

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6675394号
(P6675394)

(45) 発行日 令和2年4月1日(2020.4.1)

(24) 登録日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 38/20	(2006.01)	A 6 1 K 38/20
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 K 47/60	(2017.01)	A 6 1 K 47/60
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 9 (全 69 頁)

(21) 出願番号	特願2017-521564 (P2017-521564)	(73) 特許権者	515286243
(86) (22) 出願日	平成27年10月20日 (2015.10.20)		アルモ・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2017-533201 (P2017-533201A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア・94063、レッドウッド・シティ、チェサピーク・ドライブ・575
(43) 公表日	平成29年11月9日 (2017.11.9)	(74) 代理人	100092783
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/056383		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開番号	W02016/064817	(74) 代理人	100120134
(87) 国際公開日	平成28年4月28日 (2016.4.28)		弁理士 大森 規雄
審査請求日	平成30年10月18日 (2018.10.18)	(74) 代理人	100131990
(31) 優先権主張番号	62/067,337		弁理士 大野 玲恵
(32) 優先日	平成26年10月22日 (2014.10.22)	(74) 代理人	100104282
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患及び障害の治療のためにインターロイキン-10を使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

対象の固形腫瘍を治療または予防する方法用の医薬組成物であって、
前記医薬組成物が、PEG-IL-10を含み、
前記方法が、治療に有効な量のPEG-IL-10を対象に投与することを含み、
前記PEG-IL-10が、成熟ヒトIL-10または成熟ヒトIL-10の変異体であり、
前記変異体が前記成熟ヒトIL-10と同等の活性を示し、
前記量が、20 µg/kg ~ 40 µg/kgであり、
前記PEG-IL-10が、モノPEG化IL-10及びジPEG化IL-10の混合物を含む、
医薬組成物。

【請求項2】

前記量が、20 µg/kgである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】

前記量が、40 µg/kgである、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項4】

前記PEG-IL-10のPEG成分が約5kDa ~ 約20kDaの分子量を有する、
請求項1 ~ 3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

前記PEG-IL-10のPEG成分が約20kDaより大きい分子量を有する、請求

項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記 PEG - IL - 10 が少なくとも 1 日 2 回対象に投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記 PEG - IL - 10 が少なくとも 1 日 1 回対象に投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記 PEG - IL - 10 が少なくとも 7 2 時間毎に対象に投与される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

10

【請求項 9】

前記方法が、少なくとも 1 つの追加の予防薬または治療薬を投与することを更に含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2014年10月22日出願の米国特許仮出願第62/067,337号の優先権を主張し、その全体を参照により本明細書に組み込む。

【0002】

本発明は、多種多様な疾患及び障害の治療または予防に、IL - 10 及び関連薬を用いる方法に関する。

20

【背景技術】

【0003】

サイトカインインターロイキン10 (IL - 10) は、T細胞、B細胞、マクロファージ、及び抗原提示細胞 (APC) 上の作用を介して複数の免疫反応を調節する多面発現性サイトカインである。IL - 10 は、活性化単球及び活性化マクロファージにおいて、IL - 1、IL - 1、IL - 6、IL - 8、TNF -、GM - CSF 及び G - CSF の発現を阻害することにより免疫反応を抑制することができ、ならびにそれはNK細胞によりIFN - の産生も抑制する。IL - 10 は主にマクロファージで発現されるが、発現は活性化T細胞、B細胞、肥満細胞及び単球でも検出される。免疫反応を抑制することに加えて、IL - 10 は、IL - 2 及びIL - 4 で処理した胸腺細胞を刺激し、B細胞の生存率を高め、及びMHCクラスIIの発現を刺激することを含む、免疫刺激特性を示す。

30

【0004】

ヒトIL - 10 は、2つの単量体サブユニット間の非共有結合相互作用の破壊時に、生物学的に不活性となるホモ二量体である。機能的二量体がIFN - に対して一定の類似度を示すことを、IL - 10 の公開された結晶構造から得られるデータが示している (Zdanov et al, (1995) Structure (Lond) 3: 591 - 601)。

40

【0005】

その多面発現活性の結果として、IL - 10 は、炎症状態、免疫関連障害、線維性障害及び癌を含む、広範囲の疾患、障害ならびに状態に関連している。多くのこのような疾患、障害及び状態に対するIL - 10 の臨床ならびに前臨床の評価は、その治療の可能性を強固にした。更にPEG化IL - 10 は、一定の治療設定において、非PEG化IL - 10 より効果的であることが示されている。

【0006】

IL - 10 関連の疾患、障害及び状態の有病率及び重症度を考慮すれば、有効性、患者の忍容性などを最適化する新規な投薬レジメン及びパラメータは、IL - 10 及びPEG化IL - 10 ならびにそれらに関連する薬剤の治療上の有用性を促進することにおいて、

50

大きな価値がある。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、様々な疾患、障害及び状態ならびに／もしくはこれらの症状を治療しならび／または予防するために、IL-10、改変（例えば、PEG化）IL-10、ならびに本明細書に記載の関連する薬剤、ならびにこれらの組成物を用いる方法を想定する。より具体的には、本開示は、対象の様々な疾患、障害及び状態の治療ならびに／または予防における有効性を達成しかつ維持する一方で、これらに関係した副作用を最小にする、最適化された投薬パラメータに関する。以下に詳細に記載するように、この投薬パラメータの最適化は、例えば投与の経路及び他の因子を考慮しつつ、吸収、分布、代謝及び排泄（「ADME」）に関連した薬物動態学及び薬力学的パラメータの評価を伴う。ADME及び他のパラメータに関連した用語は、本明細書で特に指示がない限り、関連する科学分野においてそれらが通常受け入れられている意味を有することを意図すると理解されよう。一例として「血清中半減期」または「 $t_{1/2}$ 」という用語は、消失半減期（すなわち、薬剤の血清中濃度とその初期または最大値の半分に達した時間）を意味する。

10

【0008】

本明細書に記載の方法に従って、疾患、障害もしくは状態及び／またはその症状は、癌もしくは癌関連の障害などの増殖性疾患、または硬変症、NASH及びNAFLDなどの線維性障害であり得る。特定の癌に限定されるわけではないが、癌とは、結腸癌、黒色腫及び扁平上皮細胞癌に関連した腫瘍を含む固形腫瘍でもよく、または血液障害でもよい。

20

【0009】

他の実施形態において、疾患、障害または状態はウイルス性障害であり、それはヒト免疫不全ウイルス、B型肝炎もしくはC型肝炎ウイルスまたはサイトメガロウイルスを含むが、これらに限定されない。更に別の実施形態では、疾患、障害または状態は免疫性または炎症性疾患であり、それは急性または慢性でもよい。免疫性及び炎症性障害の例としては、炎症性腸疾患、乾癬、リウマチ性関節炎、多発性硬化症及びアルツハイマー病が含まれる。

【0010】

特定の実施形態では、疾患、障害または状態は、アテローム性動脈硬化を含む心血管障害である。心血管障害を有する対象は、コレステロールが上昇し得る。

30

【0011】

更に別の実施形態では、疾患、障害または状態は、血栓症または血栓状態である。

【0012】

更に以下で論じるように、ヒトIL-10はホモ二量体であり、各モノマーは178のアミノ酸を含み、その最初の18はシグナルペプチドを含む。本開示の特定の実施形態は、シグナルペプチドが欠如した成熟ヒトIL-10ポリペプチド（例えば米国特許第6,217,857号を参照）、または成熟ヒトPEG-IL-10を含む。更なる特定の実施形態では、IL-10薬は成熟ヒトIL-10の変異体である。変異体が示す活性は成熟ヒトIL-10の活性に比べて、低い、それに匹敵する、またはそれより大きくてもよく、特定の実施形態では、この活性は成熟ヒトIL-10の活性に匹敵する、またはそれよりも大きい。

40

【0013】

本開示の特定の実施形態は、1つ以上の特性（例えば薬物動態学的パラメータ、有効性など）を高めるために、IL-10の改変を想定する。特定の実施形態で、IL-10は、例えばPEG化、グリコシル化、アルブミン（例えばヒト血清アルブミン（HSA））接合及びHES化によって改変される。更なる実施態様では、IL-10の改変は、免疫原性への治療的に関連する有害な影響をもたらさず、他の更なる実施形態では、改変IL-10は未改変IL-10より免疫原性が低い。用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド（複数可）」、「薬剤（複数可）」などは幅広く解釈されることを目的としており、例えば同族体、変異体（変異タンパク質を含む）及びそのフラグメントを含む、ヒト

50

ならびに非ヒトIL-10関連ポリペプチドを含み、ならびに例えばリーダー配列を有しているIL-10ポリペプチド(例えば、シグナルペプチド)及びこれらの改変型を含む。更なる特定の実施形態では、用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド(複数可)」、「薬剤(複数可)」は作動薬である。特定の実施形態はPEG化IL-10に関するものであり、これは本明細書において「PEG-IL-10」とも呼ばれる。本開示は、前述のものをコードする核酸分子も想定する。

【0014】

実験の項に記載のとおり、固形腫瘍(例えば卵巣腫瘍、腎臓腫瘍、結腸腫瘍または膵臓腫瘍)患者のPEG-hIL-10の効果の評価は、病勢コントロール率(DCR)を最適化するために、最初に想到したものより高いPEG-hIL-10の血清中濃度を達成することが有利であることを示した。腫瘍学用語において、DCRとは治療への反応を示す患者の合計割合を指し、DCRとは完全寛解(CR)+部分奏効(PR)+安定疾患(SD)の合計である。しかし、臨床的有用性は低濃度でも観察される点に留意する必要がある。

10

【0015】

更に、結腸癌患者の腫瘍マーカーCEA(癌胎児性抗原)上のPEG-hIL-10の効果の分析は、このような癌患者のために最初に想到したものより高い血清中濃度と一体となった高い投与量が、安定疾患を達成しかつ維持するために必要とされることを示した。

【0016】

本開示の特定の実施形態は、対象の疾患、障害もしくは状態を治療または予防する方法に関し、それは治療に有効な量のIL-10薬を対象に投与することを含み、その量は、少なくとも6.0ng/mLの平均IL-10血清中トラフ濃度を達成するに十分である。治療または予防する方法は、CD8+T細胞によって媒介されてもよい。

20

【0017】

他の実施形態は、対象(例えばヒト)の疾病、障害もしくは状態を治療または予防する方法に関し、それは治療に有効な量のIL-10薬を対象に投与することを含み、その量はある期間にわたって平均IL-10血清トラフ濃度を維持するのに十分であり、平均IL-10血清トラフ濃度は少なくとも6.0ng/mLであり、及び平均IL-10血清トラフ濃度は期間の少なくとも90%の間維持される。本開示の特定の実施形態では、平均IL-10血清中トラフ濃度は、少なくとも7.0ng/mL、少なくとも8.0ng/mL、少なくとも9.0ng/mL、少なくとも10.0ng/mL、少なくとも11.0ng/mL、少なくとも12.0ng/mL、少なくとも13.0ng/mL、少なくとも14.0ng/mL、少なくとも15.0ng/mL、少なくとも16.0ng/mL、少なくとも17.0ng/mL、少なくとも18.0ng/mL、少なくとも19.0ng/mL、少なくとも20.0ng/mL、少なくとも21.0ng/mL、少なくとも22.0ng/mL、または22.0ng/mL超である。

30

【0018】

更なる実施態様で、期間は、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1か月、少なくとも6週間、少なくとも2か月、少なくとも3か月、または3か月超である。

40

【0019】

本開示の特定の実施形態では、平均IL-10血清中トラフ濃度は、期間の少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または期間の100%の間、維持される。

【0020】

特定の定常状態血清中トラフ濃度(例えば2.0ng/mL)を維持するのに十分な投薬レジメンにより、所望の定常状態血清中トラフ濃度より高い初期血清中トラフ濃度がもたらされる可能性があることが想定される。哺乳動物の対象中のIL-10の薬力学的及

50

び薬物動態学的特性が故に、初期トラフ濃度（例えば1回以上の初回負荷量の投与後、一連の維持量の投与により達成される）は、投薬パラメータ（量及び頻度）が一定に保たれる場合でも、徐々にかつ持続的に、ある期間にわたって低減する。その期間の後、この少しずつかつ連続的な減少は終わり、定常状態血清中トラフ濃度は維持される。

【0021】

一例として、マウス（例えば、C57BL/6マウス）へのIL-10薬（例えば、mIL-10）の約0.1mg/kg/日の非経口投与（例えば、SC及びIV）は、例えば2.0ng/mLの定常状態血清中トラフ濃度を維持するために必要である。しかし、その定常状態血清中トラフ濃度は、0.1mg/kg/日の投与の開始後（及び、任意の初回負荷投与量（複数可）後も）の約30日まで達成されない場合がある。むしろ初期血清中トラフ濃度が達成された後（例えば、2.5ng/mL）、その濃度は、例えば約30日の期間にわたって徐々にかつ持続的に低減し、その後、所望の定常状態血清中トラフ濃度（例えば、2.0ng/mL）が維持される。当業者は、例えばADME及び患者特異的なパラメータを用いて所望の定常状態トラフ濃度を維持するために、必要な投与量を決定することができる。

10

【0022】

対象の疾患、障害もしくは状態を治療または予防する方法も想定されており、それは治療に有効な量のIL-10薬を対象に投与することを含み、その量はIL-10薬の少なくともEC50の平均IL-10血清中トラフ濃度を達成するのに十分である。他の実施形態において、その量は、IL-10薬の少なくともEC60、少なくともEC70、少なくともEC80、または少なくともEC90の平均IL-10血清中トラフ濃度を達成するのに十分である。

20

【0023】

本明細書で使用する場合「EC50」という用語、及び「最大有効濃度の半分」という語句は、その一般的に認められる意味を有し、すなわちEC50は治療薬（例えば、IL-10薬）の濃度であり、それは、いくつかの特定の曝露時間後、ベースラインと最大の間の中間の反応を誘発する。当業者は、治療薬のEC50の測定方法について熟知している。例えばEC50は、細胞系アッセイにおいて治療薬の特定の濃度関連パラメータを測定した後に、市販のソフトウェア（例えば、Graphpad Software, Inc. (Lajolla, CA)）を使用して測定できる。

30

【0024】

IL-10薬が改変IL-10薬を形成するための少なくとも1つの改変を含んでもよく、この改変がIL-10薬のアミノ酸配列を変更しない方法を、本開示は想定する。いくつかの実施形態において、改変IL-10薬はPEG-IL-10薬である。PEG-IL-10薬は、IL-10の少なくとも1つのサブユニットの少なくとも1つのアミノ酸残基に共有結合する、少なくとも1つのPEG分子を含んでもよく、または他の実施形態では、モノPEG化及びジPEG化IL-10の混合物を含んでもよい。PEG-IL-10薬のPEG成分は、約5kDaより大きい、約10kDaより大きい、約15kDaより大きい、約20kDaより大きい、約30kDaより大きい、約40kDaより大きい、または約50kDaよりも大きい分子量を有してもよい。いくつかの実施形態では、分子量は、約5kDa~約10kDa、約5kDa~約15kDa、約5kDa~約20kDa、約10kDa~約15kDa、約10kDa~約20kDa、約10kDa~約25kDa、または約10kDa~約30kDaである。

40

【0025】

いくつかの実施形態において、改変IL-10薬は、少なくとも1つのFc融合体分子、少なくとも1つの血清アルブミン（例えば、HSAもしくはBSA）、HSA融合体分子、またはアルブミン抱合体を含む。追加の実施形態において、改変IL-10薬はグリコシル化され、HES化され、またはドメインに結合する少なくとも1つのアルブミンを含む。いくつかの改変IL-10薬は、2つ以上の種類の改変を含むことができる。特定の実施形態では、改変は部位特異的である。いくつかの実施形態はリンカーを含む。改変

50

IL - 10 薬は、以後詳細に論述される。

【0026】

IL - 10 薬は、任意の有効な経路により投与されてもよい。いくつかの実施形態において、皮下注射を含む非経口注入によって投与される。

【0027】

本開示の特定の実施形態は、1つ以上の薬学的に許容される希釈液、担体または賦形剤（例えば、等張性注射液）と共に上述のそれらの薬剤を含む、ある量（例えば治療に有効な量）のIL - 10 薬を含む医薬品組成物に関する。医薬組成物は一般的に、ヒトへの投与に適切なものである。更にいくつかの実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1つの追加の予防薬または治療薬を含む。

10

【0028】

本開示の特定の実施形態は、上述の医薬組成物のうちの1つ及び所望により1つ以上の追加の成分を含有する、滅菌容器を想定する。一例として、滅菌容器は注射器であり得るが、これに限定されない。更に別の実施形態では、滅菌容器はキットの1つの要素であり、キットは、例えば少なくとも1つの予防薬または治療薬を含む、第2の滅菌容器も含有し得る。

【0029】

本開示は、IL - 10 薬が1日に少なくとも2回、1日に少なくとも1回、48時間毎に少なくとも1回、72時間毎に少なくとも1回、1週間に少なくとも1回、2週間毎に少なくとも1回、毎月少なくとも1回、2か月毎に少なくとも1回、または3か月毎に少なくとも1回、対象に投与される方法を想定する。いくつかの実施形態は、少なくとも1つの追加の予防薬または治療薬と共にIL - 10 薬を投与することを含み、その例は後述する。

20

【0030】

本開示は、本明細書の教示と併せて遺伝子治療の使用も意図する。遺伝子治療の使用及び方法において、対象の細胞は、生体内で本明細書に記載のIL - 10 関連ポリペプチドをコードする核酸で形質転換することができる。あるいは細胞は、導入遺伝子またはポリヌクレオチドで *in vitro* で形質転換し、その後治療を行うために対象の組織内に移植することができる。更に初代細胞分離株または株化細胞株は、IL - 10 関連ポリペプチドをコードする導入遺伝子またはポリヌクレオチドで形質転換することができ、その後場合により対象の組織内に移植できる。

30

【0031】

更なる本開示の特定の実施形態は、対象の疾患、障害もしくは状態を治療または予防する方法に関し、治療に有効な量のIL - 10 薬剤を対象に投与することを含み、その量は、少なくとも0.1 ng/mLの平均IL - 10 血清中トラフ濃度を達成するのに十分である。治療または予防する方法は、CD8 + T細胞によって媒介されてもよい。

【0032】

他の実施形態は、対象（例えばヒト）の疾患、障害もしくは状態を治療または予防する方法に関し、それは治療に有効な量のIL - 10 薬を対象に投与することを含み、その量はある期間にわたって平均IL - 10 血清中トラフ濃度を維持するのに十分であり、平均IL - 10 血清中トラフ濃度は少なくとも0.1 ng/mLであり、及び平均IL - 10 血清中トラフ濃度は期間の少なくとも90%の間維持される。本開示の特定の実施形態では、平均IL - 10 血清中トラフ濃度は、少なくとも0.2 ng/mL、少なくとも0.3 ng/mL、少なくとも0.4 ng/mL、少なくとも0.5 ng/mL、少なくとも0.6 ng/mL、少なくとも0.7 ng/mL、少なくとも0.8 ng/mL、少なくとも0.9 ng/mL、少なくとも1 ng/mL、少なくとも1.2 ng/mL、少なくとも1.25 ng/mL、少なくとも1.3 ng/mL、少なくとも1.4 ng/mL、少なくとも1.5 ng/mL、少なくとも1.6 ng/mL、少なくとも1.7 ng/mL、少なくとも1.8 ng/mL、少なくとも1.85 ng/mL、少なくとも1.9 ng/mL、少なくとも1.95 ng/mL、少なくとも1.97 ng/mL、少なくとも

40

50

1.98 ng/mL、少なくとも1.99 ng/mL、少なくとも2.0 ng/mL、または2 ng/mL超である。

【0033】

更なる実施態様で、期間は、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1か月、少なくとも6週間、少なくとも2か月、少なくとも3か月、または3か月超である。

【0034】

本開示の特定の実施形態では、平均IL-10血清中トラフ濃度は、期間の少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または期間の100%の間、維持される。

10

【0035】

本開示の他の実施形態を本明細書に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】図1は、ヒト(配列番号28)及びマウスIL-10(配列番号29)のアミノ酸配列を示す。

【図2A】IL-10の濃度を上昇させた場合のPBMC中のMCP-1の濃度(pg/mL)を示す。1 ng/mL以上の濃度で、IL-10はMCP-1の分泌を増加させた。

20

【図2B】IL-10の濃度を上昇した場合の、LPSで刺激されるPBMC中のMCP-1の濃度(pg/mL)を示す。IL-10はPBMCのLPS媒介活性化の阻害剤であり、及び1 ng/mL以上の濃度のIL-10の添加はMCP-1の分泌を著しく抑制した。

【図3】PEG-hIL-10が所望の腫瘍の種類を有する患者に投与される、投与量逐次漸増試験の結果を示す。個々の腫瘍のサイズ及び全腫瘍量は、免疫関連効果判定基準(irRC)に従って、7週間の治療後測定された。

【図4】算出したEC50値と比較して、1、2.5、5、10または20 µg/kgのPEG-hIL-10を投与した患者で達成される、平均血清中濃度を示す。

【図5】図5A及び図5Bは、*in vitro*細胞を使用した活性に基づく算出EC50値と比較して、10 µg/kgのPEG-hIL-10(図5A)、及び20 µg/kgのPEG-hIL-10(図5B)を投与した各患者の血清中濃度を示す。

30

【図6】2人のCRC患者のCEA腫瘍マーカー上に、PEG-hIL-10の増加した量を投与する効果を示す。

【図7】図7A~図7Cは、3つの一次腫瘍の種類(黒色腫(図7A)、RCC(図7B)及びCRC(図7C)のうちの1つを有する患者の転移性病変のサイズ上のPEG-hIL-10の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0037】

本開示を更に説明する前に、本開示が本明細書に記載された特定の実施形態に限定されるものではなく、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、限定することを意図するものではないことを理解すべきである。

40

【0038】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限値及び下限値の間、文脈が別途明確に指示しない限り下限値の単位の10分の1まで各介在値、ならびにその言及された範囲の任意の他の表示値または介在値が本発明内に包含されると理解されている。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内にそれぞれ独立して含まれてもよく、言及された範囲内の具体的に除外された任意の値に従って本発明内にも包含される。言及された範囲がそれらの上限値及び下限値のうちの1つまたは両方を含む場合、それらの包含される上限値及び下限値のいずれかまたは両方を除外する範囲も本発明に包含される。別

50

途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者が一般に理解する意味と同一の意味を有する。

【0039】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、他に明記されない限り、単数形「a」、「an」及び「the」は複数の指示物を含むことに留意しなければならない。特許請求の範囲が任意の要素を除外するように作成されてもよいことに更に留意する。したがって本記述は、特許請求の範囲の要素の列挙に関連した「単に」「のみ」などの排他的な専門用語の使用において、または「否定的な」限定の使用において、先行詞として機能することを目的としている。

【0040】

本明細書で示す出版物は、本出願の出願日前のその開示のためだけに提供される。更に提供される出版物の日付は実際の出版日とは異なる場合があり、それぞれ確認する必要がある。

【0041】

概略

本開示は、様々な疾患、障害及び状態ならびに／もしくはそれらの症状を治療するならび／または予防するための、本明細書に記載される薬剤ならびにその組成物の使用を想定する。本開示の特定の態様では、このような治療または予防は、特定の投薬パラメータを利用することによって行われる。いくつかの実施形態において、薬剤は、例えば炎症性及び免疫関連障害、線維性障害、癌及び癌関連の障害、または心血管障害（例えば、アテローム性動脈硬化症）の治療のために最適化される血清中トラフ濃度が達成されるように投与される。

【0042】

本開示のいくつかの実施形態では、IL-10薬（例えばIL-10ポリペプチド）によって治療可能な疾患もしくは障害を有する、またはそれを有する危険性がある対象は、約6.0 ng/mL超の血清中トラフ濃度を達成するに十分な量のIL-10薬を投与されて、特定の実施形態で血清中トラフ濃度は約10.0 ng/mL超であり、他の実施形態において血清中トラフ濃度は約20.0 ng/mL超である。

【0043】

本開示のポリペプチド及び核酸分子に関連する「ヒト」へのいかなる言及も、ポリペプチドまたは核酸が得られる方法または供給源に関して限定することを意図したものではなく、むしろそれは天然起源のヒトポリペプチドまたは核酸分子の配列に対応する際の、配列に関してのみであるという点に留意すべきである。ヒトポリペプチド及びそれらをコードする核酸分子に加えて、本開示は、他の種からのIL-10関連ポリペプチド及び対応する核酸分子を想定する。

【0044】

定義

特に指示のない限り、以下の用語は、下記に示す意味を有することを目的としている。他の用語は、明細書の全体を通して他の場所で定義される。

【0045】

用語「患者」または「対象」は、ヒトまたはヒト以外の動物（例えば、哺乳動物）を指して同じ意味で用いられる。

【0046】

用語「投与」「投与する」などは、それらが、例えば対象、細胞、組織、器官、または生体液に適用されるとき、例えばIL-10またはPEG-IL-10、核酸（例えば、天然型ヒトIL-10をコードする核酸）、前述のものを含む医薬組成物または診断薬と、対象、細胞、組織、器官または生体液との接触を意味する。細胞との関係において、投与は、試薬の細胞への接触（例えば生体外、または生体内で）、及び流体が細胞と接触しているところでは試薬の流体への接触を含む。

【0047】

10

20

30

40

50

用語「治療する」「治療すること」「治療」などは、疾患、障害もしくは状態またはその症状が診断され観察された後、一時的にもしくは恒久的に対象が患う疾患、障害もしくは状態またはその症状に関連する少なくとも1つの症候を除去し、低減し、抑制しまたは改善するために開始する行動（IL-10またはIL-10を含む医薬組成物の投与など）の過程を意味する。したがって治療は、活動性疾患を予防すること（例えば疾患、障害もしくは状態、またはそれに関連する臨床症候の発症もしくは更なる発症を阻止する）を含む。前記用語は、IL-10またはPEG-IL-10が、例えば流体相またはコロイド相のIL-10受容体に接触するような状況など他の文脈でも使用することができる。

【0048】

本明細書で使用する場合「治療を必要とする」という用語は、対象が必要とするもしくは治療から利益を得る、医師または他の介護者によって行われる判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の領域にある様々な要因に基づき行われる。

10

【0049】

用語「予防する」「予防すること」「予防」などは、一般的に特定の疾患、障害または状態を有する傾向がある対象に関連して、一時的または恒久的のいずれかで、疾患、障害、状態などを発症する対象のリスクを予防し、抑制しもしくは低減し（例えば臨床症状の不存在により判断されるように）、またはその開始を遅延するための方法（例えば疾患、障害、状態またはその症状の開始に先立って）で開始する行動（IL-10またはIL-10を含む医薬組成物を投与することなど）の過程を意味する。特定の 경우에는、本用語は、疾患、障害または状態の進行を遅くする、または有害なもしくは望ましくない状態へのその進行を阻害することも指す。

20

【0050】

本明細書で使用する場合、用語「予防を必要とする」とは、対象が必要とするもしくは予防的ケアから利益を得る、医師または他の介護者によって行われる判断を指す。この判断は、医師のまたは介護者の専門知識の領域にある様々な要因に基づき行われる。

【0051】

語句「治療に有効な量」とは、単独でまたは医薬組成物の一部として、及び単回用量または一連の用量の一部として対象に投与した場合、疾患、障害もしくは状態の任意の症状、態様または特徴に、任意の検出可能な積極的効果を有することができる量で、対象に薬剤を投与することを意味する。治療に有効な量は、関連する生理学的効果を測定することにより確認することができ、それは、投薬レジメン及び対象の状態の診断分析などと連結して調整することができる。一例として、投与後に産生される炎症性サイトカインの量の測定は、治療に有効な量が使用されたかを示すことができる。

30

【0052】

「変化をもたらすのに十分な量」という語句は、特定の療法の施与前（例えばベースラインレベル）とその後に測定された指標のレベルの間に検出可能な差があることを意味する。指標としては、任意の客観的パラメータ（例えばIL-10の血清中濃度）または主観的パラメータ（例えば対象の満足度）が挙げられる。

【0053】

用語「小分子」は、約10kDa未満、約2kDa未満または約1kDa未満の分子量を有する化合物を指す。小分子としては、無機分子、有機分子、無機成分を含有する有機分子、放射性原子を含む分子、及び合成分子が挙げられるが、これらに限定されない。治療的に小分子は、細胞に対してより透過性があり、劣化の影響を受けにくく、大きな分子より免疫反応を誘発する可能性が低いことがあり得る。

40

【0054】

用語「リガンド」は例えば、受容体のアゴニストもしくはアンタゴニストとして作用することができる、ペプチド、ポリペプチド、膜会合もしくは膜結合分子、またはその複合体を意味する。「リガンド」は、天然及び合成リガンド、例えばサイトカイン、サイトカイン変異体、類似体、変異タンパク質及び抗体に由来する結合組成物を包含する。「リガンド」は、小分子、例えばサイトカインのペプチド模倣体及び抗体のペプチド模倣体など

50

の小分子も包含する。この用語は、その生物学的特性、例えばシグナル伝達または接着に特異的に影響を与えることなく、受容体に結合することができる、アゴニストでもアンタゴニストでもない物質も包含する。更にこの用語は、例えば化学的または組み換え法により、膜結合リガンドの可溶性バージョンに変更された膜結合リガンドを含む。リガンドまたは受容体は完全に細胞内であってもよく、すなわちそれは、サイトゾル、核またはいくつかの他の細胞内区画に存在してもよい。リガンド及び受容体の複合体は、「リガンド - 受容体複合体」と呼ばれる。

【 0 0 5 5 】

用語「抑制分子」及び「アンタゴニスト」または「活性分子」及び「アゴニスト」は、例えばリガンド、受容体、補因子、遺伝子、細胞、組織または器官の例えば活性化のために、それぞれ阻害または活性化する分子を意味する。抑制分子は、例えば遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体もしくは細胞を、減少させ、ブロックし、防止し、活性化を遅延させ、不活性化させ、感度を下げ、または下方に調節する分子である。活性分子は、例えば遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体もしくは細胞を、増加させ、活性化させ、助長し、活性化を強化し、感度を上げ、または上方に調節する分子である。抑制分子は、構成的活性を低下させ、ブロックし、または不活性化する分子としても定義することができる。「アゴニスト」は、標的の活性化の上昇を発生させ、または促進するために、標的と相互作用する分子である。「アンタゴニスト」は、アゴニストの作用（複数可）に対向する分子である。アンタゴニストは、アゴニストの作用を防止し、減少させ、阻害または中和して、及びアンタゴニストは、例えば識別されたアゴニストがない場合でも、標的受容体の構成的活性を妨害、阻止または低下させることもできる。

【 0 0 5 6 】

用語「調節する」「調節」などは、IL - 10 薬（または、それらをコードする核酸分子）の機能または活性を、直接的にもしくは間接的に上昇させるもしくは低下させるため、またはIL - 10 薬と同等の効果を産生するために分子の能力を強化するための、分子（例えば活性分子または抑制分子）の能力を意味する。用語「調節因子」は、上述の働きに影響を与えることができる分子を広く指すことを意味する。一例として、例えば遺伝子、受容体、リガンドまたは細胞の調節因子は、遺伝子、受容体、リガンドまたは細胞の活性を変化させる分子であり、ここで活性は、その調節特性を活性化させ、抑制または変化させることが可能である。調節因子は単独で作用し得る、またはそれは補因子、例えばタンパク質、金属イオンもしくは小分子を使用することができる。用語「調節因子」は、IL - 10 と同じ作用機序を介して機能する化学物質（すなわち、それと類似の手法でIL - 10 と同一のシグナル伝達経路を調節する物質）を含み、IL - 10 と同等の（またはより大きい）生物学的反応を誘発することができる。

【 0 0 5 7 】

調節因子の例としては、小分子化合物及び他の生物有機分子が含まれる。小分子化合物の多数のライブラリー（例えば、コンビナトリアルライブラリー）は市販されており、調節因子を同定するための出発点として機能することができる。当業者は、1つ以上のアッセイ（例えば、生化学的または細胞系アッセイ）を開発することができ、そのような化合物ライブラリーは望ましい特性を有する1つ以上の化合物を同定するためにスクリーニングすることができる。その後医薬品の当業者は、例えばその類似体及び誘導体を合成し、ならびに評価することにより、そのような1つ以上の化合物を最適化することができる。合成及び/または分子のモデル化試験は、活性化剤の同定でも利用され得る。

【 0 0 5 8 】

分子の「活性」は、リガンドまたは受容体への分子の結合；触媒活性；遺伝子発現または細胞のシグナル伝達、分化もしくは成熟を刺激する能力；抗原活性；他分子の活性の調節などを説明する、または意味する。この用語は、細胞間相互作用（例えば、接着）を調節する、もしくは維持することにおける活性、または細胞（例えば、細胞膜）構造の維持における活性も意味する。「活性」は、比活性、例えば[触媒活性]/[mg タンパク質]、または[免疫学的活性]/[mg タンパク質]、生体区画の濃度なども意味すること

10

20

30

40

50

ができる。用語「増殖活性」は、例えば正常な細胞分裂、ならびに癌、腫瘍、異形成、細胞の形質転換、転移及び血管形成を促進し、そのために必要なまたは特異的に関連する活性を包含する。

【0059】

本明細書で使用する場合「同等な」「同等の活性」「と同等の活性」「同等の効果」「と同等の効果」などは、定量的及び/または定性的に解釈され得る相対的な用語である。用語の意味は、それらが使用される文脈にしばしば依存する。一例として、両方が受容体を活性化する2つの化学物質は、定性的観点から同等の効果を持つと見なすことができるが、1つの化学物質が当該技術分野で認められたアッセイ（例えば、用量反応アッセイ）、または当該技術分野で認められた動物モデルで決定される他の化学物質の活性の20%のみを達成することができる場合、2つの化学物質は、定量的観点から同等の効果に欠いていると見なすことができる。1つの結果を別の結果と比較すると（例えば、1つの結果と参照標準）、「同等な」とはしばしば、1つの結果が35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満または1%未満だけ参照標準からずれていることを意味する。特定の実施形態において、参照標準の15%未満、10%未満または5%未満だけ逸脱している場合、1つの結果は参照標準と同等である。一例として活性または効果は、有効性、安定度、溶解度または免疫原性を指す場合もあるが、これらに限定されない。

10

【0060】

細胞、組織、器官または生物の「反応」という用語は、生化学的または生理学的挙動、例えば濃度、密度、接着もしくは生物学的区画内での移動、遺伝子発現の速度もしくは分化の状態の変化を包含しており、前記変化は、活性化、刺激もしくは処置、または遺伝的プログラミングなどの内部機構と相関している。特定の文脈における、用語「活性化」「刺激」などは、内部機構により、同様に外部または環境要因により調節される細胞活性化を意味し、一方で用語「阻害」「下方調整」などは逆の効果の意味する。

20

【0061】

本明細書で同じ意味で用いられる「ポリペプチド」「ペプチド」及び「タンパク質」とは任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指しており、それは遺伝的にコードした及び遺伝的にコードしていないアミノ酸、化学的にもしくは生化学的に改変されたまたは誘導化されたアミノ酸、ならびに改変ポリペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る。この用語は、融合タンパク質を含み、それは、異種のアミノ酸配列による融合タンパク質；異種の及び相同のリーダー配列による融合タンパク質；N末端メチオニン残基が存在または不存在の融合タンパク質；免疫学的にタグ付加したタンパク質による融合タンパク質などを含有するが、これらに限定されない。

30

【0062】

本開示を通して、1文字または3文字記号によるアミノ酸を参照することは理解されるであろう。読者の便宜のために、1文字及び3文字のアミノ酸記号を以下に提供する。

G	グリシン	Gly	P	プロリン	Pro
A	アラニン	Ala	V	バリン	Val
L	ロイシン	Leu	I	イソロイシン	Ile
M	メチオニン	Met	C	システイン	Cys
F	フェニルアラニン	Phe	Y	チロシン	Tyr
W	トリプトファン	Trp	H	ヒスチジン	His
K	リジン	Lys	R	アルギニン	Arg
Q	グルタミン	Gln	N	アスパラギン	Asn
E	グルタミン酸	Glu	D	アスパラギン酸	Asp
S	セリン	Ser	T	トレオニン	Thr

40

【0063】

本明細書で使用する場合「変異体」という用語は、天然起源の変異体、及び天然起源ではない変異体を包含する。天然起源の変異体は、相同体（1つの種から別の種へアミノ酸

50

またはヌクレオチド配列がそれぞれ異なるポリペプチド及び核酸)、ならびに対立遺伝子変異体(種内の1つの個体から別の個体へアミノ酸またはヌクレオチド配列がそれぞれ異なるポリペプチド及び核酸)を含む。天然起源ではない変異体は、アミノ酸またはヌクレオチド配列の変化をそれぞれ含むポリペプチド及び核酸を含み、前記配列の変化は人工的に導入され(例えば、変異タンパク質)、例えば変化はヒトの介入(「ヒトの手」)により実験室内で発生する。したがって「変異タンパク質」は変異型組み換えタンパク質に広く関連しており、それは通常、単一または複数のアミノ酸置換を運び、部位特異的もしくはランダム突然変異誘発を受けたクローン化された遺伝子、または完全に合成された遺伝子にしばしば由来する。

【0064】

用語「DNA」「核酸」「核酸分子」「ポリヌクレオチド」などは本明細書では同じ意味で用いられて、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体のいずれかの任意の長さのヌクレオチドポリマーの形態を意味する。ポリヌクレオチドの非限定例としては、直鎖状及び環状核酸、メッセンジャーRNA(mRNA)、相補的DNA(cDNA)、組み換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが挙げられる。

【0065】

ポリペプチドの構造との関係で本明細書で使用する場合、「N末端」(または「アミノ末端」)及び「C末端」(または「カルボキシル末端」)とは、それぞれポリペプチドのアミノ最端及びカルボキシル最端を指し、一方用語「N末端側」及び「C末端側」とは、それぞれN末端及びC末端に向かうポリペプチドのアミノ酸配列の相対的位置を指し、それぞれN末端及びC末端の残基を含み得る。「じかにN末端側」または「じかにC末端側」とは、第1及び第2のアミノ酸残基が連続するアミノ酸配列を提供するように共有結合されている、第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指す。

【0066】

アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列(例えば、IL-10ポリペプチド「由来の」アミノ酸配列)との関係において「由来する」とは、ポリペプチドまたは核酸が、参照ポリペプチドまたは核酸(例えば天然起源のIL-10ポリペプチドまたはIL-10をコードする核酸)の配列を基準にしている配列を有することを示すことを意味しており、タンパク質または核酸が作られた供給源または方法を限定することを意味しない。一例として「由来する」という用語は、参照アミノ酸配列またはDNA配列の相同体または変異体を含む。

【0067】

ポリペプチドとの関係において「単離された」という用語は、天然起源の場合、それが天然に存在し得るとは異なる環境にある目的のポリペプチドを指す。「単離された」は、目的のポリペプチドのために実質的に濃縮された、及び/または目的のポリペプチドを部分的または実質的に精製した試料内にあるポリペプチドを含むことを意味する。ポリペプチドが天然起源でない場合、「単離された」とは、ポリペプチドが合成または組み換え手段のいずれかにより作製された環境から分離されたことを示す。

【0068】

「濃縮された」とは、試料が非天然的に(例えば科学者により)操作されて、その結果目的のポリペプチドが、a)生物学的試料(例えば、ポリペプチドが天然に発生する、または投与後それが存在する試料)などの出発試料のポリペプチド濃度より大きい濃度(例えば、少なくとも3倍超、少なくとも4倍超、少なくとも8倍超、少なくとも64倍超、またはそれ以上に)で、または、b)ポリペプチドが作られる環境(例えばバクテリア細胞)より高濃度で、存在することを意味する。

【0069】

「実質的に純粋」とは、成分(例えば、ポリペプチド)が組成物の総含量の約50%超、通常は総ポリペプチド含量の約60%超を構成することを示す。より一般的には「実質的に純粋」とは、総組成物の少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%以

10

20

30

40

50

上が目的成分である組成物を指す。場合によってはポリペプチドは、組成物の総含量の約90%超、または約95%超を構成する。

【0070】

用語「特異的に結合する」または「選択的に結合する」は、リガンド/受容体、抗体/抗原または他の結合対を意味する場合、タンパク質と他の生物学的製剤の異質母集団におけるタンパク質の存在を決定する結合反応を示す。したがって指定した条件下で、特定のリガンドは特定の受容体に結合し、試料中に存在する他のタンパク質に有意な量では結合しない。意図した方法による抗体または抗体の抗原結合部位に由来する結合組成物は、その抗原または変異体またはムテインに、他の抗体またはそれから誘導される結合組成物の有する親和性より、少なくとも2倍超、少なくとも10倍超、少なくとも20倍超、または少なくとも100倍超の親和性で結合する。特定の実施形態において、抗体は、例えばスカチャード解析で決定されるように、約 10^9 リットル/molよりも大きい親和性を有するであろう(Munsen, et al. 1980 Analyt. Biochem. 107:220-239)。

10

【0071】

IL-10及びPEG-IL-10

また、ヒトのサイトカイン合成阻害因子(CSIF)として知られている抗炎症性サイトカインIL-10は、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24(Mda-7)、及びIL-26、インターフェロン(IFN-、-、-、-、-、-、-、及び-)、及びインターフェロン様分子(リミチン、IL-28A、IL-28B、及びIL-29)を含む、2型(クラス)サイトカイン、1組のサイトカインとして分類されている。

20

【0072】

IL-10は、免疫調節と炎症において多面的効果を有するサイトカインである。それは、アレルギー反応の部位でこれらの細胞が有する、炎症性効果を抑える肥満細胞により産生される。それは、IFN-、IL-2、IL-3、TNF及びGM-CSFなどの炎症誘発性サイトカインの合成を抑制できるが、IL-10は特定のT細胞及び肥満細胞に対しても刺激的であり、及びB細胞の成熟、増殖、及び抗体産生を刺激する。IL-10は、NF- κ B活性をブロックすることができ、JAK-STATシグナル伝達経路の調節に関与している。それはCD8+T細胞の細胞傷害活性及びB細胞の抗体産生も誘導し、それはマクロファージ活性及び腫瘍促進炎症を抑制する。CD8+T細胞の調節は用量依存的であり、より高い用量がより強い細胞傷害性反応を誘導する。

30

【0073】

ヒトIL-10は37kDaの分子量を有するホモ二量体であり、それぞれ18.5kDaの単量体は178のアミノ酸を含み、そのうち最初の18はシグナルペプチドを含み、及び2対のシステイン残基は2つの分子内ジスルフィド結合を形成する。IL-10二量体は、2つの単量体サブユニット間の非共有結合相互作用の破壊時に生物学的に不活性となる。

【0074】

本開示は、80%の相同性を示すヒトIL-10及びマウスIL-10、及びその使用を想到する。更に本開示の範囲は、ラット(受入番号NP__036986.2;GI148747382)、ウシ(受入番号NP__776513.1;GI41386772)、ヒツジ(受入番号NP__001009327.1;GI57164347)、イヌ(受入番号ABY86619.1;GI166244598)及びウサギ(受入番号AAC23839.1;GI3242896)を含む、他の哺乳動物種からのIL-10相同分子種及びその改変形態を含む。

40

【0075】

上述のように、用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド(複数可)」、「IL-10薬(複数可)」などは幅広く解釈されることを目的としており、例えば相同体、変異体(変異タンパク質を含む)及びそのフラグメントを含む、ヒトならびに非ヒトIL-

50

10 関連ポリペプチドを含み、ならびに例えばリーダー配列を有しているIL-10ポリペプチド（例えば、シグナルペプチド）及びこれらの改変型を含む。更なる特定の実施形態では、IL-10、IL-10ポリペプチド（複数可）、及びIL-10薬（複数可）はアゴニストである。

【0076】

IL-10受容体、II型サイトカイン受容体は、それぞれR1及びR2とも呼ばれる、アルファ及びベータサブユニットからなる。受容体の活性化は、アルファ及びベータの両方に結合することが必要である。IL-10ポリペプチドの1つのホモ二量体はアルファに結合し、同じIL-10ポリペプチドの他のホモ二量体はベータに結合する。

【0077】

10 組み換えヒトIL-10の有用性は比較的短いその血清中半減期によってしばしば制限されて、それは、例えば血流中の腎クリアランス、タンパク質分解及び単量体化による可能性がある。その結果、その二量体構造を破壊し、したがって活性に悪影響を与えることがないように、様々なアプローチはIL-10の薬物動態プロファイルを改善するために検討されてきた。IL-10のPEG化は、特定の薬物動態パラメータ（例えば、血清中半減期）の改善及び/または活性の強化をもたらす。例えば本開示の特定の実施形態は、PEG-IL-10で増殖性疾患（例えば、癌）の治療を最適化する方法を含む。

【0078】

20 先に示したように本開示は、本明細書中の教示と併せて、遺伝子治療の使用も想到する。遺伝子治療は、新規遺伝子を導入するために、既存の遺伝子の追加のコピーを導入するために、既存の遺伝子の機能を損なうために、または存在するが非機能的な遺伝子を修復するために、対象内の内因性細胞に、通常ベクターにパッケージングした遺伝物質を送達することにより行われる。一旦細胞内で核酸は、目的のタンパク質の産生をもたらす、細胞機構により発現する。本発明の文脈において、遺伝子治療は、本明細書に記載の疾患、障害もしくは状態の治療または予防において使用するためのIL-10薬をコードする核酸を送達するための治療法として使用される。

【0079】

30 上述のように遺伝子治療の使用及び方法において、対象の細胞は、生体内で本明細書に記載のIL-10関連ポリペプチドをコードする核酸で形質転換することができる。あるいは細胞は、導入遺伝子またはポリヌクレオチドで*in vitro*で形質転換し、その後治療を行うために対象の組織内に移植することができる。更に初代細胞分離株または株化細胞株は、IL-10関連ポリペプチドをコードする導入遺伝子またはポリヌクレオチドで形質転換することができ、その後場合により対象の組織内に移植できる。

【0080】

40 本明細書で使用する場合、用語「PEG化IL-10」及び「PEG-IL-10」は、結合が安定するように、一般的にリンカーを介してIL-10タンパク質の少なくとも1つのアミノ酸残基に共有結合する、1つ以上のポリエチレングリコール分子を有する、IL-10分子を指す。用語「モノPEG化IL-10」及び「モノPEG-IL-10」は、1つのポリエチレングリコール分子が、一般的にリンカーを介して、IL-10二量体の1つのサブユニット上の単一のアミノ酸残基に共有結合されていることを示す。特定の実施形態では、本開示で使用されるPEG-IL-10は、1~9つのPEG分子が、リンカーを介して、IL-10二量体の1つのサブユニットのN末端でアミノ酸残基の - アミノ基に共有結合される、モノPEG-IL-10である。1つのIL-10サブユニット上でのモノPEG化は一般的に、サブユニットの組み換えに起因して、非PEG化、モノPEG化及びジPEG化IL-10の不均質な混合物をもたらす。更にPEG化反応が完了するまで進行させることは、一般的に非特異的かつ多重PEG化IL-10をもたらす、その結果、その生物活性を低下させることになる。したがって本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の方法（例えば実験の項）により産生したモノ及びジPEG化IL-10の混合物の投与を含む。

【0081】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、PEG部分の平均分子量は、約5kDa～約50kDaの間である。IL-10へのPEG結合の方法または部位は重要ではないが、特定の実施形態では、PEG化はIL-10薬の活性を変更しない、または最小限に変更するだけである。特定の実施形態では、半減期の増加は生物活性のあらゆる低下より大きい。PEG-IL-10の生物活性は、米国特許第7,052,686号に記載のとおり細菌性抗原(リポ多糖体(LPS))でチャレンジし、PEG-IL-10で処理した対象の血清中の炎症性サイトカイン(例えばTNF- またはIFN-)のレベルを評価することにより、通常測定する。

【0082】

IL-10変異体は、血清中半減期の増加；IL-10に対する免疫反応の低下；精製または調製の促進；IL-10のその単量体サブユニットへの転化の減少；治療効果の改善；及び治療上の使用中の副作用の重症度または発生の軽減を含む、様々な目的を念頭に置き調製できる。いくつかは翻訳後変異体、例えばグリコシル化変異体であり得るが、アミノ酸配列変異体は通常、天然では見られない変異体をあらかじめ定めている。IL-10の任意の変異体は、それがIL-10活性の適切なレベルを維持する場合、使用できる。腫瘍と関連して、適切なIL-10活性は、例えば腫瘍部位内へのCD8+T細胞の浸潤、これらの浸潤状の細胞からのIFN-、IL-4、IL-6、IL-10及びRANKLなどの炎症性サイトカインの発現、ならびに生体試料中のIFN-のレベルの増加を含む。

【0083】

「保存的アミノ酸置換」という語句は、類似の酸性度、塩基度、電荷、極性を有する側鎖または類似の側鎖サイズを有するアミノ酸で、タンパク質のアミノ酸(複数可)を置換することにより、タンパク質の活性を保存する置換を意味する。「保存的アミノ酸置換」とは、一般的に以下の群内：1) L、I、M、V、F；2) R、K；3) F、Y、H、W、R；4) G、A、T、S；5) Q、N；及び6) D、Eでのアミノ酸残基の置換を指す。置換、挿入または欠失の指針は、異なる変異タンパク質または異なる種からのタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントに基づくことができる。したがって任意の天然起源のIL-10ポリペプチドに加えて、置換が通常保存的アミノ酸置換である場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10つ、通常20、10または5つ以下のアミノ酸置換を有することを、本発明は想到する。

【0084】

本開示は、成熟IL-10に由来する連続アミノ酸残基を含む、成熟IL-10の活性フラグメント(例えば、サブ配列)も想到する。ペプチドまたはポリペプチドのサブ配列の連続アミノ酸残基の長さは、サブ配列が由来する特定の天然起源のアミノ酸配列により異なる。一般にペプチド及びポリペプチドは、約20アミノ酸～約40アミノ酸、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約60アミノ酸～約80アミノ酸、約80アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約120アミノ酸、約120アミノ酸～約140アミノ酸、約140アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約155アミノ酸、約155アミノ酸～完全長のペプチドまたはポリペプチドであり得る。

【0085】

そのうえIL-10ポリペプチドは、連続するアミノ酸の定義された長さにわたる参照配列(例えば、「比較ウィンドウ」と比較して、定義した配列同一性を有し得る。比較のための配列のアラインメント方法は、当該技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)に記載のローカル相同性アルゴリズムにより；Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)に記載の相同性アラインメントアルゴリズムにより；Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)に記載の類似法の探索により；これらのアルゴリズム(GAP, BESTFIT, FASTA, 及びTFASTA in the Wisconsin Genetics Softwar

10

20

30

40

50

e Package, Madison, Wis.) のコンピュータでの実行により; または手動アラインメント及び目視検査により実施できる(参照: 例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement)) 実施することができる。

【0086】

一例として、適切な IL-10 ポリペプチドは、一続きの約 20 アミノ酸 ~ 約 40 アミノ酸、約 40 アミノ酸 ~ 約 60 アミノ酸、約 60 ~ 約 80 アミノ酸、約 80 アミノ酸 ~ 約 100 アミノ酸、約 100 アミノ酸 ~ 約 120 アミノ酸、約 120 アミノ酸 ~ 約 140 アミノ酸、約 140 アミノ酸 ~ 約 150 アミノ酸、約 150 アミノ酸 ~ 約 155 アミノ酸、または約 155 アミノ酸 ~ 完全長のペプチドもしくはポリペプチドに対する、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98% または少なくとも約 99% のアミノ酸の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。

10

【0087】

更に以下で議論するように、IL-10 ポリペプチドは天然源(例えばその天然に存在する環境以外の環境)から単離することができ、組み換えて作ることもでき(例えば細菌、酵母、ピチア、昆虫細胞など遺伝的に改変された宿主細胞中で)、遺伝的に改変された宿主細胞はポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で改変される。IL-10 ポリペプチドは、合成的に(例えば、無細胞の化学合成により)産生することができる。

20

【0088】

天然の及び非天然のアイソフォーム、対立遺伝子変異体及びスプライス変異体を含む、IL-10 薬をコードする核酸分子は本開示により想定される。天然起源の DNA 配列からの 1 つ以上の塩基を変化させるが、遺伝コードの縮重に起因する IL-10 ポリペプチドに対応するアミノ酸配列に更に翻訳された核酸配列も、本開示は包含する。

【0089】

IL-10 血清中濃度

ここに記載される方法における IL-10 の血しょう濃度は、いくつかの方法で特徴づけることができ、それは、(1) ある特定のレベルを上回る、もしくはそのレベルの範囲にある平均 IL-10 血清中トラフ濃度、(2) ある期間にある特定のレベルを上回る平均 IL-10 血清中トラフ濃度、(3) ある特定のレベルを上回るもしくは下回る、もしくはそのレベルの範囲にある定常状態 IL-10 血清中濃度レベル、または(4) ある特定のレベルを上回るもしくは下回る、もしくはそのレベルの範囲にある濃度プロファイルの C_{max} 、を含む。ここに記載されるように、平均血清中トラフ IL-10 濃度は、特定の指標における有効性において特に重要であることが判明した。

30

【0090】

例えば固形腫瘍を有する患者を治療するための、PEG-hIL-10 の血清レベル。

実験の項では、PDV6 扁平上皮細胞癌及び CT-26 結腸癌における mIL-10 及び PEG-mIL-10 の治療有効性の評価について記載し、そこで mIL-10 及び mPEG-IL-10 投薬パラメータ(投与の量及び頻度)は、1~2 ng/mL の平均 IL-10 血清中トラフ濃度を達成するに十分である。実験の項に記載のとおり、PEG-IL-10 治療は完全寛解をもたらした一方で、IL-10 治療は、抗腫瘍機能を実証したものの、完全寛解には至らなかった。

40

【0091】

しかし、実験の項に詳細が記載されている更なる評価は、より高い血清中濃度が癌治療において有益であることを示した。特に固形腫瘍(例えば卵巣腫瘍、腎臓腫瘍、結腸腫瘍または膵臓腫瘍)患者の PEG-hIL-10 の効果の評価は、最大有効性を得るために、最初に想到した(及び以下に述べる)ものより高い PEG-hIL-10 の血清中濃度を達成することが有利であることを示した。

【0092】

50

したがって本開示は、癌関連の疾患、障害もしくは状態の治療または予防を目的とする実施形態を想到しており、治療は、少なくとも6.0 ng/mLの平均IL-10血清中トラフ濃度を達成することによって最適化される。いくつかの実施形態において、生成することができる濃度プロファイルは、約6.5 ng/mLよりも大きい、約7.0 ng/mLよりも大きい、約7.5 ng/mLよりも大きい、約8.0 ng/mLよりも大きい、約8.5 ng/mLよりも大きい、約9.0 ng/mLよりも大きい、約9.5 ng/mLよりも大きい、約10.0 ng/mLよりも大きい、約10.5 ng/mLよりも大きい、約11.0 ng/mLよりも大きい、約11.5 ng/mLよりも大きい、約12.0 ng/mLよりも大きい、約12.5 ng/mLよりも大きい、約13.0 ng/mLよりも大きい、約13.5 ng/mLよりも大きい、約14.0 ng/mLよりも大きい、約14.5 ng/mLよりも大きい、約15.0 ng/mLよりも大きい、約15.5 ng/mLよりも大きい、約16.0 ng/mLよりも大きい、約16.5 ng/mLよりも大きい、約17.0 ng/mLよりも大きい、約17.5 ng/mLよりも大きい、約18.0 ng/mLよりも大きい、約18.5 ng/mLよりも大きい、約19.0 ng/mLよりも大きい、約19.5 ng/mLよりも大きい、約20.0 ng/mLよりも大きい、約20.5 ng/mLよりも大きい、約21.0 ng/mLよりも大きい、約21.5 ng/mLよりも大きい、約22.0 ng/mLよりも大きい、約22.5 ng/mLよりも大きい、約23.0 ng/mLよりも大きい、または約24.0 ng/mLよりも大きい、平均IL-10血清中トラフ濃度を含む。

10

【0093】

20

本開示の特定の実施形態は、約6.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約7.0 ng/mL～約19.0 ng/mL、約8.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約9.0 ng/mL～約17.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約22.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約21.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約19.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約17.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約16.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約15.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約12.5 ng/mL、約12.5 ng/mL～約22.0 ng/mL、約12.5 ng/mL～約20.0 ng/mL、約12.5 ng/mL～約17.5 ng/mL、約12.5 ng/mL～約15.0 ng/mL、約15.0 ng/mL～約22.0 ng/mL、約15.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約15.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約15.0 ng/mL～約17.0 ng/mL、約17.5 ng/mL～約22.0 ng/mL、約17.5 ng/mL～約20.0 ng/mL、約18.0 ng/mL～約22.0 ng/mL、約18.0 ng/mL～約21.0 ng/mL、約18.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約6.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約6.0 ng/mL～約16.0 ng/mL、約6.0 ng/mL～約14.0 ng/mL、約6.0 ng/mL～約12.0 ng/mL、約6.0 ng/mL～約10.0 ng/mL、約8.0 ng/mL～約22.0 ng/mL、約8.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約8.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約8.0 ng/mL～約16.0 ng/mL、約8.0 ng/mL～約14.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約22.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約16.0 ng/mL、約10.0 ng/mL～約14.0 ng/mL、約12.0 ng/mL～約22.0 ng/mL、約12.0 ng/mL～約20.0 ng/mL、約12.0 ng/mL～約18.0 ng/mL、約12.0 ng/mL～約16.0 ng/mL、または約12.0 ng/mL～約14.0 ng/mLの範囲の平均IL-10血清中トラフ濃度を含む。

30

40

【0094】

他の疾患、障害または状態の患者の更なる評価は、このような高い血清中濃度からも恩恵を受け得る患者集団を確認できる。しかし、このような患者集団でさえ、臨床的に意義のある有用性は低濃度でも観察され得る。

50

【 0 0 9 5 】

特定の患者集団を治療するのに有用な P E G - h I L - 1 0 の血清レベル。

本開示のいくつか実施形態では、生成することができる血しょうレベルの濃度プロファイルは、約 0 . 1 n g / m L よりも大きい、約 0 . 1 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 2 n g / m L よりも大きい、約 0 . 2 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 3 n g / m L よりも大きい、約 0 . 3 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 4 n g / m L よりも大きい、約 0 . 4 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 5 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 6 n g / m L よりも大きい、約 0 . 6 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 7 n g / m L よりも大きい、約 0 . 7 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 8 n g / m L よりも大きい、約 0 . 8 5 n g / m L よりも大きい、約 0 . 9 n g / m L よりも大きい、約 0 . 9 5 n g / m L よりも大きい、約 1 . 0 n g / m L よりも大きい、約 1 . 1 n g / m L よりも大きい、約 1 . 2 n g / m L よりも大きい、約 1 . 3 n g / m L よりも大きい、約 1 . 4 n g / m L よりも大きい、約 1 . 5 n g / m L よりも大きい、約 1 . 6 n g / m L よりも大きい、約 1 . 7 n g / m L よりも大きい、約 1 . 8 n g / m L よりも大きい、約 1 . 9 n g / m L よりも大きい、約 2 . 0 n g / m L よりも大きい、約 2 . 1 n g / m L よりも大きい、約 2 . 2 n g / m L よりも大きい、約 2 . 3 n g / m L よりも大きい、約 2 . 4 n g / m L よりも大きい、約 2 . 5 n g / m L よりも大きい、約 2 . 7 5 n g / m L よりも大きい、または約 3 . 0 n g / m L よりも大きい平均 I L - 1 0 血清中トラフ濃度を含む。

10

【 0 0 9 6 】

本開示の特定の実施形態は、約 0 . 1 n g / m L ~ 約 1 . 0 n g / m L、約 0 . 1 n g / m L ~ 約 0 . 9 n g / m L、約 0 . 1 n g / m L ~ 約 0 . 8 n g / m L、約 0 . 1 n g / m L ~ 約 0 . 7 n g / m L、約 0 . 1 n g / m L ~ 約 0 . 6 n g / m L、約 0 . 1 n g / m L ~ 約 0 . 5 n g / m L、約 0 . 2 n g / m L ~ 約 1 . 0 n g / m L、約 0 . 2 n g / m L ~ 約 0 . 9 n g / m L、約 0 . 2 n g / m L ~ 約 0 . 8 n g / m L、約 0 . 2 n g / m L ~ 約 0 . 7 n g / m L、約 0 . 2 n g / m L ~ 約 0 . 6 n g / m L、約 0 . 2 n g / m L ~ 約 0 . 5 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 1 . 0 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 0 . 9 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 0 . 8 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 0 . 7 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 0 . 6 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 0 . 5 n g / m L、約 0 . 3 n g / m L ~ 約 0 . 4 n g / m L、約 0 . 4 n g / m L ~ 約 1 . 0 n g / m L、約 0 . 4 n g / m L ~ 約 0 . 9 n g / m L、約 0 . 4 n g / m L ~ 約 0 . 8 n g / m L、約 0 . 4 n g / m L ~ 約 0 . 7 n g / m L、約 0 . 4 n g / m L ~ 約 0 . 6 n g / m L、約 0 . 4 n g / m L ~ 約 0 . 5 n g / m L、約 0 . 5 n g / m L ~ 約 1 . 0 n g / m L、約 0 . 5 n g / m L ~ 約 0 . 9 n g / m L、約 0 . 5 n g / m L ~ 約 0 . 8 n g / m L、約 0 . 5 n g / m L ~ 約 0 . 7 n g / m L、約 0 . 5 n g / m L ~ 約 0 . 6 n g / m L、約 0 . 7 n g / m L ~ 約 2 . 3 n g / m L、約 0 . 8 n g / m L ~ 約 2 . 2 n g / m L、約 0 . 9 n g / m L ~ 約 2 . 1 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 2 . 1 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 2 . 0 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 1 . 9 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 1 . 8 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 1 . 7 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 1 . 6 n g / m L、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 1 . 5 n g / m L、約 1 . 9 n g / m L ~ 約 2 . 5 n g / m L、約 1 . 9 n g / m L ~ 約 2 . 4 n g / m L、約 1 . 9 n g / m L ~ 約 2 . 3 n g / m L、約 1 . 9 n g / m L ~ 約 2 . 2 n g / m L、または約 1 . 9 n g / m L ~ 約 2 . 1 n g / m L の範囲の平均 I L - 1 0 血清中トラフ濃度を含む。

20

30

40

【 0 0 9 7 】

抗炎症疾患、障害もしくは状態の治療または予防を目的とする特定の実施形態では、治療は、0 . 1 n g / m L ~ 1 . 0 n g / m L、0 . 1 n g / m L ~ 0 . 9 n g / m L、0 . 1 n g / m L ~ 0 . 8 n g / m L、0 . 1 n g / m L ~ 0 . 7 n g / m L、0 . 1 n g / m L ~ 0 . 6 n g / m L、0 . 1 n g / m L ~ 0 . 5 n g / m L、0 . 2 n g / m L ~ 1 . 0 n g / m L、0 . 2 n g / m L ~ 0 . 9 n g / m L、0 . 2 n g / m L ~ 0 . 8 n

50

g / mL、0.2 ng / mL ~ 0.7 ng / mL、0.2 ng / mL ~ 0.6 ng / mL、0.2 ng / mL ~ 0.5 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 1.0 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 0.9 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 0.8 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 0.7 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 0.6 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 0.5 ng / mL、0.3 ng / mL ~ 0.4 ng / mL、0.4 ng / mL ~ 1.0 ng / mL、0.4 ng / mL ~ 0.9 ng / mL、0.4 ng / mL ~ 0.8 ng / mL、0.4 ng / mL ~ 0.7 ng / mL、0.4 ng / mL ~ 0.6 ng / mL、0.4 ng / mL ~ 0.5 ng / mL、0.5 ng / mL ~ 1.0 ng / mL、0.5 ng / mL ~ 0.9 ng / mL、0.5 ng / mL ~ 0.8 ng / mL、0.5 ng / mL ~ 0.7 ng / mL、または0.5 ng / mL ~ 0.6 ng / mLの平均IL-10血清中トラフ濃度を達成することにより最適化される。

10

【0098】

実験の項及び図4～図7は、所望のIL-10血清中トラフ濃度を得るために使用できる、投薬レジメンの例を提供する。図4を参照すると、PEG-hIL-10の20 µg / kgの毎日の皮下(SC)投与は、約6 ng / mLのEC50を超える(EC50以上の曝露量は有利であると見なされた)及び継続して10 ng / mLのIL-10血清中トラフ濃度を超える、曝露量をもたらし、その一方で、PEG-hIL-10の10 µg / kgの毎日のSC投与は、EC50以上の、及び継続して5 ng / mLのIL-10血清中トラフ濃度を超える、曝露量をもたらした。類似のIL-10血清中トラフ濃度は、PEG-hIL-10の10 µg / kg及び20 µg / kgを毎日SC投与した、特定の癌の種類

20

【0099】

C型肝炎におけるIL-10治療の効果を評価することができる。C型肝炎ウイルスによる感染の作用を受けやすい機能性免疫系によるマウスモデル(Dorner, M. (09 June 2011) Nature 474: 208-211を参照)を、mIL-10及びPEG-mIL-10の薬物動態及び薬力学的効果を評価するために利用することができる。本明細書に記載した教示及び当業者の知識基盤を使用して、所望の平均IL-10血清中トラフ濃度を得るために投与されるmIL-10及びPEG-mIL-10の効果を、評価することができる。

【0100】

大部分の患者集団における治療用量で一般的であるわけではないが、IL-10の高用量の投与は、限られた数の対象において副作用(例えば頭痛、貧血及び肝臓に対する影響)を引き起こした。幸いにも、0.1 ~ 2.0 ng / mLの平均IL-10血清中濃度が治療の持続時間にわたって維持される場合、この副作用は一般的ではない。更により高い平均血清中濃度(例えば、10.0 ~ 20.0 ng / mL)でさえ、このような副作用は通常一般的ではなく、治療している疾患の重症度を考慮すると対処可能である及び/または許容可能である。それにもかかわらず、本開示の別の実施形態は、IL-10治療を受けている対象を監視して、副作用を予測し、したがって潜在的にそれを回避するための方法を提供し、その方法は(1)対象のIL-10の最高濃度を計測すること、(2)対象のIL-10のトラフ濃度を計測すること、(3)最高~トラフの変動を計算すること、及び(4)算出した最高~トラフの変動を使用して、対象の潜在的な副作用を予測すること、を含む。最高~トラフの変動が小さくなれば、対象がIL-10関連の副作用を経験する可能性が低くなることを示す。特定の実施形態では、特定の最高~トラフの変動が、特定の投薬パラメータを用いる特定の疾患、障害及び状態の治療のために決定され、その変動は参照標準として用いられる。

30

40

【0101】

上述のIL-10投与関連のパラメータに加えて、分布容積の考慮も関係する。大部分の薬剤において、血しょう中薬物濃度は、多指数関数的な形態で減少する。静脈内投与の直後に、薬剤は最初のスペース(血しょう量として最小に画定した)全体に迅速に分配され、その後、血管外スペース(例えば特定の組織)への低速の受動拡散型分配がなされる

50

。静脈 I L - 1 0 投与は、そのような 2 - コンパートメント反応速度論モデルに関連する (R a c h m a w a t i , H . e t a l . (2 0 0 4) P h a r m . R e s . 2 1 (1 1) : 2 0 7 2 - 7 8 を参照)。皮下組み換え h I L - 1 0 の薬物動態学も、検討された (R a d w a n s k i , E . e t a l . (1 9 9 8) P h a r m . R e s . 1 5 (1 2) : 1 8 9 5 - 1 9 0 1)。更に、特異的細胞型へのサイトカインをターゲットにするために、I L - 1 0 改変が導入された (R a c h m a w a t i , H . (M a y 2 0 0 7) D r u g M e t . D i s t . 3 5 (5) : 8 1 4 - 2 1 を参照)。

【 0 1 0 2 】

更に後述されるように、マウスに観察される I L - 1 0 及び P E G - I L - 1 0 抗腫瘍有効性は、C D 8 + T 細胞中の細胞傷害性酵素の誘導から生じ、その結果、腫瘍細胞の死滅がもたらされる。非限定的にアポトーシス誘発薬剤を含む多くの抗癌化合物が、サイクルで投与される。多くの場合、単回投与または最大耐用量 (M T D) に接近する一連の投与が投与されて、単一投与または最大耐用量 (M T D) に接近する一連の高用量投与を行った後、投与の中断 (「休薬日」) が続き、患者の正常な生理機能の回復が可能になる。一例として、この投与戦略は、抗 V E G F (A V A S T I N) などの細胞傷害性化学療法剤抗体療法、及び P R O L E U K I N (I L - 2) などの短寿命の生物学的試薬に適用される。

【 0 1 0 3 】

マウスでの研究を行って、I L - 1 0 治療の薬物動態パラメータを理解すること及びヒトの腫瘍治療レジメンを最適化することに役に立つデータを得た。実験の項に記載のとおり、1 週間にわたって同量の薬剤を、1 回投与または複数回投与のいずれかを投与されたマウスは、同程度の総曝露量を得るものの、1 日 1 回投与されたマウスは腫瘍サイズが最も大きく低下した (表 1 5)。更に約 1 n g / m L 超 (例えば、1 . 1 ~ 2 . 1 n g / m L) の高い血清中トラフ濃度の維持をもたらす治療レジメンでは、腫瘍サイズ及び重量が最も大きく低下した (表 1 6)。

【 0 1 0 4 】

本開示は、約 6 . 0 n g / m L 超の血清中トラフ濃度の維持をもたらす、任意の投与量を想到する。例えば対象がヒトである場合、非 P E G 化 h I L - 1 0 は、1 5 μ g / k g / 日超、1 8 μ g / k g / 日超、2 0 μ g / k g / 日超、2 1 μ g / k g / 日超、2 2 μ g / k g / 日超、2 3 μ g / k g / 日超、2 4 μ g / k g / 日超、または 2 5 μ g / k g / 日超の投与量で投与されてもよい。対象がヒトである場合、比較的小さな P E G (例えば、5 k D a のモノ - ジ P E G - h I L 1 0) を含む P E G - h I L - 1 0 は、2 . 0 μ g / k g / 日超、2 . 3 μ g / k g / 日超、2 . 5 μ g / k g / 日超、2 . 6 μ g / k g / 日超、2 . 7 μ g / k g / 日超、2 . 8 μ g / k g / 日超、2 . 9 μ g / k g / 日超、3 . 0 μ g / k g / 日超、3 . 1 μ g / k g / 日超、3 . 2 μ g / k g / 日超、3 . 3 μ g / k g / 日超、3 . 4 μ g / k g / 日超、または 3 . 5 μ g / k g / 日超の投与量で投与されてもよい。

【 0 1 0 5 】

I L - 1 0 機能における C D 8 + T 細胞の役割

C D 8 (分化抗原群 8) は、T 細胞受容体 (T C R) の共受容体としての機能を果たす膜貫通型糖タンパク質である。C D 8 共受容体は主に細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) の表面上で発現するが、それは、ナチュラルキラー細胞 (N K) を含む他の細胞型上でも見出される。T C R のように、C D 8 は主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) 分子に結合するが、M H C クラス I タンパク質に特異的である。

【 0 1 0 6 】

C D 8 機能は、C D 8 鎖の対を含むダイマーの形成を必要とする。C D 8 には 2 つのアイソフォーム、アルファ及びベータがあり、C D 8 の最も一般的な形態は、C D 8 アルファ及び C D 8 ベータ鎖、免疫グロブリン超分子群の両方の部分を含んでいる。C D 8 アルファは M H C クラス I 分子と相互作用し、この相互作用は、細胞障害性 T 細胞の T 細胞受容体と標的細胞とを、抗原特異的活性化の間に、密接に結合した状態に保つ。C D 8 表面

10

20

30

40

50

タンパク質を有する細胞傷害性T細胞を、「CD8 + T細胞」と呼ぶ。CD8 + T細胞（CTL及びNK細胞）は、特異的な感染標的細胞の抗原（一般に、細胞内病原菌による感染から生じる細胞表面ペプチドまたはタンパク質）を認識して、それらの抗原が対象の通常の抗原プロファイル（「免疫学的自己」）と異なる場合、CD8 + T細胞は活性化され、標的細胞のアポトーシスを誘発する。

【0107】

抗原プロファイルが異なるいくつかのシナリオが、存在する。例えば病原体（例えばウイルス）が細胞に侵入するとき、細胞は「非自己」細胞表面抗原を生成し、CD8 + T細胞は、感染細胞を根絶するために免疫反応を開始する。細胞のタンパク質の一部が核酸及び/またはアミノ酸レベルで突然変異により改変される、という他のシナリオも生じる。癌細胞は多くの突然変異を一般にもたらし、CD8 + T細胞により「異なっている」と認識される。ヒト癌中のCD8 + T細胞の存在は、より長い生存率と関連する。

10

【0108】

前記のシナリオの両方ともに、活性化CD8 + T細胞は、IFN γ 、パーフォリン及びグランザイムBを生成する。IFN γ は、標的細胞上で抗原の「提示」を更に上方制御するために重要であり、それはMHCクラスIタンパク質上で発生する。パーフォリン及びグランザイムBは、標的細胞（例えばウイルス及び癌）の死滅を媒介する。

【0109】

パーフォリンは、CTL及びNKの顆粒に見出される細胞障害性タンパク質であり、脱顆粒の際にそれ自体を標的細胞の原形質膜に挿入する。パーフォリンは、補体成分9（C9）と構造上かつ機能上類似点を有し、C9と同様に、パーフォリンは膜貫通小管を生成し、様々な標的細胞を非特異的に溶解することができる。パーフォリンは、T細胞及びNK細胞媒介性細胞溶解における、重要なエフェクター分子である。

20

【0110】

上記のように、グランザイムBは、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）及びナチュラルキラー（NK）細胞により発現されるセリンプロテアーゼである。CTL及びNK細胞は、特異的に感染した標的細胞集団を認識して、細胞のアポトーシスを誘発し、これは、通常は細胞内病原菌による感染から生じるペプチドまたはタンパク質である「非自己」抗原を、その表面で有する。グランザイムBは、細胞性免疫反応においてCTLによる標的細胞アポトーシスの迅速な誘導のために重要である。

30

【0111】

IL-10は、CD8 + T細胞の活性化において多様な役割を果たす。例えばIL-10は、エフェクター分子（IFN γ 、パーフォリン及びグランザイムB）を、メモリーCD8 + T細胞、すなわちその前の感染またはワクチン投与中に発生した細胞に誘発する。このメモリーCD8 + T細胞は、ウイルスに対する対象の長期保護を提供する原因となる細胞である。IL-10が存在しないとき、メモリーCD8 + T細胞の生成及び増幅が発生し得る（Vicari, A. and Trinchieri, G. (2004) *Immuno. Rev.* 202: 223 - 236）が、IL-10がこのような細胞を直接的に活性化するという事実は、固有のかつ代替的な治療的アプローチを提供する。慢性ウイルス感染がCD8 + T細胞に関連がある（Virgin, H. et al. (2009) *Cell* 138, p. 30）ものの、非PEG化IL-10またはPEG化IL-10による対象（例えば、マウス）の治療は記載されていない。

40

【0112】

上記を考慮すると、本開示の実施形態は、CD8 + T細胞と、癌及びウイルス感染の両方との間のネクサスに基づく。したがって癌関連の疾患、障害及び状態を治療ならびに/または予防する特定の方法は、ウイルスに関連した疾患、障害及び状態の治療においても適用されるべきである。

【0113】

他のサイトカインとは対照的に、IL-10は、有力な免疫刺激及び免疫抑制因子と見なすことができる。慢性炎症におけるCD8 + T細胞の役割は、完全には明らかにされて

50

いない。しかし、癌及びウイルス関連疾患においては、少なくともある程度はCD8 + T細胞を通してIFN の関係が媒介されるため、及び炎症関連の疾患の制御に関係するIL - 10 - T細胞経路に（炎症性サイトカインのダウンレギュレーションを通して）IFN も関与しているため、CD8 + T細胞は炎症において重要な役割も演じることができると判明され得る。

【0114】

IL - 10 産生の方法

本発明のポリペプチドは、非組み換え（例えば、化学合成）及び組み換え法を含む任意の適切な方法により産生することができる。

10

【0115】

A . 化学合成

ポリペプチドが化学合成される場合、合成は液相または固相を介して進行できる。固相ペプチド合成（SPPS）は、非天然アミノ酸及び/またはペプチド/タンパク質骨格改変の組み込みを可能にする。9 - フルオレニルメトキシカルボニル（Fmoc）及びt - ブチルオキシカルボニル（Boc）などのSPPSの様々な形態は、本開示のポリペプチドを合成するために利用可能である。化学合成の詳細は当該技術分野で周知である（例えば、Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6 : 3 - 10 ; 及びCamarero J. A. et al. , (2005) Protein Pept Lett. 12 : 723 - 8）。

20

【0116】

固相ペプチド合成は、以下に記載されるように実施され得る。官能基（N）及び任意の反応性側鎖は、酸不安定基または塩基不安定基で保護される。保護基は、アミド結合を連結するための条件下で安定的だが、形成したペプチド鎖を損なわずに容易に切断することができる。 - アミノ官能基に適した保護基としては、下記のBoc、ベンジルオキシカルボニル（Z）、O - クロロベンジルオキシカルボニル、ピフェニルイソプロピルオキシカルボニル、tert - アミルオキシカルボニル（Amoc）、 - ジメチル - 3 , 5 - ジメトキシ - ベンジルオキシカルボニル、o - ニトロスルフェニル、2 - シアノ - t - ブトキシ - カルボニル、Fmoc、1 - (4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル（Dde）などが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0117】

適切な側鎖保護基は、アセチル、アリル（All）、アリルオキシカルボニル（Allo）、ベンジル（Bzl）、ベンジルオキシカルボニル（Z）、t - ブチルオキシカルボニル（Boc）、ベンジルオキシメチル（Bom）；o - プロモベンジルオキシカルボニル、t - ブチル（tBu）、t - ブチルジメチルシリル、2 - クロロベンジル；2 - クロロベンジルオキシカルボニル、2 , 6 - ジクロロベンジル、シクロヘキシル、シクロペンチル、1 - (4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル（Dde）、イソプロピル、4 - メトキシ - 2 , 3 , 6 - トリメトキシベンジルスルホン（Mtr）、2 , 3 , 5 , 7 , 8 - ペンタメチルクロマン - 6 - スルホン（Pmc）、ピパリル、テトラヒドロピラン - 2 - イル、トシル（Tos）、2 , 4 , 6 - トリメトキシベンジル、トリメチルシリル、及びトリチル（Trit）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0118】

固相合成では、C末端アミノ酸は好適な支持体材料に結合される。好適な支持体材料は、合成工程の段階的凝縮及び切断反応のための試薬ならびに反応条件に対して不活性であるもの、ならびに使用される反応媒質に溶解しないものである。市販の支持体材料の例としては、反応基で改変され得るスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー、及び/または、ポリエチレングリコール；クロロメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマー；ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマーなどが挙げ

50

られる。ペプチド酸の調製が望ましいとき、ポリスチレン(1%) - ジビニルベンゼン、または4 - ベンジルオキシベンジル - アルコールで誘導体化されたTentaGel(登録商標)(Wang - アンカー)、または2 - クロロトリチルクロリドを使用できる。ペプチドアミドの場合、ポリスチレン(1%) - ジビニルベンゼン、または5 - (4' - アミノメチル) - 3' , 5' - ジメトキシフェノキシ)吉草酸(PAL - アンカ -)もしくはp - (2 , 4 - ジメトキシフェニル - アミノメチル) - フェノキシ基(Rinkアミドアンカー)で誘導化されたTentaGel(登録商標)を使用できる。

【0119】

ポリマー支持体への結合は、室温または高温(例えば40 ~ 60)で、例えば2 ~ 72時間の反応時間で、エタノール、アセトニトリル、N , N - ジメチルホルムアミド(DMF)、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N - メチルピロリドン、または類似する溶媒中の活性化試薬を添加することにより、C末端Fmoc保護アミノ酸を支持体材料と反応させることにより達成され得る。

【0120】

N 保護アミノ酸(例えばFmocアミノ酸)のPAL、WangまたはRinkアンカーへのカップリングは、例えばN , N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N , N' - ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)または他のカルボジイミド; 2 - (1H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボラート(TBTU)または他のウロニウム塩; O - アシル - 尿素; ベンゾトリアゾール - 1 - イル - トリス - ピロリジノ - ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)または他のホスホニウム塩; N - ヒドロキシスクシンイミド; 他のN - ヒドロキシイミドもしくはオキシムなどのカップリング剤を使用して、1 - ヒドロキシベンゾトリアゾールもしくは1 - ヒドロキシ - 7 - アザベンゾトリアゾールの存在下または非存在下で; 例えばHOBtを加えたTBTUを使用して; 例えばジイソプロピルエチルアミン(DIEA)、トリエチルアミンもしくはN - メチルモルホリンなどの塩基を添加してまたは添加しないで; 例えばジイソプロピルエチルアミンで反応時間2 ~ 72時間で(例えばアミノ酸及びカップリング剤の1 . 5倍 ~ 3倍超で、例えば2倍超で、3時間、約10 ~ 50 の温度で、例えば25 で、ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドン、またはジクロロメタン、例えばジメチルホルムアミドなどの溶媒中で)実施できる。

【0121】

カップリング剤の代わりに、活性エステル(例えば、ペンタフルオロフェニル、p - ニトロフェニルなど)、N - Fmoc - アミノ酸の対称無水物、その酸クロリドまたは酸フルオリドを上記の条件下で使用することも可能である。

【0122】

N 保護アミノ酸(例えば、Fmocアミノ酸)は、DIEAを添加したジクロロメタン中の2 - クロロトリチル樹脂に、10 ~ 120分の反応時間で、例えば20分間で、この溶媒及びこの塩基の使用を限定せずにカップリングできる。

【0123】

保護アミノ酸の連続カップリングは、ペプチド合成の従来の方法に従い、通常は自動ペプチド合成装置で実行され得る。例えばジメチルホルムアミド中のピペリジン(10% ~ 50%)で5 ~ 20分、例えばDMF中の50%のピペリジンで2 x 2分、及びDMF中の20%のペリジンで1 x 15分処理することによる、固相上に結合されたアミノ酸のN - Fmoc保護基の切断後、3 ~ 10倍超、例えば10倍超の次の保護されたアミノ酸が、約10 ~ 50、例えば25 の温度で、ジクロロメタン、DMFまたはその2つの混合物などの不活性で非水性の極性溶媒中で前のアミノ酸にカップリングされる。第1のN - Fmocアミノ酸をPAL、WangまたはRinkアンカーへカップリングするための前述の試薬は、カップリング剤として適している。保護アミノ酸の活性エステルまたはクロリドまたはフルオリドまたはその対称無水物も、代替物として使用することができる。

【0124】

固相合成の終了時に、ペプチドは支持体材料から切断され、同時に側鎖保護基を切断する。切断は、トリフルオロ酢酸または他の強酸性の媒体をジメチルスルフィド、エチルメチルスルフィド、チオアニソール、チオクレゾール、*m*-クレゾール、アニソール、エタンジチオール、フェノールまたは水などの5%～20%V/Vのスカーベンジャーを加えて、例えば15%V/Vのジメチルスルフィド/エタンジチオール/*m*-クレゾール1:1:1で、0.5～3時間で、例えば2時間で実施することができる。完全に保護された側鎖を有するペプチドは、氷酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン2:2:6で、2-クロロトリチルアンカーを切断することにより得られる。保護されたペプチドは、シリカゲル上のクロマトグラフィーにより精製することができる。ペプチドがWangアンカーを介して固相に連結される場合、及びC末端アルキルアミド化によってペプチドを得ることが意図される場合、切断はアルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンを用いたアミノ分解によって実行され得る。アミノ分解は、約12～24時間（例えば、約18時間）の反応時間で、約-10～50の温度（例えば、約25）で実施する。更にペプチドを、例えばメタノールで再エステル化することにより、支持体から切断することができる。

10

【0125】

ペプチドを沈殿させ、したがってエーテルに残存するスカーベンジャー及び切断された保護基を分離するために、得られた酸性溶液は、3～20倍量の氷エーテルまたは*n*-ヘキサン、例えば10倍超のジエチルエーテルと混合され得る。更なる精製は、氷酢酸からペプチドを数回再沈殿させることによって行うことができる。得られた沈殿物は、水もしくは*tert*-ブタノールまたはその2つの溶媒の混合物、例えば*tert*-ブタノール/水の1:1の混合物に取り込んで、凍結乾燥され得る。

20

【0126】

得られたペプチドは、酢酸形態中で弱塩基性樹脂のイオン交換を含む、下記の様々なクロマトグラフィー法：非誘導体化ポリスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー（例えば、Amberlite（登録商標）XAD）上の疎水性吸着クロマトグラフィー；シリカゲル上の吸着クロマトグラフィー；例えばカルボキシメチルセルロース上のイオン交換クロマトグラフィー；例えばSephadex（登録商標）G-25上の分配クロマトグラフィー；遠心向流分配クロマトグラフィー；または例えばオクチルまたはオクタデシルシリルシリカ（ODS）相上の逆相HPLCなどの高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製することができた。

30

【0127】

B. 組み換え産生

ヒト及びマウスIL-10の調製を説明する方法は、例えば米国特許第5,231,012号に見出すことができ、それは組み換え及び他の合成技術を含む、IL-10活性を有するタンパク質を産生するための方法を教示する。IL-10はウイルス起源であり得て、Epstein Barrウイルス（BCRF1タンパク質）からクローニング及びウイルス性IL-10の発現がMooreら（1990）Science 248:1230に開示されている。IL-10は、本明細書に記載のものなど当該技術分野で周知の標準的技術を用いて多数の方法で得ることができる。組み換えヒトIL-10は、Peprotech, Inc.（Rocky Hill, N.J.）からも市販品として入手可能である。

40

【0128】

ポリペプチドが組み換え技術を用いて産生される場合、ポリペプチドはそれぞれ任意の適切な構築物、及び細菌（例えば、大腸菌）などの原核細胞もしくは真核細胞であり得る、任意の適切な宿主細胞または酵母宿主細胞を用いて、細胞内タンパク質または分泌タンパク質として産生できる。宿主細胞として使用することができる真核細胞の他の例としては、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び/または植物細胞が含まれる。哺乳動物宿主細胞が使用される場合、それらは、ヒト細胞（例えば、HeLa細胞、293、H9及びJurka

50

t細胞) ; マウス細胞 (例えば、NIH3T3、L細胞及びC127細胞) ; 霊長類細胞 (例えば、Cos1、Cos7及びCV1) ; 及びハムスター細胞 (例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を含んでもよい。

【0129】

ポリペプチドの発現に好適な様々な宿主 - ベクター系が当該技術分野に公知の標準的な手順に従い採用され得る。例えば Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York 及び Ausubel et al., 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons を参照のこと。遺伝物質を宿主細胞に導入するための方法は、例えば形質転換、電気穿孔法、共役結合、リン酸カルシウム法などを含む。導入されたポリペプチドをコードする核酸の安定な発現を提供するように転換する方法が選択できる。ポリペプチドをコードする核酸は、遺伝性エピソーム要素 (例えば、プラスミド) として提供することができる、またはゲノム的に統合することができる。目的のポリペプチド産生に使用する種々の適切なベクターが市販されている。

10

【0130】

ベクターは、宿主細胞内の染色体外維持のために提供することができる、または宿主細胞ゲノムへの組み込みを提供することができる。発現ベクターは転写及び翻訳の調節配列を提供し、及び誘導的または構成的発現を提供することができ、コード領域は転写開始領域、転写及び翻訳終結領域の転写制御の元で作動可能に連結される。一般的に転写及び翻訳の調節配列は、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び停止配列、翻訳開始及び停止配列ならびにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含むが、これらに限定されない。プロモーターは構成的または誘導的のいずれかであり得て、強力な構成的プロモーター (例えば、T7) であり得る。

20

【0131】

発現構築物は一般的に、目的のタンパク質をコードする核酸配列の挿入を提供するために、プロモーター配列の付近に配置される簡便な制限部位を有する。発現宿主で作動する選択マーカーは、ベクターを含む細胞の選択を容易にするために存在してもよい。更に発現構築物は、追加の要素を含んでもよい。例えば発現ベクターは1つまたは2つの複製系を有していてもよく、したがって、発現のために生物内で、例えば哺乳動物または昆虫細胞で、ならびにクローニング及び増幅のために原核生物宿主で維持することが可能である。更に発現構築物は、形質転換された宿主細胞の選択を可能にするために、選択マーカー遺伝子を含んでもよい。選択可能な遺伝子は当該技術分野において周知であり、使用される宿主細胞により変動する。

30

【0132】

タンパク質の単離及び精製は、当該技術分野において周知の方法に従い達成され得る。例えばタンパク質は、タンパク質を構成的に及び/または誘導時に発現するように遺伝的に改変された細胞の可溶化液から、またはサンプルを抗タンパク質抗体と接触させ、非特異的に結合した材料を除去するために洗浄し、特異的に結合したタンパク質を溶出することを一般的に伴う免疫親和性精製による合成反応混合物から単離され得る。単離したタンパク質は更に、透析によって及びタンパク質精製に用いられる他の方法によって精製することができる。一実施形態でタンパク質は、金属キレートクロマトグラフィー法を用いて単離することができる。タンパク質は、単離を容易にするための改変を含んでもよい。

40

【0133】

ポリペプチドは、実質的に純粋な形態または単離された形態 (例えば、他のポリペプチドを含まない) で調製され得る。ポリペプチドは、存在し得る他の成分に対して (例えば他のポリペプチドまたは他の宿主細胞成分)、ポリペプチドが濃縮された組成物中に存在し得る。例えば精製されたポリペプチドは、ポリペプチドが他の発現タンパク質を実質的に含まない組成物中に、例えば約90%未満、約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満または約1%未満存在する

50

ように提供され得る。

【0134】

IL-10ポリペプチドは、IL-10ポリペプチドをコードすることができる構築物を提供するために、当該技術分野において周知の異なるIL-10関連核酸を操作する組み換え技術を用いて生成され得る。特定のアミノ酸配列が提供されるとき、当業者は、例えば個体の分子生物学の背景及び経験を考慮して、そのようなアミノ酸配列をコードする様々な異なる核酸分子を認識することは理解されるであろう。

【0135】

アミド結合置換

いくつかの場合では、IL-10はペプチド結合以外の1つ以上の連結を含み、例えば少なくとも2つの隣接するアミノ酸はアミド結合以外の連結を介して結合される。例えば、望ましくないタンパク質分解もしくは分解の他の手段を低減もしくは排除するため、及び/または血清の安定性を増加させるために、及び/または骨格内の立体配座の柔軟性を制限もしくは増加させるために、IL-10の主鎖内の1つ以上のアミド結合を置換できる。

10

【0136】

別の例では、IL-10の1つ以上のアミド結合(-CO-NH-)は、-CH₂NH-、CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-(シス及びトランス)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-または-CH₂SO-などのアミド結合のアイソスターである連結で置換され得る。IL-10の1つ以上のアミド結合は、例えば還元したアイソスター偽ペプチド結合によっても置換され得る。Couder et al. (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41:181-184を参照のこと。そのような置換及びそれを達成する方法は、当業者には周知である。

20

【0137】

アミノ酸置換

1つ以上のアミノ酸置換は、IL-10ポリペプチド内で行われる。下記は非限定的な例である。

【0138】

a) アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、ノルロイシン、(S)-2-アミノ酪酸、(S)-シクロヘキシルアラニン、または分枝状、環状及び直鎖状アルキル、アルケニルもしくはアルキニル置換を含むC₁~C₁₀炭素からの脂肪族側鎖により置換された他の単純なアミノ酸置換を含む、アルキル置換の疎水性アミノ酸の置換。

30

【0139】

b) フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、スルホチロシン、ビフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-ベンゾチエニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、ヒスチジンを含む、芳香族置換された疎水性アミノ酸の置換であり、アミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アザ、ハロゲン化(フルオロ、クロロ、プロモ、またはヨード)または上述の芳香族アミノ酸のアルコキシ置換型(C₁~C₄)を含み、その代表例としては、2-、3-または4-アミノフェニルアラニン、2-、3-または4-クロロフェニルアラニン、2-、3-または4-メチルフェニルアラニン、2-、3-または4-メトキシフェニルアラニン、5-アミノ-、5-クロロ-、5-メチル-または5-メトキシトリプトファン、2'-、3'-または4'-アミノ-、2'-、3'-または4'-クロロ-、2-、3-または4-ビフェニルアラニン、2'-、3'-または4'-メチル-、2-、3-または4-ビフェニルアラニン、及び2-または3-ピリジルアラニンがある。

40

【0140】

c) 置換基がヘテロ原子(窒素または遠位窒素または窒素など)上、または例えばβR位置の炭素上にあるかに関わらず、前述のアミノ酸のアルキル、アルケニルまたはアリール置換された(C₁~C₁₀分枝状、直線状もしくは環状からの)誘導体を含む、アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、2,3-ジアミノプロピオン酸、ホモア

50

ルギニンを含む、塩基性側鎖を含有するアミノ酸の置換。代表的例として機能する化合物は、N - β - イソプロピル - リジン、3 - (4 - テトラヒドロピリジル) - グリシン、3 - (4 - テトラヒドロピリジル) - アラニン、N, N - β - ジエチル - ホモアルギニンを含む。 β - メチルアルギニン、 β - メチル - 2, 3 - ジアミノプロピオン酸、 β - メチルヒスチジン、 β - メチルオルニチンなどの化合物も含まれ、アルキル基は α - 炭素のプロR位を占める。アルキル、芳香族、ヘテロ芳香族(ここでヘテロ芳香族基は、1つ以上の窒素、酸素もしくは硫黄原子を単独でまたは組み合わせて有する)、カルボン酸、または酸クロリド、活性エステル、活性アゾリド及び関連誘導体ならびにリジン、オルニチンもしくは2, 3 - ジアミノプロピオン酸などの多くの公知の活性化誘導体のいずれかも、含まれる。

10

【0141】

d) アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、チロシン、アルキル、アリール、アリールアルキル、及び2, 4 - ジアミノプロピオン酸、オルニチンまたはリジンのヘテロアリールスルホンアミド、ならびにテトラゾール置換したアルキルアミノ酸を含む、酸性アミノ酸の置換。

【0142】

e) アスパラギン、グルタミン、及びアスパラギンもしくはグルタミンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む側鎖アミド残基の置換。

【0143】

f) セリン、トレオニン、ホモセリン、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、及びセリンもしくはトレオニンのアルキルまたは芳香族置換誘導体を含む、ヒドロキシル含有アミノ酸の置換。

20

【0144】

いくつかの場合では、IL - 10は、アミノ酸の1つ以上の天然起源の非遺伝的にコードされるL - アミノ酸、合成L - アミノ酸またはD - エナンチオマーを含む。例えばIL - 10は、D - アミノ酸のみを含み得る。例えばIL - 10ポリペプチドは、下記の残基：ヒドロキシプロリン、 β - アラニン、o - アミノ安息香酸、m - アミノ安息香酸、p - アミノ安息香酸、m - アミノメチル安息香酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、 β - アミノイソ酪酸、N - メチルグリシン(サルコシン)、オルニチン、シトルリン、t - ブチルアラニン、t - ブチルグリシン、N - メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン、ナフチルアラニン、ピリジルアラニン、3 - ベンゾチエニルアラニン、4 - クロロフェニルアラニン、2 - フルオロフェニルアラニン、3 - フルオロフェニルアラニン、4 - フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸、 β - 2 - チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、ホモアルギニン、N - アセチルリジン、2, 4 - ジアミノ酪酸、 β - アミノフェニルアラニン、N - メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン、 β - アミノヘキサ酸、 β - アミノヘキサ酸、 β - アミノヘプタン酸、 β - アミノオクタン酸、 β - アミノデカン酸、 β - アミノテトラデカン酸、シクロヘキシルアラニン、 β - ジアミノ酪酸、 β - ジアミノプロピオン酸、 β - アミノ吉草酸、2, 3 - ジアミノ酪酸のうち

30

40

【0145】

追加の改変

システイン残基またはシステイン類似体は、ジスルフィド結合を介して別のペプチドに結合を提供するために、またはIL - 10ポリペプチドの環化を提供するために、IL - 10ポリペプチドに導入され得る。システインまたはシステイン類似体を導入する方法は、当該技術分野で周知である。例えば米国特許第8, 067, 532号を参照。

【0146】

IL - 10ポリペプチドは環化され得る。導入されるシステインまたはシステイン類似体が第2の導入されるシステインまたはシステイン類似体とジスルフィド結合を形成することができる場合、1つ以上のシステインまたはシステイン類似体はIL - 10ポリペ

50

チド内に導入することができる。環化の他の手段は、オキシムリンカーまたはランチオニンリンカーの導入を含む。例えば米国特許第 8,044,175 号を参照。環化結合を形成することができるアミノ酸（もしくは非アミノ酸部分）の任意の組み合わせを使用する、及び/または導入することができる。環化結合は、アミノ酸（またはアミノ酸と - (CH₂)_n - CO - もしくは - (CH₂)_n - C₆H₄ - CO -)と、架橋の導入を可能にする官能基との任意の組み合わせにより、生成することができる。いくつかの例は、ジスルフィド、ジスルフィド模倣体（例えば - (CH₂)_n - カルバ架橋、チオアセタール、チオエーテル架橋（シスタチオニンまたはランチオニン））ならびにエステル及びエーテルを含有する架橋である。これらの例では、n は任意の整数であり得るが、多くの場合 10 未満である。

10

【0147】

他の改変は、例えば N - アルキル（またはアリール）置換（ [CONR] ）、またはラクタム及び他の環状構造を構築するための骨格架橋を含む。他の誘導体は、C 末端ヒドロキシメチル誘導体、o - 改変誘導体（例えば、C - 末端ヒドロキシメチルベンジルエーテル）、アルキルアミド及びヒドラジドなどの置換アミドを含む N - 末端改変誘導体を含む。

【0148】

場合によっては、IL - 10 ポリペプチドの 1 つ以上の L - アミノ酸は、1 つ以上の D - アミノ酸で置換される。

【0149】

場合によっては、IL - 10 ポリペプチドは、レトロインベルソ類似体である（例えば Sela and Zisman (1997) FASEB J. 11:449 参照）。レトロインベルソペプチド類似体は線状ポリペプチドの異性体であり、そのアミノ酸配列の方向は逆転し（レトロ）、例えば L - アミノ酸の代わりに D - アミノ酸を用いて、内部の 1 つ以上のアミノ酸のキラリティ、D 体もしくは L 体が反転した（インベルソ）[例えば、Jameson et al. (1994) Nature 368:744; 及び Brady et al. (1994) Nature 368:692 参照]。

20

【0150】

IL - 10 ポリペプチドは「タンパク質導入ドメイン」(PTD) を含むことができ、それは脂質二層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜もしくは小胞膜を横断することを支援する、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物または有機もしくは無機分子を意味する。別の分子に結合した PTD は、細胞外空間から細胞内空間へ、またはオルガネラ内の細胞質ゾルへ行くために、膜を横断する分子を支援する。いくつかの実施形態においては、PTD は IL - 10 ポリペプチドのアミノ末端に共有結合するが、一方他の実施形態においては、PTD は IL - 10 ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合する。代表的なタンパク質形質導入ドメインとしては、最小のウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン (YGRKKRRQRRR; 配列番号 1 を含む HIV - 1 TAT の残基 47 ~ 57 に対応する); 細胞内に直接組み入れるのに十分なアルギニン残基の数を含むポリアルギニン配列（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10 または 10 ~ 50 アルギニン）; VP22 ドメイン (Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9 (6): 489 - 96); ショウジョウバエのアンテナペディアタンパク質形質導入ドメイン; (Noguchi et al. (2003) Diabetes 52 (7): 1732 - 1737); 切断されたヒトカルシトニンペプチド (Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21: 1248 - 1256); ポリリジン (Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13003 - 13008); RRQRRTSKLMKR (配列番号 2); トランスポータン GWTLNSAGYLLGKINLKAALAKKIL (配列番号 3); KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (配列番号 4); 及び、RQIKIWFQNRRMKWKK (配列番号 5) を含むが、これらに限定されない。代表的な PTD としては、YGRKKRRQRRR (配列番号 1)、R

30

40

50

KKRRQRRR (配列番号6); 3つのアルギニン残基~50つのアルギニン残基のアルギニンホモポリマーを含むが、これらに限定されず、代表的なPTDドメインアミノ酸配列としては、YGRKKRRQRRR (配列番号1); RKKRRQRRR (配列番号7); YARAAARQARA (配列番号8); THRLPRRRRRR (配列番号9); 及びGGRRAARRRRR (配列番号10)のうちのいずれかを含むが、これらに限定されない。

【0151】

IL-10ポリペプチドのC末端のアミノ酸のカルボキシル基COR₃は、遊離形態(R₃=OH)で、または生理学的に耐性のある、例えばナトリウム、カリウムもしくはカルシウム塩などアルカリもしくはアルカリ土類塩の形態などで存在することができる。カルボキシル基は、例えばメタノール、分枝状もしくは非分枝状C₁~C₆アルキルアルコール、例えばエチルアルコールもしくはtert-ブタノールなどの1級、2級または3級アルコールでエステル化もされ得る。カルボキシル基は、アンモニア、分枝状もしくは非分枝状のC₁~C₆アルキルアミン、またはC₁~C₆ジアルキルアミン、例えばメチルアミンまたはジメチルアミンなどの1級または2級アミンでアミド化もできる。

10

【0152】

IL-10ポリペプチドのN末端のアミノ酸NR₁R₂のアミノ基は、遊離形態(R₁=H及びR₂=H)で、または例えば塩化物もしくは酢酸塩などの生理学的に許容される塩の形態で存在し得る。アミノ基は、R₁=H及びR₂=アセチル、トリフルオロアセチルまたはアダマンチルであるように、酸でアセチル化もされ得る。アミノ基は、上記で提供されるものなどペプチド化学で従来より使用されているアミノ保護基で保護された形態でも存在し得る(例えば、Fmoc、ベンジルオキシ-カルボニル(Z)、Boc、及びAlloc)。アミノ基はN-アルキル化されることができ、R₁及び/またはR₂=C₁~C₆アルキルもしくはC₂~C₈アルケニルもしくはC₇~C₉アラルキルである。アルキル残基は、直鎖、分枝状または環状(例えばそれぞれエチル、イソプロピル及びシクロヘキシル)であり得る。

20

【0153】

IL-10機能を増強する及び/または模倣するための特定の修飾

本明細書に開示された治療法(例えば、IL-10)及び/またはそれらを投与する方法における、1つ以上の物理的特性を向上させることは、しばしば有益であり、時には必須である。物理的特性の改善は、例えば免疫原性を調節すること、水溶解性、バイオアベイラビリティ、血清中半減期及び/もしくは治療用半減期、ならびに/または生物学的活性を上昇させる方法を含む。特定の改変は、例えば検出アッセイ(例えばエピトープタグ)で使用するための抗体を産生するために、及びタンパク質精製の容易性を提供するためにも有用であり得る。このような改変は一般的に、治療モダリティの生物活性に悪影響を与えないことなく、及び/またはその免疫原性を増大させることなく付与される必要がある。

30

【0154】

IL-10のPEG化は、本開示により想到される特定の改変であり、一方他の改変は、グリコシル化(N-及びO-結合); ポリシリル化; 血清アルブミンを含むアルブミン融合分子(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA)、シアノ血清アルブミンまたはウシ血清アルブミン(BSA)); 例えば共役型脂肪酸鎖によるアルブミン結合(アシル化); 及び、Fc融合タンパク質を含むが、これらに限定されない。

40

【0155】

PEG化: タンパク質治療薬の臨床効果は、短い血しょう半減期及びプロテアーゼ分解を受けやすいことにより制限されることが多い。このような問題は、ポリペプチドシーケンスを、様々な非タンパクポリマーのいずれか、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンなどのいずれかに接合または結合させることを含む、様々な改変で対処することができる。様々な治療タンパク質(例えばフィルグラスチム)の研究において示された。これは、タンパク質及び非タン

50

パク質ポリマー、例えばPEGの両方に共有結合した連結部分によりしばしば行われる。このようなPEG共役型生体分子は、良好な物理的及び熱的安定性、酵素分解の感受性に対する保護、増大した溶解性、長い生体内循環半減期及び低下したクリアランス、低下した免疫原性及び抗原性、ならびに低下した毒性を含む、臨床的に有用な特性を有することが示される。

【0156】

薬物動態パラメータにおけるPEG化の有益な効果に加えて、PEG化自体が活性を高めることができる。例えばPEG-IL-10は、非PEG化IL-10よりも特定の癌に対してより効果的であることが示される（参照：例えば、欧州特許第206636A2号）。

10

【0157】

ポリペプチド配列への共役結合に好適なPEGは一般的に室温で水溶性であり、及び一般式 $R(O-CH_2CH_2)_nO-R$ を有し、式中、Rは水素、またはアルキルもしくはアルカノール基などの保護基であり、nは1~1000の整数である。Rが保護基である場合、それは一般的に1~8つの炭素を有する。ポリペプチド配列に共役結合したPEGは、直鎖状または分枝状であり得る。分枝状PEG誘導體、「スターPEG」及び多分岐PEGは、本開示により想到される。本開示で使用されるPEGの分子量は、いかなる特定の範囲にも限定されず、その例は本明細書のあらゆる場所に記載される。一例として、特定の実施形態では5kDa~20kDaの間の分子量を有し、他の実施形態では4kDa~10kDaの間の分子量を有する。

20

【0158】

本開示は抱合体の組成物も想到し、PEGは異なるn値を有し、したがって様々な異なるPEGは特定の割合で存在する。例えばいくつかの組成物は抱合体の混合物を含み、ここでn=1、2、3及び4である。いくつかの組成物で抱合体のパーセントは、n=1の場合18~25%、n=2の場合50~66%、n=3の場合12~16%、n=4の場合最大5%である。このような組成物は、当該技術分野で周知の反応条件及び精製方法により産生できる。代表的な反応条件は、本明細書の至るところに記載されている。カチオン交換クロマトグラフィーは抱合体を分離するために使用され、次に、例えば所望の数のPEGが付着され、精製された抱合体を含有し、非改変タンパク質配列及び他の数のPEGが付着した抱合体を含まないフラクションが同定される。

30

【0159】

PEG化は最も頻繁に、ポリペプチドのN末端の-アミノ基、リジン残基の側鎖上の-アミノ基、及びヒスチジン残基の側鎖上のイミダゾール基で起こる。ほとんどの組み換えポリペプチドは単一の-アミノ基及び多数の-アミノならびにイミダゾール基を有しているため、多くの位置異性体はリンカー化学に応じて生成できる。当該分野で周知の一般的なPEG化戦略を、本明細書で適用することができる。PEGは、ポリペプチド配列の1つ以上の遊離アミノ基またはカルボキシル基とポリエチレングリコールの間の結合を媒介する末端反応性基（「スペーサー」）を介して、本開示のポリペプチドに結合することができる。遊離アミノ基に結合し得るスペーサーを有するPEGは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドで活性化させることにより調製され得るN-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールを含む。遊離アミノ基に結合され得る別の活性化されたポリエチレングリコールは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルを塩化シアヌルと反応させることにより調製され得る、2,4-ビス(オ-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンである。遊離のカルボキシル基に結合する活性化ポリエチレングリコールは、ポリオキシエチレンジアミンを含む。

40

【0160】

スペーサーを有するPEGへの本開示のポリペプチド配列のうちの1つ以上の共役結合は、様々な従来の方法により実行され得る。例えば共役結合反応は、pH5~10の溶媒中、4~室温の温度、30分~20時間、タンパク質対試薬のモル比が4:1~30:

50

1で実施できる。反応条件は、主に望ましい程度の置換を産生するように、反応を誘導することを選択できる。一般に、低温、低pH（例えばpH = 5）及び短い反応時間は、接合されるPEGの数を減少させる傾向があり、一方、高温、中性～高pH（例えばpH 7）及び長い反応時間は、共役結合されるPEGの数を増加させる傾向がある。当該技術分野で周知の種々の手段は、反応を停止するために使用できる。いくつかの実施形態では、反応は、反応混合物を酸性化し、かつ例えば-20で凍結することにより停止する。種々の分子のPEG化は、例えば米国特許第5,252,714号、同第5,643,575号、同第5,919,455号、同第5,932,462号及び同第5,985,263号に記載されている。PEG-IL-10は、例えば米国特許第7,052,686号に記載されている。本明細書で使用するのに想到される特定の反応条件は、実験の項に記載される。

10

【0161】

本開示はPEG模倣体の使用も想到する。いくつかの追加の有利な性質を付与しつつ、PEGの特質（例えば向上した血清中半減期）を保持する、組み換えPEG模倣体が開発されてきた。一例として、PEGに類似する伸長した立体構造を形成することができる単純なポリペプチド鎖（例えばAla、Glu、Gly、Pro、Ser及びThrを含む）は、既に目的のペプチドまたはタンパク質薬物に融合された状態で、組み換えにより産生され得る（例えばAmunix'XTEN technology (Mountain View, CA)）。これにより、製造過程中に更なる共役結合工程を不要にする。更に確立された分子生物学技術は、ポリペプチド鎖の側鎖組成の制御を可能にし、免疫原性及び製造特性の最適化を可能にする。

20

【0162】

グリコシル化：本開示の目的のため、「グリコシル化」は、グリカンタンパク質、脂質または他の有機分子に結合する酵素処理を広く指すことを意味する。本開示と関連した用語「グリコシル化」の使用は一般的に、1つ以上の炭水化物部分を付加する、もしくは欠失させる（潜在するグリコシル化部位を除去することによる、または化学及び/もしくは酵素手段によりグリコシル化を欠失させることによる）、ならびに/または天然配列に存在しても存在しなくてもよい1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味することが意図される。更に前記語句は、存在する様々な炭水化物部分の性質及び比率の変化を含有する、天然タンパク質のグリコシル化の質的变化を含む。

30

【0163】

グリコシル化はIL-10などのポリペプチドの物理的性質（例えば溶解度）に劇的に影響を及ぼす可能性があり、タンパク質の安定性、分泌及び細胞内局在性にも重要であり得る。グリコシル化ポリペプチドは更に、強化された安定性を示すことができる、または半減期など1つ以上の薬物動態特性を改善することができる。更に溶解度の改善は例えば、非グリコシル化ポリペプチドを含む製剤よりも、医薬品投与でより適した製剤の生成を可能にすることができる。

【0164】

適切なグリコシル化は、生物活性に必須であり得る。実際、真核生物からのいくつかの遺伝子は、グリコシル化タンパク質の細胞過程を欠く細菌（例えば、大腸菌）で発現されるとき、それらのグリコシル化の欠失の理由により、ほとんどまたはまったく活性がなく回収されるタンパク質をもたらす。

40

【0165】

グリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することにより達成され得る。ポリペプチドの変更は例えば、1つ以上のセリンもしくはスレオニン残基（O-結合グリコシル化部位において）もしくはアスパラギン残基（N-結合グリコシル化部位において）の付加、またはそれによる置換により行うことができる。各種類に見られるN-結合及びO-結合オリゴ糖ならびに糖残基の構造は、異なってもよい。両方に一般的に見られる糖の1つの種類は、N-アセチルノイラミン酸（以後シアル酸と称する）である。シアル酸は通常N-結合及びO-結合オリゴ糖の両方の末端残基であり、その負の電荷により、糖タン

50

パク質に酸性の性質を付与することができる。本開示の特定の実施形態は、N-グリコシル化変異体の生成及び使用を含む。

【0166】

本開示のポリペプチド配列は、核酸レベルでの変化を通じて、特に所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるようあらかじめ選択された塩基でポリペプチドをコードする核酸を突然変異させることにより、任意に変更することができる。ポリペプチド上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、ポリペプチドへのグリコシドの化学または酵素カップリングによる。炭水化物の除去は、化学的にもしくは酵素的に、またはグリコシル化されるアミノ酸残基をコードするコドンの置換により達成され得る。化学的脱グリコシル化技法は周知であり、ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素切断は、様々なエンドグリコシダーゼ及びエキソグリコシダーゼの使用により達成され得る。

10

【0167】

ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)欠損チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞は、組み換え糖タンパク質の生成のために、一般的に使用される宿主細胞である。これらの細胞は酵素 - ガラクトシド - 2,6-シアリルトランスフェラーゼを発現せず、したがって - 2,6結合におけるシアル酸を、これらの細胞で生成された糖タンパク質のN-連結オリゴ糖に付加しない。

【0168】

ポリシアル化: 本開示は、ポリシアル化の使用、ポリペプチドの安定性及び生体内薬物動態を改善するための、天然起源の生分解性 - (28)結合ポリシアル酸(「PSA」)へのポリペプチドの共役結合も想到する。PSAは、高度に親水性である生分解性、非毒性の天然ポリマーであり、血中においてその血清中半減期を増加させる大きな見かけ上の分子量を付与する。更にペプチド及びタンパク質の治療薬の範囲のポリシアル化は、著しく減少したタンパク質分解、生体内活性の維持、ならびに免疫原性及び抗原性の減少をもたらした(例えば、G. Gregoriadis et al., Int. J. Pharmaceutics 300(1-2): 125-30を参照)。他の共役結合(例えば、PEG)による改変と同様に、部位特異的ポリシアル化の様々な技法が利用可能である(例えば、T. Lindhout et al., PNAS 108(18)7397-7402(2011)を参照)。

20

【0169】

アルブミン融合: 共役結合のための追加の好適な成分及び分子としては、ヒト血清アルブミン(HSA)、カニクイザル血清アルブミン、及びウシ血清アルブミン(BSA)などのアルブミンが挙げられる。

30

【0170】

約20日の血清中半減期を有する成熟HSA、585アミノ酸のポリペプチド(約67kDa)は、膠質浸透血圧の維持、血液pHならびに多数の内因性及び外因性リガンドの輸送及び分布を主に担う。タンパク質は3つの構造的に相同のドメイン(ドメインI、II及びIII)を有し、ほぼ完全にヘリックスの構造にあり、17のジスルフィド架橋により高度に安定化される。アルブミンの3つの主要な薬物結合領域は、サブドメイン内の3つのドメインIB、IIA及びIIIAの各々に位置する。

40

【0171】

アルブミン合成は肝臓で行われ、これは短寿命の一次産物であるプレプロアルブミンを生成する。したがって完全長のHSAは、18アミノ酸(MKWVTFISLLFLFS SAYS; 配列番号11)のシグナルペプチド、続いて6アミノ酸のプロドメイン(RGVFRR; 配列番号12)を有し、この24アミノ酸残基はプレ-プロドメインと称され得る。HSAは、プレ-プロドメインとしてのその内因性シグナルペプチドを用いて、発現かつ分泌することができる。あるいはHSAは、成熟構築物に融合したIgKシグナルペプチドを用いて、発現かつ分泌することができる。プレプロアルブミンは、そのアミノ末端で、小胞体内腔において素早く共翻訳的に切断されて、安定した609アミノ酸前駆体ポリペプチド、プロアルブミンを生成する次いでプロアルブミンはゴルジ装置へと通過

50

し、ここでそれはフーリン依存性アミノ末端切断により、585アミノ酸成熟アルブミンに変換される。

【0172】

アルブミンの一次アミノ酸配列、構造及び機能は、アルブミン合成及び分泌のプロセスのように、種において高度に保存される。HSAと同等のアルブミン血清タンパク質は、例えばカニクイザル、ウシ、イヌ、ウサギ及びラットに見出される。非ヒト種のうち、ウシ血清アルブミン(BSA)はHSAに最も構造的に類似している(例えばKosae et al., Nov 2007 J Pharm Sci. 96(11):3117-24参照)。本開示は、例えば薬物開発プロセスにおいて上に記載されるものを含むがこれらに限定されない、非ヒト種からのアルブミンの使用を想定する。

10

【0173】

本開示によると、アルブミンは、薬物分子(例えば、本明細書に記載のポリペプチド)のカルボキシル末端、アミノ末端、カルボキシル末端とアミノ末端の両方で、及び内部で共役結合され得る(例えば、米国特許第5,876,969号及び米国特許第7,056,701号を参照されたい)。

【0174】

本開示により想定されるHSA-薬物分子共役結合において、アルブミン分泌プレ配列及びその変異体、その断片及び変異体、ならびにHSA変異体などの様々な形態のアルブミンが使用され得る。そのような形態は概して、1つ以上の所望のアルブミン活性を有する。追加の実施形態では、本開示は、直接もしくは間接的にアルブミン、アルブミン断片、及びアルブミン変異体などに融合されるポリペプチド薬物分子を含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は非融合薬物分子よりも高い血しょう安定性を有する、及び/または融合タンパク質は非融合薬物分子の治療活性を維持する。いくつかの実施形態では、間接融合は、ペプチドリンカーまたはその改変された型などのリンカーより行われる。

20

【0175】

細胞内切断は、例えばフーリンまたはカスパーゼによって酵素的に行われてもよい。細胞は低レベルのそれらの内因性酵素を発現し、これは融合分子の一部分を細胞内で切断することが可能であり、このため、ポリペプチドのうちのいくつかは、HSAに共役結合されることがなく細胞から分泌されるが、一方、ポリペプチドのうちのいくつかは、HSAを含む融合分子の形態で分泌される。本開示の実施形態は、様々なフーリン融合構築物の使用を想定する。例えば配列RGRR(配列番号13)、RKRRKR(配列番号14)、RKRR(配列番号15)またはRRRKR(配列番号16)を含む、構築物が設計されてもよい。

30

【0176】

本開示は細胞外切断(すなわち生体外切断)も想定し、それにより融合分子は細胞から分泌され、精製に供され、次いで切断される。切断は、成熟IL-10からHSA-リンカー複合体全体、またはHSA-リンカー複合体全体以下を解離し得ることが理解される。

【0177】

上述のように、本開示の1つ以上のポリペプチドへのアルブミンへの融合は、例えばHSAをコードする核酸、またはそのフラグメントが、1つ以上のポリペプチド配列をコードする核酸に接合されるように遺伝子操作で実施できる。その後、好適な宿主は、融合ポリペプチドを発現するように、例えば好適なプラスミドの形態の融合されたヌクレオチド配列で形質転換される、またはそれを遺伝子導入され得る。発現は、例えば、原核細胞もしくは真核細胞から*in vitro*で、または例えば、遺伝子導入生物から*in vivo*でもたらされ得る。本開示のいくつかの実施形態では、融合タンパク質の発現は、哺乳動物の細胞株、例えばCHO細胞株において実施される。形質転換は、外因性の遺伝的物質(外因性核酸)の細胞膜を通過する直接的な取り込み、組み込み及び発現によって生じる、細胞の遺伝子変異を指すように本明細書において広く使用される。形質転換はいくつかの細菌種において天然に生じるが、他の細胞において人工的な手段によってもたら

40

50

され得る。

【0178】

更にアルブミン自体は、その循環半減期を延長するように改変され得る。改変アルブミンのIL-10への融合は、上述の遺伝的操作法により、または化学的共役結合により達成され得て、得られた融合分子は非改変アルブミンとの融合物の半減期を超える半減期を有する（国際特許第WO2011/051489号参照）。

【0179】

代替的なアルブミン結合戦略：いくつかのアルブミン結合戦略が、共役型脂肪酸鎖を介したアルブミン結合（アシル化）を含む、直接融合の代替物として開発されている。血清アルブミンは脂肪酸の輸送タンパク質であるため、アルブミン結合活性を有するこれらの天然リガンドは、小タンパク質治療薬の半減期の延長に使用されている。例えば、承認された糖尿病の製品であるインスリンデテミル（LEVEMIR）は、遺伝的に改変されたインスリンに共役結合したミリスチル鎖を含み、長期作用インスリン類似体をもたらす。

【0180】

本開示はまた、アルブミン結合ドメイン（ABD）ポリペプチド配列、及び本明細書に記載されるポリペプチドのうちの一つ以上の配列を含む、融合タンパク質を想定する。文献に記載されるいずれのABDポリペプチド配列も、融合タンパク質の成分であり得る。融合タンパク質の成分は所望により、本明細書に記載されるそれらのリンカーなどのリンカーを介して、共有結合させることができる。本開示の実施形態のうちいくつかでは、融合タンパク質は、N末端部分としてのABDポリペプチド配列、及びC末端部分としての本明細書に記載されるポリペプチドを含む。

【0181】

本開示はまた、アルブミン結合ポリペプチドの断片を含む融合タンパク質を想定し、断片は、実質的に、アルブミン結合を維持する、または単量体単位としての少なくとも2つのアルブミン結合ポリペプチドもしくはそれらの断片を含む、アルブミン結合ポリペプチドもしくはそれらの断片の多量体を維持する。ABD及び関連技術の一般考察に関しては、国際特許第WO2012/050923号、同第WO2012/050930号、同第WO2012/004384号、及び同第WO2009/016043号を参照されたい。

【0182】

他の分子との共役結合：共役結合のための追加の好適な成分及び分子は、例えば、チログロブリン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリアミノ酸（ポリ（D-リジン：D-グルタミン酸）など）；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルスヘマグルチニン、インフルエンザウイルスヌクレオタンパク質；キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）；ならびにB型肝炎コアタンパク質及び表面抗原、または前述の任意の組み合わせを含む。

【0183】

したがって本開示は、別のポリペプチド（例えば、対象ポリペプチドとは異種であるアミノ酸配列を有するポリペプチド）などのポリペプチド配列のN末端及び/もしくはC末端での、一つ以上の追加の成分もしくは分子、または担体分子の共役結合を想定する。したがって代表的なポリペプチド配列は、別の成分または分子との共役結合として提供できる。

【0184】

共役結合改変は、第2の分子に由来する更なるもしくは相補的な機能または活性を伴う活性を維持するポリペプチド配列をもたらすことができる。例えばポリペプチド配列は、例えば溶解度、貯蔵、生体内もしくは保存半減期または安定性、免疫原性の減少、遅延または制御された生体内放出などを促進するように、分子に共役結合されてもよい。他の機能または活性は、非接合ポリペプチド配列に対して毒性を減少させる共役結合、非共役結合ポリペプチド配列より効率的な種類の細胞もしくは器官を標的とする共役結合、または本明細書に記載される疾患、障害もしくは状態（例えば、癌）に関連する原因もしくは作

10

20

30

40

50

用に更に対抗する薬物を含む。

【0185】

IL-10ポリペプチドは、タンパク質；セファロース、アガロース、セルロースまたはセルロースビーズなどの多糖；ポリグルタミン酸またはポリリジンなどのポリマー性アミノ酸；アミノ酸コポリマー；不活性化されたウイルス粒子；ジフテリア、破傷風、コレラまたはロイコトキシン分子からのトキソイドなどの不活性化された細菌性毒素；不活性化された細菌；及び樹状細胞などの、大きくゆっくり代謝される巨大分子にも共役結合され得る。このような共役結合した形態は、所望する場合、本開示のポリペプチドに対して抗体を生成するように使用され得る。

【0186】

共役結合のための追加の候補成分及び分子は、単離または精製に適したものを含む。特定の非限定例としては、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対）、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または、例えばプラスチックもしくはポリスチレンのビーズ、プレートもしくはビーズ、磁気ビーズ、試験片及び膜を含有する固体支持体を含む分子、などの結合分子が挙げられる。

【0187】

カチオン交換クロマトグラフィーなどの精製方法は、共役結合をそれらの様々な分子量に効率的に分離する電荷の差によって共役結合を分離するために使用され得る。例えばカチオン交換カラムは、充填され、次に約20mMの酢酸ナトリウム、pH約4で洗浄され、次に約3~5.5のpH、例えばpH約4.5で緩衝された(0M~0.5M)NaClの直線的勾配で溶出され得る。カチオン交換クロマトグラフィーによって得られた画分の内容物は、例えば質量分析、SDS-PAGEなどの従来の方法、または分子量により分子実体を分離するための他の公知の方法を用いて、分子量により特定され得る。

【0188】

Fc融合分子：ある実施形態では、本開示のポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端は、免疫グロブリンFc領域（例えば、ヒトFc）と融合されて、融合コンジュゲート（または融合分子）を形成することができる。Fc融合共役結合は、生物製剤の全身半減期を増加することが示されており、したがって生物医薬製品は頻繁な投与をあまり必要としない可能性がある。Fcは血管を覆う内皮細胞の新生児Fc受容体（FcRn）に結合し、結合によりFc融合分子は分解から保護され、循環内に再放出され、分子をより長く循環内に保つ。このFc結合は、内因性IgGがその長い血しょう中半減期を維持する機構であると考えられる。より最近のFc融合技術は、従来Fc融合共役結合と比較して、生物製剤の薬物動態及び薬力学の性質を最適化するために、生物製剤の1つの複製物を抗体のFc領域に連結する。本明細書に開示されるポリペプチドの用途に適切な他のFc関連の技術の例は、国際特許第WO2013/113008号に記載される。

【0189】

他の改変：本開示は、現在既知であるまたは将来開発される、1つ以上の性質を改善するためのIL-10の他の改変の使用を想定する。本開示のポリペプチドの循環半減期を延長する、安定性を増加させる、クリアランスを減少させる、または免疫原性もしくは抗原性を変更するためのそのような方法の1つは、分子の特性を改変するために、他の分子に連結されたヒドロキシエチルデンブレン誘導体を利用する、HES化によるポリペプチド配列の改変を伴う。HES化の様々な態様は、例えば米国特許出願第2007/0134197号及び同第2006/0258607号に記載されている。

【0190】

本開示はまた、融合タグとしてのSUMOを含む融合分子を想定する(LifeSensors, Inc. (Malvern, PA))。本明細書に記載されるポリペプチドのSUMOへの融合は、発現の増強、溶解度の改善及び/または精製方法の開発の支援を含む、いくつかの有益な効果をもたらす得る。SUMOプロテアーゼはSUMOの3次構造を認識し、SUMOのC末端で融合タンパク質を切断し、したがって所望のN末端アミノ酸を伴う本明細書に記載されるポリペプチドを放出する。

10

20

30

40

50

【0191】

リンカー：リンカー及びその使用は上述してある。本開示のポリペプチド配列を改変するために使用される上述の成分及び分子のいずれも、リンカーを介して任意に共役結合され得る。好適なリンカーは、改変されたポリペプチド配列と連結された成分及び分子との間のある程度の移動を可能にするのに一般的に十分な長さである「可動性リンカー」を含む。リンカー分子は一般的に、約6～50つの原子の長さである。リンカー分子はまた、例えばアリアルアセチレン、2～10つのモノマー単位を含有するエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二塩基酸、アミノ酸、またはこれらの組み合わせであってもよい。適切なリンカーは容易に選択することができ、1アミノ酸（例えば、Gly）、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、30～50または50超アミノ酸など任意の適切な長さであり得る。

10

【0192】

例示的な可動性リンカーは、グリシンポリマー（G）_n、グリシン-セリンポリマー（例えばGS）_n、GSGGS_n（配列番号17）、GGGS_n（配列番号18）、（G_mS_o）_n、（G_mS_oG_m）_n、（G_mS_oG_mS_oG_m）_n（配列番号19）、（GSGGS_m）_n（配列番号20）、（GSGS_mG）_n（配列番号21）及び（GGGS_m）_n（配列番号：22）ならびにこれらの組み合わせであり、ここでm、n及びoは少なくとも1つの整数からそれぞれ選択される）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマーならびに他の可動性リンカーを含む。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは比較的構造不定であり、したがって成分間のニュートラルなテザーとして機能することができる。例示の可動性リンカーは、GSGG（配列番号23）、GSGGG（配列番号24）、GSGSG（配列番号19）、GSGGG（配列番号25）、GGGSG（配列番号26）及びGSSSG（配列番号27）を含むが、これらに限定されない。

20

【0193】

治療的及び予防的使用

本開示は、疾患、障害及び/もしくは状態ならびに/またはその症状の広い範囲の治療または予防における本明細書に記載のIL-10ポリペプチド（例えばPEG-IL-10）の使用を想到する。実際、本開示の教示は、上記のIL-10平均血清中トラフ濃度パラメータを達成するまたは保持することが有益となり得る、あらゆる疾患、障害または状態に適用することになっている。特定の用途を以下に詳細に記載するが、本開示はそれに限定されないことを理解すべきである。更に、特定の疾患、障害及び状態の一般的なカテゴリーを以下に記載するが、疾患、障害及び状態のいくつかは、2つ以上のカテゴリーに属する（例えば、癌及び線維性関連障害）ことができ、他のものは開示されたカテゴリーのいずれにも属さない可能性がある。

30

【0194】

線維症関連障害及び癌：本開示に従い、IL-10（例えば、PEG-IL-10）を用いて、癌（例えば子宮、子宮頸部、乳房、前立腺、精巣、消化管（例えば、食道、咽頭、胃、小腸もしくは大腸、結腸、もしくは直腸）、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髄、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、膵臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳（例えば、グリオーマ）、神経節、中枢神経系（CNS）及び末梢神経系（PNS）、造血系の癌や免疫系（例えば、脾臓または胸腺）の癌）を含む、増殖性状態もしくは疾患を治療または予防するために使用することができる。本開示は例えば、免疫原性腫瘍、非免疫原性腫瘍、休眠腫瘍、ウイルス誘発性癌（例えば、上皮細胞癌、内皮細胞癌、扁平上皮癌及びパピローマウイルス）、腺癌、リンパ腫、細胞腫、黒色腫、白血病、骨髄腫、肉腫、奇形癌、化学的に誘発された癌、転移、及び血管形成を含む、他の癌関連の疾患、障害もしくは状態を治療または予防する方法も提供する。本開示は、例えば制御性T細胞及び/もしくはCD8+T細胞の活性を調節することにより、腫瘍細胞または癌細胞抗原に対する忍容性を減少させることを意図する（例えば、Ramirez-Montagut, et al. (2003) Oncogene 22: 3180-87; 及び Sawaya, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349: 1501-09を参照）。特定の実

40

50

施形態では、腫瘍または癌は、大腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、神経膠芽腫、または白血病である。癌関連疾患、障害及び状態の用語（複数可）の使用は、癌に直接または間接的に関連し、例えば脈管形成及び異形成などの前癌性状態を含む、幅広い状態を指すことを意味する。

【0195】

いくつかの実施形態において、本開示は、増殖性状態、癌、腫瘍もしくは前癌性状態を、IL-10ポリペプチド（例えばPEG-IL-10）、及び少なくとも1つの追加の治療薬または診断薬、例えば本明細書の他の箇所に記載したもので、治療するための方法を提供する。

【0196】

本開示は、線維性疾患、障害及び状態を治療する、または予防する方法も提供する。本明細書で使用する場合、用語「線維性疾患、障害及び状態」ならびに類似の用語（例えば、「線維性障害」）及び語句は、それが線維性組織または癒痕組織の形成（例えば、1つ以上の組織における線維症）がもたらされる可能性のある任意の状態を含むように、広く解釈されるべきである。一例として、癒痕組織となる可能性がある外傷（例えば、創傷）は、皮膚、眼、肺、腎臓、肝臓、中枢神経系及び心臓血管系の創傷を含む。この語句は、脳卒中から生じる癒痕組織形成、及び例えば損傷または外科手術の結果としての組織接着も包含する。

【0197】

本明細書で使用する場合「線維症」という用語は、器官または組織の正常な構成要素としてよりも、修復または反応過程としての線維組織の形成を指す。線維症は、任意の特定の組織における正常な沈着を超えた線維芽細胞蓄積及びコラーゲン沈着により特徴づけられる。

【0198】

線維性障害としては、創傷治癒、全身及び局所強皮症、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、肺の炎症及び線維症、特発性肺線維症、間質性肺疾患、肝硬変、慢性B型またはC型肝炎感染症の結果としての線維症、腎疾患（例えば、糸球体腎炎）、癒痕組織から発生する心臓病、ケロイドや肥厚性癒痕、ならびに黄斑変性症、及び網膜硝子体や網膜症などの眼疾患から発生する線維症を含むが、これらに限定されない。追加の線維性疾患は、化学療法薬剤誘発性の線維症、放射線誘発性線維症、及び損傷や火傷を含む。

【0199】

線維性障害は多くの場合肝臓に関連し、このような障害と、肝細胞内の肝臓コレステロール及びトリグリセリドの不適當な蓄積の間のネクサスが、しばしばある。この蓄積は、肝線維症及び肝硬変につながる炎症誘発性反応をもたらすように思われる。線維性成分を有する肝臓障害は、非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）及び非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）が挙げられる。

【0200】

心臓血管疾患本開示は、特定の循環器疾患及び/もしくは関連する代謝関連疾患、障害ならびに状態、ならびにそれに関連する障害を治療する、ならびに/または予防するために、本明細書に記載のIL-10ポリペプチド（PEG-IL-10）の使用も想到する。

【0201】

本明細書で使用する場合、「心血管疾患」、「心臓病」などの用語は、心臓血管系、主に心疾患、脳及び腎臓の血管疾患、ならびに末梢動脈疾患に影響を与える疾患を意味する。心血管疾患は、冠動脈性心疾患（すなわち、虚血性心疾患または冠動脈疾患）、アテローム性動脈硬化症、心筋症、高血圧、高血圧性心疾患、肺性心、心律動異常、心内膜炎、脳血管疾患、及び末梢動脈疾患を含む疾患の一群である。心血管疾患は全世界で死亡の主要な原因であり、それは通常、高齢者に影響を及ぼすが、心血管疾患の前駆症状、特にアテローム性動脈硬化症は若齢期で始まる。

【0202】

10

20

30

40

50

本開示の特定の実施形態は、慢性疾患であるアテローム性動脈硬化症を治療する及び/または予防するために、IL-10ポリペプチドの使用を目的としており、その疾患で、動脈壁は、コレステロール及びトリグリセリドなどの脂肪物質の蓄積の結果として、プラークを形成するために厚くなる。アテローム性動脈硬化症はしばしば、マクロファージの蓄積により概ね引き起こされ、機能的な高密度リポタンパク質によりマクロファージから脂肪及びコレステロールを適切に除去されることなく、低密度リポタンパク質(LDL)により促進する、動脈壁における慢性的な炎症反応を含む。慢性的にアテローム性動脈硬化病変が拡大することは、内腔の完全な閉鎖を引き起こすことがあり、内腔狭窄が下流組織(複数可)への血液供給が不十分であるほど重症であるとき、唯一顕在化して、虚血をもたらす。

10

【0203】

IL-10ポリペプチドは、例えば心臓血管疾患(例えばアテローム性動脈硬化症)、脳血管疾患(例えば脳卒中)及び末梢血管疾患に関連し得る、コレステロール関連疾患の治療ならびに/または予防に特に有利である。一例としてIL-10ポリペプチドは、対象の血中コレステロール値を低下させるために使用することができるが、これに限定されない。対象が高コレステロール血症を有するか判定する際に、正常と異常なコレステロール値の間にしっかりした区分がなく、値の解釈は、他の健康状態及び危険因子と関連して行われる必要がある。それにもかかわらず、総コレステロール<200mg/dLが望ましく、200~239mg/dLは高境界値であり、総コレステロール240mg/dLは高いというガイドラインは、米国で一般的に使用されている。より高いレベルの総コレステロールは心血管疾患のリスクを増加させ、LDLまたは非HDLコレステロールのレベルは両方とも、将来の冠動脈性心疾患を予測する。高コレステロール血症を評価する場合、すべてのリポタンパク質の細画分(VLDL、IDL、LDL及びHDL)を測定することは、しばしば有用である。特定の治療目標は、HDLを維持または増加させて、一方でLDLを減少させることである。

20

【0204】

血栓症及び血栓状態。

血管中の血栓(凝血)の形成である血栓症は、循環系による血液の流れを妨害するものであり、凝固性亢進もしくは血液凝固の増大、内皮細胞の傷害、または血流妨害(うっ血、乱流)(ウィルヒョウの3主徴)のうちの1つ以上における、異常に起因し得る。

30

【0205】

血栓症は一般的に静脈性または動脈性に分類されて、そのそれぞれはいくつかのサブタイプによって提示される。静脈血栓症は、深部静脈血栓症(DVT)、門脈血栓症、腎静脈血栓症、頸静脈血栓、パッド-キアリ症候群、パジェット-シュレッター病、脳静脈洞血栓症を含む。動脈血栓症には、脳卒中や心筋梗塞が含まれる。

【0206】

他の疾患、障害及び状態は、心房血栓症及び真性多血症(また、紅斑、原発性赤血球増加症及び一次性赤血球増加症として知られている)、骨髓があまりにも多くのRBC、WBC及び/または血小板を作る骨髓増殖性血液疾患を含む、本開示で想到される。

【0207】

免疫及び炎症状態: 本明細書で使用する場合「免疫疾患」「免疫状態」「免疫障害」「炎症性状態」「炎症性障害」「炎症性疾患」などの用語は、広く任意の免疫または炎症に関連する状態(例えば、病理学的炎症及び自己免疫疾患)を包含することを意味する。そのような状態はしばしば、他の疾患、障害及び状態に密接に関連している。一例として「免疫状態」は、免疫系による根絶に抵抗する感染症(急性及び慢性)、腫瘍ならびに癌を含む、癌、腫瘍ならびに脈管形成などの増殖状態を意味することができる。

40

【0208】

例えば炎症性サイトカインに起因し得る免疫及び炎症性関連の疾患、疾患及び状態の非限定的なリストには、関節炎、腎不全、狼瘡、喘息、乾癬、大腸炎、膵臓炎、アレルギー、線維症、外科合併症(例えば炎症性サイトカインが治癒を妨げる場合)、貧血及び線維

50

筋痛が含まれる。慢性炎症と関連し得る他の疾患及び障害は、アルツハイマー病、うっ血性心不全、脳卒中、大動脈弁狭窄症、動脈硬化症、骨粗しょう症、パーキンソン病、感染症、炎症性腸疾患（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）、アレルギー性接触性皮膚炎及び他の湿疹、全身性硬化症、移植ならびに多発性硬化症を含む。

【0209】

IL-10（例えばPEG-IL-10）が特に有効であり得る（例えば、現在の治療法が限界であるため）上述の疾患、障害及び状態のいくつかは、より詳細に下記に記載される。

【0210】

本開示のIL-10ポリペプチドは、炎症性腸疾患（IBD）の治療及び予防に特に有効であり得る。IBDはクローン病（CD）及び潰瘍性大腸炎（UC）を含み、その両方は消化管の任意の部分に影響を与えることができる突発性慢性疾患であり、それは多くの好ましくない影響に関連し、長期のUCを患う患者は大腸癌を発症するリスクが高い。現在のIBDの治療は炎症症状を制御することを目的とし、一方で特定の薬剤（例えば、コルチコステロイド、アミノサリチル酸及び標準免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、アザチオプリン及びメトトレキサート））は限られた成功をもたらし、長期的な治療は肝臓障害（例えば、線維症または肝硬変）及び骨髄抑制を引き起こす可能性があり、患者はしばしばそのような治療に抵抗性となり得る。

10

【0211】

一般的な免疫媒介性の慢性皮膚疾患の一群である乾癬は、米国では450万人以上の人々に影響を及ぼし、そのうち150万人が中等度から重症度の疾患を有していると考えられる。更に乾癬患者の10%以上が乾癬性関節炎を発症し、それは関節周囲の骨及び結合組織に損傷を与える。乾癬の根本的な生理学的理解の向上は、例えば疾患の炎症性性質の原因となるTリンパ球及びサイトカインの活性を標的とする薬剤の導入をもたらした。そのような薬剤は、ENBREL（エタネルセプト）、REMICADE（インフリキシマブ）及びHUMIRA（アダリムマブ）を含むTNF-阻害剤（関節リウマチ（RA）の治療でも使用される）、ならびにAMEVIVE（アレファセプト）、RAPTIVA（エファリズマブ）などのT細胞阻害剤を含む。これらの薬剤のいくつかは特定の患者集団である程度有効ではあるが、いずれもすべての患者を効果的に治療することは示さない。

20

30

【0212】

一般的に関節の膜内層（滑膜）の慢性炎症を特徴とするリウマチ性関節炎（RA）は、米国人口の約1%または米国の210万人に影響を与えている。炎症過程におけるTNF-及びIL-1を含むサイトカインの役割の更なる理解により、新種の疾患改変性の抗リウマチ薬（DMARD）の開発及び導入が可能になった。薬剤（いくつかはRAのための治療法と重複する）としては、ENBREL（エタネルセプト）、REMICADE（インフリキシマブ）、HUMIRA（アダリムマブ）及びKINERET（アナキンラ）が挙げられる。これらの薬剤のいくつかは症状を緩和し、構造的損傷の進行を阻害し、特定の患者集団における身体機能を改善するが、有効性の改善、作用の補完機構、及びより少ない/少ない重篤な有害作用を有する代替薬の必要性が依然として存在する。

40

【0213】

現在の治療が症状を軽減するまたは障害の進行を遅らせるだけなので、多発性硬化症（MS）、脳及び脊髄のミエリンの炎症及び瘢痕の多数の領域を含む、重篤な衰弱性の自己免疫疾患を患う対象は特に本明細書に記載のIL-10ポリペプチドによって助けられることができる。

【0214】

同様にIL-10ポリペプチドは、患者の思考、記憶及び言語プロセスを深刻に弱める脳障害であるアルツハイマー病（AD）、ならびに例えば異常運動、固縮及び震動により特徴づけられるCNSの進行性疾患であるパーキンソン病（PD）など、神経改変疾患で苦しめられている対象に対して特に有利となり得る。これらの障害は進行性かつ衰弱性で

50

あり、何の治療剤も使用できない。

【0215】

ウイルス性疾患。ウイルス性疾患におけるIL-10の役割に対する興味が高まっている。IL-10は、受容体結合活性に応じて、促進効果及び抑制効果の両方を生成すると想定されてきた。

【0216】

例えば抗ウイルス免疫及びワクチンの有効性を増加させるために、IL-10の機能を阻害する効果が検討されている(Wilson, E., (2011) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 350: 39-65を参照)。更にヒト免疫不全ウイルス(HIV)機能におけるIL-10の役割が研究されている。ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の複製の阻害に加えて、IL-10は、エフェクター免疫機構の不活性化によるウイルスの存続も促進することができる(Naicker, D., et al., (2009) J. Infect. Dis. 200(3): 448-452)。別の研究では、慢性B型肝炎ウイルス(HBV)感染症における、T細胞免疫を調節することができるB細胞のサブセットを産生するIL-10を同定した。

10

【0217】

上述の研究はIL-10の阻害が有益であり得ることを示しているが、CD8+T細胞の成分を含む特定のウイルス感染は、IL-10の投与による治療及び/または予防の候補であり得る。これは、制御性T細胞及び/またはCD8+T細胞の調節による、特定の癌におけるIL-10が果たす積極的な役割により支持される。

20

【0218】

本開示は、IL-10による治療が有益であり得る、任意のウイルス性疾患、障害及び/もしくは状態の治療または予防におけるIL-10ポリペプチドの使用を想到する。想定されるウイルス性疾患、傷害及び状態の例としては、B型肝炎、C型肝炎、HIV、ヘルペスウイルス及びサイトメガロウイルス(CMV)が含まれる。

【0219】

医薬組成物

本開示のIL-10ポリペプチドは、対象に投与するのに適した組成物の形態であり得る。一般にそのような組成物は、IL-10及び1つ以上の薬学的に許容されるもしくは生理学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤を含む「医薬組成物」である。特定の実施形態では、IL-10ポリペプチドは治療的に許容される量で存在する。医薬組成物は本開示の方法で使用されることができ、したがって例えば医薬組成物は、本明細書に記載される治療法及び予防法ならびに使用を実践するために、*ex vivo*または*in vivo*で対象に投与され得る。

30

【0220】

本開示の医薬組成物は意図される投与方法または投与経路に適合するように製剤化され得て、例示的な投与経路は本明細書に記載される。更に医薬組成物は、本開示により想定される疾患、障害及び状態を治療するまたは予防するために、本明細書に記載される、他の治療的に有効な薬剤または化合物と組み合わせて使用され得る。

【0221】

医薬組成物は通常、治療に有効な量の本開示により想定されるIL-10ポリペプチドと、1つ以上の薬学的及び生理学的に許容される製剤とを含む。好適な薬学的に許容されるもしくは生理学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤は、抗酸化剤(例えば、アスコルビン酸及び重硫酸ナトリウム)、防腐剤(例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチルもしくはn-プロピル、p-ヒドロキシベンゾエート)、乳化剤、懸濁剤、分散剤、溶媒、充填剤、増量剤、洗剤、緩衝剤、ビヒクル、希釈剤ならびに/または補助剤を含むが、これらに限定されない。例えば好適なビヒクルは、生理食塩溶液またはクエン酸緩衝生理食塩水であってよく、可能であれば一般的に非経口投与用の医薬組成物に他の材料が補充される。更なる例示的なビヒクルは、中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水である。当業者は、本明細書で想到する医薬組成物及び投与

40

50

形態に使用することができる様々な緩衝剤を容易に認識するだろう。通常の緩衝液は、薬学的に許容される弱酸、弱塩基またこれらの混合物を含むが、これらに限定されない。一例として緩衝液の成分は、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸及びそれらの塩などの水溶性材料であり得る。許容される緩衝液は、例えばトリス緩衝液、N - (2 - ヒドロキシエチル) ピペラジン - N ' - (2 - エタンスルホン酸) (H E P E S)、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸 (M E S)、2 - (N - モルホリノ) エタンスルホン酸ナトリウム塩 (M E S)、3 - (N - モルホリノ) プロパンスルホン酸 (M O P S)、及びN - トリス [ヒドロキシメチル] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 (T A P S) を含む。

【 0 2 2 2 】

医薬組成物が製剤化された後、溶液、懸濁液、ゲル、エマルション、固体または無水もしくは凍結乾燥された粉末として滅菌バイアルに保管され得る。そのような製剤は、すぐに使用できる形態、使用前に再調製を必要とする凍結乾燥形態、使用前に希釈を必要とする液体形態、または他の許容される形態のいずれかで保管され得る。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、単回使用容器（例えば、単回使用バイアル、アンプル、注射器または自動注入装置（例えば、EpiPen（登録商標）に類似））で提供され、一方、多回使用容器（例えば、多回使用バイアル）は他の実施形態において提供される。任意の薬物送達装置はIL - 10を送達するために使用されることができ、移植物（例えば、移植可能なポンプ）ならびにカテーテル系、低速注入ポンプ及び装置を含み、そのすべては当業者に周知である。一般的に皮下または筋肉内に投与されるデポ注射も、一定の期間にわたり、本明細書に開示されるポリペプチドを放出するために利用され得る。デポ注射は通常固系または油系のいずれかであり、本明細書に記載される製剤成分のうちの少なくとも一つを一般的に含む。当業者は、デポ注射の可能な製剤及び使用に精通している。

【 0 2 2 3 】

医薬組成物は、滅菌の注射可能な水性または油性の懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、本明細書に記載されるそれらの好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁剤を用いた、既知の技術分野に従い製剤化され得る。滅菌の注射用調製物は、例えば1, 3 - ブタンジオール中の溶液などの非毒性の非経口的に許容される希釈剤もしくは溶媒中の、滅菌の注入可能な溶液または懸濁液であってもよい。使用され得る許容可能な希釈剤、溶媒及び分散媒質は、水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム溶液、Cremophor EL（商標）（BASF（Parsippany, NJ））、またはリン酸緩衝食塩水（PBS）、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール）、ならびにそれらの好適な混合物を含む。更に滅菌の固定油は、溶媒または懸濁媒質として常用されている。この目的のために、合成モノまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激性固定油を用いてもよい。更にオレイン酸などの脂肪酸は、注射可能物の調製に用途を見出す。特定の注射用製剤の持続的吸収は、吸収を遅延させる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチン）を含むことにより達成される。

【 0 2 2 4 】

活性成分を含有する医薬組成物は、例えば錠剤、カプセル、トローチ剤、ドロップ剤、水性もしくは油性懸濁液、分散性粉末もしくは顆粒、エマルション、硬カプセルもしくは軟カプセル、またはシロップ、溶液、ミクロビーズ、またはエリキシル剤として、経口使用に好適な形態であり得る。経口使用を目的とする医薬組成物は、医薬組成物の製造の分野に公知の任意の方法に従い調製されることができ、そのような組成物は、薬学的に優れたかつ美味の調製物を提供するために、例えば甘味剤、香味剤、着色剤及び防腐剤などの一つ以上の薬剤を含有することができる。錠剤、カプセルなどは、錠剤の製造に適する非毒性の薬学的に許容される賦形剤との混合物中に活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウムなどの希釈剤；例えばコーンスターチまたはアルギン酸などの顆粒剤及び崩壊剤；例えばデンプン、ゼラチンまたはアカシアなどの結合剤；ならびに例えばステアリ

10

20

30

40

50

ン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクなどの潤滑剤であり得る。

【0225】

経口投与に適した錠剤、カプセルなどは、消化管における崩壊及び吸収を遅らせ、それによって持続作用を提供するための既知の技法によりコーティングされても、されなくてもよい。例えばモノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの徐放化材料を用いてもよい。それらは当該技術分野に公知の技法によりコーティングされ、制御放出用の浸透性治療錠剤を形成することができる。追加の薬剤は、投与した組成物の送達を制御するために、ポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、エチレン-酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、もしくはラクチド/グリコリドコポリマー、ポリラクチド/グリコリドコポリマー、またはエチレン酢酸ビニルコポリマーなどの生分解性もしくは生体適合性粒子またはポリマー物質を含む。例えば経口剤は、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルもしくはポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルの使用により、それぞれ、コアセルベーション技法により、もしくは界面重合により調製されたマイクロカプセル、またはコロイド薬物送達系に封入され得る。コロイド状分散系は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロ球体、ミクロビーズ、及び脂質に基づく系を含んでおり、それは水中油型エマルション、ミセル、混合されたミセル及びリポソームを含む上述の製剤を調製するための方法は当業者に明らかである。

10

【0226】

経口使用のための製剤は、活性成分が、不活性固形希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリン、または微結晶セルロースと混合される硬ゼラチンカプセルとして、あるいは活性成分が、水、または油性媒質、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィン、もしくはオリーブ油と混合される軟ゼラチンカプセルとして、提示されてもよい。

20

【0227】

水性懸濁液は、その製造に適した賦形剤との混合物中に活性材料を含有する。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガントガム、及びアカシアガムであり、分散剤もしくは湿潤剤は、天然のホスファチド(例えば、レシチン)、またはアルキレンオキシドと脂肪酸の縮合物(例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン)、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールの縮合物(例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール)、またはエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステルの縮合物(例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート)、またはエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステルの縮合物(例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート)であり得る。水性懸濁液は、1つ以上の防腐剤も含み得る。

30

【0228】

油性懸濁液は、活性成分を植物油、例えば落花生油、オリーブ油、ゴマ油もしくはヤシ油中に、または流動パラフィンなどの鉱物油中に懸濁させることによって製剤化され得る。油性懸濁液は、増粘剤、例えば蜜蝋、固形パラフィンまたはセチルアルコールを含有し得る。上述のものなどの甘味剤及び香味剤は、美味の経口調製物を提供するために添加され得る。

40

【0229】

水の添加によって水性懸濁液の調製に適した分散性粉末及び顆粒は、分散剤または湿潤剤、懸濁剤、及び1つ以上の防腐剤との混合物中に活性成分を提供する。好適な分散剤もしくは湿潤剤、及び懸濁剤は、本明細書において例示される。

【0230】

本開示の医薬組成物は、水中油型エマルションの形態であってもよい。油相は、植物油、例えばオリーブ油もしくは落花生油、または鉱物油、例えば流動パラフィン、またはこれらの混合物であり得る。好適な乳化剤は、天然起源のガム(例えば、アカシアガムもしくはトラガントガム)、天然起源のホスファチド(例えば、大豆、レシチン、及び脂肪酸

50

由来のエステルまたは部分エステル)、ヘキシトール無水物(例えば、ソルビタンモノオレエート)、ならびに部分エステルとエチレンオキシドの縮合物(例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート)であり得る。

【0231】

製剤は、移植片、リポソーム、ヒドロゲル、プロドラッグ、及びマイクロ封入された送達系を含む制御放出製剤などの、迅速な分解または身体からの排除に対して組成物を保護するための担体も含み得る。例えば、モノステアリン酸グリセリル、もしくはステアリン酸グリセリルなどの徐放化材料が単独でまたは蠟との組み合わせで用いてもよい。

【0232】

本開示は、直腸投与用の坐剤の形態でのIL-10ポリペプチドの投与を想定する。坐剤は、通常の温度では固体であるが、直腸温度で液体であり、したがって薬物を放出するために直腸で融解する好適な非刺激性賦形剤と、薬物を混合することにより調製され得る。そのような材料は、カカオバター及びポリエチレングリコールを含むが、これらに限定されない。

10

【0233】

本開示により想定されるIL-10ポリペプチドは、現在既知の、また将来開発される任意の他の好適な医薬組成物の形態(例えば、鼻または吸入用途のためのスプレー)であり得る。

【0234】

製剤中のポリペプチドまたはその断片の濃度は、広く変動し得て(例えば、約0.1重量%未満、通常約2重量%または少なくとも2重量%~20重量%程度~50重量%以上)、主に、例えば選択される特定の投与形態による、流体量、粘度、及び対象に基づく要因に基づき、通常選択される。

20

投与経路

【0235】

本開示は、任意の適切な方法でIL-10及びその組成物の投与を想定する。好適な投与経路は、非経口(例えば筋肉内、静脈内、皮下(例えば注射または移植片)、腹腔内、大槽内、関節内、腹腔内、脳内(実質内)及び脳室内)、経口、経鼻、経膈、舌下、眼内、直腸内、局所(例えば経皮)、舌下ならびに吸入を含む。一般的に皮下または筋肉内に投与されるデポ注射も、一定の期間にわたり、本明細書に開示されるIL-10ポリペプチドを放出するために利用され得る。

30

【0236】

本開示の特定の実施形態は非経口投与を想到し、更なる特定の実施形態で非経口投与は皮下である。

【0237】

併用療法

本開示は、1つ以上の活性治療剤(例えばサイトカイン)または他の予防または治療法(例えば放射線)と併用した、IL-10(例えばPEG-IL-10)の使用を想定する。そのような併用療法では、様々な活性剤は、往々にして、異なる作用機序を有する。そのような併用療法は、薬剤のうちの1つ以上の用量減少を可能にし、それによって、薬剤のうちの1つ以上に関連する有害な作用を減少させる、または排除することにより特に有益であり、更にそのような併用療法は、基礎疾患、障害もしくは状態に対して相乗治療または予防作用を有し得る。

40

【0238】

本明細書で使用される「併用」とは、別個に投与され得る、例えば別個に投与するために別個に製剤化される(例えばキットに提供され得るような)療法、及び単一の製剤で一緒に投与され得る(すなわち、共製剤化)療法を含むことが意味される。

【0239】

特定の実施形態では、IL-10ポリペプチドは、順次投与される、または適用される、例えば1つの薬剤が1つ以上の他の薬剤の前に投与される。他の実施形態では、IL-

50

10 ポリペプチドは、同時に投与される、例えば2つ以上の薬剤が同時にまたはほぼ同時に投与されて、2つ以上の薬剤は、2つ以上の別個の製剤中に存在する、または単一製剤に組み合わされ得る（すなわち、共製剤化）。2つ以上の薬剤が順次にまたは同時に投与されるかに関わらず、それらは本開示の目的のために併用して投与されると考えられる。

【0240】

本開示のIL-10ポリペプチドは、その状況下で適切なあらゆる方法で、1つ以上の他の（活性）薬剤と組み合わせて用いられてもよい。一実施形態では、少なくとも1つの活性剤、及び少なくとも1つの本開示のIL-10ポリペプチドを用いた治療は、一定の期間にわたり維持される。別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた治療は縮小される、または中断される（例えば、対象が安定しているとき）一方で、本開示のIL-10ポリペプチドを用いた治療は一定の投薬レジメンで維持される。更なる実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた治療は縮小される、または中断される（例えば、対象が安定しているとき）一方で、本開示のIL-10ポリペプチドを用いた治療は縮小される（例えば、低投与量、投薬頻度の減少、または治療レジメンの短縮）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた治療は縮小される、または中断される（例えば、対象が安定しているとき）一方で、本開示のIL-10ポリペプチドを用いた治療は増加される（例えば、高投与量、投薬頻度の増加、または治療レジメンの延長）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた治療は維持されて、本開示のIL-10ポリペプチドを用いた治療は縮小される、または中断される（例えば、低投与量、投薬頻度の減少、または治療レジメンの短縮）。更に別の実施形態では、少なくとも1つの活性剤を用いた治療、及び本開示のIL-10ポリペプチドを用いた治療は縮小される、または中断される（例えば、低投与量、投薬頻度の減少、または治療レジメンの短縮）。

【0241】

線維症関連障害及び癌：本開示は、増殖性状態、癌、腫瘍もしくは前癌性疾患、障害もしくは状態を、IL-10ポリペプチド（例えばPEG-IL-10）及び少なくとも1つの追加の治療薬もしくは診断薬で治療するならびに/または予防するための方法を提供する。

【0242】

化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロホスファミドなどのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドローパ、カルボコン、メツレドローパ、及びウレドローパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド及びトリメチロールメラミンを含むエチレンイミン及びメチレンイミン；チオランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキソ塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロノマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピュロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質；メトトレキセート及び5-フルオロウラシル（5-FU）などの抗代謝産物；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステ

ロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオンスタノール、メピチオステイン、テストラクトンなどのアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトテイン、トリロステインなどの抗副腎抗体；フォリン酸などの葉酸補充液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキセート；デホファミン；デメコルチン；ジアジコン；エルホルミチン；エリブチニウム酢酸塩；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピタモール；ニトラクリン；ペントスタチン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ポドフィン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；ラゾキサソ；シゾフィラン；シピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2, 2 - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラピノシド (Ara - C)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル及びドセタキセル；クロラムブシル；ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金及び白金配位錯体；ピンラスチン；エトボシド (VP - 16)；イホスファミド；マイトマイシン C；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT 11；トポイソメラーゼ阻害剤；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)、レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタピン；及び上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

【0243】

化学療法剤は、抗エストロゲンなどの腫瘍に対するホルモン作用を調節し、または阻害するように作用する、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、4 (5) - イミダゾールを阻害するアロマトラーゼ、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、オナプリストン、及びトレミフェンを含む、抗ホルモン剤；及び、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン；及び薬学的に許容される塩、酸または上記のいずれかの誘導体も含有する。特定の実施形態において、併用療法は、ホルモンまたは関連ホルモン剤の投与を含む。

【0244】

IL - 10 ポリペプチドと組み合わせて用いることができる追加の治療法は、IL - 12、INF γ もしくは抗上皮成長因子受容体などのサイトカインもしくはサイトカインアンタゴニスト、放射線療法、他の腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体、モノクローナル抗体及び毒素の複合体、T細胞アジュバント、骨髄移植、または抗原提示細胞（例えば、樹状細胞療法）を含む。ワクチン（例えば、可溶性タンパク質として、またはタンパク質をコードする核酸として）も、本明細書に提供される。

30

【0245】

心臓血管疾患本開示は、特定の心血管関連及び/または代謝関連疾患、障害及び状態、ならびにそれに関係した疾患を、IL - 10 ポリペプチド（例えば、PEG - IL - 10）及び少なくとも1つの付加的な治療または診断剤で、治療及び/または予防する方法を提供する。

40

【0246】

高コレステロール血症（及び、したがってしばしばアテローム性動脈硬化）の治療のための併用療法に有用な治療薬の例としては、コレステロールの酵素的合成を阻害するスタチン（例えば、CRESTOR、LESCOL、LIPITOR、MEVACOR、PRAVACOL及びZOCOR）；コレステロールを分離してその吸収を予防する胆汁酸樹脂（例えば、COLESTID、LO - CHOLEST、PREVALITE、QUESTRAN及びWELCHOL）；コレステロール吸収を抑止するエゼチミブ（ZETIA）；トリグリセリドを低減してHDLを穏当に増大させ得るフィブリン酸（例えば、TRICOR）；LDLコレステロール及びトリグリセリドを穏当に低下させるナイアシン（例えば、NIACOR）；及び/または前述の組み合わせ（例えば、VYTORIN（シ

50

ンバスタチンと共にエゼチミブ))が挙げられる。本明細書に記載のIL-10ポリペプチドと組み合わせて使用するための候補となり得る代替的なコレステロール治療は、様々な栄養補助成分及び薬草(例えば、ニンニク、ポリコサノール及びグッグル)を含む。本開示は、上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を包含する。

【0247】

免疫及び炎症状態。本開示は、免疫関連及び/もしくは炎症性関連の疾患、障害及び状態、ならびにそれに関係した疾患を、IL-10ポリペプチド(例えば、PEG-IL-10)ならびに少なくとも1つの追加の治療もしくは診断薬で、治療ならびに/または予防する方法を提供する。

【0248】

併用療法において有用な治療薬の例としては、アスピリン、イブプロフェンならびに他のプロピオン酸誘導体(アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ブクロクス酸、カルプロフェン、フェンブフェン、フェノプロフェン、フルプロフェン、フルルビプロフェン、インドプロフェン、ケトプロフェン、ミロプロフェン、ナプロキセン、オキサプロジン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、スプロフェン、チアプロフェン酸及びチオキサプロフェン)などの非ステロイド系の抗炎症薬(NSAID)、酢酸誘導体(インドメタシン、アセメタシン、アルクロフェナック、クリダナク、ジクロフェナク、フェンクロフェナク、フェンクロジン酸、フェンチアザク、フィロフェナック、イブフェナック、イソキセパック、オキシピナック、スリンダク、チオピナク、トルメチン、ジドメタシン、及びゾメピラク)、フェナム酸誘導体(フルフェナム酸、メクロフェナム酸、メフェナム酸、ニフルム酸及びトルフェナム酸)、ピフェニルカルボン酸誘導体(ジフルニサル及びフルフェニサル)、オキシカム(イソキシカム、ピロキシカム、スドキシカム及びテノキシカム)、サリチル酸(アセチルサリチル酸、スルファサラジン)ならびにピラゾロン(アパゾン、ベンゾピペリロン、フェブラゾン、モフェブタゾン、オキシフェンブタゾン、フェニルブタゾン)が挙げられるが、これらに限定されない。他の組み合わせは、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)阻害剤が含まれる。

【0249】

組み合わせのための他の活性剤は、プレドニゾロン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、ベタメタゾン、デキサメタゾン、またはヒドロコルチゾンなどのステロイドが含まれる。現在のIL-10ポリペプチドと組み合わせて患者を治療する場合に必要なステロイドの投与量を漸減させることにより、ステロイドの1つ以上の副作用を低減または排除できるため、このような組み合わせは特に有利となり得る。

【0250】

例えばリウマチ性関節炎の治療のために組み合わせる活性剤の更なる例としては、サイトカイン抑制抗炎症剤(CSAID)(複数可);他のヒトサイトカインまたは成長因子に対する抗体または拮抗薬、例えばTNF、LT、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGFまたはPDGFを含む。

【0251】

活性剤の特定の組み合わせは、自己免疫及びその後炎症カスケードの異なる時点で妨げることができて、TNF拮抗剤(例えばキメラ、ヒト化またはヒトTNF抗体)、REMICADE、抗TNF抗体フラグメント(例えば、CDP870)及び可溶性p55またはp75TNF受容体(その誘導剤、p75TNFR1gG(ENBRELV)またはp55TNFR1gG(LENERCEPT))を含むことができ、可溶性IL-13受容体(sIL-13)、更にはTNF変換酵素(TACE)阻害剤、同様にIL-1阻害剤(例えば、インターロイキン-1-変換酵素阻害剤)も効果的であり得る。他の組み合わせは、インターロイキン11、抗P7及びp-セレクチン糖タンパク質リガンド(PSGL)を含む。本明細書に記載のIL-10ポリペプチドと組み合わせて有用な薬剤の他の例は、インターフェロン-1a(AVONEX)、インターフェロン-1b(BETASERON)、コパキソン、高圧酸素、静注用免疫グロブリン、クラブリピン、ならび

10

20

30

40

50

に他のヒトサイトカインもしくは成長因子の抗体またはアンタゴニスト（例えば、CD40リガンド及びCD80に対する抗体）を含む。

【0252】

本開示は、上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を包含する。

【0253】

ウイルス性疾患。本開示は、ウイルス性疾患、障害及び状態、ならびにそれに関係した疾患を、IL-10ポリペプチド（例えば、PEG-IL-10）及び少なくとも1つの付加的な治療または診断薬（例えば、1つ以上の他の抗ウイルス剤及び/または1つ以上の他の非ウイルス剤）で、治療及び/または予防する方法を提供する。

【0254】

このような併用療法は、ウイルス脱殻阻害剤（例えば、アマンタジン及びリマンチジン）；逆転写酵素阻害剤（例えば、アシクロビル、ジドブジン及びラミブジン）；インテグラーゼを標的とする薬剤；ウイルスDNAへの転写因子の結合をブロックする薬剤；翻訳に影響を与える薬剤（例えば、アンチセンス分子）（例えば、ホミビルセン）；翻訳/リボザイム機能を調節する薬剤；プロテアーゼ阻害剤；ウイルス組み合わせ調節剤（例えば、リファンピシン）；ウイルス粒子（例えば、ザナミビル及びオセルタミビル）の放出を防止する薬剤を含む、様々なウイルスのライフサイクルステージを標的とし、異なる作用機構を有する抗ウイルス剤が含まれるが、これらに限定されない。特定のウイルス感染（例えば、HIV）の治療及び/または予防は、しばしば、抗ウイルス剤の群（「カクテル」）を伴う。

【0255】

IL-10ポリペプチドと組み合わせて使用するために意図される他の抗ウイルス剤としては、アバカビル、アデフォビル、アマンタジン、アンプレナビル、アンプリゲン、アルビドール、アタザナビル、アトリプラ、ボセプレビルテット、シドフォビル、コンビビル、ダルナビル、デラビルジン、ジダノシン、ドコサノール、エンドクスジン、エファビレンツ、エムトリシタピン、エンフビルチド、エンテカビル、ファムシクロビル、ホスアンプレナビル、ホスカルネット、ホスホネット、ガンシクロビル、イバシタピン、イムノビル、イドクスウリジン、イミキモド、インジナビル、イノシン、様々なインターフェロン（例えば、ペグインターフェロン-2a）、ロピナビル、ロビリド、マラビロク、モロキシジン、メチサゾン、ネルフィナビル、ネビラピン、ネクサビル、ペンシクロビル、ペラミビル、プレコナリル、ポドフィロトキシン、ラルテグラビル、リバビリン、リトナビル、ピラミジン、サキナビル、スタブジン、テラプレビル、テノホビル、チプラナビル、トリフルリジン、トリジビル、トロマンタジン、ツルバダ、バラシクロビル、バルガンシクロビル、ビクリピロク、ビダラピン、ピラミジン、及びザルシタピンを含むが、これらに限定されない。

【0256】

本開示は、上述のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体を包含する。

【0257】

投与量

本開示のIL-10ポリペプチドは、例えば投与の目標（例えば所望の消失の程度）；製剤が投与される対象の年齢、体重、性別ならびに健康及び身体状態；投与経路；ならびに疾患、障害、状態またはその症状の性質に依存する量で対象に投与され得る。投薬レジメンは、投与される薬剤（複数可）に関連する任意の副作用の存在、性質、及び程度も考慮に入れることができる。有効投与量及び投与レジメンは、例えば安全性及び用量漸増試験、in vivo試験（例えば、動物モデル）、及び当業者に周知の他の方法により容易に決定することができる。

【0258】

本開示は、特定の血清中トラフ濃度を達成するため及び/または特定の平均血清中トラフ濃度を維持するための、IL-10の投与を想定する。IL-10に特異的な手順が、本明細書の他の部分及びこの下記の項に記載される。

【0259】

一般に投薬パラメータは、対象に不可逆的に有害であり得る量未満（すなわち最大耐用量、「MTD」）の投与量であり、対象に対して測定可能な作用を生成するために必要とされる量未満ではないことを必要とする。そのような量は、投与経路及び他の要因を考慮に入れる、例えばADMEに関連する薬物動態及び薬力学パラメータにより決定される。

【0260】

有効量（ED）は、それを服用する対象のいくらかの割合において、治療反応または所望の作用を生成する薬剤の投与量または量である。薬剤の「半有効量」またはED50は、それを投与される集団の50%において、治療反応または所望の作用を生成する薬剤の投与量または量である。ED50は通常、薬剤の作用の妥当な予測の手段として使用されるが、臨床医がすべての関連要因を考慮に入れた、適切であると判断し得る投与量とは限らない。したがっていくつかの場合では、有効量は算出したED50超であり、他の場合では有効量は算出したED50未満であり、また他の場合では有効量は算出したED50と同じである。

10

【0261】

更に本開示のIL-10ポリペプチドの有効量は、対象に1つ以上の投与量で投与されたとき、健康な対象に対して所望の結果を生成する量であり得る。例えば特定の障害を経験する対象に関して、有効量とは、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または90%超だけその障害の診断パラメータ、指標、マーカーなどを改善するものであり得て、100%とは通常の対象によって示される診断パラメータ、指標、標識などとして定義される。

20

【0262】

本明細書に記載の疾患、障害または状態を治療するために必要なPEG-IL-10の量は、共役タンパク質のIL-10活性を基準にしており、それは、当該技術分野において周知のIL-10活性アッセイによって決定され得る。一例として、腫瘍と関連して、適切なIL-10活性は、例えば腫瘍部位内へのCD8+T細胞の浸潤、これらの浸潤状の細胞からのIFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10及びRANK-Lなどの炎症サイトカインの発現、ならびに生体試料中のIFN- γ のレベルの増加を含む。

30

【0263】

IL-10薬の治療に有効な量は、約0.01~約100 μ gタンパク質/体重kg/日、約0.1~20 μ gタンパク質/体重kg/日、約0.5~10 μ gタンパク質/体重kg/日、または約1~4 μ gタンパク質/体重kg/日の範囲であり得る。いくつかの実施形態ではIL-10薬を連続注入によって投与し、約50~800 μ gタンパク質/kg/体重kg/日を送達する（例えば、約1~16 μ gタンパク質/体重kg/日のIL-10薬）。注入速度は、例えば副作用及び血液中細胞数の評価に基づいて変えることができる。

【0264】

経口剤の投与に関して、組成物は、1.0~1000ミリグラムの活性成分、特に1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0及び1000.0ミリグラムの活性成分を含有する、錠剤、カプセルなどの形態で提供され得る。

40

【0265】

IL-10ポリペプチドのための特定の投薬レジメン（例えば投薬頻度）は、本明細書の他の部分に記載される。

【0266】

特定の実施形態では、開示されるIL-10ポリペプチドの投与量は、「単位投与形態」内に含有される。「単位投与形態」という語句は物理的に分離した単位を指し、各単位

50

は、単独または1つ以上の追加の薬剤との併用のいずれかで、所望の作用を生成するのに十分な既定量の本開示のIL-10ポリペプチドを含有する。単位投与形態のパラメータは、達成される特定の薬剤及び作用に依存することが理解される。

【0267】

キット

本開示は、IL-10及びその医薬組成物を含むキットも想定する。キットは一般的に、以下に記載される様々な成分を収容する物理的構造の形態であり、例えば、上述の方法を実践する（例えば、コレステロール恒常性の回復を必要とする対象へのIL-10ポリペプチドの投与）際に利用され得る。

【0268】

キットは、対象に投与するのに適した医薬組成物の形態であり得る、本明細書に開示されるIL-10ポリペプチドのうちの一つ以上を含み得る（例えば、滅菌容器に提供される）。IL-10ポリペプチドは、すぐに使用できる形態で、または例えば投与前に再構成または希釈を必要とする形態で提供され得る。IL-10ポリペプチドが使用者によって再構成される必要がある形態であるとき、キットは緩衝液、薬学的に許容される賦形剤なども含み、IL-10ポリペプチドと一緒にまたは別個にパッケージされ得る。併用療法が想定されるとき、キットは別個にいくつかの薬剤を含有する、またはそれらはキットに既に組み合わされてよい。キットの各成分は個々の容器内に密閉され得て、様々な容器のすべては単一のパッケージ内にあり得る。本開示のキットは、その中に収容された成分を適切に保持するのに必要な状態（例えば、冷却または凍結）に設計され得る。

【0269】

キットは、その中の成分についての情報及びそれらの使用説明書（例えば作用機序、薬物動態及び薬力学、有害作用、禁忌などを含む、活性成分の投薬パラメータ、臨床薬理）を特定することを含む、ラベルまたは添付文書を含み得る。ラベルまたは文書は、ロット番号及び使用期限などの製造情報を含み得る。ラベルまたは添付文書は、例えば成分を収容する物理構造に統合される、物理的構造内に別個に収容される、またはキットの要素（例えばアンプル、チューブもしくはバイアル）に添付され得る。

【0270】

ラベルまたは添付文書は、ディスク（例えばハードディスク、カード、メモリディスク）、光学ディスク（CD-もしくはDVD-ROM/RAMなど）、DVD、MP3、磁気テープもしくは電気記憶媒体（RAM及びROMなど）、もしくはこれらのハイブリッド（磁気/光学記憶媒体、FLASHメディアもしくはメモリ型カードなど）などのコンピュータ可読媒体を更に含む、またはそれに組み込むことができる。いくつかの実施形態では、実際の説明書は、キットに存在しないが、例えばインターネットを介して遠隔源から説明書を得るための手段が提供される。

【0271】

実験

以下の実施例は、当業者に本発明をどのように作製及び使用するかの完全な開示及び説明を提供するように提示され、本発明者が自身の発明と見なすものの範囲を限定するようには意図されておらず、以下の実験が実施された及びすべての実験が実施され得ることを示すようにも意図されていない。現在形で書かれた例示の記述は必ずしも実施されたものとは限らず、むしろ、説明は、本明細書に記述されたデータなどを生成するために実施できることと理解すべきであろう。使用される数字（例えば量、温度など）に関して正確さを保証するために努力がはらわれているが、いくつかの実験誤差及び偏差があることを考慮すべきであろう。

【0272】

特に指示のない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏（ $^{\circ}\text{C}$ ）であり、及び圧力は大気圧またはそれに近い圧力である。下記の標準的略号を使用する：bp = 塩基対（複数可）；kb = キロ塩基（複数可）；pl = ピコリットル（複数可）；sまたはsec = 秒（複数可）；min = 分（複数可）；hまたはhr = 時間（複

10

20

30

40

50

数可) ; a a = アミノ酸 (複数可) ; k b = キロ塩基 (複数可) ; n t = ヌクレオチド (複数可) ; n g = ナノグラム ; μ g = マイクログラム ; m g = ミリグラム ; g = グラム ; k g = キログラム ; d l または d L = デシリットル ; μ l または μ L = マイクロリットル ; m l または m L = ミリリットル ; l または L = リットル ; μ M = マイクロモル濃度 ; m M = ミリモル濃度 ; M = モル濃度 ; k D a = キロダルトン ; i . m . = 筋肉内 (に) ; i . p . = 腹腔内 (に) ; i . v または I V = 静脈内 (に) ; s . c . または S C = 経皮的 (に) ; Q D = 日毎 ; B I D = 1日に2回 ; Q W = 週毎 ; Q M = 月毎 ; H P L C = 高速液体クロマトグラフィー ; B W = 体重 ; U = ユニット ; n s = 統計的に有意ではない ; P B S = リン酸塩 - 生理食塩水緩衝液 ; P C R = ポリメラーゼ連鎖反応 ; N H S = N - ヒドロキシスクシンイミド ; D M E M = ダルベッコ変法イーグル培養液 ; G C = ゲノムコピー ; E D T A = エチレンジアミン四酢酸。

10

【0273】

材料及び方法

下記の一般的な材料及び方法を、以下の実施例で使用する。

【0274】

分子生物学での標準的な方法は記載されている (例えば、Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 及び Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1 - 4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. 参照、それは、細菌細胞及びDNA突然変異誘発のクローニング (Vol. 1)、哺乳動物細胞及び酵母のクローニング (Vol. 2)、複合多糖及びタンパク質の発現 (Vol. 3) 及び生物情報学 (Vol. 4) について記載する。

20

【0275】

科学文献には、免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離、及び結晶化、ならびに化学分析、化学改変、翻訳後改変、融合タンパク質の産生、及びタンパク質のグリコシル化を含むタンパク質精製のための方法が記載されている (例えば、Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vols. 1 - 2, John Wiley and Sons, Inc., NY 参照)。

30

【0276】

ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の産生、精製及びフラグメント化が下記に記載されている (例えば Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 参照)。リガンド/受容体相互作用を特徴づけるための標準的な技術が利用可能である (例えば Coligan et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., NY 参照)。蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含むフローサイトメトリーのための方法が利用可能である (例えば Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ 参照)。例えば診断試薬としての使用のための、核酸プライマー及びプローブ、ポリペプチドならびに抗体を含む核酸を改変するのに適した蛍光試薬が利用可能である (*Molecular Probes* (2003) *Catalogue*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; *Sigma-Aldrich* (2003) *Catalogue*, St. Louis, MO.)。

40

【0277】

免疫系の組織学の標準的な方法が記載されている (例えば Louis et al. (2002) *Basic Histology: Text and Atlas*, McGr

50

aw - Hill , New York , NY 参照)。

【 0 2 7 8 】

免疫細胞 (CD 4 + 及び CD 8 + T 細胞) の欠失は、抗体媒介性の消失により行うことができる。例えば 2 5 0 μ g の CD 4 - または CD 8 - 特異的抗体を毎週注射して、細胞欠失は F A C S 及び I H C 分析を用いて確認できる。

【 0 2 7 9 】

例えば、抗原性フラグメント、リーダー配列、タンパク質折り畳み、機能ドメイン、グリコシル化部位、及び配列アラインメントを決定するためのソフトウェアのパッケージ及びデータベースが利用可能である (例えば、G C G W i s c o n s i n P a c k a g e (A c c e l r y s , I n c . , S a n D i e g o , C A) 及び DeCypher (商標) (T i m e L o g i c C o r p . , C r y s t a l B a y , N V) 参照)。

10

【 0 2 8 0 】

免疫応答性 B a l b / C または B 細胞 - 欠損 B a l b / C マウスを、J a c k s o n L a b . (B a r H a r b o r , M E) から入手して、標準法に従い使用できる (例えば、M a r t i n e t a l (2 0 0 1) I n f e c t . I m m u n . , 6 9 (1 1) : 7 0 6 7 - 7 3 a n d C o m p t o n e t a l . (2 0 0 4) C o m p . M e d . 5 4 (6) : 6 8 1 - 8 9 参照)。本開示により想到される実験作業に適した他のマウス株は当業者に既知であり、一般的には J a c k s o n L a b から入手可能である。

【 0 2 8 1 】

特に明記しない限り、皮膚の P D V 6 扁平上皮癌が、ここに記載される実験に用いられた (例えば、L a n g o w s k i e t a l . (2 0 0 6) N a t u r e 4 4 2 : 4 6 1 - 4 6 5 を参照)。E p 2 乳癌、C T 2 6 結腸癌腫、及び 4 T 1 乳癌モデル等の他の腫瘍学関連モデル及び細胞株が、使用可能であり (L a n g o w s k i e t a l . (2 0 0 6) N a t u r e 4 4 2 : 4 6 1 - 4 6 5 を参照)、これは当業者に知られている。また、腫瘍学非関連モデル及び細胞株 (例えば炎症のモデル) を用いてもよく、これは当業者にも知られている。

20

【 0 2 8 2 】

血清中 I L - 1 0 濃度レベル及び曝露レベルは、当該技術分野で使用される標準的な方法により決定することができる。例えば血清曝露レベルのアッセイは、全血 (約 5 0 μ l / マウス) をマウスの尻尾切断から毛細管に採取して、遠心分離により血清及び血液細胞を分離し、標準的な E L I S A キットと技術により、I L - 1 0 曝露レベルを決定することにより実施できる。I L - 1 0 血清中濃度を決定する更なる手段が、この後に記載される。

30

【 0 2 8 3 】

本開示は、当業者に知られているあらゆる手段での P E G 化 I L - 1 0 の合成を想定する (例えば、米国特許第 7 , 0 5 2 , 6 8 6 号及び米国特許公開第 2 0 1 1 / 0 2 5 0 1 6 3 号を参照のこと)。

【 0 2 8 4 】

表 1 5 までの下記の材料及びその説明は、米国特許公開第 2 0 1 1 / 0 0 9 1 4 1 9 号 (米国特許公開第 2 0 1 1 / 0 0 9 1 4 1 9 号の共同発明者は本出願の発明者でもある) から流用されており、ならびにその教示及びその変形は広く適用でき、多数の異なる文脈で利用される及び / または改変される。同様に、関連分野及び / または技術領域の他の公開の教示 (例えば、米国特許第 6 , 3 8 7 , 3 6 4 号及び同第 7 , 0 5 2 , 6 8 4 号、ならびに P C T 公開第 W O 2 0 0 6 / 0 7 5 1 3 8 号を参照) は、当業者の総合的な知識とあいまって、更なる実験研究の基礎を形成することができる。

40

【 0 2 8 5 】

腫瘍モデル及び腫瘍分析

当技術分野で認められたあらゆる腫瘍モデル、アッセイなどを用いて、様々な腫瘍に関する I L - 1 0 及び P E G - I L - 1 0 の効果を評価することができる。この後記載される腫瘍モデル及び腫瘍分析は、利用可能なものの代表であり、それらを用いて、表 1 ~ 表

50

15に記載されたデータを生成し、評価する。

【0286】

同系マウス腫瘍細胞は、腫瘍接種当たり10⁴、10⁵または10⁶細胞で、皮下にまたは皮内に注射される。EP2乳癌、CT26結腸癌、皮膚のPDV6扁平上皮癌、及び4T1乳癌モデルを用いることができる(例えば、Langowski et al. (2006) Nature 442: 461-465参照)。免疫適格Balb/CまたはB細胞欠損Balb/Cマウスを使用することができる。PEG-mIL-10を免疫適格マウスに投与することができる一方で、PEG-hIL-10治療をB細胞欠損マウスに用いることができる。腫瘍は、治療を開始する前に100~250mm³の大きさに到達させる。IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10または緩衝対照を、腫瘍移植から離れた部位に皮下投与する。腫瘍増殖は通常、電子カリパスを用いて週2回監視する。

10

【0287】

多くの炎症マーカー用のmRNAの発現を測定するために、及びいくつかの炎症細胞マーカー用の免疫組織化学を行うために、腫瘍組織及びリンパ器官を様々なエンドポイントで採取した。組織を液体窒素中で急速凍結し、-80で保存する。一次腫瘍の増殖は通常、電子カリパスを用いて週2回監視する。腫瘍容積は式(幅²×長さ/2)を用いて計算でき、長さは長い方の寸法である腫瘍は、治療を開始する前に90~250mm³の大きさに到達させる。

20

【0288】

IL-10及び/またはPEG-IL-10の投与

上記の腫瘍モデル及び癌分析法を利用して、以下に記載するデータを生成した。しかし、上述のように、これらと同じモデル及び手順を他の実験の設定に用いてもよい。

【0289】

マウスIL-10(mIL-10)またはPEG-mIL-10を、免疫適格マウスに投与し、一方PEG-hIL-10処置がB細胞欠損マウスに用いられた。マウスIL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10またはビヒクル対照は、腫瘍移植から離れた部位に皮下投与された。これらの試験に使用したPEG-mIL-10は、Sc-PEG-12Kのリンカーで調製された。mIL-10及びPEG-mIL-10の生物活性を、内因性mIL-10受容体(R1及びR2)を発現するマウス肥満細胞株である、MC/9を利用した短期増殖バイオアッセイを適用して評価した。MC/9細胞は、mIL-4及びmIL-10の同時刺激に反応して増殖する(MC/9細胞は、mIL-4またはmIL-10のみでは増殖しない)。アラマーブルー、代謝活性の検出に基づく成長指標染料を用いた比色分析で、増殖を計測した。組み換え型またはPEG-mIL-10の生物活性は、EC50値、または最大半量の刺激が用量反応曲線で観察されるときタンパク質の濃度により評価された(表1)。

30

表1

この実験で使用するmIL-10及びPEG-mIL10 試薬の生物活性の評価のためのMC/9増殖バイオアッセイ	
タンパク質	MC/9アッセイのEC50 (ng/mL)
mIL-10	0.5711
PEG-mIL-10	4.039

40

【0290】

50

表 1 に示すように、M C / 9 バイオアッセイに基づき、実験に使用した P E G - m I L - 1 0 の比活性は、m I L - 1 0 の活性より約 7 倍低かった。

【 0 2 9 1 】

E p 2 乳癌腫瘍を内部に持つマウスに、P E G - m I L - 1 0 を 2 日毎に投与してもよい。処置は、腫瘍のサイズの縮小及び腫瘍の拒絶の誘発に効果的であった。

表 2

P E G m I L - 1 0 は、B a l b / C マウスの E p 2 乳癌モデルの腫瘍サイズ (m m ³) を減らす。							
	播種後の日数						
	11	15	18	21	25	27	33
対照	300	450	500	750	1300	1500	2700
PEG-IL-10	300	400	310	280	250	50	0

10

【 0 2 9 2 】

P E G - m I L - 1 0 による処置も、P D V 6、C T - 2 6 及び 4 T 1 同系免疫適格マウスの腫瘍モデルの癌サイズ低減にも、効果的であった (表 3、表 4 及び表 5 参照)

20

表 3

実験 04-M52 338 : 移植後 36 日で開始した PEG-mIL-10 は、C57B/6 マウスの PDV6 腫瘍サイズ (mm³) を低減する。

	播種後の日数						
	36	38	42	44	46	48	52
対照	200	255	290	380	395	420	485
PEG-mIL-10	210	265	200	190	155	110	55

10

表 4

移植後開始 7 日目の PEG-mIL-10 は、BALB/c マウスの CT26 腫瘍のビヒクル対照と比較して腫瘍サイズ (mm³) を低減する。

	播種後の日数					
	10	15	17	20	22	24
ビヒクル対照	155	424	791	1274	1737	2170
PEG-mIL-10	136	212	291	336	450	455

20

表 5

IL-10 及び PEG-mIL-10 は、4T1 乳癌の腫瘍サイズ (mm³) を低減する

処理日数	20	24	29	33
対照	200	410	584	1000
PEG-mIL-10	200	320	560	350
IL-10	200	290	575	400

30

【0293】

用量漸増法の検討

用量漸増の試験では、予想されるピーク及びトラフ投与量レベルに想到する時間で、各群の代表的なマウスから尾静脈の出血を収集した。電気化学発光検出とパターン化されたアレイとの組み合わせであるマルチアレイ技術に基づく、Meso Scale Discovery プラットフォームを用いて、採取された血清を mIL-10 濃度について分析した。両側不對スチューデント t 検定を用いて、血清 mIL-10 濃度で分類した mIL-10 - 処理または PEG-mIL-10 - 処理マウスの平均腫瘍容積を、それらに対応するビヒクル対照群の平均腫瘍容積と比較した。2つの群に不等分散 (t 検定から $p < 0.05$) があったとき、ウェルチ補正を用いた。

40

【0294】

担 4T1 乳癌マウスの PEG-mIL-10 及び mIL-10 の用量漸増では、一次腫瘍の制御及び肺転移は、mIL-10 及び PEG-mIL-10 の両方で用量漸増が可能であることが示された。表 6 に記載したように、任意の投与量で、PEG-mIL-10

50

はmIL-10より効果的である。1日2回の処理は移植の後17日目に開始され、その際、平均腫瘍容積は84~90mm³であった。処理群は群当たり14匹のマウスからなり、対照群は各群で8匹のマウスを有していた。トリス及びHepes緩衝液はmIL-10及びPEG mIL-10に対する対照であった。

表 6

実験 06-M175-1103. mIL-10及び PEG-mIL-10は、用量依存的方法で、BALB/c マウスの4T1乳癌の一次腫瘍サイズ (mm ³) を低減する。								
	播種後の日数							
	17	21	24	27	30	34	38	42
トリスビヒクル対照	90	184	288	448	560	861	1126	1248
Hepesビヒクル対照	90	215	344	476	658	940	1261	1520
PEG-mIL-10 (0.5 mg/kg)	86	107	117	129	150	165	204	195
PEG-mIL-10 (0.1 mg/kg)	84	112	142	152	224	256	286	356
PEG-mIL-10 (0.01 mg/kg)	85	140	200	240	288	462	627	773
PEG-mIL-10 (0.001 mg/kg)	88	168	239	262	373	532	729	942
mIL-10 (1.0 mg/kg)	85	117	168	207	256	350	446	497
mIL-10 (0.1 mg/kg)	84	136	180	251	337	424	641	704
mIL-10 (0.01 mg/kg)	86	121	165	231	331	436	631	809

【0295】

担PDV6扁平上皮癌マウスでのPEG-mIL-10及びmIL-10の用量漸増では、一次腫瘍の制御はmIL-10及びPEG-mIL-10の両方で用量漸増可能であるが、任意の投与量で、PEG-mIL-10はmIL-10より効果的である(表7)。高投与量PEG-mIL-10処理から、100%近くの腫瘍退縮がもたらされ、その後、再投与への耐性が示された(表8)。1日2回の治療は移植後23日目に開始され、その際平均腫瘍容積は107~109mm³であり、すべてのmIL-10処理群及び0.01mg/kgのPEG-mIL-10処理群に対し、55日目まで継続して行われた。100%の腫瘍退縮が認められたとき、0.1mg/kgのPEG-mIL-10処理は48日目に停止され、他方、残りの群は51日目まで処理した。処理群は、群当たり10匹のマウスからなり、各ビヒクル対照は6匹のマウスを含んでいた。トリス緩衝液及びHepes緩衝液はそれぞれ、mIL-10及びPEG mIL-10におけるビヒクル対照であった。一次移植の85日後及び最後のPEG-mIL-10処理の4週間後に、再移植がなされた。群当たり10匹のマウスがいた。

表 7

実験 06-M52-1106. mIL-10及びPEG-mIL-10は、用量依存的方法で、C57B16/JマウスのPDV6扁平上皮癌の腫瘍サイズ (mm ³) を低減する。											
	播種後の日数										
	23	27	30	33	36	40	43	47	51	55	
トリスピヒクル 対照	111	179	232	318	412	493	635	848	958		10
Hepes スピヒクル対照	107	210	293	433	541	653	712	761	986		
PEG-mIL-10 (0.1 mg/kg)	108	99	55	31	17	11	3	1	1	1	
PEG-mIL-10 (0.01 mg/kg)	107	131	92	97	95	114	119	123	183	228	
PEG-mIL-10 (0.001 mg/kg)	109	191	191	241	327	455	535				
mIL-10 (1.0 mg/kg)	107	129	144	143	124	87	51	36	52	75	
mIL-10 (0.1 mg/kg)	107	85	85	88	117	121	130	143	182	217	20

実験 06-M52-1106. mIL-10及びPEG-mIL-10は、用量依存的方法で、C57B16/JマウスのPDV6扁平上皮癌の腫瘍サイズ (mm ³) を低減する。											
	播種後の日数										
	23	27	30	33	36	40	43	47	51	55	
mIL-10 (0.01 mg/kg)	107	120	150	146	196	244	262	263	249	250	30

表 8

実験 06-M52-1106. PEGmIL-10処理の3週間後、PDV6扁平上皮癌腫瘍を消失したC57B16/Jマウスは、追加の処理がない場合再移植に抵抗する。

	播種後の日数						腫瘍陽性の マウス%
	0	16	21	28	36	49	
スピヒクル対照	0	113	145	188	418	761	100
PEG-mIL-10 (0.1 mg/kg)	0	0.3	0	7	16	47	10

【 0 2 9 6 】

肺転移の研究

4T1乳癌モデルにおける肺転移は、Current Protocols in Immunology (Section 20.2.4) John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) に

記載されるように、肺切除の後肉眼で（表 9）、または培養の後肺転移のコロニーを計数することによって（表 10）定量化された。簡潔にいうと、担 4 T 1 腫瘍マウスから採取した肺を細かく刻み、コラゲナーゼ/エラスターゼカクテルで消化処理して、その後、6-チオグアニンを含む媒体中の限界希釈アッセイで培養した。4 T 1 細胞のみが 6-チオグアニン耐性を示し、培養の 10 ~ 14 日後にコロニー数を計数することによって定量化が可能である。1 日 2 回の処理は移植の後 17 日目に開始され、その際、平均腫瘍容積は 84 ~ 90 mm³ であった。トリス及び H e p e s 緩衝液は m I L - 10 及び P E G m I L - 10 に対する対照であった。肺当たり培養された転移のコロニーの数として、肺転移は計測された。

表 9

10

実験 05-M52-496. 移植後 19 日で開始した m I L - 10 及び P E G - m I L - 10 処理 2 週間で、4 T 1 乳癌の転移は減少した（マウス当たりの肺転移数として測定）

播種後の 33 日の肺転移

	ビヒクル 対照	mIL-10	PEG-mIL-10
マウス #1	7	0	0
マウス #2	7	0	0
マウス #3	7	0	0
マウス #4	8	0	0
マウス #5	20	4	0

20

表 1 0

実験 06-M175-1103. mIL-10 及び PEG-mIL-10 は、
用量依存的方法で、BALB/c マウスの 4T1 乳癌の肺転移を低減する。

播種後の 42-45 日の肺転移
肺当たりのコロニー ($\times 10^3$)

マウス	トリス 緩衝ビヒ クル対照	H e p e s 緩衝ビヒ クル対照	mIL-10 1.0 mg/kg	mIL-10 0.1 mg/kg	mIL-10 0.01 mg/kg	PEG- mIL-10 0.5 mg/kg	PEG- mIL-10 0.1 mg/kg	PEG- mIL-10 0.01 mg/kg	PEG- mIL-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	
中央値	418.0	499.0	16.7	170.5	69.8	0.17	1.28	47.5	338.0
平均値	502.0	579.0	28.9	262.0	268.2	17.9	24.1	138.9	381.0
S.D.	519.0	467.0	36.5	276.9	397.1	64.0	61.8	183.7	284.0

【 0 2 9 7 】

定量的 R T - P C R で計測されたように、担 4 T 1 乳癌マウスへの P E G - m I L - 1 0 または I L - 1 0 の投与により、転移の割合が低減し、C D 8 + T 細胞の浸潤及び免疫刺激性サイトカインの発現が増加する (表 1 1 及び表 1 2)。C D 8 表面マーカー用免疫組織化学によって染色されたいくつかの腫瘍の代表的な部分から、浸潤性 C D 8 + T 細胞の数が計算され、抗 C D 3 及び抗 T C R 抗体による染色により確認した。

表 1 1

I L - 1 0 及び P E G m I L - 1 0 は、
4 T 1 癌の C D 8 + T 細胞浸潤を誘発する

	対照	IL-10	PEG-IL-10
C D 8 + 細胞 / 領域の平均数	6.4	25.8	39.2

【 0 2 9 8 】

P E G - m I L - 1 0 は、炎症サイトカインの誘導において、I L - 1 0 よりも効果的

である。均質化した腫瘍試料からの全RNAは抽出されて、上述のとおり逆転写された（例えば、Homey, et al. (2000) J. Immunol. 164: 3465 - 3470を参照）。相補的DNAは、蛍光性5'-ヌクレアーゼPCRアッセイによって、サイトカインの発現に関して量的に分析された（例えば、Holland, et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 7276 - 7280を参照）。特異的PCR生成物は、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems)を利用して、40サイクル間連続的に計測された。数値をユビキチンに正規化した。対数変換したデータを、Kruskal-Wallis統計解析（メディアン法）で処理した。発現レベル（対数変換）は、腫瘍試料で発現した炎症性サイトカインの量に対応しており、その結果、発現レベル（対数変換）が高くなると、腫瘍試料で発現した炎症性サイトカインの量は多くなる。

10

表 1 2

投与されたPEG-mIL-10は、用量投与24時間後に、
4T1癌の炎症性サイトカインのレベル維持を誘導する。

サイトカイン	対照	IL-10	PEG-mIL-10
IFN γ	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
RANKリガンド	19.14	36.13	46.08

20

【0299】

免疫細胞の除去

CD4+及びCD8+T細胞は、抗体媒介性排除によって除去された。250 μ gのCD4またはCD8特異的抗体が、この目的のために週1回注入された。細胞除去は、FACS及びIHC分析を用いて確認された。

30

【0300】

CD4抗体によるB細胞欠損BALB/cマウス(C.129-Igh-6^{tm1Cgn})中のCD4+T細胞の除去は、腫瘍のPEG-hIL-10機能を阻害した(表13)。

表 1 3

移植後8日で開始したPEG-hIL-10処理は、B細胞が欠損しているBALB/cマウス(C.129-Igh-6^{tm1Cgn})のCD4欠乏後、CT-26大腸癌の腫瘍サイズ(mm³)を低減できなかった。

40

移植後の日数	8	10	13	19	27
PBS	173	322	391	841	1979
PEG-hIL-10	184	276	251	602	1332

【0301】

50

CD8+T細胞の除去は、同系腫瘍増殖におけるPEG-mIL-10の効果を完全に阻害する(表14)。

表14

移植後8日で開始したPEG-hIL-10処理は、B細胞が欠損しているBALB/cマウスのCD8欠乏後、CT-26大腸癌の腫瘍サイズ(mm³)を低減できなかった。

移植後の日数	8	10	13	19	27
PBS	151	335	584	1434	2746
PEG-hIL-10	226	575	1047	2449	4799

10

【0302】

IL-10投与頻度及び血清中トラフ濃度

IL-10治療の薬物動態パラメータの理解を高めるため、及び、ヒト対象中の組み換え型ヒトIL-10(rhIL-10)に対する腫瘍治療レジメンを最適化するのに有用なマウスのデータを生成するため、マウス実験はデザインされ実施された。

20

【0303】

マウスにPDV6腫瘍細胞が接種されて、腫瘍を2.5週間増殖させて100mm³に達した。次に担腫瘍マウスの群(n=10/群)は、同一の週1回の投与量(0.7mg/kg/週間)で、5kDaのモノ-ジPEGmIL-10を投与して処理されて、これは、a)週1回のボラスSC注射、またはb)週を通して分割投与量での複数のSC注射、週2回(0.35mg/kg)、2日毎(約0.25mg/kg、その結果1週当たり全投与量=0.7mg/kg)、及び毎日(0.1mg/kg/日)を含む。すべてのマウスが1週間にわたって同じ量の薬剤を投与されたため、類似した総曝露量(曲線下面積、AUC)が観察された。ピークの曝露量は週1回投与された動物が最も高く、一方、最小薬物曝露量(トラフ)が最も高かったのはより少量の1日の投与量のマウスであった。驚くべきことに、表15に示すように、毎日投与される動物は最も高い抗腫瘍有効性を示し、血清トラフ曝露量は抗腫瘍機能にとって重要であった一方で、抗腫瘍機能上のピーク曝露量の影響は決定的ではないことが示された。

30

表15

投薬スケジュール	腫瘍のサイズ(mm ³)
対照試料	813.9522
毎日	43.196
2日毎	170.186
隔週	347.315
毎週	425.572

40

【0304】

必要な血清中トラフ濃度は、2つの腫瘍モデル: C57BL/6マウス中のPDV6腫瘍及びBALB/cマウス中のCT26結腸癌細胞で、更に検討された。標準法を利用して、マウスを100mm³まで成長させた後、処理を開始し、5kDaのモノ-ジ-PEGmIL-10を4週間投与した。その後、異なる処理スケジュールを受けている担腫瘍

50

マウスでIL-10の血清中トラフ濃度を計測した。そしてIL-10血清中トラフ濃度は、得られた腫瘍のサイズに相関していた。表16に示されるように、IL-10血清中トラフが1 ng/mL超のマウスは継続して小さな腫瘍を有し、その腫瘍を拒絶した。

表 16

IL-10血清中 トラフ 範囲 [pg/mL]	IL-10血清中 トラフ (平均値) (pg /mL)	腫瘍のサイズ (平均値) [mm 3]	腫瘍重量 (平均値) [g]
30-73	47	846	1.1
105-246	164	610	0.7
250-629	433	570	0.6
1155-2095	1619	148	0.2

10

【0305】

ヒト細胞の重要なトラフ濃度を確認するため、hIL-10は高濃度で、ヒト末梢血単球細胞(PBMC)の培養物に加えられた。PBMC培養物は非処理のままにされた、またはリポ多糖体(LPS)で刺激された。IL-10がPBMCのLPS媒介活性化を阻害するという事は、知られている。活性を、ケモカインMCP-1の分泌として計測した。LPS及びIL-10は共にMCP-1の分泌を誘発するものの、ケモカインの誘発においては互いの活性を抑制し合う。1 ng/mL以上の濃度で、IL-10は、LPSの不存在下で、MCP-1の分泌を上昇させた(図2A)。対照的に、PBMCがLPSで刺激された場合、1 ng/mLの濃度でのIL-10の添加は、MCP-1の分泌を著しく抑制した(図2B)。これにより、それぞれの生体学的プロセスの誘導及び阻害の両方において、IL-10の生物活性が確認された。

20

【0306】

ヒト対象におけるサイトカイン及びコレステロールに対するIL-10の効果

30

ヒト対象中の血清IL-10濃度の測定。ヒトのボランティアに所望の量のrhIL-10をSCまたはIVで投与し、投与後所望の時間(複数可)に、全血液試料をヘパリン抗凝固剤入りの容器内にとった。標準サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを用いて、血清rhIL-10またはPEG-rhIL-10濃度を測定した。通常ELISAアッセイは、0.1~10 ng/mLの濃度範囲で、選択的、線状及び再現可能であると判断して、その定量下限(LOO)は0.1 ng/mLであった。血清試料は、hIL-10に結合する抗体の存在に関しても、ELISAで分析された。更に、マウス肥満細胞株MC9を含むバリデーション済みのバイオアッセイを用いて、選択された血清試料は分析されて、この細胞株はIL-10に反応して増殖する。バイオアッセイを用いて、GMP生成rHuIL-10及びPEG-rHuIL-10の生物活性を決定するとともに、患者血清中のIL-10の生物活性を決定する。通常、IL-10濃度及び活性のELISA及びバイオアッセイの測定は、対応する値を明らかにした。

40

【0307】

ヒト対象中のTNF及びIL-1濃度の決定。IL-10は、慢性炎症性疾患に罹患している患者において抗炎症機能を有しており、TNF及びIL-1は、この疾患中に放出される重要な炎症性サイトカインを示す。TNF及びIL-1の濃度は、ヒト対象から得られる血液試料で決定された。通常、rhIL-10のSCまたはIV投与の直前(0時間)、ならびにその投与後0.5、2、3、4、6、8、12、16、24、48、72及び96時間で、3 mLの静脈血を無菌で収集した。LPS及び抗凝血剤の存在下で、試料は全血サイトカイン放出アッセイを行い、TNF及びIL-1濃度を

50

E L I S A アッセイで計測した。L P S は、血液細胞からの T N F 及び I L - 1 の放出を刺激した。

【 0 3 0 8 】

個体が r H u I L - 1 0 を I V で投与された後、0 . 5 ~ 1 2 時間後に収集した試料において、T N F 及び I L - 1 の放出は抑制された。r H u I L - 1 0 を S C 投与された個体から収集した試料において、T N F 及び I L - 1 の放出は 0 . 5 時間 ~ 2 4 時間抑制された。それらのヒト対象中の r H u I L - 1 0 の血清中濃度は、E L I S A によって決定された。T N F 及び I L - 1 の阻害は、r H u I L - 1 0 の血清中濃度と相関した。r H u I L - 1 0 の血清中濃度は投与後に上昇して、4 8 時間上がったままだった。しかし、r H u I L - 1 0 の濃度が 0 . 2 n g / m L 以上である場合のみ、T N F 及び I L - 1 の放出が抑制されて、濃度が 0 . 1 n g / m L 未満の場合、T N F 及び I L - 1 の放出は抑制されなかった。r H u I L - 1 0 の I V 投与後 1 2 時間後、及び S C 投与後 2 4 時間後、血清中濃度は 0 . 2 n g / m L 未満に低下して、T N F 及び I L - 1 の放出が観測された。慢性炎症性疾患に罹患している患者において、0 . 2 n g / m L 以上の I L - 1 0 血清中トラフ濃度を達成すること、または抗炎症機能を観測することが必要であることを、これらのデータは示している。

10

【 0 3 0 9 】

ヒト癌患者における P E G - I L - 1 0 による I N F 及びコレステロール調節の決定。I L - 1 0 は C D 8 + T 細胞中に I F N を誘発して、この I F N 誘発は、マウスの I L - 1 0 媒介性腫瘍拒絶に必須である。対照マウスで腫瘍の回復を誘発する濃度の P E G - r m I L - 1 0 で処理した場合、I F N 欠損マウスはその腫瘍に対して拒絶反応を示さない(データは示さない)。したがって I F N は、P E G - r h I L - 1 0 で治療した患者の血清中で計測された。

20

【 0 3 1 0 】

適切な投与技術に関する教育の後、癌患者は、P E G - r h I L - 1 0 を毎日 S C に、様々な投与量で自己注射した。血清 I L - 1 0 濃度は、前述のとおりサンドイッチ E L I S A を用いて決定された。I F N は、第 1 の投与前または投与の 2 8 日後に、採取された血清試料中、L u m i n e x ビーズアッセイ (L u m i n e x C o r p . (A u s t i o n , T X)) を用いて測定した。

【 0 3 1 1 】

表 1 7 に示されるように、1 μ g / k g の P E G - I L - 1 0 を投与した患者の血清トラフレベルは、I L - 1 0 約 0 . 4 と約 1 . 1 n g / m L の間であり、2 . 5 μ g / k g の P E G - I L - 1 0 を投与した患者の血清トラフレベルは、I L - 1 0 の約 0 . 4 と約 2 . 6 n g / m L の間である。

30

【 0 3 1 2 】

主として J a k - S t a t 経路による I F N シグナル。J a k - S t a t シグナル伝達は、連続的な受容体の補充及びキナーゼのヤヌスファミリーのメンバー (J a k s : J a k s 1 - 3 及び T y k 2) 及び S t a t (S t a t 5 a 及び S t a t 5 b を含む S t a t 1 - 6) の活性化を伴い、特異的反応要素を介して標的遺伝子の転写を制御する。このシグナル伝達機構がサイトカイン受容体スーパーファミリーの多くのメンバーの特徴であるため、I F N 誘発 J a k - S t a t シグナル伝達は、クラス I I サイトカイン受容体シグナル伝達における現在のパラダイムである。表 1 7 に示すように、1 n g / m L 以上の血清トラフレベルを有する患者で、血清中に I F N の誘発が示された一方、1 n g / m L 未満の血清トラフレベルを有する患者では I F N の誘発は示されなかった。表 1 7 を参照し、I F N 誘発は 1 超の値として画定される。

40

表 17

患者	01	02	03	04	05
投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ PEG-rhIL-10)	1	1	2.5	2.5	2.5
血清トラフ (ng/mL)	0.392	1.11	2.64	0.42	1.84
IFN γ 誘発	0.55	1.35	2.4	0.97	11.2

10

【0313】

1 ng/mL以上のIL-10血清中トラフ濃度を達成すること、または癌/腫瘍の設定で治療効果を観測することが必要であることを、これらのデータは示している。重要なことに血清中トラフ濃度はIFN誘発に関して決定的要素であり、投与量レベルはそうではない。

【0314】

PEG-rhIL-10の投与前または1週間毎日のSC投与の後(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $n=3\sim 4$ 患者/投与量)、癌患者から得た血清試料中のコレステロールを計測した。表18を参照し、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与された患者は0.4 ng/mL の1日当たりの平均血清コレステロール濃度を達成して、コレステロールが7.8%低下し、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与された患者は1 ng/mL の1日当たりの平均血清コレステロール濃度を達成して、コレステロールが19%低下し、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与された患者は2 ng/mL の平均血清トラフコレステロール濃度を達成し、コレステロールが38%低下した。したがって投薬レジメンのそれぞれにより、血清コレステロールで治療的に関連する低下をもたらし、それは約0.2 $\text{ng}/\text{mL}\sim 0.4\text{ng}/\text{mL}$ の平均IL-10血清中トラフ濃度が効果的であったことを示している。

20

表 18

用量	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.5	5
n	4	4	3
平均血清中トラフ (15日目)	0.4	1.8	3.6
平均コレステロール低下 (1週間)	7.8%	20%	37%

30

【0315】

固形腫瘍を有する患者におけるPEG-hIL-10の効果

投与量逐次漸増試験。固形腫瘍の特定の種類を有する患者に異なる量のPEG-hIL-10を投与する効果を、評価した。図3で説明したように、合計28人の患者は1、2.5、5、10または20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のPEG-hIL-10を毎日SCで投与して、その患者のうちの24人の腫瘍を、免疫関連反応評価基準(irRC)、免疫療法薬による反応パターンを決定するために一般的に用いられる手順で評価した(例えば、Wolchok et al., Clin. Cancer Res. 15(23):7412-20(December 1 2009)参照のこと)。患者は、卵巣腫瘍、腎臓腫瘍、結腸腫瘍、膵臓腫瘍または黒色腫に罹患していた。

40

【0316】

図3は、irRCを使用して決定される病勢コントロール率(DCR)を示す。腫瘍学用語において、DCRとは治療への反応を示す患者の合計割合を指し、DCRとは完全寛

50

解 (CR) + 部分奏効 (PR) + 安定疾患 (SD) の合計である。本文脈中、SDとは腫瘍量の増加 < 25% として定義され、腫瘍量は治療7週後にi r R C手順を使用して決定された。図3に示すように、PEG-hIL-10の10 μ g/kgで、DCRは40% (5人の評価可能な患者のうち2人) であり、両方の患者とも結腸腫瘍だった。PEG-hIL-10の20 μ g/kgで、DCRは80% (5人の評価可能な患者のうち4人)、その4人の患者のうち、1人は結腸腫瘍、1人は膵臓腫瘍、1人は黒色腫、1人は腎臓腫瘍だった。

【0317】

PEG-hIL-10血清中濃度の上昇PEG-hIL-10治療と関連した薬物動態学的パラメータを、腫瘍治療投薬レジメンを最適化するために評価した。上述と類似する手順を用いて、EC50値は、PEG-hIL-10を利用した細胞系アッセイで判定されて、PEG-hIL-10の10または20 μ g/kgを投与された投与量逐次漸増試験の患者で得られるIL-10血清レベルと比較した。図4に示すように、EC50は約6000pg/mL (約6ng/mL) であると判定された。次に、投与量逐次漸増試験に参加した各患者について、毎日のSCによるPEG-hIL-10の1、2.5、5、10または20 μ g/kgの投与から得た血清中濃度が測定されて、同じ投与量を投与された患者における平均血清中濃度を算出した。データを図4に示す。図4を参照すると、PEG-hIL-10の20 μ g/kgの投与はEC50を超える曝露量となり、その一方でPEG-hIL-10の10 μ g/kgの投与はしばしばEC50以上の曝露量となった (EC50以上の曝露量は有利であると見なされた)。

【0318】

図5A及び図5Bは、10 μ g/kgのPEG-hIL-10 (図5A)、及び20 μ g/kgのPEG-hIL-10 (図5B)を投与した各患者を判定した図4のデータを説明する。それぞれの線は個々の患者を表し、CRC = 大腸癌、RCC = 腎細胞癌、Pannc = 膵臓癌、MEL = 黒色腫及びCRPC = 去勢抵抗性前立腺癌である。血清中濃度は、バリデーション済みの電気化学発光 (ECL) アッセイで測定した。図4と一致して、PEG-hIL-10の20 μ g/kgを常に投与された患者はEC50を超える曝露量を得て、その一方でPEG-hIL-10の10 μ g/kgを常に投与された患者はEC50近くの曝露量を得た。

【0319】

大腸癌患者の腫瘍マーカーCEAのPEG-hIL-10の効果

癌胎児性抗原 (CEA) とは、健康成人の血清では超低レベルでしか現れない、胎児発達中に胃腸組織で生じる1組の細胞表面アンカード糖タンパク質を意味する。CEA血清レベルは癌の特定の種類 (例えばCRC) で増加して、CEAは、臨床効果を予測する、臨床試験中の腫瘍マーカーとして使用することが可能である。

【0320】

CRC患者へのPEG-hIL-10の毎日のSCの増加量を投与する効果を、評価した。低用量 (例えば、1、2.5または5 μ g/kg) の大部分のCRC患者は、治療中、CEAの緩やかな増加を経験し、PEG-hIL-10 (20 μ g/kg) の最高用量を投与されたCRC患者はCEAの急低下を経験した (データは示されない)。図6は、治療期間を通して漸増する量のPEG-hIL-10を投与された2人の患者のCEA安定化効果を表す。図6を参照すると、1人の患者は2.5 μ g/kgでPEG-hIL-10治療を開始して、治療の約130日後に投与量が5 μ g/kgに増加した後でさえ、CEAレベルは増加し続けた。投与量が治療の約190日後、10 μ g/kgにその後増やされるとき、CEAの血清中濃度は横ばいになり、安定疾患の維持に必要なPEG-hIL-10の血清中濃度を得るのに十分な投与量で、PEG-hIL-10が投与されていたことを示した。2人目の患者の治療は、PEG-hIL-10の毎日SCで5 μ g/kgで開始された。この患者のCEAレベルの測定は、30日目頃開始された。図6を参照すると、CEAレベルは徐々に増加して、それから安定した。約100日で、PEG-hIL-10の用量は10 μ g/kgに増やされ、その後CEAレベルは徐々に減少して

、安定疾患を少なくとも維持するのに必要な PEG-hIL-10 の血清中濃度を得るために十分な量の投与を示した。

【0321】

転移性腫瘍の病変サイズの減少における PEG-hIL-10 の効果

3つの種類の一次腫瘍（黒色腫、RCC及びCRC）のうちの1つを有する患者の転移性病変のサイズにおけるPEG-hIL-10の効果を、評価した。各患者について、転移の病変サイズ（容積）のパーセンテージ変化は、PEG-hIL-10治療（20µg/kgのPEG-hIL-10 SC QD）にわたって、コンピュータ断層撮影（CT）画像診断（図7A～図7Cそれぞれの左のグラフ）を使用して、判定された。PEG-hIL-10血清中濃度は各患者について測定されて、上記で判定したEC50と比較した（図7A～図7Cの右のグラフ）。

10

【0322】

黒色腫患者において、2つの肺転移性病変、2つのリンパ節転移性病変及び5つの肝臓転移性病変のサイズは、治療中に計量された。図7Aの左のグラフで示すように、肝臓病変は治療に最も反応した。図7Aの右のグラフは、治療の開始後、種々の時点で確定されるIL-10血清中濃度を表す。それが測定された各時点で、血清中濃度は10ng/mL超であり、その時点のそれぞれでEC50値を超えた。

【0323】

RCC患者において、2つの肺転移性病変及び1つの骨転移性病変のサイズは、治療の7週目で測定された。図7Bの左のグラフで示すように、両方の病変の種類は治療に反応して、肺病変のうちの1つは大きさが24%を減少した。図7Bの右のグラフは、治療の開始後、種々の時点で確定されるIL-10血清中濃度を表す。それが測定された各時点で、血清中濃度は10ng/mL超であり、その時点のそれぞれでEC50値を超えた。

20

【0324】

CRC患者において、4つの肺転移性病変及び2つの肝臓転移性病変のサイズは、治療の7週目で測定された。図7Cの左のグラフに示すように、肺病変のそれぞれは治療に反応して、肝臓病変のうちの1つは大きさが安定したままだった。図7Cの右のグラフは、治療の開始後、種々の時点で確定されるPEG-hIL-10血清中濃度を表す。それが測定された各時点で、血清中濃度は10ng/mL超であり、その時点のそれぞれでEC50値を超えた。

30

【0325】

黒色腫及び腎細胞癌患者のPEG-hIL-10の効果

2種類の固形腫瘍（黒色腫または腎細胞癌）の1つを有する患者に異なる量のPEG-hIL-10を投与する効果を、評価した。黒色腫投薬コホートにおいて、PEG-hIL-10は、表19に示す週の数にわたって投与量（1、5、20及び40µg/kg）毎に、1人の患者に毎日SCで投与された。腎細胞癌投薬コホートにおいて、PEG-hIL-10は、表19に示す週の数にわたって、投与量毎に2.5µg/kgで2人の患者に及び投与量毎に5、10及び20µg/kgで1人の患者に、毎日SCで投与された。ほとんど患者において、投薬は示された週の数を越えて継続した。

【0326】

PEG-hIL-10治療への腫瘍反応は、所定の間隔（例えば、およそ各7～8週）でコンピュータ断層撮影（CT）検査によって評価されて、その一方で、より短い間隔の追跡調査（例えば、4週）は反応または進行の確認などの目的の必要があるとき実行された。免疫関連効果判定基準（irRC）、免疫療法薬品による反応パターンを決定する一般的に用いられる方法によって、各患者における腫瘍量のパーセンテージ変化を評価した（例えばWolchok et al., Clin. Cancer Res. 15(23): 7412-20 (December 1 2009)を参照）。表19で、記載されたパーセンテージは「最大の効果」であって、それはその後の進行を含まず、例えば、8週目に41%の腫瘍反応を得た、2.5µg/kgのPEG-hIL-10を投与されたRCC患者に関して、患者は14週目で49%の反応、22週目で62%の反応、及び28

40

50

週目で 85% の反応を得た。

表 19

全般的な腫瘍反応*						
投薬コホ ート (μ g/kg)	1	2.5	5	10	20	40
黒色腫	約 8 週 で 26%		約 8 週 で 35%		約 20 週で -4% (MX)	約 43 週で -57%
RCC		41% & 12% (8 週間)	約 22 週 で 4%	約 8 週で 41% (MX)	約 32 週で -71%	
* = 全腫瘍量で最大変化 MX = 混合反応 (いくつかの病変が減少)						

10

【 0 3 2 7 】

表 19 に記載のデータで示すように、高用量は黒色腫及び腎細胞癌の投薬コホートにおいて、より高い奏効率を示す傾向があった。種々の腫瘍の治療において、より高い IL - 10 血清中トラフ濃度 (例えば、IL - 10 血清中トラフ濃度 > 10 ng / mL) を得る必要性と、これらの所見は一致している。

20

【 0 3 2 8 】

本発明を実行するために発明者が知る最良の形態を含む、本発明の特定の実施形態が本明細書において説明される。前述の説明を読むことにより、開示される実施形態の変形は当業者に明らかとなり、当業者はそのような変形を適切に採用することができることが期待される。したがって本発明が本明細書に特別に記載したものと別な方法で実践され、本発明が、適用法令に認められる、添付の請求項に記載される対象のすべての修正及び等価物を含むことが意図される。更に上記に示される要素の、それらのすべての可能な変形の任意の組み合わせも、本明細書中に特に記載されない限りまたは文脈により明らかに矛盾しない限り、本発明に含まれる。

30

【 0 3 2 9 】

本明細書に記述されるすべての刊行物、特許出願、受託番号、及び他の参照文献は、各個別の刊行物または特許出願が、具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されているように、参照により本明細書に組み込まれる。

【 図 1 】

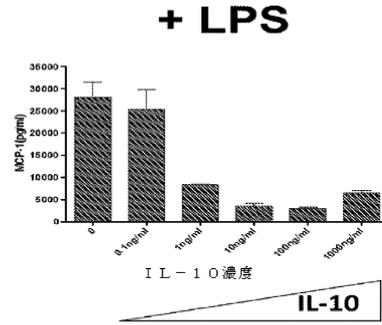
ヒト IL-10 (NP_000563) (配列番号: 28):

1 mhssallecl vltgvrasp gqgtqsense thfpgnlpnm lrdlrdafsr vktffqmkdq
61 ldnlllkesl lcdfkgylgc qalsemiqfy lcevmppqaen qdpdikahvn slgenlktlr
121 lrlrchrfl pceenkskave qvknafnlkq ekgyikamse fdifinyica ymtmkim

マウス IL-10 (NP_034678) (配列番号: 29):

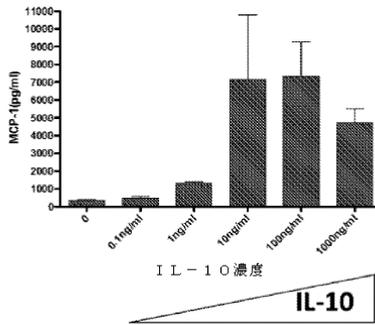
1 mpgsallecl llitgmrisr gqysrednnc thfpvgqshml lclrtafsq vktffqtkdq
61 ldnlltdsl mqdfkgylgc qalsemiqfy lvevmppqaek hgepeikehln slgeklktr
121 mrlrchrfl pceenkskave qvksdfnlkq dqgykamne fdifinicia ymmikmks

【 図 2 B 】



【 図 2 A 】

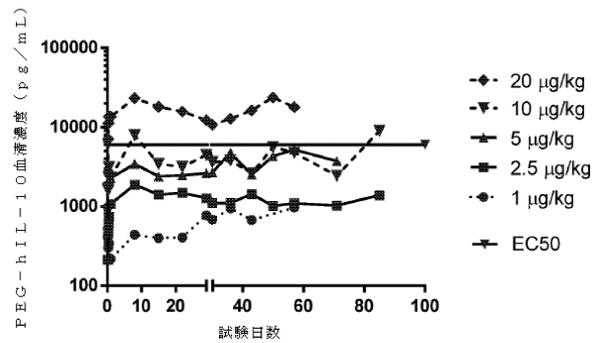
(-)LPS



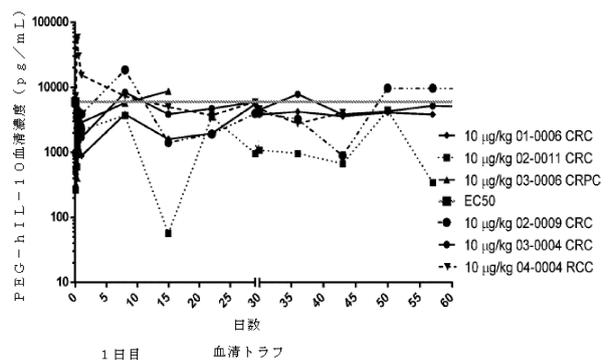
【 図 3 】

投与量増加 (μg/kg)	試験数 (n)	評価可能な試験数 (n)	DCR (SD+PR+CR)	腫瘍の種類	腫瘍の量 (nRC)	腫瘍の変化	安否状態の期間
1	4	3	1 (33%)	卵巣	+16%	+20%; +15%; +16%	8週 - 投与中止
2.5	6	5	1 (20%)	腎臓	+12%	+0.5%; +9.5%; +18%; +16%; +14%	13週
5	6	6	2 (33%)	腎臓	+4%	+3.9%; +1.5%; -9%	21週
10	6	5	2 (40%)	大腸	+8%	+2.8%; +4.4%; -0.5%; +1.3%	21週
20	6	5	4 (80%)	大腸	+24%	+22%; -3.2%	8週
40	6	5	4 (80%)	大腸	+18%	0%; -5.5%; +4.8%	8週
80	6	5	4 (80%)	大腸	+9%	0%; -2.2%; -17%; -7.7%; -6.6%; +4.7%	8週
160	6	5	4 (80%)	腎臓	+9%	0%; +5.3%; +1.2%; -2.2%	8週
320	6	5	4 (80%)	腎臓	+9%	+4.2%; +3.0%; +7.5%; +4.5%; -8.7%; -6.2%; -10.3%; -7.8%; -2.5%	16週
合計	28	24	10 (42%)	腎臓	-12%	-2.4%; -2.6%; -2.5%	8週

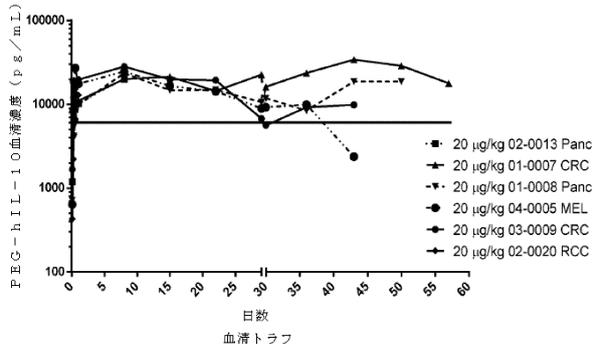
【 図 4 】



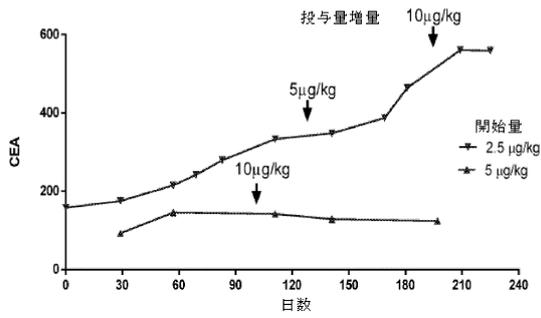
【 図 5 A 】



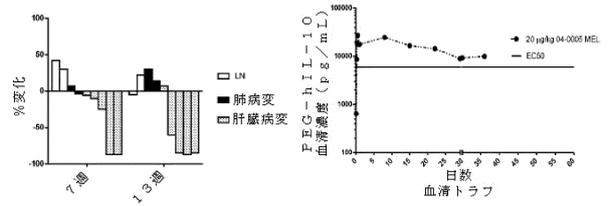
【図5B】



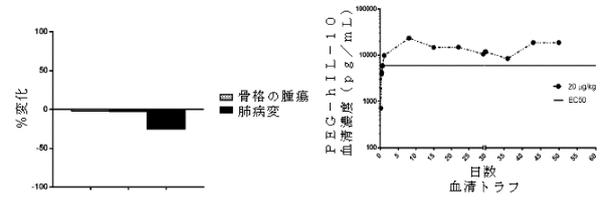
【図6】



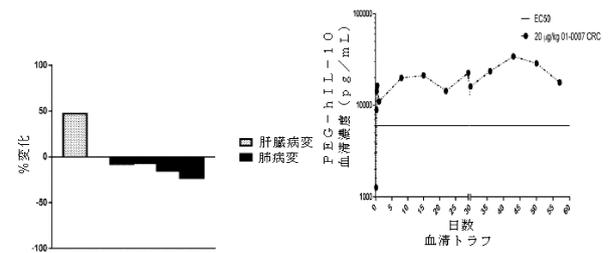
【図7A】



【図7B】



【図7C】



【配列表】

0006675394000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 オフト, マーティン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・94303、パロ・アルト、チャニング・アベニュー・1630

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 特表2010-504977(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/20

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)