, GenBank, Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); paquete GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher® (TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menne, y col. (2000), *Bioinformatics*, 16: 741-742; Menne, y col. (2000), *Bioinformatics Applications Note*, 16:741-742; Wren, y col. (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

La IL-10 (por ejemplo, de roedor o primate) se dializó contra fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 100 mM, intervalo de pH de 5-7,4. Se hizo reaccionar una proporción molar 1:1-1:7 de PEG-propilaldehído 5K con IL-10 a una concentración de 1-12 mg/ml en presencia de cianoborohidruro de sodio 0,75-30 mM. Como alternativa, la reacción puede activarse con picolina borano de una manera similar. La reacción se incubó a 5-30 °C durante 3-24

horas.

En particular, el pH de la reacción de pegilación se ajustó a 6,3, y se hicieron reaccionar 7,5 mg/ml de hIL-10 con PEG para que la proporción de IL-10 a conector de PEG fuera de 1:3,5. La concentración final de cianoborohidruro fue de 25 mM, y la reacción se realizó a 15 °C durante 12-15 horas. La figura 1 muestra la cinética de reacción de mono- y di-PEG-IL-10. La mono- y di-PEG IL-10 son los productos de reacción más grandes, siendo la concentración de cada uno 50% al finalizar.

La reacción se extinguió empleando un aminoácido, tal como glicina y lisina o, como alternativa, tampones Tris. Se han empleado múltiples procedimientos de purificación, tal como filtración en gel, cromatografías de intercambio aniónico y catiónico y exclusión molecular para aislar los prototipos PEGilados deseados.

Como alternativa, la IL-10 se dializa contra fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0, NaCl 100 mM. La IL-10 dializada se diluye 3,2 veces hasta una concentración de aproximadamente 0,5 a 12 mg/ml empleando el tampón de diálisis. Antes de la adición del conector, se añade SC-PEG-12K (Delmar Scientific Laboratories, Maywood, IL), 1 volumen de Na-tetraborato 100 mM a pH 9,1 en 9 volúmenes de la IL-10 diluida para aumentar el pH de la disolución de IL-10 a 8,6. El conector de SC-PEG-12K se disuelve en el tampón de diálisis y se añade el volumen apropiado de disolución de conector (de 1,8 a 3,6 moles de conector por mol de IL-10) en la disolución de IL-10 diluida para comenzar la reacción de pegilación. La reacción se realiza a 5 °C para controlar la velocidad de la reacción. La disolución de reacción se agita suavemente durante la reacción de pegilación. Cuando el rendimiento de mono-PEG-IL-10, determinado mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), se acerca a 40%, la reacción se detiene añadiendo una disolución de glicina 1 M hasta una concentración final de 30 mM. El pH de la disolución de reacción se ajustó lentamente a 7,0 empleando una disolución de HCl y la reacción se filtra a 0,2 micrómetros y se conserva a -80 °C.

### III. Comparaciones de eficacia

Para comparar diversos prototipos de PEG-IL-10, a 10 ratones por grupo de tratamiento se les implantaron 10<sup>6</sup> carcinomas de células escamosas PDV6 en Matrigel en el flanco derecho, en un volumen de 100 µl. Cuando el tamaño promedio de tumor alcanzó 100 mm<sup>3</sup> (aproximadamente 2-3 semanas desde la implantación), comenzó el tratamiento con los siguientes prototipos de PEG-IL-10 murina o control, una vez diaria (a menos que se especifique, el conector es PPA):

|           |                                           |
|-----------|-------------------------------------------|
| Control:  | tampón HEPES                              |
| 0,2 mpk:  | 2 x diPEG-IL-10 5K                        |
| 0,02 mpk: | 2 x diPEG-IL-10 5K                        |
| 0,2 mpk:  | 1 x monoPEG-IL-10 5K                      |
| 0,02 mpk: | 1 x monoPEG-IL-10 5K                      |
| 0,2 mpk:  | 1 x monoPEG-IL-10 5K + 2 x diPEG-IL-20 5K |
| 0,02 mpk: | 1 x monoPEG-IL-10 5K + 2 x diPEG-IL-20 5K |
| 0,2 mpk:  | 1 x monoPEG-IL-10 12K (conector SC)       |
| 0,02 mpk: | 1 x monoPEG-IL-10 12K (conector SC)       |

Los criterios de valoración medidos incluyen el tamaño del tumor (medido 2x/semana), pesos (medidos 1x/semana), y concentraciones en suero (medidas al principio, en el punto intermedio y al final del tratamiento). La figura 2 muestra las eficacias de los diversos prototipos descritos anteriormente.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de producción de una mezcla de IL-10 mono- y dipegilada, en el que al menos una molécula de PEG se une covalentemente al menos a un resto aminoácido de al menos una subunidad de IL-10, que comprende:
  - a) hacer reaccionar de 1 mg/ml-12 mg/ml de proteína de IL-10 con un conector-PEG activado, de modo que la proporción de IL-10 a conector-PEG sea de 1:1 a 1:7,7, en presencia de 25 mM o 35 mM de un agente reductor, a un pH de 5,0 a 7,4 y una temperatura de 5 °C a 30 °C, durante 3-24 horas,
  - b) purificar la mezcla de IL-10 mono- y dipegilada.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el conector-PEG se selecciona del grupo que consiste en succinimidilcarbonato-PEG, PEG-butilaldehído, PEG-pentaldehído, PEG-amido-propionaldehído, PEG-uretano-propionaldehído, y PEG-propilaldehído.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el conector-PEG es PEG-propilaldehído.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que la masa molecular de PEG que comprende el conector-PEG es de 5.000 daltons a 20.000 daltons.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la masa molecular de PEG que comprende el conector-PEG es de 5.000 daltons.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en borohidruro, cianoborohidruro de sodio, amina borano y picolina borano.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio y picolina borano.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la mezcla de mono- y di-PEG-IL-10 se purifica mediante una cromatografía seleccionada del grupo que consiste en cromatografía de intercambio catiónico, de intercambio aniónico, de exclusión molecular y de interacción hidrófoba.
9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que la mezcla de mono- y di-PEG-IL-10 se purifica mediante cromatografía de exclusión molecular.
10. Una mezcla de IL-10 mono- y dipegilada que puede obtenerse mediante el procedimiento de cualquier reivindicación anterior.
11. Una composición farmacéutica que comprende la mono- y di-PEG-IL-10 de la reivindicación 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición farmacéutica que comprende:
  - una mezcla de IL-10 monopegilada e IL-10 dipegilada, cada una en una concentración de 50%; y
  - un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición farmacéutica según la reivindicación 11 o 12 para su uso en el tratamiento del cuerpo humano mediante terapia.
14. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, en la que el tratamiento es el tratamiento de un cáncer o un tumor en un ser humano.

Cinética de la reacción de pegilación de PPA 5K

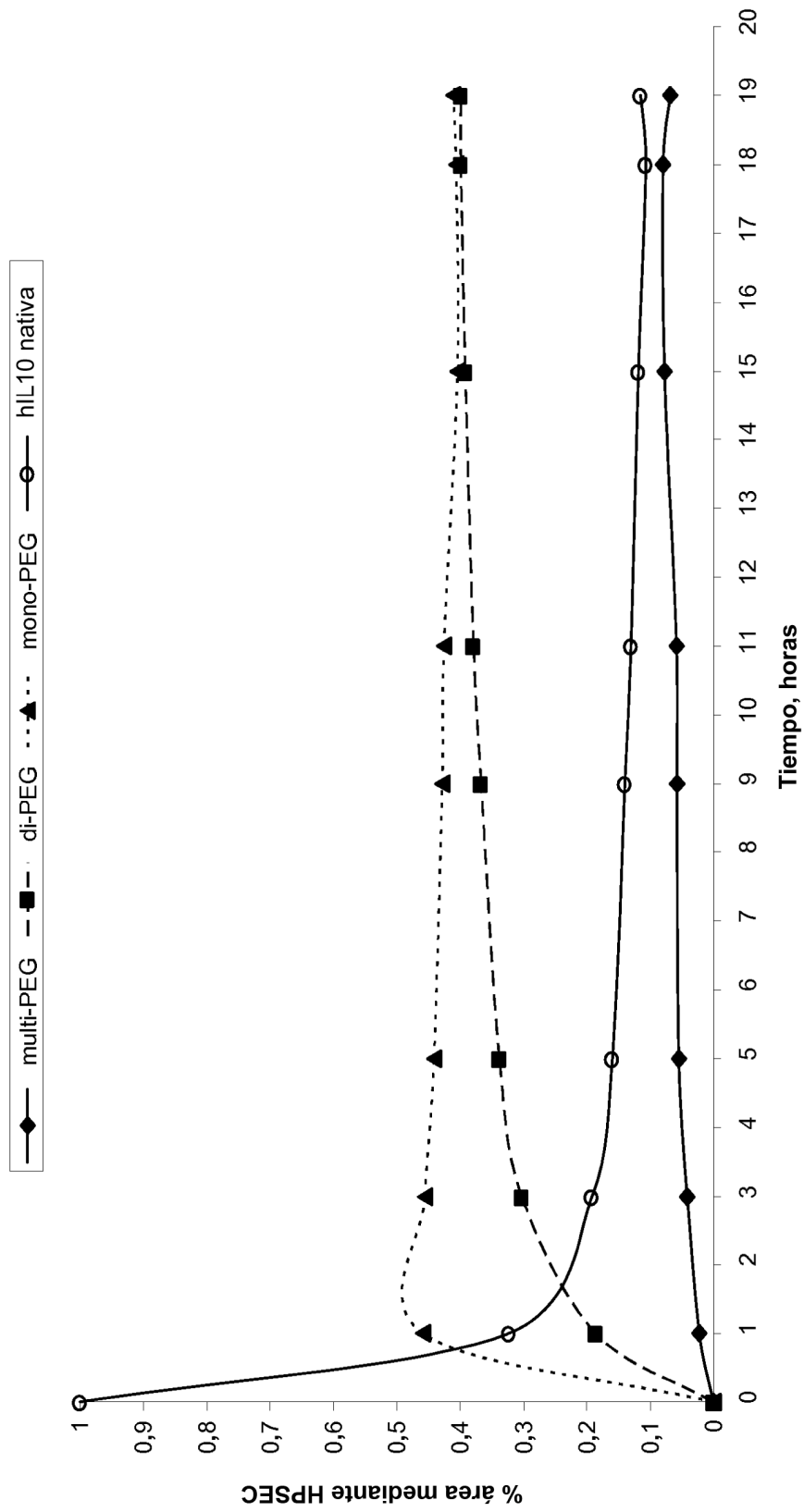


FIG. 1

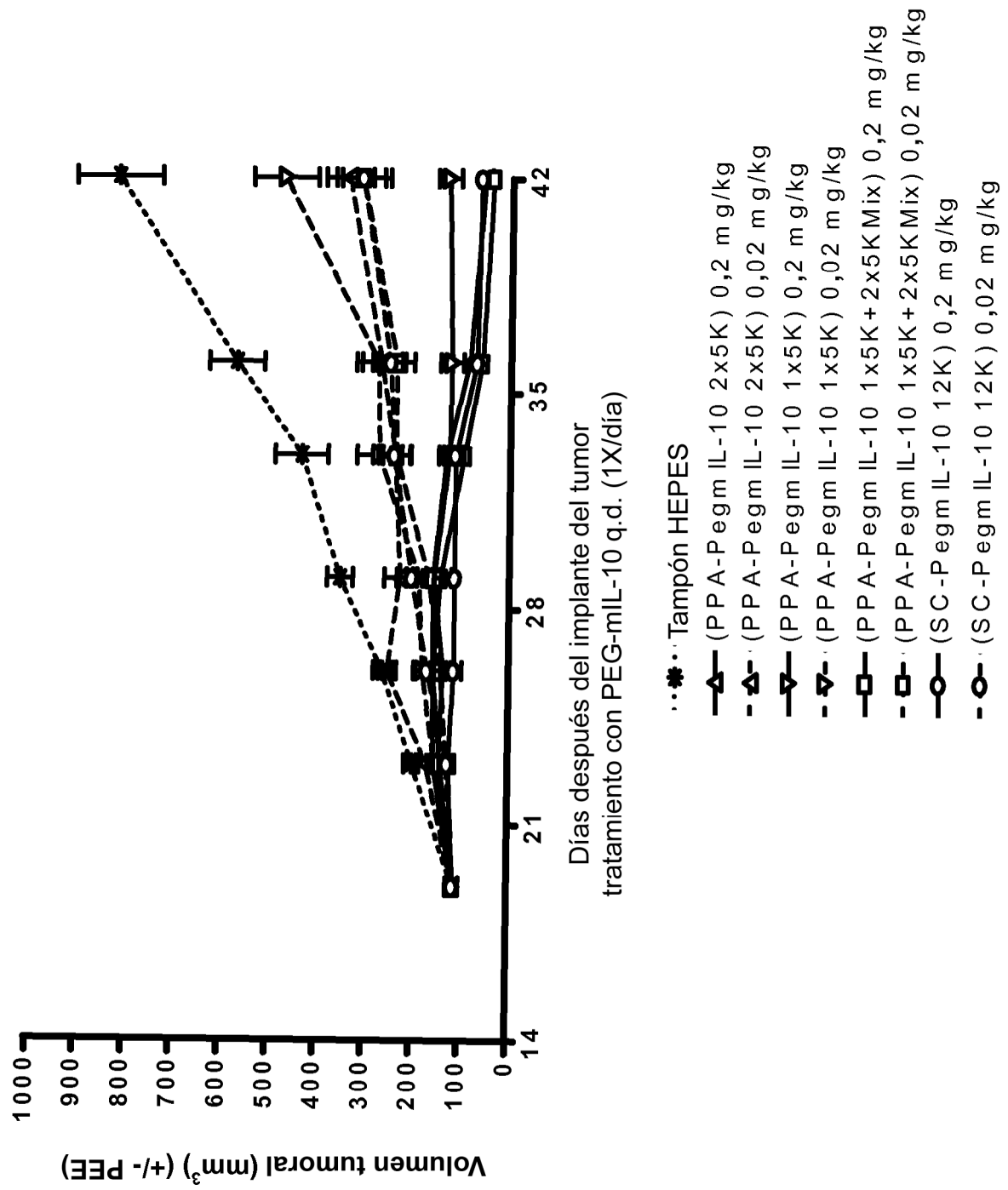


FIG. 2