



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0084033  
(43) 공개일자 2017년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인 아르모 바이오사이언ஸ 인코포레이티드 미국 캘리포니아 94603 레드우드 시티 체사피크 드라이브 575
<i>A61K 38/20</i> (2006.01) <i>A61K 45/06</i> (2006.01) <i>A61K 9/00</i> (2006.01)	
(52) CPC특허분류 <i>A61K 38/2066</i> (2013.01) <i>A61K 45/06</i> (2013.01)	(72) 별명자 오프트 마틴 미국 캘리포니아 94303 팔로 알토 채닝 애비뉴 1630
(21) 출원번호 10-2017-7011082	(74) 대리인 송봉식, 정삼영
(22) 출원일자(국제) 2015년10월20일 심사청구일자 없음	
(85) 번역문제출일자 2017년04월24일	
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/056383	
(87) 국제공개번호 WO 2016/064817 국제공개일자 2016년04월28일	
(30) 우선권주장 62/067,337 2014년10월22일 미국(US)	

전체 청구항 수 : 총 76 항

(54) 발명의 명칭 질환 및 장애를 치료하기 위해 인터루킨-10을 사용하는 방법

### (57) 요 약

특여 방법을 포함하는, IL-10에 반응성인 질환 또는 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법 및 이와 관련된 특여 요법이 제공된다.

(52) CPC특허분류  
**A61K 9/0019** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 양은 적어도 6.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 8.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 10.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 12.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 14.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 16.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 18.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 양이 적어도 20.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

#### 청구항 9

치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 양은 일정 기간 동안 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 유지하는데 충분하고;

상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 6.0 ng/mL이며,

상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 상기 기간의 적어도 90% 동안 유지되는 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 8.0 ng/mL인 방법.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 10.0 ng/mL인 방법.

#### 청구항 12

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 12.0 ng/mL인 방법.

#### 청구항 13

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 14.0 ng/mL인 방법.

**청구항 14**

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 16.0 ng/mL인 방법.

**청구항 15**

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 18.0 ng/mL인 방법.

**청구항 16**

제9항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 20.0 ng/mL인 방법.

**청구항 17**

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기간이 적어도 12시간인 방법.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 상기 기간이 적어도 24시간인 방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 기간이 적어도 48시간인 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 상기 기간이 적어도 72시간인 방법.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 기간이 적어도 1주인 방법.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 기간이 적어도 2주인 방법.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 기간이 적어도 1개월인 방법.

**청구항 24**

제9항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 상기 기간의 적어도 95% 동안 유지되는 방법.

**청구항 25**

제24항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 상기 기간의 적어도 98% 동안 유지되는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 상기 기간의 100% 동안 유지되는 방법.

**청구항 27**

치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 양은 IL-10 제제의 적어도 EC50의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 양이 IL-10 제제의 적어도 EC60의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

### 청구항 29

제27항에 있어서, 상기 양이 IL-10 제제의 적어도 EC70의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

### 청구항 30

제27항에 있어서, 상기 양이 IL-10 제제의 적어도 EC80의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

### 청구항 31

제27항에 있어서, 상기 양이 IL-10 제제의 적어도 EC90의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 방법.

### 청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 성숙한 인간 IL-10인 방법.

### 청구항 33

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 성숙한 인간 IL-10의 변이체이고, 상기 변이체가 성숙한 인간 IL-10의 활성에 대등한 활성을 나타내는 방법.

### 청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 중식 장애인 방법.

### 청구항 35

제34항에 있어서, 상기 중식 장애가 암인 방법.

### 청구항 36

제35항에 있어서, 상기 암이 고형 종양 또는 혈액학적 장애인 방법.

### 청구항 37

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 면역 또는 염증 장애인 방법.

### 청구항 38

제37항에 있어서, 상기 면역 또는 염증 장애가 염증성 장 질환, 전선, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 및 알츠하이머병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 39

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 혈전증 또는 혈전성 상태인 방법.

### 청구항 40

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 섬유증 장애인 방법.

### 청구항 41

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 바이러스 장애인 방법.

### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 바이러스 장애가 인간 면역결핍 바이러스, B형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스 및 사이토메갈로바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 43**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 질환, 장애 또는 병태가 심혈관 장애인 방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 상기 심혈관 장애가 아테롬성 동맥경화증인 방법.

**청구항 45**

제43항 또는 제44항에 있어서, 상기 대상체가 상승된 콜레스테롤을 갖는 방법.

**청구항 46**

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 변형된 IL-10 제제를 형성하는 적어도 하나의 변형을 포함하고, 상기 변형이 IL-10 제제의 아미노산 서열을 변경하지 않는 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 상기 변형된 IL-10 제제가 PEG-IL-10 제제인 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 제제가 IL-10의 적어도 하나의 서브유닛의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유결합된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함하는 방법.

**청구항 49**

제47항 또는 제48항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 제제가 모노-페길화된 및 디-페길화된 IL-10의 혼합물을 포함하는 방법.

**청구항 50**

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 제제의 PEG 성분이 약 5kDa 내지 약 20kDa의 분자량을 갖는 방법.

**청구항 51**

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 제제의 PEG 성분이 약 20kDa를 초과하는 분자량을 갖는 방법.

**청구항 52**

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 제제의 PEG 성분이 적어도 약 30kD의 분자량을 갖는 방법.

**청구항 53**

제46항에 있어서, 상기 변형된 IL-10 제제가 Fc 융합 분자인 방법.

**청구항 54**

제46항에 있어서, 상기 변형된 IL-10 제제가 혈청 일부분을 포함하는 방법.

**청구항 55**

제46항에 있어서, 상기 변형된 IL-10 제제가 당화된 방법.

**청구항 56**

제46항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형이 부위-특이적인 방법.

### 청구항 57

제46항에 있어서, 상기 변형이 링커를 포함하는 방법.

### 청구항 58

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 매일 적어도 2회 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 59

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 매일 적어도 1회 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 60

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 적어도 72시간마다 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 61

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 매주 적어도 1회 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 62

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 적어도 2주마다 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 63

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-10 제제가 매월 적어도 1회 대상체에게 투여되는 방법.

### 청구항 64

제1항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 부가적인 예방 또는 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간인 방법.

### 청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 비경구 주사에 의한 방법.

### 청구항 67

제66항에 있어서, 상기 비경구 주사가 피하인 방법.

### 청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 치료 또는 예방이 CD8+ T 세포에 의해 매개되는 방법.

### 청구항 69

제1항 내지 제56항 중 어느 한 항의 IL-10 제제의 양, 및 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

### 청구항 70

제69항에 있어서, 상기 부형제가 등장성 주사액인 약제학적 조성물.

### 청구항 71

제69항에 있어서, 상기 조성물이 인간 투여에 적합한 약제학적 조성물.

### 청구항 72

제69항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 부가적인 예방 또는 치료제를 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

### 청구항 73

제69항 내지 제72항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 포함하는 멸균 용기.

### 청구항 74

제73항에 있어서, 상기 멸균 용기가 주사기인 멸균 용기.

### 청구항 75

제73항 또는 제74항의 멸균 용기를 포함하는 키트.

### 청구항 76

제75항에 있어서, 적어도 하나의 부가적인 예방 또는 치료제를 포함하는 제2 멸균 용기를 추가로 포함하는 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본원은 하기의 우선권 이점을 주장한다: U.S. 가출원 제62/067,337호 (2014년 10월 22일 출원됨, 상기 출원은 그 전체가 참고로 본원에 통합됨).

[0002] 본 발명은 다양한 질환 및 장애의 치료 또는 예방에서 IL-10 및 관련 제제를 사용하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 사이토카인 인터루킨-10 (IL-10)은 T 세포, B 세포, 대식세포, 및 항원 제시 세포 (APC)에 대한 작용을 통해 다수의 면역 반응을 조절하는 다면발현 (pleiotropic) 사이토카인이다. IL-10은 활성화된 단핵구 및 활성화된 대식세포에서 IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, GM-CSF 및 G-CSF의 발현을 억제하여 면역 반응을 억제할 수 있고, 또한 NK 세포에 의한 IFN-γ 생산을 억제한다. IL-10은 주로 대식세포에서 발현되긴 하지만, 활성화된 T 세포, B 세포, 비만 세포, 및 단핵구에서도 발현이 검출되었다. 면역 반응을 억제하는 것 외에도, IL-10은 IL-2 - 및 IL-4 - 처리된 흥선세포의 증식을 자극하고, B 세포의 생존력을 향상시키며, MHC 클래스 II의 발현을 자극하는 것을 포함하는, 면역 자극 특성을 나타낸다.

[0004] 인간 IL-10은 2개의 단량체 서브유닛 간의 비공유 상호작용의 과정으로 불활성화되는 동종이량체이다. IL-10의 공개된 결정 구조로부터 얻은 데이터는 상기 기능적 이량체가 IFN-γ 와 어느 정도 유사성을 나타낸다는 것을 보여준다 (Zdanov 등, (1995) Structure (Lond) 3:591-601).

[0005] 그 다면발현 활성의 결과로서, IL-10은 염증 병태, 면역-관련 장애, 섬유증 장애 및 암을 포함하는, 광범위한 질환, 장애 및 병태와 연관되었다. 이러한 많은 질환, 장애 및 병태에 대한 IL-10의 임상 및 전임상 평가는 그의 치료 잠재성을 확고히 하였다. 더욱이, 폐길화된 IL-10은 특정 치료 환경에서 비-폐길화된 IL-10보다 더 효과적인 것으로 나타났다.

[0006] IL-10 - 관련 질환, 장애 및 병태의 유병률 및 중증도를 고려할 때, 효능, 환자 내성 등을 최적화하는 새로운 투약 요법 및 매개변수가 IL-10 및 폐길화된 IL-10, 및 이와 관련된 제제의 치료적 유용성을 증진시키는데 상당한 가치가 있을 것이다.

### 발명의 내용

[0007] 본 개시내용은 다양한 질환, 장애 및 병태, 및/또는 이의 증상을 치료하고/거나 예방하기 위해, IL-10, 변형된 (예컨대, 폐길화된) IL-10, 및 본원에 기재된 관련된 제제, 및 이의 조성물을 사용하는 방법을 고려한다. 보다 구체적으로, 본 개시내용은 관련된 부작용을 최소화하면서, 대상체에서의 다양한 질환, 장애 및 병태의 치료 및 /또는 예방에서 효능을 달성하고 유지하기 위한 최적화된 투약 매개변수에 관한 것이다. 이하 상세히 설명되는 바와 같이, 이러한 투약 매개변수의 최적화는, 예를 들어, 투여 경로 및 다른 인자를 고려한, 흡수, 분포,

대사, 및 배설 ("ADME")과 관련된 약동학적 및 약력학적 매개변수의 평가를 포함한다. 본원에 달리 나타내지 않는 한, ADME 및 다른 매개변수와 관련된 용어들은 관련 과학 분야에서 이들이 통상적으로 받아들여지는 의미를 갖는 것으로 이해된다. 예로서, 용어 "혈청 반감기" 또는 " $t_{1/2}$ "은 제거 반감기 (즉, 제제의 혈청 농도가 그의 초기 또는 최대 값의 절반에 도달할 때의 시간)를 지칭한다.

[0008] 본원에 기재된 방법에 따르면, 질환, 장애 또는 병태, 및/또는 이의 증상은, 증식 장애, 예컨대 암 또는 암-관련 장애, 또는 섬유증 장애, 예컨대, 간경변, NASH 및 NAFLD일 수 있다. 특정 암에 제한되지 않지만, 암은 대장암, 흑색종, 및 편평 세포 암종과 관련된 종양을 포함하는 고형 종양일 수 있거나, 또는 그것은 혈액학적 장애일 수 있다.

[0009] 다른 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 비제한적으로, 인간 면역결핍 바이러스, B형 간염 또는 C형 간염 바이러스 또는 사이토메갈로바이러스를 포함하는, 바이러스 장애이다. 추가 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 면역 또는 염증 장애이며, 이는 급성 또는 만성일 수 있다. 면역 및 염증 장애의 예는 염증성 장 질환, 전선, 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 및 알츠하이머병을 포함한다.

[0010] 특정 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 아테롬성 동맥경화증을 포함하는, 심혈관 장애이다. 심혈관 장애를 가진 대상체는 상승된 콜레스테롤을 가질 수 있다.

[0011] 추가 구현예에서, 질환, 장애 또는 병태는 혈전증 또는 혈전성 상태이다.

[0012] 이하에 추가로 논의되는 바와 같이, 인간 IL-10은 동종이량체이며, 각각의 단량체는 178개의 아미노산을 포함하고, 이의 처음 18개는 신호 펩타이드를 포함한다. 본 개시내용의 특정 구현예는 신호 펩타이드가 결여된 성숙한 인간 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, 미국 특허 제6,217,857호 참고), 또는 성숙한 인간 PEG-IL-10을 포함한다. 추가의 특정 구현예에서, IL-10 제제는 성숙한 인간 IL-10의 변이체이다. 상기 변이체는 성숙한 인간 IL-10의 활성보다 더 낮은, 대등한, 또는 더 큰 활성을 나타낼 수 있고; 특정 구현예에서 상기 활성은 성숙한 인간 IL-10의 활성과 대등하거나 더 크다.

[0013] 본 개시내용의 특정 구현예는 하나 이상의 특성 (예컨대, 약동학적 매개변수, 효능 등)을 향상시키기 위해 IL-10의 변형을 고려한다. 특정 구현예에서, IL-10은, 예를 들어, 폐길화, 당화, 알부민 (예컨대, 인간 혈청 알부민 (HSA)) 접합, 및 헤실화 (hesylation)에 의해 변형된다. 추가 구현예에서, IL-10의 변형은 면역원성에 치료학적으로 관련되고 해로운 영향을 미치지 않으며, 추가 구현예에서 변형된 IL-10은 변형되지 않은 IL-10보다 면역원성이 낮다. 용어 "IL-10", "IL-10 폴리펩타이드(들)", "제제(들)" 등은 광범위하게 해석되는 것으로 의도되며, 이는 예를 들어, 동족체, 변이체 (뮤테인 포함), 및 이의 단편을 포함하는 인간 및 비-인간 IL-10 - 관련된 폴리펩타이드, 뿐만 아니라, 예를 들어, 리더 서열 (예컨대, 신호 펩타이드)을 갖는 IL-10 폴리펩타이드, 및 전술한 것들의 변형된 형태를 포함한다. 추가의 특정 구현예에서, 용어 "IL-10", "IL-10 폴리펩타이드(들)", "제제(들)"는 효능제이다. 특정 구현예는 본원에서 "PEG-IL-10"으로도 지칭되는 폐길화된 IL-10에 관한 것이다. 본 개시내용은 또한 전술한 것을 인코딩하는 핵산 분자를 고려한다.

[0014] 실험 섹션에 기재된 바와 같이, 고형 종양 (예컨대, 난소 종양, 신장 종양, 결장 종양, 또는 퀘장 종양) 환자에서 PEG-hIL-10의 효과의 평가는 질환 조절율 (DCR)을 최적화하기 위해 초기에 고려된 것보다 더 큰 PEG-hIL-10의 혈청 농도를 달성하는 것이 유리한 것으로 나타났다. 종양학 용어에서, DCR은 치료에 대한 반응을 입증하는 환자의 총 비율을 지칭하며; DCR은 완전 반응 (CR) + 부분 반응 (PR) + 안정 질환 (SD)의 합이다. 그러나, 임상적 유용성이 낮은 농도에서도 관찰된다는 점에 유의해야 한다.

[0015] 더욱이, 결장 암종 환자에서 종양 마커 CEA (암배아 항원)에 대한 PEG-hIL-10의 효과의 분석은, 안정 질환을 달성하고 유지하기 위해, 부수적으로 더 높은 혈청 농도와 결부되어, 이러한 암 환자에게 초기에 고려된 것보다 더 높은 용량이 필요하였음을 보여주었다.

[0016] 본 개시내용의 특정 구현예는 치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 양은 적어도 6.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 (trough) 농도를 달성하는데 충분하다. 또는 예방 방법은 CD8+ T 세포에 의해 매개될 수 있다.

[0017] 다른 구현예는 치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체 (예컨대, 인간)에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 양은 일정 기간 동안 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 유지하는데 충분하며, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 6.0 ng/mL이며, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 상기 기간의 적어도 90% 동안 유지된다. 본 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농

도는 적어도 7.0 ng/mL, 적어도 8.0 ng/mL, 및 적어도 9.0 ng/mL, 적어도 10.0 ng/mL, 적어도 11.0 ng/mL, 적어도 12.0 ng/mL, 적어도 13.0 ng/mL, 적어도 14.0 ng/mL, 적어도 15.0 ng/mL, 적어도 16.0 ng/mL, 적어도 17.0 ng/mL, 적어도 18.0 ng/mL, 적어도 19.0 ng/mL, 적어도 20.0 ng/mL, 적어도 21.0 ng/mL, 적어도 22.0 ng/mL, 또는 22.0 ng/mL 초과이다.

[0018] 추가 구현예에서, 상기 기간은 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 6주, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 또는 3개월 초과이다.

[0019] 본 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 상기 기간의 적어도 85%, 상기 기간의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동안 유지된다.

[0020] 특정 정상 상태 혈청 최저 농도(예컨대, 2.0 ng/mL)를 유지하는 충분한 투약 요법은 원하는 정상 상태 혈청 최저 농도보다 높은 초기 혈청 최저 농도를 야기할 수 있음이 예상된다. 포유동물 대상체에서 IL-10의 약력학적 및 약동학적 특징 때문에, 초기 최저 농도(예를 들어, 하나 이상의 부하 용량 (loading dose) 후 일련의 유지 용량 (maintenance dose)을 투여함으로써 달성됨)는 투약 매개변수 (양 및 빈도)가 일정하게 유지될 때에도 일정 기간 동안 점진적으로 그러나 지속적으로 감소한다. 상기 기간 이후, 점진적이지만 지속적인 감소가 끝나고 정상 상태 혈청 최저 농도가 유지된다.

[0021] 예로서, 마우스 (예컨대, C57BL/6 마우스)에게 ~0.1 mg/kg/일의 IL-10 제제 (예컨대, mIL-10)를 비경구 투여 (예컨대, SC 및 IV)하는 것이, 예를 들어 2.0 ng/mL의 정상 상태 혈청 최저 농도를 유지하는데 필요하다. 그러나, 상기 정상 상태 혈청 최저 농도는 0.1 mg/kg/일로 투여를 개시한 후 (그리고 또한 임의의 부하 용량(들) 후) 약 30일까지 달성되지 않을 수 있다. 오히려, 초기 혈청 최저 농도가 달성된 후 (예컨대, 2.5 ng/mL), 상기 농도는, 예를 들어, 약 30일 기간의 과정 동안 점진적으로 그러나 지속적으로 감소하며, 이 기간 이후 원하는 정상 상태 혈청 최저 농도(예컨대, 2.0 ng/mL)가 유지된다. 당업자는, 예를 들어, ADME 및 환자-특이적 매개변수를 사용하여 원하는 정상 상태 최저 농도를 유지하는데 필요한 용량을 결정할 수 있을 것이다.

[0022] 또한 치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법이 예상되며, 상기 양은 IL-10 제제의 적어도 EC50의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분하다. 다른 구현예에서, 상기 양은 IL-10 제제의 적어도 EC60, 적어도 EC70, 적어도 EC80, 또는 적어도 EC90의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분하다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "EC50" 및 문구 "반수 최대 유효 농도 (half maximal effective concentration)"는 일반적으로 받아들여지는 의미를 가지며; 즉 EC50은 기준치와 일부 지정된 노출 시간 후의 최대치의 중간에 반응을 유도하는 치료제 (예컨대, IL-10 제제)의 농도이다. 당업자는 치료제의 EC50을 결정하는 수단에 익숙하다. 예를 들어, EC50은 세포-기반 분석에서 치료제의 특정 농도-관련 매개변수를 측정한 후 상업적으로 이용가능한 소프트웨어 (예컨대, Graphpad Software, Inc.; La Jolla, CA)를 사용하여 결정될 수 있다.

[0024] 시내용은 IL-10 제제가 변형된 IL-10 제제를 형성하기 위해 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있고 상기 변형은 IL-10 제제의 아미노산 서열을 변경하지 않는 방법을 고려한다. 구현예에서, 변형된 IL-10 제제는 PEG-IL-10 제제이다. PEG-IL-10은 IL-10의 적어도 하나의 서브유닛의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유결합된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함할 수 있거나, 다른 구현예에서 모노-페길화된 IL-10 및 디-페길화된 IL-10의 혼합물을 포함할 수 있다. PEG-IL-10의 PEG 성분은 약 5kDa 초과, 약 10kDa 초과, 약 15kDa 초과, 약 20kDa 초과, 약 30kDa 초과, 약 40kDa 초과, 또는 약 50kDa 초과의 분자 질량을 가질 수 있다. 구현예에서, 분자 질량은 약 5kDa 내지 약 10kDa, 약 5kDa 내지 약 15kDa, 약 5kDa 내지 약 20kDa, 약 10kDa 내지 약 15kDa, 약 10kDa 내지 약 20kDa, 약 10kDa 내지 약 25kDa 또는 약 10kDa 내지 약 30kDa이다.

[0025] 일부 구현예에서, 변형된 IL-10 제제는 적어도 하나의 Fc 융합 분자, 적어도 하나의 혈청 알부민 (예컨대, HSA 또는 BSA), HSA 융합 분자 또는 알부민 접합체를 포함한다. 추가 구현예에서, 변형된 IL-10 제제는 당화되거나, 헤실화되거나, 또는 적어도 하나의 알부민 결합 도메인을 포함한다. 일부 변형된 IL-10 제제는 하나를 초과하는 유형의 변형을 포함할 수 있다. 특별한 구현예에서, 변형은 부위-특이적이다. 일부 구현예는 링커를 포함한다. 변형된 IL-10 제제는 이하에 상세히 논의된다.

[0026] IL-10 제제는 임의의 효과적인 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 그것은 피하 주사를 포함하는 비경구 주사에 의해 투여된다.

[0027] 시내용의 특정 구현예는 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제 (예컨대, 등장 주사

액)와 함께, 상기 기재된 제제를 포함하는, IL-10 제제의 양 (예컨대, 치료학적 유효량)을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 상기 약제학적 조성물은 일반적으로 인간 투여에 적합한 것이다. 또한, 일부 구현예에서 상기 약제학적 조성물은 도 하나의 추가적인 예방제 또는 치료제를 포함한다.

[0028] 본 개시내용의 특정 구현예는 상기-언급된 약제학적 조성물 중 하나 및 임의로 하나 이상의 추가의 성분을 함유하는 멀균 용기를 고려한다. 비제한적인 예로써, 본 멀균 용기는 주사기일 수 있다. 추가 구현예에서, 멀균 용기는 키트의 하나의 구성요소이며; 키트는 또한, 예를 들어, 적어도 하나의 예방제 또는 치료제를 포함하는 제2 멀균 용기를 함유할 수 있다.

[0029] 시내용은 IL-10 제제가 대상체에게 매일 적어도 2회, 매일 적어도 1회, 48시간마다 적어도 1회, 72시간마다 적어도 1회, 매주 적어도 1회, 2주마다 적어도 1회, 매월 적어도 1회, 2개월마다 적어도 1회, 또는 3개월마다 적어도 1회 투여되는 방법을 고려한다. 구현예는 또한 적어도 하나의 추가적인 예방제 또는 치료제와 함께 IL-10 제제를 투여하는 것을 포함하며, 이의 예가 이하에 제시되어 있다.

[0030] 본 발명은 또한 본원의 교시와 함께 유전자 요법의 사용을 고려한다. 유전자 요법 사용 및 방법을 위해, 대상체의 세포는 생체내에서 본원에 제시된 바와 같은 IL-10 - 관련 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산으로 형질전환될 수 있다. 대안적으로, 세포는 시험관내에서 전이유전자 또는 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 다음, 치료를 달성하기 위해 대상체의 조직 내로 이식될 수 있다. 또한, 일차 세포 단리물 또는 확립된 세포주는 IL-10 - 관련된 폴리펩타이드를 인코딩하는 전이유전자 또는 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 다음, 선택적으로 대상체의 조직 내로 이식될 수 있다.

[0031] 또한, 본 개시내용의 특정 구현예는 치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 양은 적어도 0.1 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분하다. 또는 예방 방법은 CD8+ T 세포에 의해 매개될 수 있다.

[0032] 다른 구현예는 치료학적 유효량의 IL-10 제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 대상체 (예컨대, 인간)에서 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 상기 양은 일정 기간 동안 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 유지하는데 충분하며, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 0.1 ng/mL이고, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 상기 기간의 적어도 90% 동안 유지된다. 본 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 0.2 ng/mL, 적어도 0.3 ng/mL, 및 적어도 0.4 ng/mL, 적어도 0.5 ng/mL, 적어도 0.6 ng/mL, 적어도 0.7 ng/mL, 적어도 0.8 ng/mL, 적어도 0.9 ng/mL, 적어도 1 ng/mL, 적어도 1.2 ng/mL, 적어도 1.25 ng/mL, 적어도 1.3 ng/mL, 적어도 1.4 ng/mL, 적어도 1.5 ng/mL, 적어도 1.6 ng/mL, 적어도 1.7 ng/mL, 적어도 1.8 ng/mL, 적어도 1.85 ng/mL, 적어도 1.9 ng/mL, 적어도 1.95 ng/mL, 적어도 1.97 ng/mL, 및 적어도 1.98 ng/mL, 적어도 1.99 ng/mL, 적어도 2.0 ng/mL 또는 2 ng/mL 초과이다.

[0033] 추가 구현예에서, 상기 기간은 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 6주, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 또는 3개월 초과이다.

[0034] 본 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 상기 기간의 적어도 85%, 상기 기간의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동안 유지된다.

[0035] 본 개시내용의 다른 구현예가 본원에 기재되어 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0036] 도1은 하기의 아미노산 서열을 나타낸다: 인간 (서열번호: 28) 및 마우스 IL-10 (서열번호: 29).

도2A는 증가하는 IL-10의 농도에서 PBMC에서의 MCP-1의 농도 (pg/mL)를 나타낸다. 1 ng/mL 이상의 농도에서, IL-10은 MCP-1의 분비를 증가시켰다.

도2B는 증가하는 IL-10의 농도에서 LPS로 자극된 PBMC에서의 MCP-1의 농도 (pg/mL)를 나타낸다. IL-10은 PBMC의 LPS-매개된 활성화의 억제제이며, 1 ng/mL 이상의 농도의 IL-10의 부가는 MCP-1의 분비를 유의하게 억제하였다.

도3은 표시된 종양 유형을 갖는 환자에게 PEG-hIL-10을 투여한 용량 증가 연구의 결과를 나타낸다. 개별적인 종양 크기 및 총 종양 부하 (burden)은 면역 관련 반응 기준 (irRC)에 따라 7주 치료 후에 측정되었다.

도4는 계산된 EC50 값과 비교하여 1, 2.5, 5, 10 또는 20  $\mu$ g/kg의 PEG-hIL-10이 투여된 환자에서 달성된 평균

혈청 농도를 나타낸다.

도5A 및 5B는 시험관내 세포-기반 활성에 기초하여 계산된 EC50과 비교하여 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10 (도5A) 및 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of PEG-hIL-10 (도5B)이 투여된 각 환자의 혈청 농도를 나타낸다.

도6은 2명의 CRC 환자에서 CEA 종양 마커에 대한 증가하는 PEG-hIL-10의 양의 투여 효과를 나타낸다.

도7A-7C는 3개의 원발성 종양 유형 중 하나를 갖는 환자에서 전이 병변의 크기에 대한 PEG-hIL-10의 효과를 나타낸다 (흑색종 (도7A), RCC (도7B) 및 CRC (도7C)).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

본 발명이 추가로 기재되기 전에, 본 발명이 본원에 기재된 특별한 구현예에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 하고, 또한 본원에 사용된 용어는 특별한 구현예만을 기재하기 위한 것이며, 제한적이지는 않음이 이해되어야 한다.

[0038]

값의 범위가 제공되는 경우, 맥락이 명백하게 다르게 나타내지 않는 한, 그 범위의 상한치 및 하한치와 그 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 또는 중재 값 사이의 하한치의 단위의 10분의 1까지의 각 중재 값이 본 발명 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 보다 작은 범위의 상한치 및 하한치는 독립적으로 보다 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 그 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제한된 한계에 따라 본 발명에 포함된다. 언급된 범위가 한계치의 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 그 포함된 한계치 중의 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위도 또한 본 발명에 포함된다. 달리 정의되지 않으면, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명 속 하는 당해 분야의 평균적 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0039]

본원 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 단수 형태는 문맥이 명백하게 다르게 지시하지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것을 주시해야 한다. 특허청구범위는 임의의 선택적 요소를 배제하도록 초안이 작성될 수 있음을 추가로 유의해야 한다. 이와 같이, 이 진술은 특허청구범위 요소의 인용 또는 "부정적인" 제한의 사용과 관련하여 "단독", "유일한" 등과 같은 이러한 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기준으로서의 역할을 하기 위한 것이다.

[0040]

본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 그들의 개시를 위해서만 제공된다. 추가로, 제공된 공개일은 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.

[0041]

### 개관

[0042]

본 개시내용은 다양한 질환, 장애 및 병태, 및/또는 이의 증상을 치료하고/거나 예방하기 위한, 본원에 기재된 제제, 및 이의 조성물의 사용을 고려한다. 본 개시내용의 특정 측면에서, 이러한 치료 또는 예방은 특정 투약 매개변수를 이용함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, 제제는, 예를 들어, 염증- 및 면역-관련 장애, 섬유증 장애, 암 및 암-관련 장애, 또는 심혈관 장애 (예컨대, 아테로스 성 동맥경화증)을 치료하기 위해 최적화된 혈청 최저 농도를 달성하기 위해 투여된다.

[0043]

본 개시내용의 일부 구현예에서, IL-10 제제 (예컨대, IL-10 폴리펩타이드)에 의해 치료될 수 있는 질환 또는 장애를 갖거나 가질 위험성이 있는 대상체에게 약 6.0 ng/mL 초과의 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분한 양의 IL-10 제제가 투여되며, 특정 구현예에서 혈청 최저 농도는 약 10.0 ng/mL 초과인 반면, 다른 구현예에서 혈청 최저 농도는 약 20.0 ng/mL 초과이다.

[0044]

본 발명의 폴리펩타이드 및 핵산 분자와 관련된 "인간"에 대한 임의의 참조는 폴리펩타이드 또는 핵산이 수득되는 방식 또는 공급원에 대해 제한하려는 것이 아니라 오히려 서열이 천연 발생 인간 폴리펩타이드 또는 핵산 분자의 서열에 상응할 수 있기 때문에 단지 서열에 관한 것임을 주의해야 한다. 인간 폴리펩타이드 및 이를 인코딩하는 핵산 분자 외에도, 본 개시내용은 다른 종으로부터의 IL-10 - 관련 폴리펩타이드 및 상응하는 핵산 분자를 고려한다.

[0045]

### 정의

[0046]

다르게 명시되지 않는 한, 다음 용어는 이하 기재된 의미를 갖는 것으로 의도된다. 다른 용어는 명세서 전반에 걸쳐 다른 곳에서 정의된다.

[0047]

용어 "환자" 또는 "대상체"는 인간 또는 비인간 동물(예: 포유동물)을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0048]

용어 "투여", "투여하다" 등은, 이들이 예를 들어, 대상체, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체에 적용될

때, 예를 들어, IL-10 또는 PEG-IL-10, 핵산 (예컨대, 천연 인간 IL-10을 인코딩하는 핵산); 전술한 것을 포함하는 약제학적 조성물, 또는 진단 제제를 대상체, 세포, 조직, 기관, 또는 생물학적 유체에 접촉시키는 것을 지칭한다. 세포의 맥락에서, 투여는 시약의 상기 세포에의 접촉(예: 시험관내 또는 생체외) 뿐만 아니라 시약의 유체에의 접촉을 포함하고, 여기서 유체는 세포에 접촉한다.

[0049] 용어 "치료하다", "치료하는", "치료" 등은 대상체를 괴롭히는 질환, 장애, 또는 병태의 근본 원인 중 적어도 하나, 또는 대상체를 괴롭히는 질환, 장애, 또는 병태와 관련된 증상 중 적어도 하나를 일시적으로 또는 영구적으로 제거하거나, 감소시키거나, 억제하거나, 완화하거나, 또는 개선하기 위해, 질환, 장애 또는 병태, 또는 이의 증상이 진단되고, 관찰된 후에 개시된 행동 방침 (예컨대, IL-10 또는 IL-10을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것)을 지칭한다. 따라서, 치료는 활동성 질환을 억제하는 것 (예컨대, 질환, 장애 또는 병태 또는 이와 관련된 임상 증상의 발달 또는 추가 발달을 정지시키는 것)을 포함한다. 상기 용어는 또한 IL-10 또는 PEG-IL-10이, 예를 들어, 유체상 또는 콜로이드상에서 IL-10 수용체와 접촉하는 상황과 같은 다른 맥락에서 사용될 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 용어 "치료가 필요한"은 대상체가 치료를 필요로 하거나 도움이 될 것으로 의사 또는 다른 간병인이 내리는 판단을 의미한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 인자를 기반으로 하여 내려진다.

[0051] 용어 "예방하다", "예방하는", "예방" 등은 질환, 장애, 병태 등이 생길 대상체의 위험성을 일시적으로 또는 영구적으로 예방하거나, 억제하거나, 저해하거나 또는 감소시키기 위한 (예를 들어, 임상 증상의 부재에 의해 결정되는 바와 같음) 또는 일반적으로 특정 질환, 장애 또는 병태를 갖기 쉬운 대상체의 맥락에서, 이의 발병을 지연시키기 위해 방식으로 (예컨대 질환, 장애, 병태 또는 이의 증상의 발병 전에) 개시된 행동 방침 (예컨대, IL-10 또는 IL-10을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것)을 지칭한다. 특정 예에서, 상기 용어는 또한 질환, 장애 또는 상태의 진행을 늦춤 또는 유해하거나 달리 바람직하지 않은 상태로의 이의 진행을 억제함을 의미한다.

[0052] 본원에 사용된 용어 "예방이 필요한"은 대상체가 예방적 치료를 필요로 하거나 이로부터 이익을 얻을 것이라는 의사 또는 다른 간병인에 의해 내려진 판단을 의미한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 요소를 기반으로 하여 내려진다.

[0053] "치료적 유효량"이란 어구는 대상체에게 투여될 경우, 질환, 장애 또는 상태의 임의의 증상, 국면 또는 특징에 대한 임의의 검출 가능한 긍정적인 효과를 가질 수 있는 양으로 단독으로 또는 약제학적 조성물의 일부로서, 단일 용량 또는 일련의 용량의 일부로서 대상체에게 제제의 투여를 의미한다. 적 유효량은 관련 생리학적 효과를 측정함으로써 확인될 수 있으면, 이는 투여 섭생 및 대상체 상태의 진단 분석 등과 관련하여 조정될 수 있다. 예로서, 투여 후 생성된 염증성 사이토카인의 양의 측정은 치료적 유효량이 사용되었는지의 여부를 나타낼 수 있다.

[0054] "변화에 영향을 미치기에 충분한 양"이란 어구는 특정 요법의 투여 전(예: 기준선수준) 및 투여 후 측정된 지시자의 수준 사이의 검출 가능한 차이가 존재함을 의미한다. 지시자는 임의의 객관적인 매개변수 (예컨대, IL-10의 혈청 농도) 또는 주관적인 매개변수 (예컨대, 대상체의 행복감)를 포함한다.

[0055] 용어 "소분자"는 약 10kDa 미만, 약 2kDa 또는 약 1kDa 미만의 분자량을 갖는 화학적 화합물을 의미한다. 소분자는 무기 분자, 유기 분자, 무기 성분을 함유하는 유기 분자, 방사성 원자를 포함하는 분자, 및 합성 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 치료적으로, 소분자는 세포에 보다 더 침투성일 수 있고, 분해에 덜 민감할 수 있고, 큰 분자보다 면역 반응을 발휘하기가 더 어려울 수 있다.

[0056] 용어 "리간드"는 수용체의 효능제 또는 길항제로서 작용할 수 있는, 예를 들어, 웨타이드, 폴리웨타이드, 막-관련 또는 막-결합된 분자, 또는 이의 복합체를 지칭한다. "리간드"는 천연 및 합성 리간드, 예컨대, 사이토카인, 사이토카인 변이체, 유사체, 뮤테인, 및 항체로부터 유래된 결합 조성물을 포함한다. "리간드"는 또한 소 분자, 예컨대, 웨타이드 사이토카인의 웨타이드 모방체 및 항체의 웨타이드 모방체를 포함한다. 상기 용어는 또한 작용제로 길항제도 아니지만, 이의 생물학적 특성, 예를 들어, 신호전달 또는 접착에 크게 영향을 미치지 않고 수용체에 결합할 수 있는 제제를 포함한다. 또한, 상기 용어는, 예를 들어, 화학적 또는 재조합 방법에 의해 막-결합 리간드의 가용성 버전으로 변화된 막-결합 리간드를 포함한다. 리간드 또는 수용체는 완전히 세포내 일 수 있고, 즉 이는 세포질, 핵 또는 일부 다른 세포내 구획에 존재할 수 있다. 리간드 및 수용체의 복합체는 "리간드-수용체 복합체"로 불린다.

[0057]

용어 "억제제" 및 "길항제" 또는 "활성화제" 및 "작용제"는, 예를 들어, 각각, 예를 들어, 리간드, 수용체, 공동인자, 유전자, 세포, 조직 또는 기관의 활성화를 위한 억제 또는 활성화 분자를 의미한다. 억제제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 감소시키고, 차단하고, 방지하고, 활성화 저연시키고, 불활성화시키고, 탈감각화하거나 하향 조절하는 분자이다. 활성화제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 증가시키고, 활성화시키고, 촉진시키고, 활성화 개선시키고, 민감하게 하거나 상향 조절하는 분자이다. 억제제는 또한 구성적 활성을 감소시키고, 차단하거나 불활성화시키는 분자로서 정의될 수 있다. "작용제"는 표적의 활성화의 증가를 일으키거나 촉진시키기 위해 표적과 상호작용하는 분자이다. "길항제"는 작용제의 작용(들)에 대항하는 분자이다. 길항제는 작용제의 활성을 방지하고, 감소시키고, 억제하거나 중화시키고, 길항제는 또한 동정된 작용제가 존재하지 않는 경우에도 표적, 예를 들어, 표적 수용체의 구성적 활성을 방지하고, 억제하거나 감소시킬 수 있다.

[0058]

용어 "조절하다", "조절" 등은 IL-10 제제 (또는 이들을 인코딩하는 핵산 분자)의 기능 또는 활성을 직접 또는 간접적으로 증가시키거나 감소시키는 분자 (예컨대, 활성제 또는 억제제)의 능력; 또는 IL-10 제제와 대등한 효과를 야기하는 분자의 능력을 향상시키는 것을 지칭한다. 용어 "조절제"는 광범위하게 상기한 활성에 영향을 미칠 수 있는 분자를 의미한다. 예로서, 예를 들어, 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 조절제는 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 활성을 변경하는 분자이고, 이때 활성은 이의 조절 특성에서 활성화되고, 억제되거나 변경될 수 있다. 조절제는 단독으로 작용할 수 있거나, 이는 공동인자, 예를 들어, 단백질, 금속 이온 또는 소분자를 사용할 수 있다. 용어 "조절제"는 IL-10과 동일한 작용 기전을 통해 작동하는 제제 (즉, 이와 유사한 방식으로 IL-10과 동일한 신호전달 경로를 조절하는 제제) 및 IL-10과 대등한 (또는 더 큰) 생물학적 반응을 유발할 수 있는 제제를 포함한다.

[0059]

조절제의 예는 소분자 화합물 및 다른 생체유기 분자를 포함한다. 소분자 화합물의 다수의 라이브러리(예: 조합라이브러리)는 시판되고, 조절제를 동정하기 위한 출발점으로서 작용할 수 있다. 당업자는, 이러한 화합물 라이브러리가 목적하는 특성을 갖는 하나 이상의 화합물을 동정하기 위해 스크리닝될 수 있는 하나 이상의 검정(예: 생화학적 또는 세포 기반 검정)을 개발할 수 있고; 이후, 숙련된 의학 화학자는, 예를 들어, 이의 유사체 및 유도체를 합성하고 평가함으로써 그러한 하나 이상의 화합물을 최적화할 수 있다. 합성 및/또는 분자 모델링 연구가 또한 활성제의 확인에 이용될 수 있다.

[0060]

분자의 "활성"은 리간드 또는 수용체에 대한 분자의 결합; 촉매적 활성; 유전자 발현 또는 세포 신호 전달, 분화 또는 성숙을 자극하는 능력; 항원성 활성; 다른 분자의 활성의 조절 등을 기재하거나 의미할 수 있다. 상기 용어는 또한 세포-대-세포 상호작용(예: 접착)을 조절하거나 유지하는데 있어서의 활성 또는 세포(예: 세포막)의 구조를 유지하는데 있어서의 활성을 의미할 수 있다. "활성"은 또한 하기를 의미할 수 있다: 특정 활성, 예를 들어, [촉매적 활성]/[mg 단백질], 또는 [면역학적 활성]/[mg 단백질], 생물학적 구획 중의 농도 등. 용어 "증식성 활성"은 암, 종양, 형성 장애, 세포 형질전환, 전이 및 혈관 신생 뿐만 아니라, 예를 들어, 정상 세포 분열을 촉진하거나, 즉 이를 위해 필요하거나 또는 특이적으로 이와 관련되는 활성을 포함한다.

[0061]

본원에 사용되는 "필적할 만한", "필적할 만한 활성", "에 필적할 만한 활성", "필적할 만한 효과", "에 필적할 만한 효과" 등은 정량적 및/또는 정성적으로 관찰될 수 있는 상대적인 용어이다. 상기 용어의 의미는 흔히 그들이 사용되는 맥락에 의존한다. 예로서, 모두 수용체를 활성화시키는 두 제제는 정성적인 관점에서 필적할 만한 효과를 갖는 것으로 볼 수 있지만, 두 제제는 하나의 제제가 당해 분야에서 허용되는 검정(예: 용량-반응 검정) 또는 당해 분야에서 허용되는 동물 모델에서 측정된 다른 제제의 활성의 20%만을 달성할 수 있는 경우 정량적인 관점에서 필적할 만한 효과가 결여된 것으로 볼 수 있다. 하나의 결과를 다른 결과 (예컨대, 하나의 결과를 참조 표준)와 비교할 때, "대등한"은 흔히 하나의 결과가 참조 표준으로부터 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 7% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만으로 벗어나는 것을 의미한다. 특별한 구현예에서, 하나의 결과는, 그것이 참조 표준으로부터 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만으로 벗어나는 경우, 참조 표준에 필적할 만하다. 예로서, 제한적이지는 않지만, 활성 또는 효과는 효능, 안정성, 용해도 또는 면역원성을 의미할 수 있다.

[0062]

예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 유기체의 "반응"이라는 용어는 생화학적 또는 생리학적 거동, 예를 들어, 생물학적 구획 내의 농도, 밀도, 접착 또는 이동, 유전자 발현율, 또는 분화 상태의 변화를 포함하고, 이때 상기 변화는 활성화, 자극 또는 처리, 또는 유전적 프로그래밍과 같은 내부 메커니즘과 상관관계가 있다. 특정 맥락에서, 용어 "활성화", "자극" 등은 외부 또는 환경적 메커니즘 뿐만 아니라 내부 메커니즘에 의해 조절되는 세포 활성화를 의미하는 반면, 용어 "억제", "하향 조절" 등은 반대의 효과를 의미한다.

[0063]

본원에 상호교환적으로 사용된 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 유적적으로 코딩된 및 비유전적으로 코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 비화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산을 포함할 수 있는 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태 및 변형된 폴리펩타이드 골격을 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 용어는 융합 단백질을 포함하고, 이는, 비제한적으로, 이종 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질; 이종 및 동종 리더 서열을 갖는 융합 단백질; N-말단 메티오닌 잔기를 갖거나 없는 융합 단백질; 면역학적으로 태그된 단백질을 갖는 융합 단백질 등을 포함한다.

[0064]

본 명세서 전반에 걸쳐, 단일 문자 또는 3개 문자 코드에 따르는 아미노산이 참조된다는 것이 이해될 것이다. 독자의 편의상, 단일 및 3개 문자 아미노산 코드가 하기에 제공된다:

G	글리신	Gly	P	프롤린	Pro
A	알라닌	Ala	V	발린	Val
L	류신	Leu	I	이소류신	Ile
M	메티오닌	Met	C	시스테인	Cys
F	페닐알라닌	Phe	Y	티로신	Tyr
W	트립토판	Trp	H	히스티딘	His
K	리신	Lys	R	아르기닌	Arg
Q	글루타민	Gln	N	아스파라гин	Asn
E	글루탐산	Glu	D	아스파르트산	Asp
S	세린	Ser	T	트레오닌	Thr

[0065]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변이체"는 천연 발생 변이체 및 비천연 발생 변이체를 포함한다. 천연 발생 변이체는 동족체(하나의 종에서 다른 종으로 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 상이한 폴리펩타이드 및 핵산), 및 대립유전자 변이체(한 종 내의 하나의 개체로부터 다른 개체로 각각 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열이 상이한 폴리펩타이드 및 핵산)을 포함한다. 비천연 발생 변이체는 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열 변화를 각각 포함하는 폴리펩타이드 및 핵산을 포함하며, 상기 서열 변화는 인공적으로 도입되고 (예컨대, 뮤테인); 예를 들어, 상기 변화는 인간 개입 ("인간의 손")에 의해 실험실에서 생성된다. 따라서, 본원에서 "뮤테인"은 광범위하게는 일반적으로 단일 또는 다수의 아미노산 치환을 가지며 부위-지향된 또는 무작위 돌연변이 생성이 수행된 클론된 유전자, 또는 완전 합성 유전자로부터 주로 유래되는 돌연변이된 재조합 단백질을 지칭한다.

[0066]

용어 "DNA", "핵산", "핵산 분자", "폴리뉴클레오티드" 등은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 이의 유사체를 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드의 비제한적인 예는 선형 및 환형 핵산, 메신저 RNA (mRNA), 상보성 DNA (cDNA), 재조합 폴리뉴클레오티드, 벡터, 프로브, 프라이머 등을 포함한다.

[0068]

폴리펩타이드의 구조의 맥락에서 사용된 바와 같이, "N-말단" (또는 "아미노 말단") 및 "C-말단" (또는 "카복실 말단")은 각각 폴리펩타이드의 극단적인 아미노 및 카복실 말단을 의미하는 반면, 용어 "N-말단" 및 "C-말단"은 각각 N-말단 및 C-말단을 향한 폴리펩타이드의 아미노산 서열 중의 상대적 위치를 의미하고, 각각 N-말단 및 C-말단에 잔기를 포함할 수 있다. "즉시 N-말단" 또는 "즉시 C-말단"은 제1 및 제2 아미노산 잔기가 공유 결합하여 인접한 아미노산 서열을 제공하는 제2 아미노산 잔기에 대한 제1 아미노산 잔기의 위치를 의미한다.

[0069]

아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 맥락에서, "로부터 유래된" (예컨대, IL-10 폴리펩타이드"로부터 유래된" 아미노산 서열)은 상기 폴리펩타이드 또는 핵산이 참조 폴리펩타이드 또는 핵산 (예컨대, 천연 IL-10 폴리펩타이드 또는 IL-10-인코딩 핵산)의 서열에 기초한 서열을 갖는 것을 의미하며, 상기 단백질 또는 핵산이 제조되는 공급원 또는 방법에 한정되는 것을 의미하지 않는다. 예로서, 용어 "로부터 유래된"은 참조 아미노산 또는 DNA 서열의 동족체 또는 변이체를 포함한다.

[0070]

폴리펩타이드의 맥락에서, 용어 "단리된"은 천연 발생되는 경우, 그것이 천연 발생하는 것과 상이한 환경에 있는 관심 있는 폴리펩타이드를 의미한다. "단리된"은 실질적으로 관심 있는 폴리펩타이드가 풍부하고/하거나 관심 있는 폴리펩타이드가 부분적으로 또는 실질적으로 정제되는 샘플 내에 존재하는 폴리펩타이드를 포함하는 것을 의미한다. 폴리펩타이드가 천연 발생하지 않는 경우, "단리된"은 폴리펩타이드가 그것이 합성 또는 재조합 수단에 의해 재조된 환경으로부터 분리되었음을 나타낸다.

- [0071] "풍부한"이란 샘플이 비천연 조작되어(예: 과학자에 의해) 관심 있는 폴리펩타이드가 a) 생물학적 샘플과 같은 출발 샘플(예: 폴리펩타이드가 천연 발생하거나 그것이 투여 후에 존재하는 샘플) 중의 폴리펩타이드의 농도보다 큰 농도(예: 적어도 3배 초과, 적어도 4배 초과, 적어도 8배 초과, 적어도 64배 초과 또는 그 이상) 또는 b) 폴리펩타이드가 제조된 환경(예: 세균성 세포에서와 같이)에서보다 큰 농도로 존재함을 의미한다.
- [0072] "실질적으로 순수한"은 성분(예: 폴리펩타이드)이 조성물의 총 함량의 약 50% 초과, 전형적으로 전체 폴리펩타이드 함량의 약 60% 초과를 구성함을 나타낸다. 보다 전형적으로, "실질적으로 순수한"은 전체 조성물의 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 그 이상이 관심 있는 성분인 조성물을 의미한다. 일부의 경우에, 폴리펩타이드는 조성물의 총 함량의 약 90% 초과, 또는 약 95% 초과를 구성할 것이다.
- [0073] 리간드/수용체, 항체/항원 또는 다른 결합 쌍을 지칭할 때, 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "선택적으로 결합한다"는 단백질의 이종 집단 및 다른 생물체제 중에 단백질의 존재의 결정인자인 결합 반응을 나타낸다. 따라서, 지정된 조건하에, 특정 리간드는 특별한 수용체에 결합하고, 샘플 중에 존재하는 다른 단백질에 상당량으로 결합하지 않는다. 상기 고려된 방법의 항체, 또는 항체의 항원-결합 부위로부터 유래된 결합 조성물은 임의의 다른 항체, 또는 이로부터 유래된 결합 조성물과의 친화도보다 적어도 2배 큰, 적어도 10배 큰, 적어도 20배 큰, 또는 적어도 100배 큰 친화도로 그의 항원, 또는 이의 변이체 또는 뮤테인에 결합한다. 특별한 구현예에서, 항체는 하기에 의해 결정된 바와 같이, 약  $10^9$  리터/mol을 초과하는 친화도를 가질 것이다: 예를 들어, 스캐차드 분석(Scatchard analysis)(참조: Munson, 등 1980 *Analyt. Biochem.* 107: 220-239).
- [0074] IL-10 및 PEG-IL-10
- [0075] 인간 사이토카인 합성 억제 인자 (CSIF)로도 알려진 항-염증 사이토카인 IL-10은 IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (Mda-7), 및 IL-26, 인터페론 (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\delta$ , - $\varepsilon$ , - $\kappa$ , - $\omega$ , 및 - $\tau$ ) 및 인터페론-유사 분자 (limitin, IL-28A, IL-28B, 및 IL-29)를 포함하는 사이토카인의 집합인 유형 (클래스)-2 사이토카인으로 분류된다.
- [0076] IL-10은 면역조절 및 염증에서 다면발현 (pleiotropic) 효과를 갖는 사이토카인이다. 그것은 비만 세포에 의해 생성되며, 이를 세포가 알러지 반응 부위에서 갖는 염증 효과를 대항한다. 그것은 전-염증 (pro-inflammatory) 사이토카인, 예컨대 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF  $\alpha$  및 GM-CSF의 합성을 억제할 수 있지만, IL-10은 또한 특정 T 세포 및 비만 세포에 대해 자극성이고 B-세포 성숙, 증식 및 항체 생산을 자극한다. IL-10은 NF- $\kappa$ B 활성을 차단할 수 있고 JAK-STAT 신호전달 경로의 조절에 관여한다. 그것은 또한 CD8+ T-세포의 세포독성 활성 및 B-세포의 항체 생산을 유도하고, 그것은 대식세포 활성 및 종양-촉진 염증을 억제한다. CD8+ T-세포의 조절은 용량의 존적이며, 더 높은 용량은 더 강한 세포독성 반응을 유도한다.
- [0077] 인간 IL-10은 37kDa의 분자량을 갖는 동종이량체이며, 각각의 18.5kDa 단량체는 178개의 아미노산을 포함하고, 이를 중 처음 18개는 신호 펩타이드, 및 2개의 분자내 디설파이드 결합을 형성하는 2개의 시스테인 잔기의 쌍을 포함한다. IL-10 이량체는 2개의 단량체 서브유닛 간의 비공유 상호작용의 파괴시 생물학적으로 불활성화된다.
- [0078] 본 개시내용은 80% 상동성을 나타내는 인간 IL-10 및 젖과 IL-10, 및 이의 용도를 고려한다. 또한, 본 개시내용의 범위는 다른 포유동물 종으로부터의, IL-10 오솔로그 (ortholog), 및 이의 변형된 형태를 포함하며, 이는 랫트 (승인 NP\_036986.2; GI 148747382); 소 (승인 NP\_776513.1; GI 41386772); 양 (승인 NP\_001009327.1; GI 57164347); 개 (승인 ABY86619.1; GI 166244598); 및 토끼 (승인 AAC23839.1; GI 3242896)를 포함한다.
- [0079] 상기에 암시된 바와 같이, 용어 "IL-10", "IL-10 폴리펩타이드(들)", "IL-10 제제(들)" 등은 광범위하게 해석되는 것으로 의도되며, 예를 들어, 동족체, 변이체 (뮤테인 포함), 및 이의 단변을 포함하는 인간 및 비-인간 IL-10 - 관련된 폴리펩타이드, 뿐만 아니라, 예를 들어, 리더 서열 (예컨대, 신호 펩타이드)을 갖는 IL-10 폴리펩타이드, 및 전술한 것의 변형된 형태를 포함한다. 추가의 특정 구현예에서, IL-10, IL-10 폴리펩타이드(들), 및 IL-10 제제(들)는 효능제이다.
- [0080] 유형 II 사이토카인 수용체인 IL-10 수용체는 알파 및 베타 서브유닛으로 이루어지며, 이는 각각 R1 및 R2로도 불린다. 수용체 활성화는 알파 및 베타 모두에 대한 결합을 필요로 한다. IL-10 폴리펩타이드의 하나의 동종이량체는 알파에 결합하고, 동일한 IL-10 폴리펩타이드의 다른 동종이량체는 베타에 결합한다.
- [0081] 재조합 인간 IL-10의 유용성은 흔히 그의 상대적으로 짧은 혈청 반감기에 의해 제한되며, 이는 신장 제거, 단백질 분해 및 혈류에서의 단량체화 때문일 수 있다. 그 결과, 그의 이량체성 구조를 파괴하지 않고 따라서 그의 활성에 부정적으로 영향을 미치지 않으면서 IL-10의 약동학 프로파일을 개선하고자 하는 다양한 접근법이 개발

되었다. IL-10의 폐길화는 특정 약동학적 매개변수 (예컨대, 혈청 반감기)의 개선 및/또는 활성의 향상을 야기 한다. 예를 들어, 본 개시내용의 특정 구현에는 PEG-IL-10을 사용한 증식 장애 (예컨대, 암)의 치료를 최적화하는 방법을 포함한다.

[0082] 전술한 바와 같이, 본 개시내용은 또한 본원의 교시와 관련하여 유전자 요법의 사용을 고려한다. 유전자 요법은 새로운 유전자를 도입하거나, 기존의 유전자의 추가의 카피를 도입하거나 현존하는 유전자의 기능을 손상시키거나 현존하는 비기능성 유전자를 회복시키기 위해 일반적으로 벡터로 포장된 유전 물질을 대상체 내의 내인성 세포로 전달함으로써 수행된다. 일단 세포 내부이면, 핵산은 세포 기계에 의해 발현되어 관심 있는 단백질의 생산을 유도한다. 본 개시내용의 맥락에서, 유전자 요법은 본원에 기재된 질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 IL-10 제제를 인코딩하는 핵산을 전달하는 치료제로서 사용된다.

[0083] 상기에 암시된 바와 같이, 유전자 요법 사용 및 방법을 위해, 대상체에서의 세포는 생체내에서 본원에 제시된 바와 같은 IL-10 - 관련된 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산으로 형질전환될 수 있다. 대안적으로, 세포는 시험관내에서 전이유전자 또는 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 다음, 치료를 달성하기 위해 대상체의 조직 내로 이식될 수 있다. 또한, 일차 세포 단리를 또는 확립된 세포주는 IL-10 - 관련된 폴리펩타이드를 인코딩하는 전이유전자 또는 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 다음, 선택적으로 대상체의 조직 내로 이식될 수 있다.

[0084] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폐길화된 IL-10" 및 "PEG-IL-10"은 부착이 안정하도록 일반적으로 링커를 통해 IL-10 단백질의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유 부착된 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 갖는 IL-10 분자를 지칭한다. 용어 "모노폐길화된 IL-10" 및 "모노-PEG-IL-10"은 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가, 일반적으로 링커를 통해, IL-10 이량체의 하나의 서브유닛 상의 단일 아미노산 잔기에 공유 부착된 것을 가리킨다. 특정 구현예에서, 본 개시내용에 사용된 PEG-IL-10은 1 내지 9개의 PEG 분자가 링커를 통해 IL-10 이량체의 하나의 서브유닛의 N-말단에 있는 아미노산 잔기의 알파 아미노기에 공유 부착된 모노-PEG-IL-10이다. 하나의 IL-10 서브유닛 상의 모노폐길화는 일반적으로 서브유닛 셔플링(shuffling)으로 인해 비-폐길화된, 모노폐길화된 및 디폐길화된 IL-10의 비-균일 혼합물을 야기한다. 더욱이, 폐길화 반응을 완료시까지 진행시키는 것은 일반적으로 비-특이적이고 다중-폐길화된 IL-10을 야기시켜 그의 생체활성을 감소시킬 것이다. 따라서, 본 개시내용의 특정 구현예는 본원 (예컨대, 실험 섹션)에 기재된 방법에 의해 생산된 모노- 및 디-폐길화된 IL-10의 혼합물의 투여를 포함한다.

[0085] 특별한 구현예에서, PEG 잔기의 평균 분자량은 약 5kDa 내지 약 50kDa이다. IL-10에 대한 PEG 부착 방법 또는 부위가 중요하지는 않지만, 특정 구현예에서 폐길화는 IL-10 제제의 활성을 변경하지 않거나, 단지 최소한으로 변경한다. 특정 구현예에서, 반감기의 증가는 생물학적 활성의 어떤 감소보다 더 크다. PEG-IL-10의 생물학적 활성은 하기 문헌에 기재된 바와 같이, 박테리아 항원 (지질다당류 (LPS))이 투여되고 PEG-IL-10으로 처리된 대상체의 혈청에서 염증 사이토카인 (예컨대, TNF- $\alpha$  또는 IFN- $\gamma$ )의 수준을 평가함으로써 전형적으로 측정된다: U.S. 특허 제7,052,686호.

[0086] IL-10 변이체는, 혈청 반감기를 증가시키는 것, IL-10에 대한 면역 반응을 감소시키는 것, 정제 또는 제조를 용이하게 하는 것, IL-10이 그의 단량체성 서브유닛으로 전환되는 것을 감소시키는 것, 치료 효능을 개선하는 것, 및 치료 사용 동안 부작용의 중증도 또는 발생을 줄이는 것을 포함하는, 다양한 목적으로 제조될 수 있다. 아미노산 서열 변이체는 일반적으로 자연에서 발견되지 않는 소정의 변이체이지만, 일부는 면역 후 변이체, 예를 들어, 당화 변이체일 수 있다. IL-10의 임의의 변이체는 적합한 수준의 IL-10 활성을 유지하는 경우 사용될 수 있다. 종양 맥락에서, 적합한 IL-10 활성은, 예를 들어, 종양 부위 내로의 CD8+ T 세포 침윤, 이들 침윤 세포로부터 IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6, IL-10, 및 RANK-L과 같은 염증 사이토카인의 발현, 및 생물학적 샘플에서 IFN- $\gamma$ 의 수준 증가를 포함한다.

[0087] "보존적 아미노산 치환"이란 어구는 단백질 중의 아미노산(들)을 유사한 산도, 염기도, 전하, 극성 또는 크기의 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환함으로써 단백질의 활성을 보존하는 치환을 의미한다. 보존적 아미노산 치환은 일반적으로 다음 그룹 내의 아미노산 잔기의 치환을 수반한다: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; 및 6) D, E. 치환, 삽입 또는 결실에 대한 지침은 상이한 변이체 단백질 또는 상이한 종의 단백질의 아미노산 서열의 정렬에 기초할 수 있다. 따라서, 임의의 천연 발생 IL-10 폴리펩타이드 외에도, 본 개시내용은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10, 일반적으로 20, 10, 또는 5개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것을 고려하며, 상기 치환은 일반적으로 보존적 아미노산 치환이다.

[0088] 본 개시내용은 또한 성숙한 IL-10으로부터 유래된 연속적인 아미노산 잔기를 함유하는 성숙한 IL-10의 활성 단편 (예컨대, 하위서열)을 고려한다. 웨بت아이드 또는 폴리펩타이드 서열의 인접한 아미노산 잔기의 길이는 서열이

유래되는 특정 천연 발생 아미노산 서열에 의존한다. 일반적으로, 웨타이드 및 폴리웨타이드는 약 20 아미노산 내지 약 40 아미노산, 약 40 아미노산 내지 약 60 아미노산, 약 60 아미노산 내지 약 80 아미노산, 약 80 아미노산 내지 약 100 아미노산, 약 100 아미노산 내지 약 120 아미노산, 약 120 아미노산 내지 약 140 아미노산, 약 140 아미노산 내지 약 150 아미노산, 약 150 아미노산 내지 약 155 아미노산, 약 155 아미노산 내지 전장 웨타이드 또는 폴리웨타이드일 수 있다.

[0089] 또한, IL-10 폴리웨타이드는 연속적인 아미노산의 정의된 길이 (예컨대, "비교 원도우")에 대해 참조 서열과 비교하여 정의된 서열 동일성을 가질 수 있다. 비교를 위한 서열 정렬 방법은 본 기술분야에 널리 알려져 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어, 하기에 의해 수행될 수 있다: 하기 문헌의 국소 상동성 알고리즘: Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), 하기 문헌의 상동성 정렬 알고리즘: Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), 하기 문헌의 유사성 방법의 검색: Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), 이러한 알고리즘(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.)의 컴퓨터화된 구현 또는 수동 정렬 및 육안 검사(참조: 예를 들어, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 등, Eds. 1995 supplement)).

[0090] 예로서, 적합한 IL-10 폴리웨타이드는 약 20 아미노산 내지 약 40 아미노산 내지 약 60 아미노산, 약 60 아미노산 내지 약 80 아미노산, 약 80 아미노산 내지 약 100 아미노산, 약 100 아미노산 내지 약 120 아미노산, 약 120 아미노산 내지 약 140 아미노산, 약 140 아미노산 내지 약 150 아미노산, 약 150 아미노산 내지 약 155 아미노산, 약 155 아미노산 내지 전장 웨타이드 또는 폴리웨타이드의 연속적인 범위에 대해 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99%, 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0091] 하기에 추가로 논의된 바와 같이, IL-10 폴리웨타이드는 천연 공급원 (예컨대, 그의 천연 발생 환경 이외의 환경)으로부터 단리될 수 있고, 또한 재조합적으로 제조될 수 있으며 (예컨대, 박테리아, 효모, 피키아, 곤충 세포, 등과 같은 유전적으로 변형된 숙주 세포에서), 상기 유전적으로 변형된 숙주 세포는 상기 폴리웨타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로 변형된다. IL-10 폴리웨타이드는 또한 합성적으로 생산될 수 있다 (예컨대, 무세포 화학 합성에 의해).

[0092] IL-10 제제를 인코딩하는 핵산 분자가 본 개시내용에 의해 고려되며, 이는 이들의 천연 발생 및 비-천연 아형 (isoform), 대립유전자 변이체 및 스플라이스 변이체를 포함한다. 본 개시내용 또한 천연 발생 DNA 서열과 하나 이상의 염기가 다르지만 유전적 코드의 축퇴성으로 인해 IL-10 폴리웨타이드에 상응하는 아미노산 서열로 여전히 변역되는 핵산 서열을 포함한다.

### IL-10 혈청 농도

[0093] 본원에 기재된 방법에서 IL-10의 혈액 혈장 수준은 하기를 포함하는, 몇 가지 방식으로 특성이 기술될 수 있다: (1) 일부 특정 수준을 초과하거나 또는 일정 범위의 수준에 있는 평균 IL-10 혈청 최저 농도; (2) 일정 기간 동안 일부 특정 수준을 초과하는 평균 IL-10 혈청 최저 농도; (3) 일부 특정 수준을 초과하거나 그 미만이거나 또는 일정 범위의 수준에 있는 정상 상태 IL-10 혈청 농도 수준; 또는 (4) 일부 특정 수준을 초과하거나 그 미만이거나 또는 일정 수준에 있는 농도 프로파일의  $C_{max}$ . 본원에 제시된 바와 같이, 평균 혈청 최저 IL-10 농도는 특정 징후에서의 효능을 위해 특히 중요한 것으로 나타났다.

[0094] 예를 들면, 고형 종양을 갖는 환자를 치료하기 위한 PEG-hIL-10의 혈청 수준.

[0095] 실험 섹션은 PDV6 편평 세포 암종 및 CT-26 결장 암종에서  $m$ IL-10 및 PEG- $m$ IL-10의 치료 효능의 평가를 기술하며, 상기  $m$ IL-10 및  $m$ PEG-IL-10 투약 매개변수 (양 및 투여 빈도)는 1-2 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하는데 충분하다. 실험 섹션에 기재된 바와 같이, PEG-IL-10 치료는 완전 반응을 야기하는 반면, IL-10 치료는 항-종양 기능을 입증하였으나 완전 반응은 입증하지 않았다.

[0096] 그러나, 실험 섹션에 상세히 기재된 추가 평가는 더 높은 혈청 농도가 종양학 환경에서 유용하다는 것을 나타내었다. 특히, 고형 종양 (예컨대, 난소 종양, 신장 종양, 결장 종양, 또는 췌장 종양) 환자에서 PEG-hIL-10의 효과의 평가는, 최대 효과를 달성하기 위해 초기 고려된 (및 하기에 기재된) 것보다 더 큰 PEG-hIL-10의 혈청 농도를 달성하는 것이 유리하다는 것을 보여주었다.

[0097] 따라서, 본 개시내용은 암-관련-질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방에 관한 구현예를 고려하며, 상기 요법은 적어도 6.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성함으로써 최적화된다. 일부 구현예에서, 생성될 수 있

는 농도 프로파일은 하기를 포함한다: 약 6.5 ng/mL 초과, 약 7.0 ng/mL 초과, 약 7.5 ng/mL 초과, 약 8.0 ng/mL 초과, 약 8.5 ng/mL 초과, 약 9.0 ng/mL 초과, 약 9.5 ng/mL 초과, 약 10.0 ng/mL 초과, 약 10.5 ng/mL 초과, 약 11.0 ng/mL 초과, 약 11.5 ng/mL 초과, 약 12.0 ng/mL 초과, 약 12.5 ng/mL 초과, 약 13.0 ng/mL 초과, 약 13.5 ng/mL 초과, 약 14.0 ng/mL 초과, 약 14.5 ng/mL 초과, 약 15.0 ng/mL 초과, 약 15.5 ng/mL 초과, 약 16.0 ng/mL 초과, 약 16.5 ng/mL 초과, 약 17.0 ng/mL 초과, 약 17.5 ng/mL 초과, 약 18.0 ng/mL 초과, 약 18.5 ng/mL 초과, 약 19.0 ng/mL 초과, 약 19.5 ng/mL 초과, 약 20.0 ng/mL 초과, 약 20.5 ng/mL 초과, 약 21.0 ng/mL 초과, 약 21.5 ng/mL 초과, 약 22.0 ng/mL 초과, 약 22.5 ng/mL 초과, 약 23.0 ng/mL 초과, 또는 약 24.0 ng/mL 초과의 평균 IL-10 혈청 최저 농도.

[0099] 본 개시내용의 특정 구현예는 약 6.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 7.0 ng/mL 내지 약 19.0 ng/mL, 약 8.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 9.0 ng/mL 내지 약 17.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 21.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 19.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 17.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 16.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 15.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 12.5 ng/mL, 약 12.5 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 12.5 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 12.5 ng/mL 내지 약 17.5 ng/mL, 약 12.5 ng/mL 내지 약 15.0 ng/mL, 약 15.0 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 15.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 15.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 15.0 ng/mL 내지 약 17.0 ng/mL, 약 17.5 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 17.5 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 18.0 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 18.0 ng/mL 내지 약 21.0 ng/mL, 약 18.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 6.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 6.0 ng/mL 내지 약 16.0 ng/mL, 약 6.0 ng/mL 내지 약 14.0 ng/mL, 약 6.0 ng/mL 내지 약 12.0 ng/mL, 약 6.0 ng/mL 내지 약 10.0 ng/mL, 약 8.0 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 8.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 8.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 8.0 ng/mL 내지 약 16.0 ng/mL, 약 8.0 ng/mL 내지 약 14.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 16.0 ng/mL, 약 10.0 ng/mL 내지 약 14.0 ng/mL, 약 12.0 ng/mL 내지 약 22.0 ng/mL, 약 12.0 ng/mL 내지 약 20.0 ng/mL, 약 12.0 ng/mL 내지 약 18.0 ng/mL, 약 12.0 ng/mL 내지 약 16.0 ng/mL, 또는 약 12.0 ng/mL 내지 약 14.0 ng/mL 범위의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 포함한다.

[0100] 다른 질환, 장애 또는 병태를 갖는 환자의 추가 평가는 또한 이러한 상승된 혈청 농도로부터 이익을 얻을 수 있는 환자 집단을 확인할 수 있다. 그러나, 그러한 환자 집단에서도, 임상적으로 관련된 유용성은 또한 더 낮은 농도에서 관찰될 수 있다.

[0101] 특정 환자 진단을 치료하는데 유용한 PEG-hIL-10의 혈청 수준.

[0102] 본 개시내용의 일부 구현예에서, 생성될 수 있는 혈액 혈장 수준 농도 프로파일은 하기를 포함한다: 약 0.1 ng/mL 초과, 약 0.15 ng/mL 초과, 약 0.2 ng/mL 초과, 약 0.25 ng/mL 초과, 약 0.3 ng/mL 초과, 약 0.35 ng/mL 초과, 약 0.4 ng/mL 초과, 약 0.45 ng/mL 초과, 약 0.5 ng/mL 초과, 약 0.55 ng/mL 초과, 약 0.6 ng/mL 초과, 약 0.65 ng/mL 초과, 약 0.7 ng/mL 초과, 약 0.75 ng/mL 초과, 약 0.8 ng/mL 초과, 약 0.85 ng/mL 초과, 약 0.9 ng/mL 초과, 약 0.95 ng/mL 초과, 약 1.0 ng/mL 초과, 약 1.1 ng/mL 초과, 약 1.2 ng/mL 초과, 약 1.3 ng/mL 초과, 약 1.4 ng/mL 초과, 약 1.5 ng/mL 초과, 약 1.6 ng/mL 초과, 약 1.7 ng/mL 초과, 약 1.8 ng/mL 초과, 약 1.9 ng/mL 초과, 약 2.0 ng/mL 초과, 약 2.1 ng/mL 초과, 약 2.2 ng/mL 초과, 약 2.3 ng/mL 초과, 약 2.4 ng/mL 초과, 약 2.5 ng/mL 초과, 약 2.75 ng/mL 초과, 또는 약 3.0 ng/mL 초과의 평균 IL-10 혈청 최저 농도.

[0103] 본 개시내용의 특정 구현예는 약 0.1 ng/mL 내지 약 1.0 ng/mL, 약 0.1 ng/mL 내지 약 0.9 ng/mL, 약 0.1 ng/mL 내지 약 0.8 ng/mL, 약 0.1 ng/mL 내지 약 0.7 ng/mL, 약 0.1 ng/mL 내지 약 0.6 ng/mL, 약 0.1 ng/mL 내지 약 0.5 ng/mL, 약 0.2 ng/mL 내지 약 1.0 ng/mL, 약 0.2 ng/mL 내지 약 0.9 ng/mL, 약 0.2 ng/mL 내지 약 0.8 ng/mL, 약 0.2 ng/mL 내지 약 0.7 ng/mL, 약 0.2 ng/mL 내지 약 0.6 ng/mL, 약 0.2 ng/mL 내지 약 0.5 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 1.0 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 0.9 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 0.8 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 0.7 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 0.6 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 0.5 ng/mL, 약 0.3 ng/mL 내지 약 0.4 ng/mL, 약 0.4 ng/mL 내지 약 1.0 ng/mL, 약 0.4 ng/mL 내지 약 0.9 ng/mL, 약 0.4 ng/mL 내지 약 0.8 ng/mL, 약 0.4 ng/mL 내지 약 0.7 ng/mL, 약 0.4 ng/mL 내지 약 0.6 ng/mL, 약 0.4 ng/mL 내지 약 0.5 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 1.0 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 0.9 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 0.8 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 0.7 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 0.6 ng/mL, 약 0.7 ng/mL 내지 약 2.3 ng/mL, 약 0.8 ng/mL 내지 약 2.2 ng/mL, 약 0.9 ng/mL 내지 약 2.1 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 2.1 ng/mL,

약 1.0 ng/mL 내지 약 2.0 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 1.9 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 1.8 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 1.7 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 1.6 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 1.5 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 2.5 ng/mL, 약 1.9 ng/mL 내지 약 2.5 ng/mL, 약 1.9 ng/mL 내지 약 2.4 ng/mL, 약 1.9 ng/mL 내지 약 2.3 ng/mL, 약 1.9 ng/mL 내지 약 2.2 ng/mL, 또는 약 1.9 ng/mL 내지 약 2.1 ng/mL 범위의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 포함한다.

[0104] 항-염증 질환, 장애 또는 병태의 치료 또는 예방에 관한 특정 구현예에서, 요법은 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 0.1 ng/mL 내지 0.9 ng/mL, 0.1 ng/mL 내지 0.8 ng/mL, 0.1 ng/mL 내지 0.7 ng/mL, 0.1 ng/mL 내지 0.6 ng/mL, 0.1 ng/mL 내지 0.5 ng/mL, 0.2 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 0.2 ng/mL 내지 0.9 ng/mL, 0.2 ng/mL 내지 0.8 ng/mL, 0.2 ng/mL 내지 0.7 ng/mL, 0.2 ng/mL 내지 0.6 ng/mL, 0.2 ng/mL 내지 0.5 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 0.9 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 0.8 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 0.7 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 0.6 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 0.5 ng/mL, 0.3 ng/mL 내지 0.4 ng/mL, 0.4 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 0.4 ng/mL 내지 0.9 ng/mL, 0.4 ng/mL 내지 0.8 ng/mL, 0.4 ng/mL 내지 0.7 ng/mL, 0.4 ng/mL 내지 0.6 ng/mL, 0.4 ng/mL 내지 0.5 ng/mL, 0.5 ng/mL 내지 1.0 ng/mL, 0.5 ng/mL 내지 0.9 ng/mL, 0.5 ng/mL 내지 0.8 ng/mL, 0.5 ng/mL 내지 0.7 ng/mL, 또는 0.5 ng/mL 내지 0.6 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성함으로써 최적화된다.

[0105] 실험 섹션 및 도4-7은 원하는 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하기 위해 사용될 수 있는 투여 요법의 예를 제공한다. 도4를 참조하면, 매일 20  $\mu$ g/kg의 PEG-hIL-10의 피하 (SC) 투여는 ~6 ng/mL의 EC50을 초과한 노출 (EC50 이상의 노출이 유리한 것으로 간주되었음) 및 10 ng/mL의 IL-10 혈청 최저 농도보다 지속적으로 높은 노출을 야기한 반면, 매일 10  $\mu$ g/kg의 PEG-hIL-10의 SC 투여는 EC50 이상인 노출 및 5 ng/mL의 IL-10 혈청 최저 농도보다 지속적으로 높은 노출을 종종 야기하였다. 유사한 IL-10 혈청 최저 농도는 매일 10  $\mu$ g/kg 및 20  $\mu$ g/kg의 PEG-hIL-10가 SC 투여된 특정 암 유형을 갖는 환자에서 달성되었다 (도5A 및 5B).

[0106] C형 간염에서 IL-10 치료 효과가 평가될 수 있다. C형 간염 바이러스에 의해 감염되기 쉬운 기능적 면역계를 갖는 마우스 모델 (Dorner, M. (09 June 2011) *Nature* 474:208-211 참고)이 mIL-10 및 PEG-mIL-10의 약동학적 및 약력학적 효과를 평가하는데 이용될 수 있다. 본원에 제시된 교시내용 및 숙련된 당업자의 지식 기반을 사용하여, 원하는 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하기 위해 투여된 mIL-10 및 PEG-mIL-10의 효과가 평가될 수 있다.

[0107] 대부분의 환자 집단에서 보편적인 치료 용량은 아니지만, 더 높은 용량의 IL-10의 투여는 제한된 수의 대상체에서 부작용 (예컨대, 두통, 빈혈 및 간에 대한 효과)을 유발하였다. 다행스럽게도, 이러한 부작용은 치료 기간 동안 0.1-2.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 농도가 유지되는 경우 보편적이지 않다. 더욱이, 더 높은 평균 혈청 농도 (예컨대, 10.0 - 20.0 ng/mL)에도, 이러한 부작용은 일반적으로 보편적이지 않으며, 치료되는 장애의 중증도의 관점에서 관리 및/또는 허용가능하다. 그럼에도 불구하고, 본 개시내용의 또 다른 구현예는, 하기를 포함하는, 부작용을 예측하고 따라서 이를 잠재적으로 피하기 위해, IL-10 요법을 받는 대상체를 모니터링하는 방법을 제공한다: (1) IL-10의 대상체의 피크 농도를 측정하는 단계; (2) IL-10의 대상체의 최저 농도를 측정하는 단계; (3) 피크-최저 변동을 계산하는 단계; 및, (4) 계산된 피크-최저 변동을 사용하여 대상체 내의 잠재적인 부작용을 예측하는 단계. 더 작은 피크-최저 변동은 대상체가 IL-10 - 관련된 부작용을 겪을 가능성이 낮다는 것을 가리킨다. 특정 구현예에서, 특정 피크-최저 변동은 특정 투약 매개변수를 사용하여 특정 질환, 장애 및 병태의 치료에 대해 결정되며, 상기 변동은 참조 표준으로서 사용된다.

[0108] 상기 기재된 IL-10 투약-관련 매개변수 외에도, 분포 부피가 또한 적절하다. 대부분의 약물의 경우, 혈장 약물 농도는 다중-지수 (multi-exponential) 방식으로 감소한다. 정맥내 투여 후 곧바로, 약물은 초기 공간 (최소한으로 혈장 부피로서 정의됨)에 빠르게 분포된 다음, 혈관밖 공간 (예컨대, 특정 조직)으로의 느린, 평형 (equilibrative) 분포가 일어난다. 정맥내 IL-10 투여는 이러한 2구획 (two-compartment) 동력학 모델과 연관된다 (Rachmawati, H. 등 (2004) *Pharm. Res.* 21(11): 2072-78 참고). 피하 채조합 hIL-10의 약동학이 또한 연구되어 왔다 (Radwanski, E. 등 (1998) *Pharm. Res.* 15(12): 1895-1901). 또한, 사이토카인이 특정 세포 유형을 표적화하게 하기 위해 IL-10 변형이 도입되었다 (Rachmawati, H. (May 2007) *Drug Met. Dist.* 35(5): 814-21 참고).

[0109] 이하에 추가로 기재된 바와 같이, 마우스에서 관찰된 IL-10 및 PEG-IL-10 항-종양 효능은 CD8+ T 세포에서 세포 독성 효소의 유도로부터 비롯되며, 이는 종양 세포의 사멸을 야기한다. 세포독성-유도 제제를 비제한적으로 포함하는 많은 항암 화합물은 주기적으로 투여된다. 흔히, 최대로 허용된 용량 (MTD)에 근접하는 단일 적용 또는

일련의 용량을 포함하는, 최대 허용 용량 (MTD)에 근접하는 단일 용량 또는 일련의 용량이 투여된 다음, 환자의 정상적인 생리를 회복시키는 투약 중단 ("약물 휴지기")이 수행된다. 예로서, 이 투약 전략은 항-VEGF (AVASTIN)과 같은 세포독성 화학치료 항체 요법에 적용되며, PROLEUKIN (IL-2)과 같은 수명이 짧은 생물학적 시약에 적용된다.

[0110] IL-10 요법의 약동학적 매개변수를 이해하고 인간에서 종양 치료 요법을 최적화하는데 유용한 데이터를 생성하기 위해 젖과 연구가 수행되었다. 실험 섹션에 기재된 바와 같이, 1주 동안 하나 또는 몇 회의 용량이 투여된 동일한 양의 약물을 받은 마우스가 유사한 전체 노출을 가지고 있었지만, 매일 용량을 받은 마우스는 종양 크기의 가장 큰 감소를 나타내었다 (표 15). 더욱이, 약 1 ng/mL를 초과하는 (예컨대, 1.1 - 2.1 ng/mL) 혈청 최저 농도의 유지를 야기한 치료 요법은 종양 크기 및 체중의 가장 큰 감소를 나타내었다 (표 16).

[0111] 본 개시내용은 약 6.0 ng/mL를 초과하는 혈청 최저 농도의 유지를 야기하는 임의의 용량의 투여를 고려한다. 예를 들어, 대상이 인간인 경우, 바-페길화된 hIL-10은 15  $\mu$ g/kg/일 초과, 18  $\mu$ g/kg/일 초과, 20  $\mu$ g/kg/일 초과, 21  $\mu$ g/kg/일 초과, 22  $\mu$ g/kg/일 초과, 23  $\mu$ g/kg/일 초과, 24  $\mu$ g/kg/일 초과, 또는 25  $\mu$ g/kg/일 초과의 용량으로 투여될 수 있다. 대상체가 인간인 경우, 상대적으로 작은 PEG (예컨대, 5kDa 모노-디 PEG-hIL10)를 포함하는 PEG-hIL-10이 2.0  $\mu$ g/kg/일 초과, 2.3  $\mu$ g/kg/일 초과, 2.5  $\mu$ g/kg/일 초과, 2.6  $\mu$ g/kg/일 초과, 2.7  $\mu$ g/kg/일 초과, 2.8  $\mu$ g/kg/일 초과, 2.9  $\mu$ g/kg/일 초과, 3.0  $\mu$ g/kg/일 초과, 3.1  $\mu$ g/kg/일 초과, 3.2  $\mu$ g/kg/일 초과, 3.3  $\mu$ g/kg/일 초과, 3.4  $\mu$ g/kg/일 초과 또는 3.5  $\mu$ g/kg/일 초과의 용량으로 투여될 수 있다.

#### 0112] IL-10 기능에서 CD8+ T 세포의 역할

[0113] CD8 (분화 클러스터 8)은 T 세포 수용체 (TCR)에 대한 공동-수용체로서 작용하는 막통과 당단백질이다. CD8 공동-수용체는 주로 세포독성 T 램프구 (CTL)의 표면 상에서 발현되지만, 자연 살해 세포 (NK)를 포함하는 다른 세포 유형 상에서도 발견된다. TCR과 마찬가지로, CD8은 주조직적합 복합체 (MHC) 분자에 결합하지만, 클래스 I MHC 단백질에 특이적이다.

[0114] CD8 기능은 CD8 사슬쌍을 포함하는 이량체의 형성을 필요로 한다. CD8의 2개의 아형인 알파 및 베타가 있으며, CD8의 가장 흔한 형태는 면역글로불린 수퍼페밀리의 구성원인 CD8- $\alpha$  및 CD8- $\beta$  사슬을 포함한다. CD8- $\alpha$ 는 클래스 I MHC 분자와 상호작용하며, 이러한 상호작용은 세포독성 T 세포의 T 세포 수용체와 표적 세포를 항원-특이적 활성화 동안 밀접히 결합시킨다. CD8 표면 단백질을 갖는 세포독성 T 세포는 "CD8+ T 세포"로 불린다. CD8+ T 세포 (CTL 및 NK 세포)는 특정 감염된 표적 세포의 항원 (일반적으로 세포내 병원체에 의한 감염으로부터 비롯되는 세포-표면 펩타이드 또는 단백질)을 인식하고, 만약 상기 항원이 대상체의 정상적인 항원 프로파일 ("면역학적 자기")과 상이하면, CD8+ T 세포는 활성화되고 표적 세포의 세포독성을 유도한다.

[0115] 항원 프로파일이 상이한 몇 가지 시나리오가 존재한다. 예를 들어, 병원체 (예컨대, 바이러스)가 세포를 침입하는 경우, 세포는 "비-자기" 세포 표면 항원을 생산하며, CD8+ T 세포는 감염된 세포를 퇴치하고자 면역학적 반응을 개시한다. 세포의 단백질 중 일부가 핵산 및/또는 아미노산 수준에서의 돌연변이로 인해 변형되는 몇 가지 시나리오가 일어난다. 암 세포는 일반적으로 많은 돌연변이를 가지며 CD8+ T 세포에 의해 '상이한' 것으로 인식된다. 인간 암에서 CD8+ T 세포의 존재는 더 긴 생존과 상호관련된다.

[0116] 전술한 시나리오 모두에서, 활성화된 CD8+ T 세포는 IFN $\gamma$ , 퍼포린 (perforin) 및 그란자임 (Granzyme) B를 생산한다. IFN $\gamma$ 는 클래스 I MHC 단백질 상에서 일어나는, 표적 세포 상의 항원의 "제시"를 추가적으로 상향조절하는데 중요하다. 퍼포린 및 그란자임 B는 표적 세포 (예컨대, 바이러스 및 암)의 사멸을 매개한다.

[0117] CTL 및 NK의 과립에서 발견되는 세포용해 단백질인 퍼포린은 탈과립시 그 자신을 표적세포의 원형질막에 삽입시킨다. 퍼포린은 보체 성분 9 (C9)와 구조적 및 기능적 유사성을 가지며, C9와 마찬가지로, 퍼포린은 막투과 세관 (tubule)을 생성하고 다양한 표적 세포를 비특이적으로 용해시킬 수 있다. 퍼포린은 T-세포- 및 NK-세포-매개된 세포용해를 위한 핵심적인 효과기 분자이다.

[0118] 상기에 암시된 바와 같이, 그란자임 B는 세포독성 T 램프구 (CTL) 및 자연 살해 (NK) 세포에 의해 발현되는 세린 프로테아제이다. CTL 및 NK 세포는 특정 감염된 표적 세포 집단을 인식하고, 이들의 표면 상에 '비-자기' 항원, 일반적으로 세포내 병원체에 의한 감염으로부터 비롯되는 펩타이드 또는 단백질을 갖는 세포의 세포독성을 유도한다. 그란자임 B는 세포-매개된 면역 반응에서 CTL에 의한 표적 세포 세포독성을 신속하게 유도하는데 중요하다.

[0119] IL-10은 CD8+ T 세포의 활성화에서 다양한 역할을 한다. 예를 들어, IL-10은 이전의 감염 또는 백신 접종 동안

생성된 세포인 기억 CD8+ T 세포에서 효과기 분자 (IFN $\gamma$ , 퍼포린 및 그란자임 B)를 유도한다. 이러한 기억 CD8+ T 세포는 바이러스에 대한 대상체의 장기간 보호를 제공하는 것을 담당하는 세포이다. IL-10이 존재하지 않을 때 기억 CD8+ T 세포의 생성 및 증폭이 일어날 수 있지만 (Vicari, A. and Trinchieri, G. (2004) *Immuno. Rev.* 202: 223-236), IL-10이 이러한 세포를 직접 활성화시킨다는 사실은 독특하고 대안적인 치료 접근법을 제공한다. 만성 바이러스 감염이 CD8+ T 세포와 연관되어 있음에도 불구하고 (Virgin, H. 등 (2009) *Cell* 138, p. 30), 폐질화되지 않은 IL-10 또는 폐질화된 IL-10을 이용한 대상체 (예컨대, 마우스)의 치료는 기술되지 않았다.

[0120] 상기에 비추어 볼 때, 본 개시내용의 구현예는 CD8+ T 세포 및 암 및 바이러스 감염 모두 간의 관계 (nexus)에 기초한다. 따라서, 암-관련 질환, 장애 및 병태를 치료하고/거나 예방하는 특정 방법은 바이러스-관련 질환, 장애 및 병태의 치료에도 적용될 수 있을 것이다.

[0121] 다른 사이토카인과 달리, IL-10은 강력한 면역자극 및 면역억제 인자로 간주될 수 있다. 만성 염증에서 CD8+ T 세포의 역할은 완전히 밝혀지지 않았다. 그러나, IFN $\gamma$ 가 암 및 바이러스-관련 장애에 관여하는 것이 적어도 부분적으로 CD8+ T 세포를 통해 매개되기 때문에, 그리고 염증-관련 장애의 조절에 관여하는 IL-10 - T 세포 경로 (염증 사이토카인의 하향 조절을 통해) 역시 IFN $\gamma$ 를 포함하기 때문에, CD8+ T 세포는 또한 염증에서 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서, IL-10은 항-염증 제제의 현재의 제품에서 중요한 치료제인 것으로 판명될 수 있다.

#### IL-10의 생산 방법

[0123] 본 발명의 폴리펩타이드는 비재조합(예: 화학적 합성) 및 재조합 방법을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.

#### 화학적 합성

[0125] 폴리펩타이드가 화학적으로 합성되는 경우, 합성은 액체 상 또는 고상을 통해 진행될 수 있다. 고상 펩타이드 합성 (SPPS)은 비천연 아미노산의 도입 및/또는 웨타이드/단백질 골격 변형을 가능하게 한다. 다양한 형태의 SPPS, 예를 들어, 9-플루오레닐메톡시카보닐(Fmoc) 및 3급-부틸옥시카보닐(Boc)이 본 발명의 폴리펩타이드를 합성하기 위해 이용 가능하다. 화학적 합성의 세부사항은 당해 분야에 공지되어 있다(예: Ganesan A. (2006) *Mini Rev. Med. Chem.* 6:3-10; 및 Camarero J.A. 등, (2005) *Protein Pept Lett.* 12:723-8).

[0126] 고상 펩타이드 합성은 이후 기재되는 바와 같이 수행될 수 있다. 알파 작용기 ( $\text{N}\alpha$ ) 및 임의의 반응성 측쇄는 산 불안정성 또는 염기 불안정성 그룹으로 보호된다. 보호 그룹은 아미드 결합을 연결시키기 위한 조건하에 안정하지만, 형성된 펩타이드 쇄를 손상시키지 않고 쉽게 절단될 수 있다.  $\alpha$ -아미노 작용기에 적합한 보호 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: Boc, 벤질옥시카보닐 (Z), O-클로로벤질옥시카보닐, 바이-페닐이 소프로필옥시카보닐, 3급-아밀옥시카보닐 (Amoc),  $\alpha$ ,  $\alpha$ -디메틸-3,5-디메톡시-벤질옥시카보닐, o-니트로설페닐, 2-시아노-3급-부톡시-카보닐, Fmoc, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde) 등.

[0127] 적합한 측쇄 보호 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아세틸, 알릴 (Al1), 알릴옥시카보닐 (Alloc), 벤질 (Bz1), 벤질옥시카보닐 (Z), 3급-부틸옥시카보닐 (Boc), 벤질옥시메틸 (Bom), o-브로모벤질옥시카보닐, 3급-부틸 (tBu), 3급-부틸디메틸실릴, 2-클로로벤질, 2-클로로벤질옥시카보닐, 2,6-디클로로벤질, 사이클로헥실, 사이클로펜틸, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde), 이소프로필, 4-메톡시-2,3-6-트리메틸벤질설포닐 (Mtr), 2,3,5,7,8-펜타메틸크로만-6-설포닐 (Pmc), 피발릴, 테트라하이드로페란-2-일, 토실 (Tos), 2,4,6-트리메톡시벤질, 트리메틸실릴 및 트리틸 (Trt).

[0128] 고상 합성에서, C-말단 아미노산은 적합한 지지체 재료에 결합된다. 적합한 지지체 재료는 합성 공정의 단계별 축합 및 절단 반응을 위한 시약 및 반응 조건에 대해 불활성이고 사용되는 반응 매질에 용해되지 않는 것들이다. 시판되는 지지체 재료의 예는 반응성 그룹 및/또는 폴리에틸렌 글리콜로 변형된스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 클로로메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 하이드록시메틸화 또는 아미노메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체 등을 포함한다. 웨타이드산의 제조가 목적시 되는 경우, 4-벤질옥시벤질-알코올(Wang-앵커) 또는 2-클로로트리틸 클로라이드로 유도체화된 폴리스티렌 (1%-디비닐벤젠 또는 TentaGel®)이 사용될 수 있다. 웨타이드 아미드의 경우, 5-(4'-아미노메틸)-3',5'-디메톡시페녹시)발레르산 (PAL-앵커) 또는 p-(2,4-디메톡시페닐-아미노 메틸)-페녹시 그룹 (Rink 아미드 앵커)으로 유도체화된 폴리스티렌 (1%) 디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다.

[0129] 중합성 지지체에 대한 연결은 실온 또는 승온(예: 40 °C 내지 60 °C)에서, 다음의 반응 시간으로 에탄올, 아세

토니트릴, N,N-디메틸포름아미드 (DMF), 디클로로메탄, 테트라하이드로푸란, N-메틸파롤리돈 또는 유사한 용매에 활성화 시약을 첨가하여 C-말단 Fmoc-보호된 아미노산을 지지체 재료와 반응시킴으로써 달성될 수 있다: 예를 들어, 2 내지 72시간.

[0130] PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 N<sub>α</sub>-보호된 아미노산(예: Fmoc 아미노산)의 커플링은, 예를 들어, 1-하이드록시벤조트리아졸 또는 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸의 존재 또는 부재하에 커플링제, 예를 들어, N,N'-디사이클로헥실카보디이미드 (DCC), N,N'-디이소프로필카보디이미드 (DIC) 또는 다른 카보디이미드, 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TBTU) 또는 다른 우로늄 염, O-아실-우레아, 벤조트리아졸-1-일-트리스-파롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP) 또는 다른 포스포늄 염, N-하이드록시석신이미드, 다른 N-하이드록시이미드 또는 옥심의 도움으로, 예를 들어, HOBT의 첨가하고, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민 (DIEA), 트리에틸아민 또는 N-메틸모르폴린, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민과 같은 염기를 첨가하거나 첨가하지 않고 TBTU의 도움으로 다음과 같은 반응 시간으로 수행될 수 있다: 2 내지 72시간(예: 디메틸포름아마이드, N-메틸파롤리돈 또는 디클로로메탄, 예컨대, 디메틸포름아마이드와 같은 용매에서, 1.5 내지 3배 과량의 아미노산 및 커플링 시약에서, 예를 들어, 2배 과량에서 및 약 10 °C 내지 50 °C, 예를 들어, 25 °C의 온도에서 3시간).

[0131] 커플링 시약 대신에, 활성 에스테르(예: 펜타플루오로페닐, p-니트로페닐 등), N<sub>α</sub>-Fmoc-아미노산의 대칭성 무수물, 이의 산 클로라이드 또는 산 플루오라이드를 상기한 조건하에 사용하는 것도 또한 가능하다.

[0132] N<sub>α</sub>-보호된 아미노산(예: Fmoc 아미노산)은 DIEA를 첨가하고 다음의 반응 시간으로 디클로로메탄 중의 2-클로로트리틸 수지에 커플링될 수 있다: 10 내지 120분, 예를 들어, 20분, 그러나 이 용매 및 이 염기의 사용에 한정되지는 않는다.

[0133] 보호된 아미노산의 연속 커플링은 통상적인 방법에 따라서 웨타이드 합성으로, 전형적으로 자동화 웨타이드 합성화기에서 수행될 수 있다. 하기로 처리하여 고상에서 커플링된 아미노산의 N<sub>α</sub>-Fmoc 보호 그룹을 절단후: 예를 들어, 디메틸포름아미드 중의 피페리딘(10% 내지 50%)으로 5 내지 20분 동안, 예를 들어, DMF 중의 50% 피페리딘으로 2 x 2분 및 DMF 중의 20% 피페리딘으로 1 x 15 분, 다음 보호된 아미노산을 3 내지 10배 과량으로, 예를 들어, 10배 과량으로 약 10 °C 내지 50 °C의 온도, 예를 들어, 25 °C에서 디클로로메탄, DMF 또는 둘의 혼합물과 같은 불활성, 비수성 극성 용매 중에서 이전 아미노산에 커플링된다. 제1의 N<sub>α</sub>-Fmoc 아미노산의 PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 커플링을 위한 이전에 언급된 시약은 커플링 시약으로서 적합하다. 보호된 아미노산의 활성 에스테르, 또는 이의 염화물 또는 불화물 또는 이의 대칭 무수물 역시 대안으로서 사용될 수 있다.

[0134] 고상 합성의 종결시, 웨타이드는 측쇄 보호 그룹을 동시에 절단하면서 지지체 재료로부터 절단된다. 절단은 하기를 첨가하면서 트리플루오로아세트산 또는 다른 강산성 매질로 수행될 수 있다: 5%-20% V/V의 스캐빈저, 예를 들어, 디메틸설파이드, 에틸메틸설파이드, 티오아니솔, 티오크레졸, m-크레졸, 아니솔 에탄디티올, 폐놀 또는 물, 예를 들어, 15% v/v 디메틸설파이드/에탄디티올/m-크레졸 1:1:1, 0.5 내지 3시간 이내, 예를 들어, 2시간. 완전 보호된 측쇄를 갖는 웨타이드는 2-클로로트리틸 앵커를 빙초산/트리플루오로에탄올/디클로로메탄 2:2:6으로 절단시킴으로써 수득된다. 보호된 웨타이드는 실리카 젤 상에서 크로마토그래피로 정제될 수 있다. 웨타이드가 Wang 앵커를 통해 고상에 연결되는 경우 및 C-말단 알킬아미드화로 웨타이드를 수득하고자 하는 경우, 절단은 알킬아민 또는 플루오로알킬아민을 사용하는 아미노분해에 의해 수행될 수 있다. 아미노분해는 약 -10 °C 내지 50 °C의 온도(예: 약 25 °C) 및 약 12 내지 24의 반응 시간(예: 약 18시간)으로 수행된다. 또한, 웨타이드는, 예를 들어, 메탄올을 사용하는 재에스테르화에 의해 지지체로부터 절단될 수 있다.

[0135] 수득된 산성 용액은 웨타이드를 침전시키고 따라서 에테르에 잔류하는 스캐빈저와 절단된 보호 그룹을 분리하기 위해 3 내지 20배량의 차거운 에테르 또는 n-헥산, 예를 들어, 10배 과량의 디에틸 에테르와 혼합할 수 있다. 추가의 정제는 웨타이드를 빙초산으로부터 수회 침전시킴으로써 수행될 수 있다. 수득된 침전을 물 또는 3급-부탄올 또는 두 용매의 혼합물, 예를 들어, 3급-부탄올/물의 1:1 혼합물에 용해시키고, 동결 건조시킬 수 있다.

[0136] 수득된 웨타이드는 다음을 포함하는 다양한 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다: 아세테이트 형태의 약 염기성 수지를 통한 이온 교환; 하기 상의 소수성 흡착 크로마토그래피: 비유도체화 폴리스티렌/디비닐벤젠 공중합체(예: Amberlite® XAD); 실리카 젤 상의 흡착 크로마토그래피; 예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 상의 이온 교환 크로마토그래피; 예를 들어, Sephadex® G-25 상의 분배 크로마토그래피; 역류 분배 크로마토그래피; 또는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 예를 들어, 옥틸 또는 옥타데실실릴실리카(ODS) 상의 역상 HPLC.

[0137] 제조합 생산

- [0138] 인간 및 마우스 IL-10의 제조를 기술하는 방법은 하기에서 발견될 수 있다: 예를 들어, U.S. 특허 제5,231,012호 (재조합 및 다른 합성 기술을 포함하는, IL-10 활성을 갖는 단백질의 생산 방법을 교시함). IL-10은 바이러스 기원일 수 있으며, 앱스타인 바 바이러스 (BCRF1 단백질)로부터 바이러스 IL-10의 클로닝 및 발현은 하기 문헌에 개시되어 있다: Moore 등, (1990) *Science* 248:1230. IL-10은 본원에 기재된 것과 같은 본 기술분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 다양한 방법으로 수득될 수 있다. 재조합 인간 IL-10은 또한, 예컨대 하기로부터 상업적으로 이용가능하다: PeproTech, Inc., Rocky Hill, N.J.
- [0139] 폴리펩타이드가 재조합 기술을 사용하여 생산되는 경우, 폴리펩타이드는 임의의 적합한 작제물 및 하기일 수 있는 임의의 적합한 숙주 세포를 사용하여 세포내 단백질 또는 분비된 단백질로서 생산될 수 있다: 원핵 또는 진핵 세포, 예를 들어, 세균(예: 이. 콜리) 또는 효모 숙주 세포, 각각. 숙주 세포로서 사용될 수 있는 진핵 세포의 다른 예는 곤충 세포, 포유동물 세포, 및/또는 식물 세포를 포함한다. 포유동물 숙주 세포가 사용되는 경우, 그들은 하기를 포함할 수 있다: 인간 세포(예: HeLa, 293, H9 및 Jurkat 세포); 마우스 세포(예: NIH3T3, L 세포, 및 C127 세포); 영장류 세포(예: Cos 1, Cos 7 및 CV1); 및 햄스터 세포(예: 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포).
- [0140] 폴리펩타이드의 발현에 적합한 다양한 숙주-벡터 시스템은 당해 분야에 공지된 표준 절차에 따라 사용될 수 있다. 다음을 참조한다: 예를 들어, Sambrook 등, 1989 *Current Protocols in Molecular Biology* Cold Spring Harbor Press, New York; 및 Ausubel 등 1995 *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Wiley 및 Sons. 숙주 세포에 유전 재료를 도입하는 방법, 예를 들어, 형질전환, 전기천공, 접합, 인산칼슘 방법 등을 포함한다. 전달 방법은 도입된 폴리펩타이드 코딩 핵산의 안정한 발현을 제공하도록 선택될 수 있다. 폴리펩타이드 코딩 핵산은 유전되는 에피솜 요소(예: 플라스미드)로서 제공될 수 있거나 계놈적으로 통합될 수 있다. 관심 있는 폴리펩타이드의 생산에 사용하기 위한 다양한 적합한 벡터는 시판된다.
- [0141] 벡터는 숙주 세포에서 염색체외 유지를 제공할 수 있거나 숙주 세포 계놈으로의 통합을 제공할 수 있다. 발현 벡터는 전사 및 번역 조절 서열을 제공하고, 코딩 영역이 전사 개시 영역 및 전사 및 번역 종결 영역의 전사 조절 하에 작동적으로 연결되는 유도성 또는 구성적 발현을 제공할 수 있다. 일반적으로, 전사 및 번역 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 정지 서열, 번역 개시 및 정지 서열, 및 인핸서 또는 활성화제 서열을 포함할 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있고, 하기일 수 있다: 강한 구성적 프로모터(예: T7).
- [0142] 발현 작제물은 일반적으로 관심 있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열 근처에 위치하는 편리한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작동성인 선택 가능한 마커를 함유하는 세포의 선택을 촉진시키기 위해 제공될 수 있다. 또한, 발현 작제물은 추가의 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 하나 또는 두 개의 복제 시스템을 가질 수 있고, 따라서 그것이 유기체, 예를 들어, 발현을 위한 포유동물 또는 곤충 세포 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 숙주에서 유지되도록 한다. 또한, 발현 작제물은 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하기 위해 선택 가능한 마커 유전자를 함유할 수 있다. 선택 가능한 유전자는 당해 분야에 의해 공지되어 있고, 사용되는 숙주 세포에 따라 변할 것이다.
- [0143] 단백질의 단리 및 정제는 당해 분야에 공지된 방법에 따라서 달성될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 항시적으로 및/또는 유도시에 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 세포의 용해물로부터 단리될 수 있거나, 면역친화성 침전에 의해 합성 반응 혼합물로부터 단리될 수 있고, 이는 일반적으로 샘플을 항-단백질 항체와 접촉시키는 것, 세척하여 비-특이적으로 결합된 물질을 제거하는 것, 및 특이적으로 결합된 단백질을 용출시키는 것을 포함한다. 단리된 단백질은 투석 및 단백질 정제에 통상적으로 사용되는 다른 방법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 하나의 구현예에서, 단백질은 금속 키레이트 크로마토그래피 방법을 사용하여 단리될 수 있다. 단백질은 단리를 촉진시키기 위한 변형을 함유할 수 있다.
- [0144] 폴리펩타이드는 실질적으로 순수하거나 단리된 형태(예: 다른 폴리펩타이드를 함유하지 않음)로 제조될 수 있다. 폴리펩타이드는 존재할 수 있는 다른 성분(예: 다른 폴리펩타이드 또는 다른 숙주 세포 성분)에 비해 폴리펩타이드가 풍부한 조성물에 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제된 폴리펩타이드는 폴리펩타이드가 다른 발현 단백질이 실질적으로 함유되지 않는, 예를 들어, 약 90% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만 또는 약 1% 미만인 조성물에 존재하도록 제공될 수 있다.
- [0145] IL-10 폴리펩타이드는 본 기술분야에 공지된 상이한 IL-10 - 관련된 핵산을 조작하여 IL-10 폴리펩타이드를 인코딩할 수 있는 작제물을 제공하는 재조합 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 특별한 아미노산 서열이 제공될 때, 당업자는, 예를 들어, 분자 생물학에서 그의 배경 및 경험의 견지에서 이러한 아미노산 서열을 코딩하는 다

양한 상이한 핵산 분자를 인식할 것이라는 것이 이해될 것이다.

#### [0146] 아미드 결합 치환

일부 경우, IL-10은 웨타이드 결합 이외의 하나 이상의 연결을 포함하며, 예컨대, 적어도 2개의 인접한 아미노산은 아미드 결합 이외의 연결을 통해 연결된다. 예를 들어, 원하지 않는 단백질분해 또는 다른 분해 수단을 감소시키거나 제거하기 위해, 및/또는 혈청 안정성을 증가시키기 위해, 및/또는 형태적 유연성을 제한하거나 증가시키기 위해, IL-10의 백본 내의 하나 이상의 아미드 결합이 치환될 수 있다.

또 다른 예에서, IL-10 내의 하나 이상의 아미드 연결 (-CO-NH-)은 아미드 연결의 동배체 (isostere)인 연결, 예컨대 -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH=CH-(시스 및 트랜스), -COCH<sub>2</sub>-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>- 또는 -CH<sub>2</sub>SO-로 대체될 수 있다. IL-10 내의 하나 이상의 아미드 연결은 또한, 예를 들어, 감소된 동배체 (isostere) 유사웨타이드 결합에 의해 대체될 수 있다. 다음을 참조한다: Couder 등 (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41:181-184. 이러한 대체 및 그들을 수행하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

#### [0149] 아미노산 치환

하나 이상의 아미노산 치환이 IL-10 폴리웨타이드에서 이뤄질 수 있다. 다음은 비제한적인 예이다:

a) 알라닌, 류신이소류신, 발린, 노르류신, (S)-2-아미노부티르산, (S)-사이클로헥실알라닌 또는 측쇄, 사이클릭 및 직쇄 알킬, 알케닐 또는 알키닐 치환을 포함하는 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 탄소로부터의 지방족 측쇄로 치환된 다른 간단한 알파-아미노산을 포함하는 알킬 치환된 소수성 아미노산의 치환;

b) 상기 나열된 방향족 아미노산의 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 아자, 할로겐화(플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도) 또는 알콕시(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>로부터)-치환된 형태를 포함하여 페닐알라닌, 트립토판, 티로신, 셀프티로신, 비페닐알라닌, 1-나프틸알라닌, 2-나프티에닐알라닌, 3-벤조티에닐알라닌, 히스티딘을 포함하는 방향족 치환된 소수성 아미노산의 치환, 이의 예시적 예는 하기와 같다: 2-, 3- 또는 4-아미노페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-클로로페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메틸페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메톡시페닐알라닌, 5-아미노-, 5-클로로-, 5-메틸- 또는 5-메톡시트립토판, 2'-, 3'- 또는 4'-아미노-, 2'-, 3'- 또는 4'-클로로-, 2-, 3- 또는 4-비페닐알라닌, 2'-, 3'- 또는 4'-메틸-, 2-, 3- 또는 4-비페닐알라닌 및 2- 또는 3-페리딜알라닌;

c) 치환체가 헤테로원자(예: 알파 질소, 또는 원위 질소 또는 질소들, 또는, 예를 들어, 프로-R 위치에서 알파 탄소 상에 존재하는지의 여부에 관계 없이 이전 아미노산의 알킬, 알케닐 또는 아릴 치환된(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> 측쇄, 직쇄 또는 사이클릭으로부터) 유도체를 포함하여, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 오르니틴, 2,3-디아미노프로피온산, 호모아르기닌을 포함하는 염기성 측쇄를 함유하는 아미노산의 치환. 예시적인 예로서 작용하는 화합물은 하기를 포함한다: N-엡실론-이소프로필-리신, 3-(4-테트라하이드로페리딜)-글리신, 3-(4-테트라하이드로페리딜)-알라닌, N,N-감마,감마'-디에틸-호모아르기닌. 알킬 그룹이 알파-탄소의 프로-R 위치를 차지하는 알파-메틸-아르기닌, 알파-메틸-2,3-디아미노프로피온산, 알파-메틸-히스티딘, 알파-메틸-오르니틴과 같은 화합물도 또한 포함된다. 알킬, 방향족, 헤테로방향족(여기서, 헤테로방향족 그룹은 단독으로 또는 조합하여 하나 이상의 질소, 산소 또는 황 원자를 갖는다), 카복실산 또는 임의의 다수의 익히 공지된 활성화 유도체, 예를 들어, 산 클로라이드, 활성 에스테르, 활성 아졸리드 및 관련 유도체, 및 리신, 오르니틴 또는 2,3-디아미노프로피온산으로부터 형성된 아미드도 또한 포함된다;

d) 아스파르트산, 글루탐산, 호모글루탐산, 티로신, 2,4-디아미노프로피온산의 알킬, 아릴, 아릴알킬, 및 헤테로아릴 셀폰아미드, 오르니틴 또는 리신 및 테트라졸 치환된 알킬 아미노산을 포함하는 산성 아미노산의 치환;

e) 아스파라긴, 글루타민, 및 아스파라긴 또는 글루타민의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 측쇄 아미드 잔기의 치환; 및

f) 세린, 트레오닌, 호모세린, 2,3-디아미노프로피온산, 및 세린 또는 트레오닌의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 하이드록실 함유 아미노산의 치환.

일부 경우, IL-10은 하나 이상의 천연 발생 비-유전적으로 인코딩된 L-아미노산, 합성 L-아미노산, 또는 아미노산의 D-거울상이성질체를 포함한다. 예를 들어, IL-10은 D-아미노산만을 포함할 수 있다. 예를 들어, IL-10 폴리웨타이드는 하기 잔기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 하이드록시프롤린,  $\beta$ -알라닌,  $\alpha$ -아미노벤조산,  $\alpha$ -아미노벤조산,  $p$ -아미노벤조산,  $m$ -아미노메틸벤조산, 2,3-디아미노프로피온산,  $\alpha$ -아미노이소부티르산, N-메틸글리신 (사르코신), 오르니틴, 시트룰린, 3급-부틸알라닌, 3급-부틸글리신, N-메틸이소류신, 페닐글리신, 사이클

로헥실알라닌, 노르류신, 나프틸알라닌, 피리딜알라닌, 3-벤조티에닐 알라닌, 4-클로로페닐페닐알라닌, 2-플루오로페닐알라닌, 3-플루오로페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 페니실라민, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산,  $\beta$ -2-티에닐알라닌, 메티오닌 셀록사이드, 호모아르기닌, N-아세틸 리신, 2,4-디아미노 부티르산, 로우-아미노페닐알라닌, N-메틸발린, 호모시스테인, 호모세린,  $\varepsilon$ -아미노 헥산산,  $\omega$ -아미노헥산산,  $\omega$ -아미노헵탄산,  $\omega$ -아미노옥탄산,  $\omega$ -아미노데칸산,  $\omega$ -아미노테트라데칸산, 사이클로헥실알라닌,  $\alpha$ ,  $\gamma$ -디아미노부티르산,  $\alpha$ ,  $\beta$ -디아미노프로피온산,  $\delta$ -아미노 발레르산, 및 2,3-디아미노부티르산.

[0158]

### 추가의 변형

[0159]

디설파이드 연결을 통한 다른 웨타이드에의 연결을 제공하기 위해 또는 IL-10 폴리웨타이드의 고리화를 제공하기 위해, 시스테인 잔기 또는 시스테인 유사체가 IL-10 폴리웨타이드 내로 도입될 수 있다. 시스테인 또는 시스테인 유사체를 도입하는 방법은 본 기술분야에 공지되어 있으며; 예컨대, U.S. 특허 제8,067,532호를 참고한다.

[0160]

IL-10 폴리웨타이드는 고리화될 수 있다. 하나 이상의 시스테인 또는 시스테인 유사체가 IL-10 폴리웨타이드로 도입될 수 있고, 상기 도입된 시스테인 또는 시스테인 유사체는 제2의 도입된 시스테인 또는 시스테인 유사체와 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 사이클릭화의 다른 수단은 옥심 링커 또는 란티오닌 링커의 도입을 포함하고; 다음을 참조한다: 예를 들어, U.S. 특허 제8,044,175호. 사이클릭화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 (또는 비아미노산 잔기)의 임의의 조합이 사용될 수 있고/있거나 도입될 수 있다. 사이클릭화 결합은 브릿지의 도입을 가능하게 하는 작용성 그룹과 아미노산의 임의의 조합으로 (또는 아미노산 및  $-(CH_2)_n-CO-$  또는  $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$ 으로) 생성될 수 있다. 일부 예는 디설파이드, 디설파이드 모방체, 예를 들어,  $-(CH_2)_n-$  카바 브릿지, 티오아세틸, 티오에티르 브릿지(시스타티오닌 또는 란티오닌) 및 에스테르 및 에테르를 함유하는 브릿지이다. 이러한 예에서, n은 임의의 정수일 수 있지만, 흔히 10 미만이다.

[0161]

다른 변형은, 예를 들면, N-알킬 (또는 아릴) 치환 ( $\psi[CONR]$ ), 또는 락탐 및 다른사이클릭 구조물을 작제하기 위한 골격 가교결합을 포함한다. 다른 유도체는 하기를 포함한다: C-말단 하이드록시메틸 유도체, o-변형된 유도체(예: C-말단 하이드록시메틸 벤질 에테르), 알킬아미드 및 하이드라지드와 같은 치환된 아미드를 포함하는 N-말단 변형된 유도체.

[0162]

일부 경우, IL-10 폴리웨타이드 내의 하나 이상의 L-아미노산은 하나 이상의 D-아미노산으로 대체될 수 있다.

[0163]

일부 경우, IL-10 폴리웨타이드는 레트로인버소 (retroinverso) 유사체이다 (예컨대, Sela and Zisman (1997) FASEB J. 11: 449 참고). 레트로-인버소 웨타이드 유사체는 아미노산 서열의 방향이 역전되고(레트로), 내부의 하나 이상의 아미노산의 키랄성 D- 또는 L-이, 예를 들어, L-아미노산보다 오히려 D-아미노산을 사용하여 반전되는(인버소) 선형 폴리웨타이드의 이성체이다. [참조: 예를 들어, Jameson 등 (1994) Nature 368:744; 및 Brady 등 (1994) Nature 368:692].

[0164]

IL-10 폴리웨타이드는 "단백질 전달 도메인" (PTD)을 포함할 수 있으며, 이는 지질 이중층, 미셀 (micelle), 세포 막, 세포기관 막, 또는 소낭 (vesicle) 막을 통과하는 것을 용이하게 하는 폴리웨타이드, 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 또는 유기 또는 무기 분자를 지칭한다. 또 다른 분자에 부착된 PTD는 분자가 막을 가로지르는 것, 예를 들어, 세포외 공간으로부터 세포내 공간으로, 또는 세포질에서 세포 기관 내로 이동하는 것을 촉진시킨다. 일부 구현예에서, PTD는 IL-10 폴리웨타이드의 아미노 말단에 공유결합되는 반면, 다른 구현예에서, PTD는 IL-10 폴리웨타이드의 카복실 말단에 공유결합된다. 예시적인 단백질 전달 도메인은, 비제한적으로, 최소 운데카웨타이드 단백질 전달 도메인 (YGRKKRRQRRR를 포함하는 HIV-1 TAT의 잔기 47-57에 상응함; 서열번호: 1); 세포 내로의 진입을 유도하는데 충분한 아르기닌 잔기의 수를 포함하는 폴리아르기닌 서열 (예컨대, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 내지 50개 아르기닌); VP22 도메인 (Zender 등 (2002) Cancer Gene Ther. 9(6): 489-96); 드로소필라 안테나페디아 단백질 전달 도메인 (Noguchi 등 (2003) Diabetes 52(7): 1732-1737); 절단된 인간 칼시토닌 웨타이드 (Trehin 등 (2004) Pharm. Research 21:1248-1256); 폴리리신 (Wender 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008); RRQRRRTSKLMKR (서열번호: 2); 트랜스포탄 (Transportan) GWTLNSAGYLLGKINLKALAAALKIL (서열번호: 3); KALAWEAALKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (서열번호: 4); 및 RQIKIWFQNRRMKWKK (서열번호: 5). 예시적인 PTD는, 비제한적으로, YGRKKRRQRRR (서열번호: 1), RKKRRQRRR (서열번호: 6); 3개의 아르기닌 잔기 내지 50개의 아르기닌 잔기의 아르기닌 동종폴리머를 포함하며; 예시적인 PTD 도메인 아미노산 서열은, 비제한적으로, 하기 중 어느 것을 포함한다: YGRKKRRQRRR (서열번호: 1); RKKRRQRRR (서열번호: 7); YARAAARQARA (서열번호: 8); THRLPQRRRRR (서열번호: 9); 및 GGRRARRRRRR (서열번호: 10).

- [0165] IL-10 폴리펩타이드의 C-말단에 있는 아미노산의 카복실기  $\text{COR}_3$ 은 자유 형태로 ( $\text{R}_3 = \text{OH}$ ) 또는 생리학적으로-허용된 알칼리 또는 알칼리 토금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 칼슘염의 형태로 존재할 수 있다. 카복실 그룹은 또한 1차, 2차 또는 3차 알코올, 예를 들어, 메탄올, 분지되거나 비분지된  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -알킬 알코올, 예를 들어, 에틸 알코올 또는 3급-부탄올로 에스테르화될 수 있다. 카복실 그룹은 또한 1급 또는 2급 아민, 예를 들어, 암모니아, 분지되거나 비분지된  $\text{C}_1\text{-C}_6$ -알킬아민 또는  $\text{C}_1\text{-C}_6$  디-알킬아민, 예를 들어, 메틸아민 또는 디메틸아민으로 아미드화될 수 있다.
- [0166] IL-10 폴리펩타이드의 N-말단에 있는 아미노산의 아미노기  $\text{NR}_1\text{R}_2$ 는 자유 형태로 ( $\text{R}_1 = \text{H}$  및  $\text{R}_2 = \text{H}$ ) 또는 생리학적으로-허용된 염, 예컨대, 클로라이드 또는 아세테이트의 형태로 존재할 수 있다. 아미노 그룹은 또한  $\text{R}_1 = \text{H}$ 이고,  $\text{R}_2 = \text{아세틸}$ , 트리플루오로아세틸 또는 아디만틸이도록 산으로 아세틸화될 수 있다. 아미노 그룹은 웹타이드 화학에 통상적으로 사용되는 아미노 보호 그룹, 예를 들어, 하기로 보호된 형태로 존재할 수 있다: 상기 제공된 것들(예: Fmoc, 벤질옥시-카보닐 (Z), Boc, 및 Alloc). 아미노기는 N-알킬화될 수 있고, 여기서  $\text{R}_1$  및/또는  $\text{R}_2 = \text{C}_1\text{-C}_6$  알킬 또는  $\text{C}_2\text{-C}_8$  알케닐 또는  $\text{C}_7\text{-C}_9$  아르알킬이다. 알킬 잔기는 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭(예를 들어, 각각, 에틸, 이소프로필 및 사이클로헥실)일 수 있다.
- [0167] IL-10 기능을 향상시키고/거나 모방하는 특정 변형
- [0168] 본원에 개시된 치료 양상 (예컨대, IL-10)의 하나 이상의 물리적 특성 및/또는 이들이 투여되는 방식을 개선하는 것이 흔히 유용하며, 종종 필수적이다. 물리적 특성의 개선은, 예를 들어, 면역원성을 조절하는 것; 수용해도, 생체이용률, 혈청 반감기 및/또는 치료적 반감기를 증가시키는 방법; 및/또는 생물학적 활성을 조절하는 것을 포함한다. 특정 변형은 또한, 예를 들어, 검출 분석에서 사용하기 위한 항체 (예컨대, 애피토프 태그)를 증가시키고 단백질 정제의 용이성을 제공하는데 유용할 수 있다. 이러한 개선은 일반적으로 치료 양상의 생체활성에 부정적으로 영향을 미치지 않고/거나 그의 면역원성을 증가시키지 않으면서 부여되어야 한다.
- [0169] IL-10의 폐길화는 본 개시내용에 의해 고려되는 하나의 특정 변형인 한편, 다른 변형은, 비제한적으로, 당화 (N- 및 O-연결됨); 폴리시알릴화; 혈청 알부민 (예컨대, 인간 혈청 알부민 (HSA), 사이노 (cyno) 혈청 알부민, 또는 소 혈청 알부민 (BSA))을 포함하는 알부민 용합 분자; 예를 들어 접합된 지방산 사슬을 통한 알부민 결합 (아실화); 및 Fc-용합 단백질을 포함한다.
- [0170] 폐길화: 단백질 치료제의 임상 효과는 종종 짧은 혈장 반감기 및 프로테아제 분해에 대한 민감성에 의해 제한된다. 다양한 치료 단백질 (예컨대, 필그라스팀 (filgrastim))의 연구는, 이러한 어려움이 웹타이드 서열을 다양한 비단백질성 폴리머 중 어느 것, 예컨대, 에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 접합하거나 연결하는 것을 포함하는 다양한 변형에 의해 극복될 수 있음을 보여왔다. 빈번하게 단백질 및 비단백질성 중합체, 예를 들어, PEG 둘 다에 공유 결합된 연결 잔기에 의해 영향을 받는다. 이러한 PEG-접합 생체분자는 보다 우수한 물리적 및 열적 안정성, 효소 분해에 대한 민감성으로부터 보호, 증가된 용해도, 보다 긴 생체내 순환 반감기 및 감소된 클리어런스, 감소된 면역원성 및 항원성, 및 감소된 독성을 포함하는 임상적으로 유용한 특성을 포함하는 것으로 나타났다.
- [0171] 약동학적 매개변수에 대한 폐길화의 유익한 효과 외에도, 폐길화 자체는 활성을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, PEG-IL-10은 폐길화되지 않은 IL-10보다 특정 암에 대해 더 효과적인 것으로 나타났다 (예컨대, EP 206636A2 참고).
- [0172] 폴리펩타이드 서열에의 접합에 적합한 PEG는 일반적으로 실온에서 물에 가용성이고, 화학식  $\text{R}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_n\text{O}-\text{R}$ 를 갖고, 여기서  $\text{R}$ 은 수소 또는 보호 그룹, 예를 들어, 알킬 또는 알칸올 그룹이고,  $n$ 은 1 내지 1000의 정수이다.  $\text{R}$ 이 보호 그룹이면, 이는 일반적으로 1 내지 8개의 탄소를 갖는다. 폴리펩타이드 서열에 접합된 PEG는 선형이거나 분지될 수 있다. 분지된 PEG 유도체, "스탸-PEG" 및 다중-암 PEG가 본 발명에 의해 고려된다. 본 개시내용에서 사용된 PEG의 분자량은 어느 특정 범위에 제한되지 않으며, 그 예는 본원의 다른 곳에 제시되어 있고; 예로서, 특정 구현예는 5kDa 내지 및 20kDa의 분자량을 가지며, 다른 구현예는 4kDa 내지 10kDa의 분자량을 갖는다.
- [0173] 본 발명은 또한 PEG가 상이한  $n$  값을 갖고, 따라서 다양한 상이한 PEG가 특정비율로 존재하는 접합체의 조성물을 고려한다. 예를 들어, 일부 조성물은  $n=1$ , 2, 3 및 4인 접합체의 혼합물을 포함한다. 일부 조성물에서,  $n=1$ 인 접합체의 비율은 18 내지 25%이고,  $n=2$ 인 접합체의 비율은 50 내지 66%이고,  $n=3$ 인 접합체의 비율은 12 내지 16%이고,  $n=4$ 인 접합체의 비율은 5% 이하이다. 이러한 조성물은 당해 분야에 공지된 반응 조건 및 정제 방법에

의해 생성될 수 있다. 예시적인 반응 조건은 명세서 전반에 걸쳐 기재된다. 양이온 교환 크로마토그래피는 접합체를 분리하는데 사용될 수 있고, 이어서, 예를 들어, 비변형된 단백질 서열 및 다른 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하지 않고 정제된, 목적하는 수의 PEG가 부착된 접합체를 함유하는 분획이 동정된다.

[0174] 폐길화는 폴리펩타이드의 N-말단의 알파 아미노 그룹, 리신 잔기의 측쇄 상의 앱실론 아미노 그룹 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 그룹에서 가장 빈번하게 발생한다. 대부분의 재조합 폴리펩타이드가 단일 알파 및 다수의 앱실론 아미노 및 이미다졸그룹을 포함하기 때문에, 다수의 위치 이성체가 링커 화학에 따라 생성될 수 있다. 당해 분야에 공지된 일반적인 폐길화 전략이 본원에서 적용될 수 있다. PEG는 하나 이상의 폴리펩타이드 서열의 유리 아미노 또는 카복실 그룹과 폴리에틸렌 글리콜 사이의 결합을 매개하는 말단 반응성 그룹("스페이서")을 통해 본 발명의 폴리펩타이드에 결합될 수 있다. 유리 아미노 그룹에 결합될 수 있는 스페이서를 갖는 PEG는 폴리에틸렌 글리콜의 석신산 에스테르를 N-하이드록시석시닐이미드로 활성화시킴으로써 제조될 수 있는 N-하이드록시석시닐이미드 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 유리 아미노 그룹에 결합될 수 있는 또 다른 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 시아누르산 클로라이드와 반응시킴으로써 제조될 수 있는 2,4-비스(0-메톡시폴리에틸렌글리콜)-6-클로로-s-트리아진이다. 유리 카복실 그룹에 결합된 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리옥시에틸렌디아민을 포함한다.

[0175] 스페이서를 갖는 PEG에 대한 본 발명의 하나 이상의 폴리펩타이드 서열의 접합은 다양한 통상적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 접합 반응은 5 내지 10의 pH에서, 4° C 내지 실온의 온도에서 30분 내지 20시간 동안 시약 대 단백질의 몰 비 4:1 내지 30:1을 사용하여 용액 중에서 수행될 수 있다. 반응 조건은 주로 목적하는 치환도를 생성하도록 반응을 지시하도록 선택될 수 있다. 일반적으로 저온, 낮은 pH(예: pH=5), 및 짧은 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 감소시키는 경향이 있는 반면, 고온, 중성 내지 높은 pH(예: pH≥7), 및 긴 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 증가시키는 경향이 있다. 당해 분야에 공지된 다양한 수단이 반응을 종결시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 반응은 반응 혼합물을 산성화시키고, 하기에서 동결시킴으로써 종결된다: 예를 들어, -20 °C. 다양한 분자의 폐길화는, 예를 들어, 하기에서 논의된다: U.S. 특허 제5,252,714호; 제5,643,575호; 제5,919,455호; 제5,932,462호; 및 제5,985,263호. PEG-IL-10은 예컨대 하기에 기재되어 있다: U.S. 특허 제7,052,686호. 본원에서 사용하기 위해 고려되는 특정 반응 조건이 실험 섹션에 제시되어 있다.

[0176] 본 발명은 또한 PEG 모방체의 사용을 고려한다. PEG의 특성(예: 향상된 혈청 반감기)을 유지하면서 몇 가지 추가적인 유리한 특성을 부여하는 재조합 PEG 모방체가 개발되었다. 예로서, PEG와 유사한 확장된 형태를 형성할 수 있는 (예를 들어, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser 및 Thr을 포함하는) 단순한 폴리펩타이드 쇄는 하기로 이미 재조합적으로 융합되어 생성될 수 있다: 관심 있는 펩타이드 또는 단백질 약물(예: Amunix' XTEN technology; Mountain View, CA). 이는 제조 공정 동안 추가의 접합 단계의 필요성을 제거한다. 또한, 확립된 분자 생물학 기술은 폴리펩타이드 쇄의 측쇄 조성의 제어를 가능하게하여 면역원성 및 제조 특성의 최적화를 허용한다.

[0177] 본 발명의 목적을 위해, "당화"는 광범위하게 글리칸을 단백질, 지질 또는 다른 유기 분자에 부착시키는 효소 공정을 의미한다. 본 발명과 관련하여 용어 ""의 사용은 일반적으로 (기본 당화 부위를 제거하거나 화학적 및/ 또는 효소적 수단에 의해 당화를 결실시킴으로써) 하나 이상의 탄수화물 잔기를 추가하거나 결실시키고/시키거나 천연 서열에 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 하나 이상의 당화 부위를 첨가함을 의미하고자 한다., 상기 어구는 존재하는 다양한 탄수화물 잔기의 성질 및 비율의 변화를 포함하는 천연 단백질의 당화의 질적 변화를 포함한다.

[0178] 당화는 IL-10과 같은 폴리펩타이드의 물리적 특성 (예컨대, 용해도)에 극적으로 영향을 미칠 수 있고 또한 단백질 안정성, 분비, 및 세포이하 국소화 (subcellular localization)에서 중요할 수 있다. 당화된 폴리펩타이드는 또한 향상된 안정성을 나타낼 수 있거나, 반감기와 같은 하나 이상의 약물동태학적 특성을 개선시킬 수 있다. 또한, 용해도 개선은, 예를 들어, 비당화된 폴리펩타이드를 포함하는 제형보다 약제학적 투여에 더욱 적합한 제형의 생성을 가능하게 할 수 있다.

[0179] 적절한 당화는 생물학적 활성에 필수적일 수 있다. 실제로, 진핵생물 유기체의 일부 유전자는, 하기에서 발현된 경우: 세균(예: 이. 콜리)(이는 단백질을 당화하는 세포 공정이 결여되어 있다), 당화의 결여로 인해 활성이 거의 또는 전혀 없이 회수되는 단백질을 생산한다.

[0180] 부위의 추가는 아미노산 서열을 변경함으로써 달성될 수 있다. 펩타이드의 변경은, 예를 들어, 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기(0-결합된당화 부위의 경우) 또는 아스파라긴 잔기(N-결합된 당화 부위의 경우)의 첨가 또는 이에 의한 치환에 의해 수행될 수 있다. N-결합된 및 0-결합된 올리고당의 구조 및 각 형태에서 밝혀진 당 잔기는 상이할 수 있다. 둘 모두에서 통상적으로 발견된 당의 한 형태는 N-아세틸뉴라민산(이후, 시알산으로서 지칭

된다)이다. 시알산은 일반적으로 N-결합 및 O-결합 올리고당의 말단 잔기이고, 이의 음전하에 의해, 당단백질에 산성을 부여할 수 있다. 본 발명의 특별한 구현예는 N-당화 변이체의 생성 및 사용을 포함한다.

[0181] 본 발명의 폴리펩타이드 서열은 수준의 변화를 통해, 특히 목적하는 아미노산으로 번역되는 코돈이 생성되도록 미리 선택된 염기에서 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 돌연변이시킴으로써 임의로 변경될 수 있다. 펩타이드 상의 탄수화물 잔기의 수를 증가시키는 추가의 수단은 글리코사이드의 폴리펩타이드로의 화학적 또는 효소적 결합에 의해서이다. 화물의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로, 또는 당화되는 아미노산잔기를 코딩하는 코돈의 치환에 의해 달성될 수 있다. 적 탈당화 기술은 공지되어 있고, 폴리펩타이드 상의 탄수화물 잔기의 효소적 절단은 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용으로 달성될 수 있다.

[0182] 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) - 결핍 차이니즈 햅스터 난소 (CHO) 세포는 재조합 당단백질을 생산하기 위해 통상적으로 사용된 숙주 세포이다. 이들 세포는 효소 베타-갈락토시드 알파-2,6-시알릴트랜스페라제를 발현시키지 않고, 따라서, 이들 세포에서 생산된 당단백질의 N-결합 올리고당에 알파-2,6 결합 중의 시알산을 첨가하지 않는다.

[0183] 시알릴화: 본 개시내용은 또한 폴리펩타이드의 안정성 및 생체내 약동학을 개선하기 위해, 폴리펩타이드를 천연 발생 생분해가능한  $\alpha$ -(2→8) 연결된 폴리시알산 ("PSA")에 접합하는 폴리시알릴화의 사용을 고려한다. PSA는 매우 친수성인 생체분해성 무독성 천연 중합체이고 이의 혈청 반감기를 증가시키는 혈액 중 높은 겉보기 분자량을 제공한다. 또한, 다양한 펩타이드 및 단백질 치료제의 폴리시알릴화는 현저하게 감소된 단백질 분해, 생체 활성의 보유, 및 면역원성 및 항원성의 감소를 유도하였다(참조: 예를 들어, G.Gregoriadis 등, Int. J. Pharmaceutics 300(1-2): 125-30). 하기에 의한 변형과 마찬가지로(예: PEG), 부위 특이적 폴리시알릴화를 위한 다양한 기술이 이용 가능하다(참조: 예를 들어, T.Lindhout 등, (2011) PNAS 108(18)7397-7402).

[0184] 알부민 융합: 접합을 위한 추가의 적합한 성분 및 분자는 알부민, 예를 들어, 인간 혈청 알부민(HAS), 시노 혈청 알부민, 및 소 혈청 알부민(BSA)을 포함한다.

[0185] 약 20일의 혈청 반감기를 갖는 585 아미노산 폴리펩타이드(약 67kDa)인 성숙한 HAS는 주로 콜로이드성 혈액 삼투압, 혈액 pH, 및 수많은 내인성 및 외인성 리간드의 수송 및 분배의 유지에 관여한다. 단백질은 3개의 구조적 상동성 도메인(도메인 I, II 및 III)을 갖고, 거의 전체로 알파-나선형 형태이고, 17개의 디설파이드 브릿지에 의해 매우 안정화된다. 알부민의 3개의 주요 약물 결합 영역은 서브-도메인 IB, IIA 및 IIIA 내의 3개의 도메인 각각에 위치한다.

[0186] 알부민 합성은 간에서 발생하고, 이는 짧은 수명의 1차 제품 프리프로알부민을 생성한다. 따라서, 전장 HAS는 18개의 아미노산의 신호 펩타이드 (MKWVTFISLLFLFSSAYS; 서열번호: 11) 이후에 6개 아미노산의 프로-도메인 (RGVFRR; 서열번호: 12)을 가지며; 이 24개의 아미노산 잔기 펩타이드는 프리-프로 도메인으로 불릴 수 있다. HAS는 프리-프로-도메인으로서 이의 내인성 신호 펩타이드를 사용하여 발현되고 분비될 수 있다. 또는, HAS는 성숙한 작제물에 융합된 IgK 신호 펩타이드를 사용하여 발현되고 분비될 수 있다. 프리프로알부민은 아미노 말단에서 세포질 망상 루멘에서 신속하게 동시-번역적으로 절단되어 안정한 609-아미노산 전구체 폴리펩타이드, 프로알부민을 생성한다. 이어서, 프로알부민은 골지체로 통과하고, 여기서 이는 푸린 의존성 아미노 말단절단에 의해 585 아미노산 성숙 알부민으로 전환된다.

[0187] 알부민의 1차 아미노산 서열, 구조 및 기능은, 알부민 합성 및 분비의 공정과 마찬가지로, 종간에 고도로 보존된다. HAS에 필적하는 알부민 혈청 단백질은, 예를 들어, 시노몰구스 원숭이, 소, 개, 토끼 및 랫트에서 발견된다. 비인간 종 중에서, 소 혈청 알부민(BSA)이 HAS와 가장 구조적으로 유사하다(참조: 예를 들어, Kosa 등, Nov 2007 J Pharm Sci. 96(11): 3117-24). 본 발명은, 예를 들어, 약물 개발 공정에서 상기 나타낸 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는 비인간 종으로부터 알부민의 사용을 고려한다.

[0188] 본 발명에 따라서, 알부민은 카복실 말단, 아미노 말단, 카복실 및 아미노 말단 둘 다에서, 및 내적으로 약물 분자(예: 본원에 기재된 폴리펩타이드)에 접합될 수 있다(참조: 예를 들어, USP 5,876,969 및 USP 7,056,701).

[0189] 본 발명에 의해 고려된 HSA - 약물 분자 접합체에서, 알부민 분비 예비-서열 및 이의 변이체, 이의 단편 및 변이체, 및 HAS 변이체와 같은 다양한 형태의 알부민이 사용될 수 있다. 이러한 형태는 일반적으로 하나 이상의 목적하는 알부민 활성을 포함한다. 추가의 구현예에서, 본 발명은 알부민, 알부민 단편 및 알부민 변이체 등에 적접 또는 간접적으로 융합된 폴리펩타이드 약물 분자를 포함하는 융합 단백질을 포함하고, 여기서 융합 단백질은 비융합된 약물 분자보다 더 높은 혈장 안정성을 갖고/갖거나 융합 단백질은 비융합된 약물 분자의 치료 활성을 보유한다. 일부 구현예에서, 간접 융합은 링커, 예컨대 펩타이드 링커 또는 이의 변형된 형태에 의해 달성된

다.

[0190] 세포내 절단은, 예를 들어, 푸린 또는 카스파제에 의해 효소적으로 수행될 수 있다. 세포는 세포내에서 융합 분자의 일부를 절단할 수 있는, 낮은 수준의 이러한 내인성 효소를 발현하며; 따라서, 상기 폴리펩타이드의 일부는 HAS에 접합되지 않으면서 세포로부터 분비되는 반면, 상기 폴리펩타이드의 일부는 HAS를 포함하는 융합 분자의 형태로 분비된다. 본 발명의 구현에는 다양한 푸린 융합 작제물의 사용을 고려한다. 예를 들어, 작제물은 하기를 포함하도록 설계될 수 있다: 서열 RGRR (서열번호: 13), RKRKRR (서열번호: 14), RKKR (서열번호: 15), 또는 RRRKKR (서열번호: 16).

[0191] 본 개시내용은 또한 세포외 절단 (즉, 생체외 절단)을 고려하며, 이에 의해 융합 분자가 세포로부터 분비되고, 정제된 다음, 절단된다. 상기 절제 (excision)는 성숙한 IL-10으로부터 전체 HSA-링커 복합체, 또는 전체 HSA-링커 복합체보다 작은 것을 해리시킬 수 있음이 이해된다.

[0192] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 하나 이상의 폴리펩타이드에 대한 일부민의 융합은, 예를 들어, HAS 또는 이의 단편을 코딩하는 핵산이 하나 이상의 폴리펩타이드 서열을 코딩하는 핵산에 결합되도록 유전자 조작에 의해 달성될 수 있다. 이후, 적합한 숙주는 융합 폴리펩타이드를 발현시키기 위해, 예를 들어, 적합한 플라스미드의 형태로 융합된 뉴클레오티드 서열로 형질전환되거나 형질감염될 수 있다. 발현은, 예를 들어, 원핵 세포 또는 진핵 세포로부터 시험관내에서 또는, 예를 들어, 유전자 도입 유기체로부터 생체내에서 수행될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 융합 단백질의 발현은 포유동물 세포주, 예를 들어, CHO 세포주에서 수행된다. 형질전환은 외인성 유전자 재료(외인성 핵산)의 세포막을 통한 직접 흡수, 도입 및 발현으로부터 생성되는 세포의 유전적 변경을 의미하기 위해 본원에서 광범위하게 사용된다. 형질전환은 박테리아의 일부 종에서 자연적으로 일어나지만, 이는 다른 세포에서 인공적인 수단에 의해 달성될 수도 있다.

[0193] 또한, 일부민 자체는 이의 순환 반감기를 연장시키기 위해 변형될 수 있다. 변형된 일부민과 IL-10의 융합은 상기 기재된 유전자 조작 기술에 의해 또는 화학적 접합에 의해 달성될 수 있고; 수득된 융합 분자는 비-변형된 일부민과의 융합을 초과하는 반감기를 갖는다 (WO2011/051489 참고).

[0194] 대안적인 일부민 결합 전략: 다수의 일부민-결합 전략이 접합된 지방산 쇄를 통한 일부민 결합(아실화)을 포함하는 직접 융합에 대한 대안으로서 개발되었다. 혈청 일부민은 지방산에 대한 수송 단백질이기 때문에, 일부민-결합 활성을 갖는이들 천연 리간드가 작은 단백질 치료제의 반감기 연장을 위해 사용되었다. 예를 들어, 당뇨병에 승인된 제품인 인슐린 디테르미르(LEVEMIR)는 유전적으로 변형된 인슐린에 접합된 미리스틸 쇄를 포함하여 장기간 지속되는 인슐린 유사체를 생성한다.

[0195] 본 개시내용은 또한 일부민 결합 도메인 (ABD) 폴리펩타이드 서열 및 본원에 기재된 하나 이상의 폴리펩타이드의 서열을 포함하는 융합 단백질을 고려한다. 문현에 기재된 임의의 ABD 폴리펩타이드 서열은 융합 단백질의 성분일 수 있다. 융합 단백질의 성분은, 본원에 기재된 링커와 같은 링커를 통해 임의로 공유 결합될 수 있다. 본 개시내용의 일부 구현예에서, 융합 단백질은 N-말단 모이어티로서 ABD 폴리펩타이드 서열 및 C-말단 모이어티로서 본원에 기재된 폴리펩타이드를 포함한다.

[0196] 본 개시내용은 또한 일부민 결합 폴리펩타이드의 단편을 포함하는 융합 단백질 (상기 단편은 실질적으로 일부민 결합을 보유함); 또는 단량체 단위로서 적어도 2개의 일부민 결합 폴리펩타이드 또는 이의 단편을 포함하는 일부민 결합 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 다량체를 고려한다. ABD 및 관련 기술의 일반적 논의를 위해, WO 2012/050923, WO 2012/050930, WO 2012/004384 및 WO 2009/016043을 참조한다.

[0197] 분자와의 접합: 접합을 위한 추가의 적합한 성분 및 분자는, 예를 들어, 티로글로불린; 테타누스톡소이드; 디프테리아 톡소이드; 폴리아미노산, 예를 들어, 폴리(D-리신:D-글루탐산); 로타바이러스의 VP6 폴리펩타이드; 인플루엔자 바이러스 헤마글루터닌, 인플루엔자 바이러스 핵단백질; 키홀 림펫 혜모시아닌(KLH); 및 B형 간염 바이러스 코어 단백질 및 표면 항원; 또는 상기의 임의의 조합을 포함한다.

[0198] 따라서, 본 개시내용은 폴리펩타이드 서열의 N- 및/또는 C-말단에 이상의 부가적인 성분 또는 분자, 예컨대 또 다른 폴리펩타이드 (예컨대, 폴리펩타이드에 대해 이종인 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드), 또는 담체 합을 고려한다. 서, 예시적인 폴리펩타이드 서열은 또 다른 성분 또는 분자와의 접합체로서 제공될 수 있다.

[0199] 접합체 변형은 제2 분자로부터 유래된 활성을 추가의 또는 상보적 기능 또는 활성과 함께 활성을 보유하는 폴리펩타이드 서열을 초래할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드 서열은, 예를 들어, 용해도, 저장, 생체내 또는 유효 반감기 또는 안정성, 면역원성의 감소, 생체내 지연되거나 조절된 방출 등을 촉진시키기 위해 분자에 접합될 수 있다. 다른 기능 또는 활성은 비접합된 폴리펩타이드 서열에 비해 독성을 감소시키는 접합체, 비접합된 폴리

펩타이드 서열보다 더욱 효율적으로 세포 또는 기관의 유형을 표적화하는 접합체, 또는 본원에 나타낸 질환, 장애 또는 상태(예: 암)와 관련되는 원인 또는 효과를 추가로 대응하기 위한 약물을 포함한다.

[0200] IL-10 폴리펩타이드 한 거대한, 느리게 대사되는 거대분자, 예컨대 단백질; 다당류, 예컨대 세파로스, 아가로스, 셀룰로스, 또는 셀룰로스 비드; 폴리머성 아미노산, 예컨대 폴리글루탐산, 또는 폴리라이신; 아미노산 코폴리머; 불활성화된 바이러스 입자; 불활성화된 박테리아 독소, 예컨대, 디프테리아로부터의 톡소이드, 테타누스, 콜레라, 또는 류코톡신 분자; 불활성화된 박테리아; 및 수지상 세포에 접합될 수 있다. 이러한 접합된 형태는, 경우에 따라, 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 항체를 생산하기 위해 사용될 수 있다.

[0201] 접합을 위한 추가의 후보 성분 및 분자는 단리 또는 정제에 적합한 것들을 포함한다. 특정한 비제한적인 그 예는 예를 들면, 플라스틱 또는 폴리스티렌 비드, 플레이트 또는 비드, 자기 비드, 시험 스트립, 및 막을 포함하는, 고형 지지체를 포함하는 결합 분자, 예컨대 바이오틴 (바이오틴-아비딘 특이적 결합 쌍), 항체, 수용체, 리간드, 렉틴, 또는 분자를 포함한다.

[0202] 양이온 교환 크로마토그래피와 같은 정제 방법은 접합체를 그들의 다양한 분자량으로 효과적으로 분리하는 전하차이에 의해 접합체를 분리하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 양이온 교환 칼럼이 로딩될 수 있고 그리고 그 다음 ~20 mM 아세트산나트륨, pH ~4로 세정되고, 그리고 그 다음 pH 약 3 내지 5.5, 예를 들면, pH ~4.5로 완충된 선형 (0 M 내지 0.5 M) NaCl 구배로 용출된다. 양이온 교환 크로마토그래피로 수득된 분획의 함량은 통상적인 방법, 예를 들어, 질량 분광법, SDS-PAGE, 또는 분자량에 의해 분자 실체를 분리하는 다른 공지된 방법을 사용하여 분자량에 의해 동정될 수 있다.

[0203] Fc-융합 분자: 특정 구현예에서, 명의 폴리펩타이드 서열의 아미노- 또는 카복실- 말단은 글로불린 Fc 영역(예: Fc)에 융합되어 융합 접합체 (또는 융합 분자)를 형성할 수 있다. Fc 융합 접합체는 생체 의약품의 전신 반감기를 증가시키는 것으로 나타났고, 따라서 생체 의약품은 덜 빈번한 투여를 필요로 한다.

[0204] Fc는 혈관을 둘러싸고 있는 내피 세포에서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 결합하고, 결합시, Fc 융합 분자는 분해로부터 보호되고, 순환에 재방출되어 순환에서 분자를 더 오래 유지시킨다. 이러한 Fc 결합은 내인성 IgG가 이의 긴 혈장 반감기를 유지하는 메커니즘으로 간주된다. 보다 최근의 Fc-융합 기술은 생체 의약품의 단일 커피를 전통적인 Fc-융합 접합체와 비교하여 생체 의약품의 약물동력학적 및 약력학적 특성을 최적화하기 위해 항체의 Fc 영역에 연결시킨다. 본원에 개시된 폴리펩타이드와 함께 사용하는데 적합한 다른 Fc-관련 기술의 예는 WO 2013/113008에 기재되어 있다.

[0205] 다른 변형: 본 개시내용은 하나 이상의 특성을 개선하기 위해, 현재 공지된 또는 미래에 개발될 IL-10의 다른 변형의 사용을 고려한다. 본 개시내용의 폴리펩타이드의 순환 반감기를 연장하거나, 안정성을 증가시키거나, 제거를 감소시키거나, 면역원성 또는 알레르기항원성 (allergenicity)을 변경하는 상기 한 가지 방법은 헤실화 (hesylation)에 의한 폴리펩타이드의 변형을 포함하며, 이는 폴리펩타이드 서열의 특징을 변형하기 위해 다른 분자에 연결된 하이드록시에틸 전분 유도체를 사용한다. 헤실화의 다양한 국면은, 예를 들어, 하기에 기재되어 있다: U.S. 특허 출원제2007/0134197호 및 제2006/0258607호.

[0206] 본 개시내용은 또한 융합 태그로서 SUMO를 포함하는 융합 분자를 고려한다 (LifeSensors, Inc.; Malvern, PA). SUMO에 대한 본원에 기재된 폴리펩타이드의 융합은 발현의 증진, 용해도의 향상 및/또는 정제 방법의 개발에서의 도움을 포함하는 몇 가지 유익한 효과를 전달할 수 있다. SUMO 프로테아제는 SUMO의 3차 구조를 인식하고, SUMO의 C-말단에서 융합단백질을 절단하여 목적하는 N-말단 아미노산을 갖는 본원에 기재된 폴리펩타이드를 방출시킨다.

[0207] 링커: 링커 및 그들의 용도는 상기 기재되었다. 본 발명의 폴리펩타이드 서열을 변형시키기 위해 사용된 임의의 상기 성분 및 분자는 임의로 링커를 통해 접합될 수 있다. 적합한 링커는 일반적으로 변형된 폴리펩타이드 서열과 연결된 성분 및 분자 사이의 일부 이동을 허용하기에 충분한 길이의 "가요성 링커"를 포함한다. 링커 분자는 일반적으로 약 6 내지 50 원자 길이이다. 링커 분자는 또한, 예를 들어, 아릴 아세틸렌, 2 내지 10개 단량체 단위를 함유하는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 이산, 아미노산 또는 이의 조합일 수 있다. 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고, 하기와 같은 임의의 적합한 길이일 수 있다: 1 아미노산(예: Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 또는 50 이상 아미노산.

[0208] 예시적인 가소성 링커는 글리신 폴리머 ( $G_n$ ), 글리신-세린 폴리머 (예를 들어,  $(GS)_n$ ,  $GSGS_n$  (서열번호: 17),  $GGGS_n$  (서열번호: 18),  $(G_mS_o)_n$ ,  $(G_mS_oG_m)_n$ ,  $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$  (서열번호: 19),  $(GSGGS_m)_n$  (서열번호: 20),  $(GSGS_mG)_n$

(서열번호: 21) 및  $(GGGS_m)_n$  (서열번호: 22), 및 이의 조합, 여기서 m, n, 및 o는 각각 독립적으로 적어도 1의 정수로부터 선택됨), 글리신-알라닌 폴리머, 알라닌-세린 폴리머, 및 다른 가소성 링커를 포함한다. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 상대적으로 비구조화되고, 따라서 성분들 사이에 중성 테테르로서 작용할 수 있다. 예시적인 가소성 링커는, 비제한적으로 하기를 포함한다: GGSG (서열번호: 23), GGS GG (서열번호: 24), GSGSG (서열번호: 19), GS GGG (서열번호: 25), GGGSG (서열번호: 26), 및 GS SSG (서열번호: 27).

#### [0209] 치료적 및 예방적 용도

[0210] 본 개시내용은 광범위한 질환, 장애 및/또는 병태, 및/또는 이의 증상의 치료 또는 예방에서 본원에 기재된 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10)의 사용을 고려한다. 실제로, 본 개시내용의 교시는 전술한 IL-10 평균 혈청 최저 농도 매개변수를 달성하거나 유지하는 것이 유익할 수 있는 임의의 질환, 장애 또는 병태에 적용하는 것을 의미한다. 특별한 용도가 이후 상세히 기재되지만, 본 발명이 그렇게 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다. 나아가, 특정 질환, 장애 및 병태의 일반적인 카테고리가 이하에 제시되어 있지만, 일부 질환, 장애 및 병태는 하나를 초과하는 카테고리 (예컨대, 암- 및 섬유증-관련 장애)의 구성원일 수 있고, 다른 것은 상기 개시된 카테고리 중 어느 것의 구성원이 아닐 수 있다.

[0211] 섬유증 장애 및 암. 본 개시내용에 따르면, IL-10 (예컨대, PEG-IL-10)은 암 (예컨대, 자궁, 자궁 경부, 유방, 전립선, 고환, 위장관 (예컨대, 식도, 인두중앙, 위, 소장 또는 대장, 결장, 또는 직장), 신장, 신장 세포, 방광, 골, 골수, 피부, 두경부, 피부, 간, 담낭, 심장, 폐, 췌장, 타액선, 부신, 갑상선, 뇌 (예컨대, 신경교종), 신경절, 중추 신경계 (CNS) 및 말초 신경계 (PNS)의 암), 및 조혈 시스템 및 면역 시스템 (예컨대, 비장 또는 흉선)의 암을 포함하는, 증식성 병태 또는 장애를 치료하거나 예방하는데 사용될 수 있다. 본 개시내용은 또한, 예를 들어, 면역원성 종양, 비-면역원성 종양, 잠복 종양, 바이러스-유도된 암 (예컨대, 상피 세포 암, 내피 세포 암, 편평 세포 암종 및 파필로마바이러스), 선암, 림프종, 암종, 흑색종, 백혈병, 골수종, 육종, 기형암종, 화학적으로 유도된 암, 전이, 및 혈관형성을 포함하는, 다른 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 본 개시내용은, 예컨대, 조절성 T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 활성을 조절함으로써, 종양 세포 또는 암 세포 항원에 대한 관용을 감소시키는 것을 고려한다 (예컨대, Ramirez-Montagut, 등 (2003) Oncogene 22:3180-3187; 및 Sawaya, 등 (2003) New Engl. J. Med. 349: 1501-1509 참고). 특정 구현예에서, 종양 또는 암은 대장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 교아종, 또는 백혈병이다. 용어(들) 암 관련 질환, 장애 및 병태의 사용은 암과 직접 또는 간접적으로 관련된 상태를 광범위하게 지칭하는 것을 의미하고, 예를 들어, 혈관 신생 및 형성 장애와 같은 전암 상태를 포함한다.

[0212] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10) 및 적어도 하나의 부가적인 치료 또는 진단 제제를 이용하여 증식 상태, 암, 종양, 또는 전암성 상태를 치료하는 방법을 제공하며, 이의 예는 본원의 다른 곳에 제시되어 있다.

[0213] 본 개시내용 또한 섬유증 질환, 장애 및 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 본원에 사용된 바와 같이, 문구 "섬유증 질환, 장애 및 병태", 및 유사한 용어 (예컨대, "섬유증 장애") 및 문구는, 섬유증 조직 또는 흉터 조직 (예컨대, 하나 이상의 조직에서의 섬유증)의 형성을 야기할 수 있는 임의의 병태를 포함하도록 광범위하게 해석되어야 한다. 예로서, 흉터 조직을 야기할 수 있는 손상 (예컨대, 창상)은 피부, 눈, 폐, 신장, 간, 중추 신경계, 및 심혈관계에 대한 창상을 포함한다. 상기 문구는 또한, 예를 들어, 손상 또는 수술의 결과로서, 뇌졸중, 및 조직 부착으로부터 비롯되는 흉터 조직 형성을 포함한다.

[0214] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "섬유증"은 기관 또는 조직의 정상적인 구성성분이 아닌 수복 또는 반응 과정으로서 섬유 조직의 형성을 지칭한다. 섬유증은 섬유아세포 축적 및 임의의 특정 조직에서 정상적인 증착을 초과하는 콜라겐 증착을 특징으로 한다.

[0215] 섬유증 장애는, 비제한적으로, 창상 치유로부터 발생하는 섬유증, 전신 및 국소 경피증, 아테롬성 동맥경화증, 재발협착증, 폐 염증 및 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 간질성 폐 질환, 간 간경변, 만성 B형 간염 또는 C 감염의 결과로서 섬유증, 신장 질환 (예컨대, 사구체신염), 흉터 조직으로부터 비롯된 심장 질환, 켈로이드 및 비후성 흉터, 및 눈 질환, 예컨대 황반 변성, 및 망막 및 유리체 망막증을 포함한다. 부가적인 섬유증 질환은 화학치료 약물-유도 섬유증, 방사선-유도 섬유증, 및 손상 및 화상을 포함한다.

[0216] 섬유증 장애는 또한 종종 간과 관련되며, 흔히 이러한 장애와 간세포 내 간 콜레스테롤 및 트리글리세라이드의 부적절한 축적 간에 관계가 있다. 이러한 축적은 간 섬유증 및 간경변을 야기하는 전-염증 반응을 야기하는 것으로 보인다. 섬유증 성분을 갖는 간 장애는 비-알코올성 지방간 질환 (NAFLD) 및 비-알코올성 지방간염 (NAS

H)을 포함한다.

[0217] 심혈관 질환. 본 개시내용은 또한 특정 심혈관-관련 질환 및/또는 연관된 대사-관련 질환, 장애 및 병태, 뿐만 아니라 이와 연관된 장애를 치료하고/거나 예방하기 위해 본원에 기재된 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10)의 사용을 고려한다.

[0218] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "심혈관 질환", "심장 질환" 등은 심혈관계에 영향을 미치는 임의의 질환, 주로 심장 질환, 뇌 및 신장의 혈관 질환, 및 말초 동맥 질환을 지칭한다. 심혈관 질환은 관상동맥성 심장 질환 (즉, 허혈성 심장 질환 또는 관상 동맥 질환), 아테롬성 동맥경화증, 심근증, 고혈압, 고혈압성 심장 질환, 폐성심, 심장 심박장애, 심내막염, 뇌척수혈관 질환, 및 말초 동맥 질환을 포함하는 질환의 집합이다. 심혈관 질환은 전 세계적으로 사망의 주요 원인이며, 그것은 일반적으로 노인에게 영향을 미치지만 심혈관 질환, 특히 아테롬성 동맥경화증의 내력은 젊은 시절에 시작된다.

[0219] 본 개시내용의 특정 구현에는 콜레스테롤 및 트리글리세라이드와 같은 지방 물질의 축적 결과로서 동맥 벽이 두꺼워져 플라크를 형성하는 만성 병태인, 아테롬성 동맥경화증을 치료하고/거나 예방하기 위해 IL-10 폴리펩타이드를 사용하는 것에 관한 것이다. 아테롬성 동맥경화증은 종종 기능적 고밀도 지질단백질에 의해 대식세포로부터 지방 및 콜레스테롤의 충분한 제거 없이, 주로 대식세포의 축적에 의해 유발되고 저밀도 지질단백질 (LDL)에 의해 촉진되는, 동맥 벽에서의 만성 염증 반응을 수반한다. 만성적으로 확장하는 아테롬성동맥경화증 병변은 루멘의 완전한 폐쇄를 유발할 수 있고, 이는 루멘 협착이 심각하여 하류 조직(들)로의 혈액 공급이 불충분할 때에만 나타날 수 있고, 허혈을 야기할 수 있다.

[0220] IL-10 폴리펩타이드는, 예를 들어, 심혈관 질환 (예컨대 아테롬성 동맥경화증), 뇌척수혈관 질환 (예컨대, 뇌졸중), 및 말초 혈관 질환과 연관될 수 있는, 콜레스테롤-관련 장애의 치료 및/또는 예방에 특히 이로울 수 있다. 예로서, 비제한적으로, IL-10 폴리펩타이드는 대상체의 혈중 콜레스테롤 수준을 낮추는데 사용될 수 있다. 대상체가 고콜레스테롤혈증을 갖는지 여부를 결정하는데 있어서, 정상 및 비정상 콜레스테롤 수준 사이에는 확실한 경계가 없고, 다른 건강 상태 및 위험 인자와 관련하여 값을 해석할 필요가 있다. 그럼에도 불구하고, 하기 지침이 미국에서 일반적으로 사용된다: 총 콜레스테롤 < 200 mg/dL이 바람직하며, 200-239 mg/dL은 경계선 높이이며, ≥ 240 mg/dL은 높다. 더 높은 수준의 총 콜레스테롤은 심혈관 질환의 위험성을 증가시키고, LDL 또는 비-HDL 콜레스테롤의 수준 모두는 미래의 관상동맥 심장 질환을 예측한다. 고콜레스테롤혈증을 평가할 때, 모든 지질단백질 하위분획 (VLDL, IDL, LDL 및 HDL)을 측정하는 것이 종종 유용하다. 특정 치료 목표는 HDL을 유지 또는 증가시키면서 LDL을 감소시키는 것이다.

#### 혈전증 및 혈전성 상태.

[0222] 혈관 내에 혈전 (혈병)을 형성하여 순환계를 통과하는 혈액의 흐름을 폐색을 야기하는 혈전증은 하기 (비르흐의 세가지 요소 (Virchow's triad)) 중 하나 이상의 비정상에 의해 유발될 수 있다: 과응고성 (hypercoagulability) 또는 증가된 혈액 응고, 내피 세포 손상, 또는 혈액 흐름 이상 (stasis, turbulence).

[0223] 혈전증은 일반적으로 정맥 또는 동맥으로서 분류되며, 이를 각각은 몇 가지 하위유형에 의해 제시될 수 있다. 정맥 혈전증은 심부 정맥 혈전증 (DVT), 간 문맥 혈전증, 신장 정맥 혈전증, 경정맥 혈전증, 버디 키아리 (Budd-Chiari) 증후군, 파제트-슈로터 (Paget-Schroetter) 질환, 및 뇌정맥동 혈전증을 포함한다. 동맥 혈전증은 뇌졸중 및 심근 경색을 포함한다.

[0224] 다른 질환, 장애 및 병태가 본 개시내용에 의해 고려되며, 이는 심방 혈전증 및 진성다혈구증 (홍반, 일차 진성 다혈구증 및 진성 적혈구 과다증 (polycythemia rubra vera)로도 공지됨), 골수가 너무 많은 RBC, WBC 및/또는 혈소판을 만드는 골수증식성 혈액 장애를 포함한다.

[0225] 면역 및 염증성 병태. 본원에 사용된 바와 같이, "면역 질환", "면역 병태", "면역 장애", "염증성 질환", "염증성 병태", "염증성 장애" 등과 같은 용어는 광범위하게 임의의 면역- 또는 염증성 관련 상태(예: 병리학적 염증 및 자가면역 질환)를 포함하는 것을 의미한다. 그러한 상태는 종종 다른 질환, 장애 및 병태와 불가분하게 뒤얽혀 있다. 예로서, "면역 병태"는 면역 체계에 의한 퇴치를 저항하는 감염 (급성 및 만성), 종양, 및 암을 포함하는, 암, 종양, 및 혈관형성과 같은 증식 병태를 지칭할 수 있다.

[0226] 예를 들어, 염증 사이토카인에 의해 유발될 수 있는, 면역- 및 염증-관련 질환, 장애 및 병태의 비제한적 목록은, 관절염, 신부전, 낭창, 천식, 건선, 대장염, 췌장염, 알러지, 섬유증, 수술 합병증 (예컨대, 염증 사이토카인이 치유를 방지하는 경우), 빈혈, 및 섬유근육통을 포함한다. 만성 염증과 관련될 수 있는 다른 질환 및 장애는 하기를 포함한다: 알츠하이머병, 율혈성 심부전, 뇌졸중, 대동맥 판막 협착증, 아테롬성동맥경화증, 골다공

증, 파킨슨병, 감염, 염증성 장 질환(예: 크론병 및 궤양성 대장염), 알레르기성 접촉 피부염 및 기타 습진, 전신 경화증, 이식 및 다발성 경화증.

[0227] IL-10 (예컨대, PEG-IL-10)이 특히 효과적일 수 있는 (예를 들어, 현재의 요법의 제한으로 인해) 전술한 질환, 장애 및 병태의 일부가 하기에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0228] 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드는 염증성 장 질환 (IBD)의 치료 및 예방에 특히 효과적일 수 있다. IBD는 크론병(CD) 및 궤양성 대장염(UC)을 포함하고, 이들 둘 다는 위장관의 어느 부분에도 영향을 미칠 수 있는 특별성 만성 질환이고, 여러 가지 부작용과 관련되고, 장기적인 UC 환자는 결장암 발병 위험이 증가한다. 현재의 IBD 치료는 염증 증상을 조절하는 것을 목표로 하고, 특정 제제(예: 코르티코스테로이드, 아미노살리실레이트 및 표준 면역억제제(예: 사이클로스포린, 아자티오프린 및 메토트렉세이트))는 제한된 성공을 경험했지만, 장기간 치료는 간 손상(예: 섬유증 또는 간경변) 및 골수 억제를 유발할 수 있고, 환자는 종종 그러한 치료에 대해 불응성이 된다.

[0229] 통상적인 면역 매개 만성 피부 질환의 집합체인 건선은 미국에서 450만 명 이상의 사람에게 영향을 미치고, 이 중 150만 명은 중간 내지 중증 형태의 질환을 갖는 것으로 간주된다. 더욱이, 10%를 초과하는 건선 환자가 건선 성 관절염이 생기며, 이는 뼈와 관절 주변의 결합 조직을 손상시킨다. 건선의 기본 생리학의 이해가 개선되어, 예를 들어, 질환의 염증성 성질의 원인인 T 림프구와 사이토카인의 활성을 표적화하는 제제의 도입을 초래하였다. 이러한 제제는 TNF- $\alpha$  억제제 (류마티스성 관절염 (RA)의 치료에도 사용됨)를 포함하며, 이는 ENBREL (에타네르셉트), REMICADE (인플릭시맙) 및 HUMIRA (아달리무맙), 및 T-세포 억제제, 예컨대 AMEVIVE (알레파셉트) 및 RAPTIVA (에팔리주맙)를 포함한다. 이러한 제제 중 일부는 특정 환자 집단에서 어느 정도 효과적이지만, 모든 환자를 효과적으로 치료하는 것으로 나타난 제제는 없었다.

[0230] 일반적으로 관절의 막 라이닝 (활막)에서의 만성 염증을 특징으로 하는 류마티스성 관절염 (RA)은 미국 인구의 약 1%, 또는 미국에서 2.1백만명의 사람들에게 영향을 미친다. 염증 과정에서 TNF- $\alpha$  및 IL-1을 포함하는 사이토카인의 역할에 대한 더 깊은 이해는 새로운 클래스의 질환 변형성 항류마티스성 약물(DMARD)의 개발 및 도입을 가능하게 했다. 제제 (RA를 위한 치료 양상과 겹치는 것 중 일부)는 ENBREL (에타네르셉트), REMICADE (인플릭시맙), HUMIRA (아달리무맙) 및 KINERET (아나킨라)를 포함한다. 이들 제제 중 일부가 증상을 완화하고, 구조적 손상의 진행을 억제하며, 특별한 환자 집단에서 신체 기능을 향상시키지만, 개선된 효능, 보완 작용 메커니즘 및 낮은/덜 심각한 부작용을 갖는 대안의 제제가 여전히 필요하다.

[0231] 뇌와 척수에서 다수의 염증 영역 및 미엘린의 흉터를 포함하는 심각하게 쇠약하게 하는 자가면역질환인 다발성 경화증 (MS)을 앓고 있는 대상체는, 현재의 치료법이 단지 증상을 완화시키거나 장애의 진행을 지연시키기 때문에, 본원에 기재된 IL-10 폴리펩타이드에 의해 특히 도움을 받을 수 있다.

[0232] 유사하게, IL-10 폴리펩타이드는 신경퇴행성 장애, 예컨대 환자의 사고, 기억, 및 언어 처리를 심각하게 손상시키는 뇌 장애인 알츠하이머병 (AD), 및, 예를 들어, 비정상적인 움직임, 강직 및 멀림을 특징으로 하는 CNS의 진행성 장애인 파킨슨병 (PD)에 걸린 대상체에게 특히 이로울 수 있다. 이러한 장애는 진행성이고 쇠약하게 하며, 어떤 치료제도 이용 가능하지 않다.

[0233] 바이러스 질환. 바이러스 질환에서 IL-10의 역할에 대한 관심이 증가하였다. IL-10은 그의 수용체 결합 활성에 따라 자극성 및 억제성 효과 모두를 야기하는 것으로 상정된다.

[0234] 예를 들어, 항바이러스 면역력 및 백신 효능을 증가시키기 위해 IL-10 기능을 억제하는 효과가 고려되었다 (Wilson, E., (2011) Curr Top Microbiol Immunol. 350: 39-65 참고). 더욱이, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 기능에서 IL-10의 역할이 연구되었다. 인간 면역결핍 바이러스 유형 1 (HIV-1) 복제의 억제 외에도, IL-10은 또한 효과기 면역 기전의 불활성화에 의해 바이러스 지속성을 촉진할 수 있다 (Naicker, D., 등, (2009) J Infect Dis. 200 (3): 448-452). 또 다른 연구는 IL-10을 생산하는 B 세포의 하위집단이 만성 B형 간염 바이러스 (HBV) 감염에서 T 세포 면역을 조절할 수 있음을 확인하였다.

[0235] 전술한 연구가 IL-10 억제가 유익할 수 있다는 것을 나타냄에도 불구하고, CD8+ T 세포 성분을 포함하는 특정 바이러스 감염이 IL-10의 투여를 통한 치료 및/또는 예방을 위한 후보일 수 있다. 이것은 IL-10이 조절성 T 세포 및/또는 CD8+ T 세포의 조절에 의해 특정 암에서 수행하는 긍정적 역할에 의해 뒷받침된다.

[0236] 본 개시내용은 IL-10을 이용한 치료가 유익할 수 있는 치료를 위한 임의의 바이러스 질환, 장애 또는 병태의 치료 및/또는 예방에서 IL-10 폴리펩타이드의 사용을 고려한다. 고려되는 바이러스 질환, 장애 및 병태의 예는 B

형 간염, C형 간염, HIV, 헤르페스 바이러스 및 사이토메갈로바이러스 (CMV)를 포함한다.

[0237] **약학 조성물**

[0238] 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드는 대상체에게 투여하는데 적합한 조성물의 형태일 수 있다. 일반적으로, 이러한 조성물은 IL-10 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 또는 생리학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 "약제학적 조성물"이다. 특정 구현예에서, IL-10 폴리펩타이드는 치료학적으로 허용가능한 양으로 존재한다. 약제학적 조성물은 본 발명의 방법에 사용될 수 있고; 따라서, 예를 들어, 약제학적 조성물 원에 기재된 치료 및 예방 방법 및 용도를 실행하기 위해 대상체에게 외내 될 수 있다.

[0239] 명의 약제학적 조성물은 의도된 투여 방법 및 투여 경로에 적합하도록 제형화될 수 있고; 예시적인 투여 경로는 본원에 제시된다., 약제학적 조성물은 본 발명에 의해 고려되는 질환, 장애 및 상태를 치료하거나 예방하기 위해 본원에 기재된 다른 치료적 활성제 또는 화합물과 함께 사용될 수 있다.

[0240] 약제학적 조성물은 전형적으로 본 개시내용에 의해 고려되는 치료학적 유효량의 IL-10 폴리펩타이드 및 하나 이상의 약제학적으로 및 생리학적으로 허용가능한 제형 제제를 포함한다. 적합한 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제는 산화방지제(예: 코르브산 및 중황산나트륨), 제(예: 알코올, 메틸파라벤, 에틸 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트), 유화제, 혼탁화제, 분산제, 용매, 충전제, 벌크화제, 세정제, 완충제, 비히클, 희석제 및/또는 보조제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 적합한 비히클은 가능하게는 비경구 투여용 약제학적 조성물에 통상적인 다른 재료로 보충된 생리 식염수 용액 또는 시트레이트 완충 식염수일 수 있다. 중성 완충 생리 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 생리 식염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 당업자는 본원에서 고려되는 약제학적 조성물 및 투여 형태에 사용될 수 있는 다양한 완충제를 용이하게 인식할 것이다. 전형적인 완충제는, 약제학적으로 허용되는 약산, 약 염기 또는 이의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예로서, 완충제 성분은 수용성 재료, 예를 들어, 인산, 타르타르산, 락트산, 석신산, 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 글루탐산 및 이의 염일 수 있다. 허용되는 완충제는, 예를 들어, 트리스 완충제, N-(2-하이드록시에틸)페페라진-N'-(2-에탄설폰산)(HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산 나트륨 염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판설폰산(MOPS), 및 N-트리스[하이드록시메틸]메틸-3-아미노프로판설폰산(TAPS)을 포함한다.

[0241] 약제학적 조성물이 제형화된 후, 이는 멸균 바이알에 용액, 혼탁액, 젤, 에멀젼, 고체 또는 탈수되거나 동결 건조된 분말로서 저장될 수 있다. 이러한 제형은 즉시 사용 가능한 형태, 사용 전에 재구성이 필요한 동결 건조된 형태, 사용 전에 희석을 필요로 하는 액체 형태 또는 다른 허용되는 형태로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 단일 사용 용기(예: 단일 사용 바이알, 앰플, 주사기 또는 자동 주입기(예를 들어, EpiPen®과 유사))로 제공되는 반면, 다용도 용기(예: 다용도 바이알)가 다른 구현예에서 제공된다. 임의의 약물 전달 장치가 IL-10을 전달하는데 사용될 수 있고, 이는 이식물(예컨대, 이식가능한 펩프) 및 카테터 시스템, 느린 주사 펩프 및 장치를 포함하며, 이를 모두는 본 속련된 당업자에게 널리 공지되어 있다. 일반적으로 피하 또는 근육내로 투여되는 데포 주사제는 또한 정의된 기간에 걸쳐 본원에 개시된 폴리펩타이드를 방출시키는데 이용될 수 있다. 데포 주사제는 일반적으로 고체- 또는 오일 기반이고, 일반적으로 본원에 제시된 제형화 성분 중 적어도 하나를 포함한다. 당업자는 데포 주사제의 가능한 제형 및 용도에 친숙하다.

[0242] 약제학적 조성물은 멸균 주사 가능한 수성 또는 유성 혼탁액의 형태로 존재할 수 있다. 이 혼탁액은 본원에 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁화제를 사용하는 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 제제는 또한 비독성 경구 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 가능한 용액 또는 혼탁액, 예를 들어, 1,3-부탄 디올 중의 용액으로 존재할 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 희석제, 용매 및 분산 매질은 물, 링거액, 등장성 염화나트륨 용액, 모포이 EL(BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산염 완충된 생리 식염수(PBS), 에탄올, 폴리올(예: 세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 포함한다. 또한, 멸균 비휘발성 오일은 용매 또는 혼탁화 매질로서 통상적으로 사용된다. 이 목적을 위하여, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는, 임의의 자극없는 고정된 오일이 이용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사제의 제조에서 용도를 찾는다. 특별한 주사 가능한 제형의 장기한 흡수는 흡수를 지연시키는 제제(예: 알루미늄모노스테아레이트 또는 젤라틴)를 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0243] 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물은 경구 용도에 적합한 형태, 예를 들어, 정제, 캡슐제, 트로키제, 로젠지제, 수성 또는 유성 혼탁액, 분산 가능한 분말 또는 과립제, 에멀젼, 경질 또는 연질 캡슐제, 또는 시럽, 용액, 마이크로비드 또는 엘릭서로서 존재할 수 있다. 경구용을 위해 의도된 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 제조에 대한 기술에서 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있고, 이러한 조성물은 약제학적으로 품격있고

맛있는 조합약을 제공하기 위해 1종 이상의 제제 예컨대, 예를 들면, 감미제, 풍미제, 착색제 및 보존제를 함유 할 수 있다. 정제, 캡슐제 등은 정제의 제조용으로 적합한 무독성의 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합물로 활성 성분을 함유한다. 이들 부형제는, 예를 들어, 불활성 희석제, 예컨대 탄산칼슘 또는 탄산나트륨, 락토스, 인산칼슘 또는 인산나트륨; 과립화제 및 붕해제, 가령 옥수수 전분, 또는 알긴산; 결합제, 가령 녹말, 젤라틴 또는 아카시아; 및 유후제, 가령 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탈크일 수 있다.

[0244] 경구 투여에 적합한 정제, 캡슐제 등은 코팅되지 않거나 공지된 기술에 의해 코팅되어 위장관에서 봉해 및 흡수를 지연시키고 이에 의해 지속적인 작용을 제공할 수 있다. 예를 들어, 시간 지연 재료, 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 사용될 수 있다. 그들은 또한 제어 방출을 위한 삼투성 치료 용 정제를 형성하기 위해 당해 분야에 공지된 기술로 코팅될 수 있다. 의 제제는 투여된 조성물의 전달을 조절하기 위해 생분해성 또는 생체적합성입자 또는 중합체성 물질, 예를 들어, 에스테르, 폴리아민 산, 하이드로겔, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜산, 에틸렌-비닐아세테이트, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 프로타민 설페이트, 또는 락티드/글리콜리드 공중합체, 폴리락티드/글리콜리드 공중합체 또는 에틸렌비닐 아세테이트 공중합체를 포함한다. 예를 들어, 제제는 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 또는 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐을 사용하여 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 또는 콜로이드 약물 전달 시스템에 포함될 수 있다. 이드성 분산 시스템은 수중유 에멀젼, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 거대분자 복합체, 나노-캡슐, 마이크로스피어, 마이크로비드 및 지질계 시스템을 포함한다. 언급된 제형의 제조방법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0245] 경구 용도용 제형은 또한 활성 성분이 불활성 고체 희석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 인산칼슘, 카올린 또는 미세 결정성 셀룰로스와 혼합된 경질 젤라틴 캡슐로서, 또는 활성 성분이 물 또는 유성 매질, 예를 들어, 땅콩 오일, 액체 파라핀 또는 올리브 오일과 혼합된 연질 젤라틴 캡슐로서 제공될 수 있다.

[0246] 수성 혼탁액은 이의 제조에 적합한 부형제와 혼합물로 활성 재료를 함유한다. 이러한 부형제는 혼탁화제, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시-프로필메틸셀룰로스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐-피롤리돈, 트라가칸트 겸 및 아카시아 겸; 분산제 또는 습윤제, 예를 들어, 천연 발생 포스파티드(예: 레시틴), 또는 알킬렌과 지방산의 축합 생성물(예: 폴리옥시-에틸렌 스테아레이트) 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올(예: 헵타데카에틸렌옥시제탄올의 경우)의 축합 생성물 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분 에스테르의 축합 생성물(예: 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트) 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분 에스테르의 축합 생성물(예: 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레이트)일 수 있다. 수성 혼탁액은 또한 하나 이상의 방부제를 함유할 수 있다.

[0247] 유성 혼탁액은 활성 성분을 식물성 오일, 예를 들어, 아라키스 오일, 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일에 또는 액체 파라핀과 같은 광유에 혼탁시킴으로써 제형화될 수 있다. 유성 혼탁액은 중점제, 예를 들어, 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올을 함유할 수 있다. 상기 제시된 것들과 같은 감미제, 및 향미제가 맛이 좋은 경구 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다.

[0248] 물의 추가에 의해 수성 혼탁액을 제조하는데 적합한 분산가능한 분말들 및 과립은 분산 또는 가습 물질, 혼탁 물질 그리고 하나 또는 그 이상의 보존제들과 혼합된 활성 성분을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 혼탁화제는 본원에 예시된다.

[0249] 본 발명의 약제학적 조성물은 또한 수중유 에멀젼 형태로 존재할 수 있다. 유상은 식물성 오일, 예를 들어, 올리브 오일 또는 아라키스 오일, 또는 광유, 예를 들어, 액체 파라핀, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 천연 발생 겸, 예를 들어, 아카시아 겸 또는 트라가칸트 겸; 천연 발생 포스파티드, 예를 들어, 대두, 레시틴 및 지방산으로부터 유래되는 에스테르 또는 부분 에스테르; 헥시톨 무수물, 예를 들어, 소르비탄 모노올레이트; 및 부분 에스테르와 에틸렌 옥사이드의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트일 수 있다.

[0250] 은 또한 임플란트, 리포솜, 하이드로겔, 프로드럭 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 조절 방출 제형과 같은, 신체로부터 신속한 분해 또는 제거로부터 조성물을 보호하는 담체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 스테아레이트와 같은 시간지연 재료는 단독으로 또는 왁스와 함께 사용될 수 있다.

[0251] 본 개시내용은 직장 투여를 위한 좌제 형태의 IL-10 폴리펩타이드의 투여를 고려한다. 좌제는 약물을 상온에서 고체이지만 직장 온도에서 액체이고, 따라서 직장에서 용해되어 약물을 방출시키는 적합한 비자극성 부형제와

혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 재료는 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0252] 본 개시내용에 의해 고려되는 IL-10 폴리펩타이드는 현재 공지되어 있거나 미래에 개발될 임의의 다른 적합한 약제학적 조성물 (예컨대, 비강 또는 흡입용 스프레이)의 형태일 수 있다.

[0253] 제형 중의 폴리펩타이드 또는 이의 단편의 농도는 광범위하게 가변적일 수 있고(예: 약 0.1중량% 미만, 통상적으로 약 2중량% 또는 적어도 약 2중량% 내지 20중량% 내지 50중량% 이상), 일반적으로, 예를 들어, 선택된 특별한 투여 방식에 따라서 유체 용적, 점도 및 대상체 기반 인자에 기초하여 주로 선택된다.

#### 투여 경로

[0255] 본 개시내용은 임의의 적합한 방식으로, IL-10, 및 이의 조성물의 투여를 고려한다. 적합한 투여 경로는 비경구 (예: 근육내, 정맥내, 피하(예: 주사 또는 임플란트), 복강내, 대장내, 관절내, 복강내, 대뇌내(뇌실질내) 및 뇌실내), 경구, 비강, 질내, 설하, 안내, 직장, 국소(예: 경피), 설하 및 흡입을 포함한다. 일반적으로 피하로 또는 근육내로 투여되는 데포 (depot) 주사가 또한 정의된 기간 동안 본원에 개시된 IL-10 폴리펩타이드를 방출하는데 이용될 수 있다.

[0256] 본 발명의 특별한 구현예는 비경구 투여를 고려하고, 추가의 구현예에서, 비경구 투여는 피하이다.

#### 병용 요법

[0258] 본 개시내용은 하나 이상의 활성 치료제 (예컨대, 사이토카인) 또는 다른 예방 또는 치료 양상 (예컨대, 방사선)과 조합된 IL-10 (예컨대, PEG-IL-10)의 사용을 고려한다. 이러한 병용 요법에서, 다양한 활성제는 빈번하게 상이한 작용 기전을 갖는다. 이러한 병용 요법은 하나 이상의 제제의 용량 감소를 허용함으로써 하나 이상의 제제와 관련된 부작용을 감소시키거나 제거함으로써 특히 유리할 수 있으며; 더욱이, 이러한 병용 요법은 기저 질환, 장애 또는 병태에 대해 상승작용 치료 또는 예방 효과를 가질 수 있다.

[0259] 본원에 사용된 바와 같이, "병용"은 별도로 투여될 수 있는, 예를 들어, 개별 투여를 위해 별도로 제형화된 요법(예: 키트로 제공될 수 있다), 및 단일 제형(즉, "공동-제형")으로 함께 투여될 수 있는 요법을 포함하는 것을 의미한다.

[0260] 특정 구현예에서, IL-10 폴리펩타이드는 순차적으로 투여되거나 적용되며, 예컨대 하나의 제제가 하나 이상의 다른 제제 전에 투여된다. 다른 구현예에서, IL-10 폴리펩타이드는 동시에 투여되며, 예컨대, 둘 이상의 제제는 동일한 또는 거의 동일한 시점에 투여되고; 둘 이상의 제제는 둘 이상의 별개의 제형으로 제공될 수 있거나 단일 제형으로 조합될 수 있다 (즉, 공동-제형). 둘 이상의 제제가 순차적으로 또는 동시에 투여되는지의 여부에 관계없이, 그들은 본 발명의 목적을 위해 병용 투여되는 것으로 간주된다.

[0261] 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드는 상기 상황 하에서 적절한 임의의 방식으로 하나 이상의 다른 (활성) 제제와 조합하여 사용될 수 있다. 하나의 구현예에서, 적어도 하나의 활성 제제 및 적어도 하나의 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드를 이용한 치료는 기간 동안 유지된다. 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 활성 제제를 이용한 치료는 감소되거나 중단되는 반면 (예컨대, 대상체가 안정한 경우), 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드를 이용한 치료는 일정한 투약 요법에 유지된다. 추가 구현예에서, 적어도 하나의 활성 제제를 이용한 치료는 감소되거나 중단되는 반면 (예컨대, 대상체가 안정한 경우), 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드를 이용한 치료는 감소된다 (예컨대, 더 낮은 용량, 덜 빈번한 투약 또는 더 짧은 치료 요법). 추가 구현예에서, 적어도 하나의 활성 제제를 이용한 치료는 감소되거나 중단되고 (예컨대, 대상체가 안정한 경우), 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드를 이용한 치료는 증가된다 (예컨대, 더 높은 용량, 더 빈번한 투약 또는 더 긴 치료 요법). 추가의 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 활성 제제를 이용한 치료는 유지되고 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드를 이용한 치료는 감소되거나 중단된다 (예컨대, 더 낮은 용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 요법). 추가의 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 활성 제제를 이용한 치료 및 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드를 이용한 치료는 감소되거나 중단된다 (예컨대, 더 낮은 용량, 덜 빈번한 투여 또는 더 짧은 치료 요법).

[0262] 설유증 장애 및 암. 본 개시내용은 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10) 및 적어도 하나의 부가적인 치료 또는 진단 제제를 이용하여 면역- 및/또는 염증-관련 질환, 장애 및 병태, 뿐만 아니라 이와 연관된 장애를 치료하고/거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0263] 화학치료제의 예는, 비제한적으로, 알킬화 제제, 예컨대 티오텐파 및 사이클로포스파미드; 알킬 살포네이트, 예컨대 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카보퀸, 메투레도파, 및 우레도파; 에틸렌

이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸로로멜라민; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 메팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칙티노마이신, 칼리케아마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 퀼라마이시, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투버시딘, 우베니벡스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테롭테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 페리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘, 5-FU; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피토오스스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라تون; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지퀸; 엘포르미틴; 엘립티니움 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라자이드; 프로카르바진; 라죽산; 시조파란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2,2',2'''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드 (Ara-C); 사이클로포스파미드; 티오텐파; 탁소이드, 예컨대, 파클리탁셀 및 도세탁셀; 클로람부실; 챈시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 및 백금 배위 착물, 예컨대 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 에토포사이드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미놉테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT11; 토포이소머라아제 억제제; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페마이신; 카페시타빈; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0264]

화학치료제는 또한 항-에스트로겐과 같이 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 항-호르몬 제제, 예를 들어 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 오나프리스톤, 및 토레미펜; 및 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 널루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 특정 구현예에서, 병용 요법은 호르몬 또는 관련 호르몬제의 투여를 포함한다.

[0265]

IL-10 폴리펩타이드와 조합하여 사용될 수 있는 부가적인 치료 양상은 사이토카인 또는 사이토카인 길항제, 예컨대 IL-12, INF  $\alpha$ , 또는 항-표피 성장 인자 수용체, 방사선요법, 또 다른 종양 항원에 대한 단일클론 항체, 단일클론 항체 및 독소의 복합체, T-세포 보조제, 골수 이식, 또는 항원 제시 세포 (예컨대, 수지상 세포 요법)를 포함한다. 백신(예를 들어, 가용성 단백질로서 또는 단백질을 코딩하는 핵산으로서)도 또한본원에 제공된다.

[0266]

심혈관 질환. 본 개시내용은 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10) 및 적어도 하나의 부가적인 치료 또는 진단 제제를 이용하여 면역- 및/또는 염증-관련 질환, 장애 및 병태, 뿐만 아니라 이와 연관된 장애를 치료하고/거나 예방하는 방법을 제공한다.

[0267]

고콜레스테롤증 (및 따라서 흔히 아테롬성 동맥경화증)의 치료를 위한 조합 요법에 유용한 치료제의 예는, 콜레스테롤의 효소적 합성을 억제하는 스타틴 (예컨대, CRESTOR, LESCOL, LIPITOR, MEVACOR, PRAVACOL, 및 ZOCOR); 콜레스테롤을 격리시키고 그의 흡수를 방해하는 담즙산 수지 (예컨대, COLESTID, LO-CHOLEST, PREVALITE, QUESTRAN, 및 WELCHOL); 콜레스테롤 흡수를 차단하는 에제티미비 (ZETIA); 트리글리세라이드를 감소시키고 HDL을 보통으로 증가시킬 수 있는 피브르산 (예컨대, TRICOR); LDL 콜레스테롤 및 트리글리세라이드를 보통으로 낮추는 니아신 (예컨대, NIACOR); 및/또는 전술한 것의 조합 (예컨대, VYTORIN (심바스타틴을 갖는 에제티미비)). 본원에 기재된 IL-10 폴리펩타이드와 조합하여 사용하기 위한 후보일 수 있는 대안적인 콜레스테롤 치료는 다양한 보충제 및 약초 (예컨대, 마늘, 폴리코사놀, 및 구굴(guggul))를 포함한다. 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0268]

면역 및 염증성 병태. 본 개시내용은 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10) 및 적어도 하나의 부가적인 치료 또는 진단 제제를 이용하여 면역- 및/또는 염증-관련 질환, 장애 및 병태, 뿐만 아니라 이와 연관된 장애를 치

료하고/거나 예방하는 방법을 제공한다.

- [0269] 병용 요법에 유용한 치료제의 예는 하기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 비스테로이드성 항염증성 약물(NSAID), 예를 들어, 아스파린, 아부프로펜 및 다른 프로피온산 유도체(알미노프로펜, 베녹사프로펜, 부클로식산, 카프로펜, 펜부펜, 페노프로펜, 플루프로펜, 플루르비프로펜, 인도프로펜, 케토프로펜, 미로프로펜, 나프록센, 옥사프로진, 피르프로펜, 프라노프로펜, 수프로펜, 티아프로펜산 및 티옥사프로펜), 아세트산 유도체(인도메타신, 아세메타신, 알클로페낙, 클리다낙, 디클로페낙, 펜클로페낙, 펜티아작, 푸이로페낙, 아부페낙, 이속세파크, 옥스피낙, 술린다, 티오피낙, 톨메틴, 지도메타신 및 조메피락), 페남산 유도체(플루페남산, 메클로페남산, 메페남산, 니플룸산 및 톤페남산), 비페닐카복실산 유도체(디플루니살 및 플루페니살), 옥시캄(이속시캄, 피록시캄, 수독시캄 및 테독시캄), 살리실레이트(아세틸 살리실산, 살파살라진) 및 피라졸론(아파존, 베즈피페릴론페프라존, 모페부타존, 옥시펜부타존, 페닐부타존). 다른 조합은 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 억제제를 포함한다.
- [0270] 조합을 위한 다른 활성체는 스테로이드, 예를 들어, 프레드니솔론, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 베타메타손, 멕사메타손 또는 하이드로코르티손을 포함한다. 이러한 조합은 특히 유리할 수 있는데, 본 발명의 IL-10 폴리펩타이드와 조합하여 환자를 치료할 때 필요한 스테로이드 용량을 점점 줄임으로써 스테로이드의 하나 이상의 부작용이 감소되거나 제거될 수도 있기 때문이다.
- [0271] 예를 들어, 류마티스성 관절염을 치료하기 위한 조합을 위한 활성 제제의 부가적인 예는 사이토카인 억제성 항-염증 약물(들) (CSAID); 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자, 예를 들어, TNF, LT, IL-1 $\beta$ ., IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF, 또는 PDGF에 대한 항체 또는 길항제를 포함한다.
- [0272] 활성 제제의 특정 조합은 상이한 시점에 자가면역 및 후속 염증 캐스캐이드에 간섭할 수 있고, 이는 키메라성, 인간화된 또는 인간 TNF 항체, REMICADE, 항-TNF 항체 단편 (예컨대, CDP870), 및 가용성 p55 또는 p75 TNF 수용체, 이의 유도체, p75TNFR1gG (ENBREL.) 또는 p55TNFR1gG (LENERCEPT), 가용성 IL-13 수용체 (sIL-13), 및 또한 TNF $\alpha$  전환 효소 (TACE) 억제제와 같은 TNF 길항제를 포함하며; 유사하게는 IL-1 억제제 (예컨대, 인터류킨-1-전환 효소 억제제)가 효과적일 수 있다. 다른 조합은 인터류킨 11, 항-P7s 및 p-셀렉틴 당단백질 리간드 (PSGL)를 포함한다. 본원에 기재된 IL-10 폴리펩타이드과 조합된 유용한 제제의 다른 예는 인터페론- $\beta$ 1a (AVONEX); 인터페론- $\beta$ 1b (베타SERON); 코팍손; 고암 산소; 정맥내 면역글로불린; 클라브리빈; 및 다른 인간 사이토카인 또는 성장 인자에 대한 항체 또는 길항체 (예컨대, CD40 리간드 및 CD80에 대한 항체)를 포함한다.
- [0273] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.
- [0274] 바이러스 질환. 본 개시내용은 IL-10 폴리펩타이드 (예컨대, PEG-IL-10) 및 적어도 하나의 부가적인 치료 또는 진단 제제 (예컨대, 하나 이상의 다른 항-바이러스 제제 및/또는 하나 이상의 다른 비-바이러스 제제)를 이용하여, 바이러스 질환, 장애 및 병태, 뿐만 아니라 이와 연관된 장애를 치료하고/거나 예방하는 방법을 제공한다.
- [0275] 이러한 병용 요법은 다양한 바이러스 라이프-사이클 단계를 표적화하고, 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 상이한 작용 메커니즘을 갖는 항바이러스제를 포함한다: 바이러스 탈각 (uncoating)의 억제제 (예컨대, 아만타딘 및 리만티딘); 역전사효소 억제제 (예컨대, 아시클로비어, 지도부딘, 및 라미부딘); 인테그라제를 표적화하는 제제; 바이러스 DNA에 대한 전사 인자의 부착을 차단하는 제제; 번역에 영향을 미치는 제제 (예컨대, 안티센스 분자) (예컨대, 포미비르센); 번역/리보자임 기능을 조절하는 제제; 프로테아제 억제제; 바이러스 어셈블리 조절제 (예컨대, 리팜피신); 및 바이러스 입자의 방출을 막는 제제 (예컨대, 자나미비어 및 오셀타미비어). 하기의 치료 및/또는 예방: 특정 바이러스 감염(예: HIV)은 종종 항바이러스제의 그룹("칵테일")을 수반한다.
- [0276] IL-10 폴리펩타이드와 조합하여 사용하기 위해 고려되는 다른 항바이러스 제제는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 아바카비어, 아데포비어, 아만타딘, 암프레나비어, 암플리겐, 아르비돌, 아타자나비어, 아트리플라, 보세프레비래르테트, 시도포비어, 콤비비어, 다루나비어, 멜라비르딘, 디다노신, 도코사놀, 에독수딘, 에파비렌츠, 엠트리시타빈, 엔푸비르티드, 엔테카비어, 팜시클로비어, 포삼프레나비어, 포스카네트, 포스포네트, 간시클로비어, 이바시타빈, 이무노비어, 이독수리딘, 이미퀴모드, 인디나비어, 이노신, 다양한 인터페론 (예컨대, 페그인터페론 알파-2a), 로피나비어, 로비리드, 마라비록, 모록시딘, 메티사존, 멜피나비어, 네비라핀, 넥사비어, 펜시클로비어, 페라미비어, 플레코나릴, 포도필로톡신, 랄테그라비어, 리바비린, 리토나비어, 페라미딘, 사퀴나비어, 스타부딘, 텔라프레비어, 테노포비어, 티프라나비어, 트리플루리딘, 트리지비어, 트로만타딘, 트루바다, 발라시클로비어, 발간시클로비어, 비크리비록, 비다라빈, 비라미딘, 및 잘시타빈.
- [0277] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0278] **투여**

[0279] 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드는, 예를 들어, 투여 목표 (예컨대, 원하는 분해정도); 제형이 투여되는 대상체의 연령, 체중, 성별, 및 건강 및 물리적 상태; 투여 경로; 및 질환, 장애, 병태 또는 이의 증상의 특성에 좌우되는 양으로 대상체에게 투여된다. 투약 레지멘은 또한 투여되는 제제(들)과 관련된 임의의 부작용의 존재, 특성 및 정도를 고려한다. 효과적인 투여량 및 투여 섭생은, 예를 들어, 안전성 및 용량 증가 시험, 생체내연구 (예: 동물 모델), 및 당업자에게 공지된 다른 방법으로부터 용이하게 결정될 수 있다.

[0280] 본 개시내용은 특정 혈청 최저 농도를 달성하고/거나 특정 평균 혈청 최저 농도를 유지하기 위해 IL-10의 투여를 고려한다. IL-10에 특이적인 방법이 본원의 다른 곳에 그리고 하기 본 섹션에 기재되어 있다.

[0281] 일반적으로, 투약 매개변수는 복용량이 대상체에게 비가역적으로 독성일 수 있는 양(즉, 최대 내성 용량, "MTD")보다 작고 그리고 대상체에 대해 측정가능한 효과를 생성하는데 필요한 양보다 적지 않게 되도록 규정한다. 이러한 양은, 예를 들어, 투여 경로 및 다른 인자를 고려하여 ADME와 관련된 약동학적 및 약력학적 매개변수에 의해 결정된다.

[0282] 유효 투여량(ED)은 그것을 복용하는 대상체의 일부분에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. 제제의 "중간 유효 투여량" 또는 ED50은 그것이 투여되는 집단의 50%에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. ED50은 일반적으로 제제의 효과의 합리적인 기대치의 척도로서 사용되지만, 임상의가 모든 관련 인자를 고려하여 적절하다고 간주할 수 있는 투여량일 필요는 없다. 따라서, 일부 상황에서, 유효량은 계산된 ED50 이상이고, 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50 미만이고, 또 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50과 동일하다.

[0283] 또한, 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드의 유효 용량은 대상체에게 하나 이상의 용량으로 투여될 때, 건강한 대상체 대비 원하는 결과를 야기하는 양일 수 있다. 예를 들어, 특별한 장애를 앓고 있는 대상체의 경우, 유효 투여량은 그 장애의 진단 매개변수, 척도, 마커 등을 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90% 또는 90% 이상까지 향상시키는 양일 수 있고, 여기서 100%는 정상 대상체가 나타내는 진단 매개변수, 척도, 마커 등으로서 정의된다.

[0284] 본원에 기재된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 필요한 PEG-IL-10의 양은 접합된 단백질의 IL-10 활성에 기초하며, 이는 본 기술분야에 공지된 IL-10 활성 분석에 의해 결정될 수 있다 예로서, 종양 맥락에서, 적합한 IL-10 활성은, 예를 들어, 종양 부위 내로의 CD8+ T-세포 침윤, 이들 침윤 세포로부터 염증 사이토카인, 예컨대 IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-10, 및 RANK-L의 발현, 및 생물학적 샘플에서 IFN-γ의 수준 증가를 포함한다.

[0285] IL-10 제제의 치료학적 유효량은 약 0.01 내지 약 100 μg 단백질/체중의 kg/일, 약 0.1 내지 20 μg 단백질/체중의 kg/일, 약 0.5 내지 10 μg 단백질/체중의 kg/일, 또는 약 1 내지 4 μg 단백질/체중의 kg/일의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, IL-10 제제는 약 50 내지 800 μg 단백질/체중의 kg/일 (예컨대, IL-10 제제의 약 1 내지 16 μg 단백질/체중의 kg/일)을 전달하기 위해 연속 주입에 의해 투여된다. 주입 속도는, 예를 들어, 부작용 및 혈구수의 평가에 기초하여 변할 수 있다.

[0286] 경구 제제의 투여를 위해, 조성물은 1.0 내지 1000 밀리그램의 활성 성분, 특히 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, 및 1000.0 밀리그램의 활성 성분을 함유하는 정제, 캡슐 등의 형태로 제공될 수 있다.

[0287] IL-10 폴리펩타이드에 대한 특정 투여 요법 (예컨대, 투여 빈도)이 본원 다른 곳에 기재되어 있다.

[0288] 특정 구현예에서, 상기 개시된 IL-10 폴리펩타이드의 투여량은 "단일 투여 형태"로 함유된다. 문구 "단위 투여 형태"는 물리적으로 구별된 단위를 지칭하며, 각 단위는 단독으로 또는 원하는 효과를 달성하는데 충분한 하나 이상의 부가적인 제제와 조합된 본 개시내용의 IL-10 폴리펩타이드의 미리 결정된 양을 함유한다. 단위 투여 형태의 매개변수는 특별한 제제 및 달성되는 효과에 의존한다는 것이 이해된다.

[0289] **키트**

[0290] 본 개시내용은 또한 IL-10, 및 이의 약제학적 조성물을 함유하는 키트를 고려한다. 키트는 일반적으로 하기에 기재된 바와 같은 다양한 성분을 수용하는 물리적 구조의 형태이며, 예를 들어, 상기 기재된 방법 (예컨대, 콜레스테롤 항상성을 회복할 필요가 있는 대상체에게 IL-10 폴리펩타이드의 투여)을 실행하는데 이용될 수 있다.

- [0291] 키트는 본원에 개시된 IL-10 폴리펩타이드 중 하나 이상을 포함할 수 있고 (예컨대, 멸균 용기 내에 제공됨), 이는 대상체에게 투여하는데 적합한 약제학적 조성물의 형태일 수 있다. IL-10 폴리펩타이드는 사용할 준비가 된 형태 또는 투여 전에, 예를 들어, 재구성 또는 희석을 필요로 하는 형태로 제공될 수 있다. IL-10 폴리펩타이드가 사용자에 의해 재구성될 필요가 있는 형태인 경우, 키트는 또한 IL-10 폴리펩타이드와 함께 또는 분리되어 포장된, 완충제, 약제학적으로 허용가능한 부형제 등을 포함할 수 있다. 병용 요법이 고려될 경우, 키트는 여러 제제를 별도로 함유할 수 있거나, 그들은 이미 키트로 조합될 수 있다. 의 각 성분은 개별 용기 내에 포함될 수 있고, 다양한 용기 모두는 단일 패키지 내에 존재할 수 있다. 명의 키트는 내부에 수용된 성분을 적절히 유지시키기 위해 필요한 조건(예: 냉동 또는 동결)을 위해 설계될 수 있다.
- [0292] 는 내부의 성분에 대한 식별 정보 및 사용 지침(예: 매개변수, 작용 메커니즘, 약물동태학 및 약력학을 포함하는 활성 성분(들)의 임상 약리학, 부작용, 금기사항 등)을 포함하는 라벨 또는 포장 삽입물을 함유할 수 있다. 또는 삽입물은 로트 번호 및 유효 기간과 같은 제조업자 정보를 포함할 수 있다. 또는 포장 삽입물은, 예를 들어, 성분을 수용하는 물리적 구조에 통합되거나 물리적 구조 내에 별도로 함유되거나 키트의 성분(예: 튜브 또는 바이알)에 부착될 수 있다.
- [0293] 또는 삽입물은 디스크(예: 디스크, 카드, 메모리 디스크), CD- 또는 DVD-ROM/RAM과 같은 광학 디스크, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 RAM 및 ROM과 같은 전기 저장 매체 또는 자기/광학 저장 매체, 플래시 매체 또는 메모리-타입 카드와 같은 이들의 하이브리드와 같은 컴퓨터 판독 가능한 매체를 추가로 포함하거나 이에 통합될 수 있다. 일부 구현예에서, 실제 지침은 키트에 존재하지 않지만, 원격 공급원으로부터, 예를 들어, 인터넷을 통해 지침을 수득하는 수단이 제공된다.
- [0294] **실험**
- [0295] 하기 실시예는 본 발명을 제조하고 사용하는 방법에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되며, 발명자가 그들의 발명으로 간주하는 범위를 제한하는 것을 의도하지 않고, 그들은 이하 실험이 수행되었고 수행될 수 있는 모든 실험임을 나타내고자 의도하지 않는다. 본 시제로 기술된 예시적 설명은 반드시 수행될 필요는 없고, 오히려 설명이 본원에 기재된 데이터 등을 생성하기 위해 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 사용된 숫자(예: 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력이 수행되었지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다.
- [0296] 다르게 기술되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도(°C)이고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다. 하기를 포함하는 표준 약어가 사용된다: bp = 염기쌍(들); kb = 킬로베이스(들); pl = 피코리터(들); s 또는 sec = 초(들); min = 분(들); h 또는 hr = 시간(들); aa = 아미노산(들); kb = 킬로베이스(들); nt = 뉴클레오타이드(들); ng = 나노그램; μg = 마이크로그램; mg = 밀리그램; g = 그램; kg = 킬로그램; dl 또는 dL = 데시리터; μl 또는 μL = 마이크로리터; ml 또는 mL = 밀리리터; l 또는 L = 리터; μM = 마이크로몰; mM = 밀리몰; M = 몰; kDa = 퀄로달톤; i.m. = 근육내(로); i. P. = 복강내(1y); i.v. 또는 IV = 정맥내(1y); s.c. 또는 SC = 피하(1y); QD = 매일; BID = 매일 2회; QW = 매주; QM = 매월; HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피; BW = 체중; U = 단위; ns = 통계학적으로 유의하지 않음; PBS = 인산염 완충 염수; PCR = 효소 연쇄 반응; NHS = N-하이드록시석신이미드; DMEM = 둘베코 변형 이글스 배지; GC = 게놈 카페; EDTA = 에틸렌디아민테트라아세트산.
- [0297] **재료 및 방법**
- [0298] 하기 일반적 재료 및 방법이 이하 실시예에 사용될 수 있다:
- [0299] 분자 생물학의 표준 방법이 기재되어 있다(참조: 예를 들어, Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 및 Ausubel, 등 (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley 및 Sons, Inc. New York, N.Y., 이는 하기를 기재한다: 세균 세포에서 클로닝 및 DNA 돌연변이 생성 (Vol.1), 포유동물 세포 및 효모에서 클로닝 (Vol.2), 당접합체 및 단백질 발현 (Vol.3), 및 생물 정보학 (Vol.4)).
- [0300] 과학 문헌은 면역침전, 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리 및 결정화 뿐만 아니라 화학적 분석, 화학적 변형, 번역후 변형, 융합 단백질의 생산 및 단백질의 당화를 포함하는 단백질 정제 방법을 기재한다(참조: 예를 들어, Coligan, 등 (2000) Current Protocols in Protein Science, Vols. 1-2, John Wiley 및 Sons, Inc., NY).
- [0301] 폴리클로날 및 모노클로날 항체의 생산, 정제 및 단편화가 기재되고(예: Harlow and Lane (1999) Using

Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY); 리간드/수용체 상호작용을 특성화하는 표준 기술이 이용 가능하고(참조: 예를 들어, Coligan 등 (2001) Current Protocols in Immunology, Vol.4, John Wiley, Inc., NY); 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함하는 유동 세포 계측법이 이용 가능하고(참조: 예를 들어Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley 및 Sons, Hoboken, NJ); 예를 들어, 진단 시약으로서 사용하기 위한, 핵산 프라이머 및 프로브, 폴리펩타이드 및 항체를 포함하는 핵산을 변형시키는데 적합한 형광 시약이 이용 가능하다(Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.;Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St.Louis, MO.).

- [0302] 면역계의 조직학의 표준 방법이 기재되어 있다(참조: 예를 들어, Louis 등 (2002) Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NY).
- [0303] 면역 세포(CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T-세포)의 결실은 항체 매개 제거에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 250 μg의 CD4- 또는 CD8-특이적 항체를 매주 주사할 수 있고, 세포 결실은 FACS 및 IHC 분석을 사용하여 검증할 수 있다.
- [0304] 예를 들어, 항원성 단편, 리더 서열, 단백질 풀딩, 기능적 도메인, 당화 부위 및 서열 정렬을 결정하기 위한 소프트웨어 패키지 및 데이터베이스가 이용 가능하다(참조: 예를 들어, GCG 위스콘신 패키지 (Accelrys, Inc., San Diego, CA); 및 DeCypher™ (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV)).
- [0305] 면역적격 Balb/C 또는 B-세포 - 결핍 Balb/C 마우스는 Jackson Lab., Bar Harbor, ME로부터 수득되었고 표준 과정에 따라 사용되었다 (예컨대, Martin et al (2001) Infect. Immun., 69(11): 7067-73 and Compton 등 (2004) Comp. Med. 54(6): 681-89 참고). 본 발명에 의해 고려되는 실험 작업에 적합한 다른 마우스 균주는 당업자에게 공지되어 있고, 일반적으로 The Jackson Lab으로부터 이용 가능하다.
- [0306] 달리 나타내지 않는 한, 피부의 PDV6 편평 세포 암종이 본원에 기재된 실험에 사용되었다 (예컨대, Langowski 등 (2006) Nature 442:461-465). 다른 종양학-관련 모델 및 세포주, 예컨대 Ep2 포유동물 암종, CT26 결장 암종, 및 4T1 유방 암종 모델이 사용될 수 있고(예컨대, Langowski 등 (2006) Nature 442:461-465 참고), 본 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다. 비-종양학 - 관련 모델 및 세포주 (예컨대, 염증의 모델)가 또한 사용될 수 있고 본 기술분야의 숙련가에게 공지되어 있다.
- [0307] IL-10 농도 수준 및 노출 수준은 본 기술분야에서 사용된 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 노출 수준 분석은 마우스 꼬리 조각으로부터 전혈 (~50 μl/스)을 보통의 모세관 튜브 내로 모으고, 원심분리에 의해 혈청 및 혈액 세포를 분리하고, 표준 ELISA 키트 및 기술에 의해 IL-10 노출 수준을 결정함으로써 수행될 수 있다. IL-10 농도를 결정하는 부가적인 수단이 하기에 기재되어 있다.
- [0308] 본 개시내용은 숙련된 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 폐길화된 IL-10의 합성을 고려한다 (예컨대, US 특허 제U.S. 특허 제7,052,686호 및 US 특허 공개 제2011/0250163호).
- [0309] 하기 및 표 15 및 그의 설명에 제시된 물질은 US 특허 공개 제2011/0091419호 (US 특허 공개 제2011/0091419호의 공동발명자는 본 출원의 발명자임)로부터 재현되며, 내부의 교시 및 이의 변화는 광범위하게 적용가능하며 많은 상이한 맥락에서 이용되고/거나 변형될 수 있다. 유사하게, 숙련된 당업자의 일반적인 지식과 함께, 관련 분야 및/또는 기술 영역 내의 다른 문헌의 교시 (예컨대, USP 제6,387,364호 및 제7,052,684호, 및 PCT 공개 WO 제2006/075138호 참고)는 부가적인 실험 작업에 대한 기초를 형성할 수 있다.
- [0310] **종양 모델 및 종양 분석**
- [0311] 임의의 당업계에서 허용되는 종양 모델, 분석 등이 다양한 종양에 대한 IL-10 및 PEG-IL-10의 효과를 평가하는데 사용될 수 있다. 이하 기재된 종양 모델 및 종양 분석은 이용될 수 있는 것을 대표하며, 이들은 표 1-15에 제시된 데이터를 생성하고 평가하는데 사용되었다.
- [0312] 동계 마우스 종양 세포를 종양 접종당 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> 또는 10<sup>6</sup> 세포로 피하 또는 피내로 주사한다. Ep2 유방 암종, CT26 결장 암종, 피부의 PDV6 편평상피 암종 및 4T1 유방암종모델이 사용될 수 있다(참조: 예를 들어, Langowski 등 (2006) Nature 442:461-465). 면역적격 Balb/C 또는 B 세포 결핍 Balb/C 마우스가 사용될 수 있다. PEG-mIL-10은 면역적격 마우스에게 투여될 수 있는 반면, PEG-hIL-10 치료는 B-세포 결핍 마우스에서 사용될 수 있다. 종양은 치료가 시작되기 전에 100 내지 250 mm<sup>3</sup>의 크기에 도달하도록 허용된다. IL-10, PEG-mIL-10, PEG-hIL-10, 또는 완충제 대조군은 종양 이식에서 원위성 부위에 피하로 투여된다. 종양 성장은 전형적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다.

[0313] 종양 조직 및 림프 기관을 다수의 염증 마커에 대한 mRNA 발현을 측정하고, 다수의 염증 세포 마커에 대한 면역 조직화학을 수행하기 위해 다양한 종점에서 수거한다. 조직을 액체 질소에서 급속 동결시키고,  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 저장한다. 1차 종양 성장은 전형적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다. 종양 용적은 화학식 ( $\text{너비}^2 \times \text{길이}/2$ )을 사용하여 계산할 수 있고, 여기서 길이는 더 긴 치수이다. 종양은 치료가 시작되기 전에 90 내지  $250 \text{ mm}^3$ 의 크기에 도달하도록 허용된다.

[0314] IL-10 및/또는 PEG-IL-10의 투여

[0315] 상기 기재된 종양 모델 및 종양 분석 방법은 하기 제시된 데이터를 생성하는데 이용되었다. 그러나, 상기에 암시된 바와 같이, 이러한 동일한 모델 및 방법은 다른 실험 환경에서 사용될 수 있다.

[0316] 쥐과 IL-10 ( $\text{mIL-10}$ ) 또는 PEG- $\text{mIL-10}$ 은 면역적격 마우스에게 투여된 반면, PEG-hIL-10 치료는 B-세포 결핍 마우스에서 사용되었다. 쥐과 IL-10, PEG- $\text{mIL-10}$ , PEG-hIL-10, 또는 비히를 대조군은 종양 이식으로부터 원위성 부위에 피하로 투여되었다. 이들 연구에 사용된 PEG- $\text{mIL-10}$ 은 SC-PEG-12K 링커를 사용하여 제조되었다.  $\text{mIL-10}$  및 PEG- $\text{mIL-10}$ 의 생물학적 활성은 내인성  $\text{mIL-10}$  수용체 (R1 및 R2)를 발현하는 마우스 비만 세포주인 MC/9를 이용하는 단기간 증식 생물분석의 적용에 의해 평가되었다. MC/9 세포는  $\text{mIL-4}$  및  $\text{mIL-10}$ 을 이용한 공동-자극에 대한 반응으로 증식한다 (MC/9 세포는  $\text{mIL-4}$  또는  $\text{mIL-10}$ 만을 이용하여 증식하지 않는다). 증식은 대사 활성의 검출에 기반한 성장 지시자 염료인 알라마 블루 (Alamar Blue)를 사용한 비색 수단에 의해 측정되었다. 재조합 또는 PEG- $\text{mIL-10}$ 의 생물학적 활성은 EC50 값, 또는 용량-반응 곡선에서 반수 최대 자극이 관찰된 단백질의 농도에 의해 평가되었다 (표 1).

## 표 1

---

이들 연구에서 사용된  $\text{mIL-10}$  및 PEG- $\text{mIL-10}$  시약의  
생물활성의 평가를 위한 MC/9 증식 생물검정

---

단백질	MC/9 검정에서 EC50 (ng/mL)
$\text{mIL-10}$	0.5711
PEG- $\text{mIL-10}$	4.039

[0317]

[0318] 표 1에 나타난 바와 같이, MC/9 분석에 기초하여, 실험에 사용된 PEG- $\text{mIL-10}$ 의 특이적 활성은  $\text{mIL-10}$ 의 활성보다 약 7배 낮다.

[0319] PEG- $\text{mIL-10}$ 은 또한 Ep2 유방 암 종양을 갖는 마우스에게 2일마다 투여될 수 있다. 치료는 종양 크기를 감소시키고 종양 거부반응을 유도하는데 효과적이었다.

표 2

---

PEG-mIL-10은 Balb/C 마우스에서  
Ep2 유방암 모델에서 종양 크기( $\text{mm}^3$ )를 감소시킨다.

---

		접종후 일수						
		11	15	18	21	25	27	33
대조군		300	450	500	750	1300	1500	2700
PEG-mIL-10		300	400	310	280	250	50	0

---

[0320]

[0321] PEG-mIL-10을 이용한 치료는 또한 PDV6, CT-26, 및 4T1 동계 면역 적격 마우스 종양 모델에서 종양 크기를 감소시키는데 효과적이었다 (표 3, 4, 및 5 참고).

표 3

---

연구 04-M52 338: 이식 후 36일 째에 개시되는 PEG-mIL-10은  
C57B/6 마우스에서 PDV6 종양 ( $\text{mm}^3$ )를 감소시킨다.

---

		접종후 일수						
		36	38	42	44	46	48	52
대조군		200	255	290	380	395	420	485
PEG-mIL-10		210	265	200	190	155	110	55

---

[0322]

표 4

---

| 이식 후 7일 째에 개시되는 PEG-mIL-10은 BALB/c 마우스에서  
CT26 종양 ( $\text{mm}^3$ )의 비히클 대조군에 대한 종양 크기를 감소시킨다.

---

		접종후 일수					
		10	15	17	20	22	24
비히클 대조군		155	424	791	1274	1737	2170
PEG-mIL-10		136	212	291	336	450	455

---

[0323]

표 5

IL-10 및 PEG-mIL-10은 4T1 유방 암종의 종양 크기( $mm^3$ )를 감소시킨다				
처리 일수	20	24	29	33
대조군	200	410	584	1000
PEG-mIL-10	200	320	560	350
IL-10	200	290	575	400

[0324]

[0325]

## 용량 적정 연구

[0326]

용량 적정 연구에서, 꼬리-정맥 채혈이 예상된 피크 및 최저 용량 수준에 상응하는 시간에 각 그룹의 대표적인 마우스로부터 수집되었다. 채집된 혈청은 전기화학발광 검출 및 패턴화된 어레이의 조합인 멀티-어레이 기술에 기초한 중간 규모 디스크버리 플랫폼 (Meso Scale Discovery platform)을 사용하여 mIL-10 농도에 대해 분석되었다. 양측 비모수 스튜던트 t-검정 (two-tailed unpaired student t-test)을 사용하여 혈청 mIL-10 농도에 의해 그룹화된 mIL-10 또는 PEG-mIL-10 - 처리된 마우스의 평균 종양 부피를 이들의 상응하는 비허를 대조군 그룹의 평균 종양 부피와 비교하였다. 2개의 그룹이 동일하지 않은 편차 ( $p<0.05$  from t-test)를 가진 경우 웰치 보정(Welch's correction)을 사용하였다.

[0327]

4T1 유방 암종을 갖는 마우스에서 PEG-mIL-10 및 mIL-10의 용량 적정은 원발성 종양 및 폐 전이의 조절이 mIL-10 및 PEG-mIL-10 모두를 이용하여 용량 적정될 수 있음을 보여준다. 표 6에 제시된 바와 같이, 임의의 주어진 용량에서, PEG-mIL-10은 mIL-10보다 더 효과적이다. 평균 종양 부피가  $84-90 mm^3$ 인 경우 이식 후 17일에 매일 2회 치료를 시작하였다. 치료 그룹은 그룹당 14마리의 마우스로 구성된 반면, 대조군 그룹은 각 그룹 내에 8마리의 마우스를 가지고 있었다. Tris 및 Hepes 완충제는 각각 mIL-10 및 PEG mIL-10에 대한 대조군이었다.

표 6

연구 06-M175-1103. mIL-10 및 PEG-mIL-10은 용량-의존 방식으로 BALB/c 마우스에서 4T1 유방 암종의 일차 종양 크기( $mm^3$ )를 감소시킨다.								
이식후 일수								
	17	21	24	27	30	34	38	42
Tris 비허를 대조군	90	184	288	448	560	861	1126	1248
Hepes 비허를 대조군	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

[0328]

[0329]

PDV6 편평 세포 암종을 갖는 마우스에서 PEG-mIL-10 및 mIL-10의 용량 적정은, 임의의 주어진 용량에서 PEG-mIL-10이 mIL-10보다 더 효과적임에도 불구하고, 원발성 종양의 대조군이 mIL-10 및 PEG-mIL-10 모두를 이용하여 적정가능하다는 것을 보여준다 (표 7). 고용량 PEG-mIL-10 처리는 거의 100% 종양 퇴행 및 후속하는 재투여에 대한 내성을 야기하였다 (표 8). 평균 종양 부피가  $107-109 mm^3$ 인 경우 이식 후 23일에 매일 2회 치료를 시

작하였고, mIL10 -처리된 그룹 및 0.01 mg/kg PEG mIL-10 치료된 그룹 모두의 경우 55일까지 지속되었다. 0.1 mg/kg PEG-mIL-10 치료는 100% 종양 퇴화가 관찰되는 경우 48일에 중단된 반면, 나머지 그룹은 51일까지 처리되었다. 치료 그룹은 그룹당 10마리의 마우스로 구성된 반면, 각 비히클 대조군은 6마리의 마우스를 포함하였다. Tris 완충제 및 Hepes 완충제는 mIL-10 및 PEG mIL-10 각각에 대한 비히클 대조군이었다. 일차 이식 후 85일에 그리고 마지막 PEG-mIL10 처리 후 4주에 재이식을 수행하였다. 그룹당 10마리의 마우스가 있었다.

표 7

연구 06-M52-1106. mIL-10 및 PEG-mIL-10은  
용량 의존 방식으로 C57B16/J 마우스에서  
PDV6 편평상피세포암종의 종양 크기 (mm<sup>3</sup>)를 감소시킨다.

	이식후 일수									
	23	27	30	33	36	40	43	47	51	55
Tris 비히클 대조군	111	179	232	318	412	493	635	848	958	
Hepes 비히클 대조군	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

연구 06-M52-1106. mIL-10 및 PEG-mIL-10은  
용량 의존 방식으로 C57B16/J 마우스에서  
PDV6 편평상피세포암종의 종양 크기 (mm<sup>3</sup>)를 감소시킨다.

	이식후 일수									
	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

[0330]

표 8

연구 06-M52-1106. PEG-mIL-10 처리의 3주 후  
PDV6 편평상피세포암종 종양을 제거한 C57B1/6J 마우스는  
추가 처리의 부재에서 재-이식에 대해 저항성이 있다.

	이식후 일수							종양 양성인 마우스 %
	0	16	21	28	36	49		
비히클 대조군	0	113	145	188	418	761		100
PEG-mIL-10 (0.1 mg/kg)	0	0.3	0	7	16	47		10

[0331]

[0332]

## 폐 전이 연구

[0333]

4T1 유방 암종 모델에서 폐 전이는 폐 절제 후 거시경적으로 (표 9) 또는 하기에 기재된 바와 같이 배양 후 폐 전이 콜로니를 계수함으로써 정량하였다(표 10): Current Protocols in Immunology (Section 20.2.4) John Wiley 및 Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999). 요약하면, 4T1 종양을 갖는 마우스로부터 채취된 폐를 잘게 썰고 콜라게나제/엘라스타제 칵테일로 소화시킨 다음 6-티오구아닌을 함유하는 배지에서 제한 희석 분석에서 배양하였다. 4T1 세포만은 6-티오구아닌 - 내성이고, 이는 10-14일의 배양 후 콜로니의 수를 계수함으로써 정량될 수 있다. 평균 종양 부피가 84-90 mm<sup>3</sup>인 경우 이식 후 17일에 매일 2회 치료를 시작하였다. Tris 및 Hepes 완충제는 각각 mIL-10 및 PEG mIL-10에 대한 대조군이었다. 폐 전이는 폐마다 배양된 전이 콜로니의 수로서 측정하였다.

## 표 9

---

연구 05-M52-496. 이식후 19일 째에 개시되는 mIL-10 및  
PEG-mIL-10에 의한 2주 처리는 4T1 유방 암종의 전이를 감소시킨다  
(마우스 당 폐 전이의 수로서 측정됨)

---

## 접종후 폐 전이 33일

비하클 대조군	mIL-10	PEG-mIL-10
마우스 #1	7	0
마우스 #2	7	0
마우스 #3	7	0
마우스 #4	8	0
마우스 #5	20	4

---

[0334]

## 표 10

연구 06-M175-1103. mIL-10 및 PEG-mIL-10은 용량-의존 방식으로  
BALB/c 마우스에서 4T1 유방 암종의 폐 전이를 감소시킨다.

마우스	이식후 폐 전이 43 내지 45일 폐당콜로니 ( $\times 10^3$ )								
	Tris 완충액	Hepes 완충액	mIL-10 비히클 대조군	mIL-10 비히클 대조군	mIL-10 mg/kg	PEG- mIL-10 0.5 0.1 0.01 0.001	PEG- mIL-10 0.1 0.01 0.01 0.001	PEG- mIL-10 0.43 234 377 586 0.54 486 1.67 844 6.5 338 177 263 7.4 0.01 139 338 177 263 7.4 0.01 0.01 0.01 47.5 338.0 381.0 284.0	
	비히클 대조군	비히클 대조군	1.0 0.1 0.01 0.001	1.0 0.1 0.01 0.001	0.5 0.1 0.01 0.001	0.02 10.1 315 223 0.07 0.07 1.85 27 0.01 139 7.6 68 265 0.01 139 338 177 263 7.4 0.01 0.01 0.01 47.5 338.0 381.0 284.0	0.02 10.1 315 223 0.07 0.07 1.85 27 0.01 139 7.6 68 265 0.01 139 338 177 263 7.4 0.01 0.01 0.01 47.5 338.0 381.0 284.0	0.02 10.1 315 223 0.07 0.07 1.85 27 0.01 139 7.6 68 265 0.01 139 338 177 263 7.4 0.01 0.01 0.01 47.5 338.0 381.0 284.0	
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	
중앙	418.0	499.0	16.7	170.5	69.8	0.17	1.28	47.5	338.0
평균	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

[0335]

[0336] PEG-mIL-10 또는 IL-10을 4T1 유방 암종을 갖는 마우스에게 투여하는 것은 정량적 RT-PCR에 의해 측정된 바와 같이, 전이 속도를 감소시키고 면역 자극 사이토카인의 CD8+ T-세포 침윤 및 발현을 증가시킨다 (표 11 및 12). 침윤 CD8+ T-세포의 수는 CD8 표면 마커에 대한 면역조직화학에 의해 염색된 몇 가지 종양의 대표적인 단면으로부터 계수되었고, 항-CD3 및 항-TCR  $\alpha$   $\beta$  항체를 이용한 염색에 의해 입증되었다.

## 표 11

IL-10 및 PEG-mIL-10은 4T1 암종에서  
CD8+ T-세포 침윤을 유도한다

	대조군	IL-10	PEG-IL-10
CD8+ T의 평균 수/필드	6.4	25.8	39.2

[0337]

[0338] PEG-mIL-10은 염증 사이토카인의 유도에서 IL-10보다 더 효과적이다. 균질화된 종양 샘플로부터 총 RNA를 추출하고 이전에 기재된 바와 같이 역전사시켰다 (예컨대, Homey, 등 (2000) J. Immunol. 164:3465-3470 참고). 상보적 DNA를 형광발생 5'-뉴클레아제 PCR 분석에 의해 사이토카인의 발현에 대해 정량분석하였다 (예컨대, Holland, 등 (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 7276-7280 참고). 특이적 PCR 생성물을 40 사이클 동안 ABI PRISM 7700 서열 검출 시스템 (Applied Biosystems)에 의해 계속 측정하였다. 값을 유비퀴틴에 대해 정규화하였다. 로그-변형된 데이터를 크루스칼-월리스 (Kruskal-Wallis) 통계분석 (중앙 방법)에 두었다. 상기 발현 수준

(로그 변형됨)은 종양 샘플에서 발현된 염증 사이토카인의 양에 상응하며, 발현 수준 (로그 변환됨)이 높을수록 종양 샘플에서 발현된 염증 사이토카인의 양은 더 크다.

표 12

투여된 PEG-mIL-10은 용량 투여 24시간 후 4T1 암종에서 염증성 사이토카인의 유지된 수준을 유도한다.			
사이토카인	대조군	IL-10	PEG-mIL-10
IFN $\gamma$	36.04	68.51	98.96
IL-4	7.77	13.13	40.32
IL-6	43.64	50.59	111.98
IL-10	9.94	41.62	106.16
RANK-리간드	19.14	36.13	46.08

[0339]

## 면역 세포의 고갈

[0341]

CD4+ 및 CD8+ T-세포는 항체-매개된 제거에 의해 고갈되었다. 250  $\mu$ g의 CD4- 또는 CD8-특이적 항체를 이 목적을 위해 매주 주사하였다. 세포 고갈은 FACS 및 IHC 분석을 사용하여 입증하였다.

[0342]

CD4 항체를 갖는 B 세포 결핍 BALB/c 마우스 (C. 129-Igh-6<sup>tm1Cgn</sup>)에서의 CD4+ T 세포의 고갈은 종양에 대한 PEG-hIL-10 기능을 억제한다 (표 13).

표 13

종양 이식후 8일에 개시되는 PEG-hIL-10 처리는 B 세포 결여 BALB/c 마우스에서 CD4 결실 후 CT-26 직장 암종의 종양 크기 ( $\text{mm}^3$ )를 감소시키지 못했다 (C.129-Igh-6 <sup>tm1Cgn</sup> ).					
이식후 일수	8	10	13	19	27
PBS	173	322	391	841	1979
PEG-hIL-10	184	276	251	602	1332

[0343]

CD8+ T-세포의 고갈은 동계 종양 성장에 대한 PEG-mIL-10의 효과를 완전히 억제한다 (표 14).

## 표 14

종양 이식 후 8일에 개시되는 PEG-mIL-10 처리는  
B 세포 결여 BALB/c 마우스에서 CD8 결실 후  
CT-26 직장 암종의 종양 크기 ( $\text{mm}^3$ )를 감소시키지 못했다.

이식후 일수	8	10	13	19	27
PBS	151	335	584	1434	2746
PEG-hIL-10	226	575	1047	2449	4799

[0345]

## IL-10 투약 빈도 및 혈청 최저 농도

[0347]

IL-10 요법의 약동학적 매개변수의 이해를 향상시키고 인간 대상체에서 재조합 인간 IL-10 (rhIL-10)의 종양 치료 요법을 최적화하는데 유용한 마우스에서 데이터를 생성하기 위해 젖과 연구를 설계하고 수행하였다.

[0348]

마우스에게 PDV6 종양 세포를 접종하고, 종양을  $100\text{mm}^3$ 에 도달할 때까지 2.5주 동안 성장시켰다 그리고 나서, a) 매주 1회 1개의 볼루스 SC 주사, 또는 b) 매주 2회 ( $0.35\text{ mg/kg}$ ), 2일마다 ( $\sim 0.25\text{ mg/kg}$ , 총 매주 용량 =  $0.7\text{ mg/kg}$ ), 및 매일 ( $0.1\text{ mg/kg/일}$ )을 포함하여, 주에 걸쳐 분할 용량으로 몇 회의 SC 주사로서 5kDa 모노-디PEGmIL-10을 투여하여, 종양을 갖는 마우스의 그룹( $n = 10/\text{그룹}$ )에게 동일한 매주 용량 ( $0.7\text{ mg/kg/주}$ )을 처리하였다. 모든 마우스는 1주 동안 동일한 양의 약물을 받았기 때문에, 유사한 전체적인 노출 (곡선하면적, AUC)이 관찰되었다. 피크 노출은 매주 1회 투약된 동물에서 가장 높은 반면, 최소 약물 노출 (최저)은 더 작은 매일 용량을 받은 동물에서 가장 높았다. 놀랍게도, 표 15에 나타낸 바와 같이, 매일 투약된 동물은 가장 높은 항-종양 효능을 나타내었고, 이는 혈청 최저 노출이 항-종양 기능에 중요한 반면, 항-종양 기능에 대한 피크 노출의 영향은 결정적이 아님을 보여준다.

## 표 15

## 표 15

투약 스케줄	종양 크기 ( $\text{mm}^3$ )
대조군	813.9522
매일	43.196
2일마다	170.186
2주마다	347.315
매주	425.572

[0349]

필요한 혈청 최저 농도를 2개의 종양 모델에서 추가로 조사하였다: C57BL/6 마우스에서의 PDV6 종양 및 Balb/C 마우스에서 CT26 대장암 세포. 표준 절차를 사용하여, 마우스를  $100\text{ mm}^3$ 까지 성장시킨 다음, 4주간 5kDa 모노-디PEGmIL-10을 투여하여 치료를 개시하였다. 이후, 상이한 치료 스케줄을 받는 종양을 갖는 마우스에서 IL-10의 혈청 최저 농도를 측정하였다. 이후, IL-10 혈청 최저 농도는 수득된 종양 크기와 상관관계가 있었다. 표 16에 나타낸 바와 같이,  $1\text{ng/mL}$ 을 초과하는 IL-10의 혈청 최저를 갖는 마우스는 지속적으로 작은 종양을 가지고 있었고, 이들의 종양을 거부하였다.

## 표 16

표 16

IL-10 혈청 최저 범위 [pg/ml]	IL-10 혈청 최저 (평균) [pg/ml]	총양 크기 (평균) [mm <sup>3</sup> ]	총양 무게 (평균) [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

[0351]

[0352] 인간 세포에서 중요한 최저 농도를 확인하기 위해, hIL-10을 인간 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC)의 배양물에 증가하는 농도로 첨가하였다. PBMC 배양물을 처리하지 않고 그대로 두거나 지질다당류 (LPS)로 자극하였다. IL-10은 PBMC의 LPS-매개된 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 활성을 케모카인 MCP-1의 분비로서 측정하였다. LPS 및 IL-10 모두는 MCP-1의 분비를 유도하지만, 케모카인을 유도하는데 있어 서로의 활성을 억제한다. 1 ng/mL 이상의 농도에서, IL-10은 LPS의 부재시 MCP-1의 분비를 증가시켰다 (도2A). 반면, LPS로 자극된 PBMC에서, 1 ng/mL의 농도의 IL-10의 부가는 MCP-1의 분비를 유의하게 억제하였다 (도2b). 이는 각각의 생물학적 공정의 유도 및 억제 모두에 대한 IL-10의 생물학적 활성을 확인시켜 주었다.

## 인간 대상체에서 사이토카인 및 콜레스테롤에 대한 IL-10의 효과

[0354] 인간 대상체에서 혈청 IL-10 농도의 결정. 인간 지원자에게 원하는 양의 rhIL-10을 SC 또는 IV로 투여하였고, 투여 후 원하는 시간(들)에 전혈 샘플을 헤파린 항응고제-함유 용기 내로 채혈하였다. 혈청 rhIL-10 또는 PEG-rhIL-10 농도를 표준 샌드위치 효소-연관 면역 흡착 분석 (ELISA) 키트를 사용하여 결정하였다. 전형적으로, ELISA 분석은 0.1 내지 10 ng/mL의 농도 범위에서 선택적이고, 선형적이며, 재현 가능한 것으로 결정되었고, 정량 한계 (LOQ)는 0.1 ng/mL이었다. 혈청 샘플을 또한 ELISA에 의해 hIL-10에 결합하는 항체의 존재에 대해 분석하였다. 또한, 선택된 혈청 샘플을 마우스 비만 세포주 MC9를 포함하는 유효 생물분석을 사용하여 분석하였고; 이 세포주는 IL-10에 대한 반응으로 증식한다. 상기 생물분석을 사용하여 GMP-생산된 rHuIL-10 및 PEG-rHuIL-10의 생체활성을 결정하고 환자 혈청에서 IL-10의 생물학적 활성을 결정하였다. 전형적으로, IL-10 농도 및 활성의 ELISA 및 생물분석 결정은 상응하는 값을 밝혀내었다.

[0355] 인간 대상체에서 TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  농도의 결정. IL-10은 만성 염증 질환을 겪고 있는 환자에서 항-염증 기능을 가지며, TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 는 이러한 질환에서 방출된 핵심적인 염증 사이토카인에 해당한다. TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  농도를 인간 대상체로부터 수득된 혈액 샘플에서 결정하였다. 전형적으로, 3 mL의 정맥 혈액을 rhIL-10의 SC 또는 IV 투여 (0시간) 전에 곧바로 그리고 투약 후 0.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 및 96시간에 무균적으로 수집하였다. 샘플을 LPS 및 항응고제의 존재하에 전혈 사이토카인 방출 분석하고, TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$  농도를 ELISA 분석으로 측정하였다. LPS는 혈액 세포로부터 TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 방출을 자극하였다.

[0356] 개체에게 rHuIL-10을 IV로 투약한 후 0.5-12시간에 수집된 샘플에서, TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 방출이 억제되었다. rHuIL-10이 SC로 투약된 개체로부터 수집된 샘플에서, TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 방출은 0.5시간 내지 24시간에 억제되었다. 상기 인간 대상체에서 rHuIL-10의 혈청 농도를 ELISA에 의해 결정하였다. TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 억제는 rHuIL-10의 혈청 농도와 상관관계가 있었다. rHuIL-10의 혈청 농도는 투약 후 증가하였고, 48시간 동안 증가된 상태를 유지하였다. 그러나, TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 방출은 rHuIL-10의 농도가 단지 0.2 ng/mL 이상일 때에만 억제되었고; TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 방출은 농도가 0.1 ng/mL 미만인 경우에는 억제되지 않았다. rHuIL-10의 IV 투약 후 12시간 후에 그리고 SC 투여 후 24시간 후에, 혈청 농도는 0.2 ng/mL 미만으로 낮아졌고 TNF  $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 의 방출이 관찰되었다. 이들 데이터는 만성 염증 질환로부터 고통받고 있는 환자에서 0.2 ng/mL 이상의 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하거나 만성 염증 질환로부터 고통받고 있는 환자에서 항-염증 기능을 관찰하는 것이 필요하다는 것을 가리킨다.

[0357] 인간 암 환자에서 PEG-IL-10에 의한 INF  $\gamma$  및 콜레스테롤 조절의 결정. IL-10은 CD8+T 세포에서 IFN  $\gamma$ 를 유도하며, IFN  $\gamma$  유도는 마우스에서 IL-10-매개된 종양 거부반응에 필수적이다. IFN  $\gamma$ -결핍 마우스는 대조군 마우스에서 종양 분해를 유도하는 농도에서 PEG-rmIL-10로 치료될 때 이들의 종양을 거부하지 못하였다 (데이터 미제

시). 따라서, IFN $\gamma$ 는 PEG-rhIL-10으로 처리된 환자의 혈청에서 측정되었다.

[0358] 적절한 투여 기술에 관해 교육한 후, 암 환자는 다양한 용량으로 매일 SC로 PEG-rhIL-10을 스스로 주사하였다. 혈청 IL-10 농도를 이전에 기재된 바와 같이 샌드위치 ELISA를 사용하여 결정하였다. IFN $\gamma$ 를 첫 용량 전 또는 28일의 투약 후에 얻은 혈청 샘플에서 루미넥스 비드 분석 (Luminex Corp.; Austin, TX)을 사용하여 측정하였다.

[0359] 표 17에 나타난 바와 같이, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PEG-IL-10을 받은 환자는 ~0.4 내지 ~1.1 ng/mL IL-10의 혈청 최저 수준을 가진 반면, 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PEG-IL-10 용량을 받은 환자는 ~0.4 내지 ~2.6 ng/mL의 IL-10의 혈청 최저 수준을 가지고 있었다.

[0360] IFN $\gamma$ 는 주로 Jak-Stat 경로를 통해 신호를 전달한다. Jak-Stat 신호전달은 순차적인 수용체 동원 및 특정 반응 요소를 통한 표적 유전자의 전사를 조절하는 키나아제의 앤누스 패밀리 (Jaks: Jaks 1-3 및 Tyk2) 및 Stats (Stat5a 및 Stat5b를 포함하는 Stats 1-6)의 구성원의 활성화를 수반한다. 이 신호전달 기전은 사이토카인 수용체 수퍼패밀리의 많은 구성원의 특징이므로, IFN $\gamma$ -유도된 Jak-Stat 신호전달은 클래스 II 사이토카인 수용체 신호 전달을 위한 현재의 패러다임이다. 표 17에 나타낸 바와 같이, 1 ng/mL 이상의 혈청 최저 수준을 갖는 환자는 혈청에서 IFN $\gamma$ 의 유도를 나타낸 반면, 1 ng/mL 미만의 혈청 최저 수준을 가진 환자는 IFN $\gamma$ 의 유도를 나타내지 못하였다. 표 17을 참조할 때, IFN $\gamma$  유도는 1을 초과하는 값으로서 정의된다.

## 표 17

표 17

환자	01	02	03	04	05
용량 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ PEG-rH uIL-10)	1	1	2.5	2.5	2.5
혈청 최저 (ng/mL)	0.392	1.11	2.64	0.42	1.84
IFN $\gamma$ 유도	0.55	1.35	2.4	0.97	11.2

[0361]

[0362] 이들 데이터는 암/종양 환경에서 1 ng/mL 이상의 IL-10 혈청 최저 농도를 달성하거나 암/종양 환경에서 치료 효과를 관찰하는 것이 필요하다는 것을 나타낸다. 중요하게도, 혈청 최저 농도는 IFN $\gamma$  유도를 위한 결정 인자였으며, 용량 수준은 아니었다.

[0363] 콜레스테롤을 PEG-rhIL-10의 투여 전 또는 매일 SC 투약 (1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 또는 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; n=3-4 환자/용량)의 1주 후 암 환자로부터 채혈된 혈청 샘플에서 측정하였다. 표 18을 참조하면, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 받은 환자는 0.4 ng/mL의 평균 매일 혈청 콜레스테롤 농도를 달성하였고 콜레스테롤이 7.8% 감소하였고; 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 을 받은 환자는 1 ng/mL의 평균 매일 혈청 콜레스테롤 농도를 달성하였고 콜레스테롤이 19% 감소하였으며; 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 를 받는 환자는 2 ng/mL의 평균 혈청 최저 콜레스테롤 농도를 달성하였고 콜레스테롤이 38% 감소하였다. 따라서, 투약 요법 각각은 혈청 콜레스테롤에서 치료학적으로 관련된 감소를 야기하였고, 이는 약 0.2 ng/mL 내지 0.4 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 효과적임을 나타낸다.

표 18

표 18

용량	1 ug/kg	2.5	5
n	4	4	3
평균혈청 최저 (15일)	0.4	1.8	3.6
평균콜레스테롤 감소 (1주)	7.8%	20%	37%

[0364]

#### 고형 종양을 갖는 환자에서 PEG-hIL-10의 효과

[0365] 용량 증가 연구. PEG-hIL-10의 상이한 양을 특정 유형의 고형 종양을 갖는 환자에게 투여하는 효과를 평가하였다. 도3에 제시된 바와 같이, 총 28명의 환자는 1, 2.5, 5, 10 또는 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10을 매일 SC로 받았고, 상기 환자 중 24명의 종양을 면역치료제로 반응 패턴을 결정하는 통상적으로 사용되는 방법인 면역-관련 반응 기준 (irRC)에 의해 평가하였다 (예컨대, Wolchok 등, Clin. Cancer Res. 15(23): 7412-20 (December 1 2009) 참고). 환자들은 난소 종양, 신장 종양, 결장 종양, 췌장 종양 또는 흑색종 중 하나를 가지고 있었다.

[0366] [0367] 도3은 irRC를 사용하여 결정된 바와 같은 질환 조절율 (DCR)을 제시한다. 종양학 용어에서, DCR은 치료에 대한 반응을 입증하는 환자의 총 비율을 지칭하며; DCR은 완전 반응 (CR) + 부분 반응 (PR) + 안정 질환 (SD)의 합이다. 이 맥락에서, SD는 종양 총량 < 25% 증가로서 정의되는 반면, 종양 총량은 7주의 치료 후 irRC 방법을 사용하여 결정되었다. 도3에 나타낸 바와 같이, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of PEG-hIL-10에서, DCR은 40% (평가할 수 있는 5명의 환자 중 2명)였고, 두 명의 환자는 결장 종양을 가지고 있었다. 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10에서, DCR은 80% (평가할 수 있는 5명의 환자 중 4명)였고, 이들 4명의 환자 중에서, 1명은 결장 종양을 가지고 있었고, 1명은 췌장 종양을 가지고 있었으며, 1명은 흑색종을 가지고 있었고, 1명은 신장 종양을 가지고 있었다.

[0368] 증가하는 PEG-hIL-10 혈청 농도. PEG-hIL-10 요법과 관련된 약동학적 매개변수는 종양 치료 투여 요법을 최적화하기 위해 평가되었다. 상기 언급된 방법과 유사한 방법을 사용하여, EC50 값을 PEG-hIL-10을 이용한 세포-기반의 분석에서 결정하였고 10 또는 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10을 받은 용량 증가 연구에서 상기 환자에서 달성된 IL-10 혈청 수준과 대등하였다. 도4에 나타낸 바와 같이, EC50은  $\sim 6000 \text{ pg/mL}$  ( $\sim 6 \text{ ng/mL}$ )인 것으로 결정되었다. 다음으로, 1, 2.5, 5, 10 또는 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10의 매일 SC 투여로부터 비롯되는 혈청 농도를 용량 증가 연구에 참여한 환자 각각에 대해 결정하였고, 동일한 용량을 받은 상기 환자에 대한 평균 혈청 농도를 계산하였다. 데이터가 하기에 제시되어 있다: 도4. 도4를 참조하면, 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10의 투여는 EC50을 초과한 노출을 야기한 반면, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10의 투여는 종종 EC50 이상인 노출을 야기하였다 (EC50 이상의 노출은 유익한 것으로 간주되었다).

[0369] 도5A 및 B는 하기를 받은 각 환자에서 결정된 도4로부터의 데이터를 제시한다: 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PEG-hIL-10 (도5A) 및 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PEG-hIL-10 (도5B) (도&각 선은 개별 환자를 나타내고, 여기서 CRC = 결장 암, RCC = 신장 세포 암 종, Panc = 췌장 암, MEL = 흑색종, 및 CRPC = 거세-내성 전립선암. 혈청 농도를 유효 전기화학발광 (ECL) 분석에서 측정하였다. 도4와 일치하게도, 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10를 받은 환자는 일상적으로 EC50을 초과하는 노출을 달성한 반면, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10을 받은 환자는 일상적으로 EC50 근처의 노출을 달성하였다.

#### 결장 암종 환자에서 종양 마커 CEA에 대한 PEG-hIL-10의 효과

[0370] [0371] 암배아 항원 (CEA)은 태아 발달 동안 위장관 조직에서 생산되지만 건강한 성인의 혈청에서 매우 낮은 수준으로만 존재하는 세포 표면-고정된 당단백질의 집합을 지칭한다. CEA 혈청 수준은 특정 유형의 암 (예컨대, CRC)에서 증가하고, CEA는 임상 시험 중에 종양 마커로서 사용되어 임상 반응을 예측할 수 있다.

[0372] 증가하는 양의 PEG-hIL-10을 SC로 매일 CRC 환자에게 투여하는 효과를 평가하였다. 더 낮은 용량 (예컨대, 1, 2.5, 또는 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )에서 대부분의 CRC 환자는 치료 동안 CEA의 느린 증가를 경험한 반면, PEG-hIL-10 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )의 가장 높은 용량을 받은 CRC 환자는 CEA의 급격한 하락을 경험하였다 (데이터 미제시). 도6은 치료 과정

동안 PEG-hIL-10의 증가하는 양을 받은 2명의 환자에서 CEA-안정화 효과를 나타낸다. 도6을 참조하면, 1명의 환자는 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 에서 PEG-hIL-10 요법을 시작하였고, CEA 수준은 ~130일의 치료 후 용량이 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 증가한 후에도, 지속적으로 증가하였다. 이어서, 상기 용량이 ~190일의 치료 후 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 증가하였을 때, CEA의 혈청 농도는 안정되었고, 이는 PEG-hIL-10이 안정 질환의 유지에 필요한 PEG-hIL-10의 혈청 농도를 달성하는데 충분한 용량으로 투여되고 있었음을 제시한다. 두 번째 환자의 요법은 매일 SC로 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 PEG-hIL-10에서 개시되었다. 이 환자에서, CEA 수준의 측정을 약 30일에 개시하였다. 도6을 참조하면, CEA 수준은 점차적으로 증가하였고 이후 안정해졌다. 100일에, PEG-hIL-10의 용량은 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 증가되었고, 이 시간 후 CEA 수준은 점진적으로 감소되었고, 이는 적어도 안정 질환을 유지하는데 필요한 PEG-hIL-10의 혈청 농도를 달성하는데 충분한 용량의 투여를 나타낸다.

[0373] 전이 종양 병변 크기의 감소에 대한 PEG-hIL-10의 효과

[0374] 3개의 원발성 종양 유형 (흑색종, RCC 및 CRC) 중 하나를 갖는 환자에서 전이 병변에 대한 PEG-hIL-10의 효과를 평가하였다. 각 환자의 경우, 전이 병변 크기 (부피)의 백분율 변화를 컴퓨터를 이용한 토모그래피 (CT) 이미징을 사용하여 PEG-hIL-10 치료 과정 (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PEG-hIL-10 SC QD) 동안 결정하였다 (도7A-C 각각에서 우측 그레프). PEG-hIL-10 혈청 농도를 각 환자에 대해 측정하였고 상기 결정된 EC50 값과 비교하였다 (도7A-C 각각에서 우측 그레프).

[0375] 흑색종 환자에서, 2개의 폐 전이 병변, 2개의 립프절 전이 병변, 및 5개의 간 전이 병변의 크기를 요법 과정 동안 측정하였다. 도7A의 좌측 그레프에 묘사된 바와 같이, 간 병변이 치료에 가장 반응하였다. 도7A의 우측 그레프는 치료의 개시 후 다양한 시점에 결정된 IL-10 혈청 농도를 나타낸다. 측정된 각 시점에, 혈청 농도는 10 ng/mL를 초과하였고, 상기 각각의 시점에서의 EC50 값을 초과하였다.

[0376] RCC 환자에서, 2개의 폐 전이 병변 및 하나의 골격 전이 병변의 크기를 요법의 7주에 측정하였다. 도7B의 좌측 그레프에 나타난 바와 같이, 두 가지 병변 유형은 치료에 반응하였고, 폐 병변 중 하나는 크기가 24% 감소하였다. 도7B의 우측 그레프는 치료의 개시 후 다양한 시점에 결정된 IL-10 혈청 농도를 나타낸다. 측정된 각 시점에, 혈청 농도는 10 ng/mL를 초과하였고, 상기 각각의 시점에서의 EC50 값을 초과하였다.

[0377] CRC 환자에서, 4개의 폐 전이 병변 및 2개의 간 전이 병변의 크기를 요법의 7주에 측정하였다. 도 7C의 좌측 그레프에 나타난 바와 같이, 폐 병변 각각은 치료에 반응하였고, 간 병변 중 하나는 안정한 크기를 유지하였다. 도7C의 우측 그레프는 치료의 개시 후 다양한 시점에 결정된 PEG-hIL-10 혈청 농도를 나타낸다. 측정된 각 시점에, 혈청 농도는 10 ng/mL를 초과하였고, 상기 각각의 시점에서의 EC50 값을 초과하였다.

[0378] 흑색종 및 신장 세포 암종을 갖는 환자에서 PEG-hIL-10의 효과

[0379] PEG-hIL-10의 상이한 양을 2개의 유형의 고형 종양, 흑색종 또는 신장 세포 암종 중 하나를 갖는 환자에게 투여하는 효과를 평가하였다. 흑색종 투약 코호트에서, PEG-hIL-10을 표 19에서 표시된 주의 수 동안 용량 (1, 5, 20 및 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 당 하나의 환자에게 SC로 매일 투여하였다. 신장 세포 암종 투약 코호트에서, PEG-hIL-10을 표 19에서 표시된 주의 수 동안 용량당 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 2명의 환자에게 SC로 매일 투여하였고, 1명의 환자에게 5, 10 및 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 각각 투여하였다. 대부분의 환자의 경우, 투약은 표시된 주의 수를 초과하여 지속되었다.

[0380] PEG-hIL-10 치료에 대한 종양 반응을 정의된 간격 (예컨대, ~ 7-8주마다)에 컴퓨터를 이용한 토모그래피 (CT)에 의해 평가한 반면, 필요한 경우 반응 또는 진행의 확인과 같은 목적을 위해 더 짧은 추적 조사 (예컨대, 4주)을 수행하였다. 각 환자에 대한 종양 총량의 백분율 변화를 면역치료제로 반응 패턴을 결정하는 통상적으로 사용되는 방법인 면역-관련된 반응 기준 (irRC)에 의해 평가하였다 (예컨대, Wolchok 등, Clin. Cancer Res. 15(23): 7412-20 (December 1 2009) 참고). 표 19에서, 제시된 백분율은 후속 진행을 포함하지 않는 "최고 반응"이며; 예로서, 8주에 41% 종양 반응을 야기한 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  PEG-hIL-10을 받은 RCC 환자의 경우, 상기 환자는 14주에서 49%의 반응, 22주에서 62%의 반응, 및 28주에서 85%의 반응을 가지고 있었다.

## 표 19

표 19

전체 종양 반응*						
용량 코호트 (μg/ kg)	1	2.5	5	10	20	40
흑색종	~ 8주에 26%		~ 8주에 35%		~ 20주에 -4% (MX)	~ 43 주에 -57%
RCC		41% & 1 2% (8 주에)	~ 22 주에 4% 1% (MX)	~ 8주에 4 1% (MX)	~ 32주에 -71%	

\* = 총 종양 총량에서 최고 변화  
MX = 혼합 반응 (감소된 일부 병변)

[0381]

[0382] 표 19에 제시된 데이터에 나타난 바와 같이, 더 높은 용량은 흑색종 및 신장 세포 암종 투약 코호트 모두에 대해 더 높은 반응 속도 쪽으로의 추세를 나타내었다. 이러한 발견은 다양한 종양의 치료를 위해 더 높은 IL-10 혈청 최저 농도 (예컨대,  $> 10 \text{ ng/mL}$ )를 달성할 필요성과 일치한다.

[0383]

본 발명을 수행하기 위한 발명자에게 공지된 최선의 방식을 포함하는 본 발명의 특별한 구현예가 본원에 기재된다. 상기한 설명을 판독시, 개시된 구현예의 변형이 당업자에게 명백해질 수 있고, 당업자는 그러한 변형을 적절하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명은 본원에 구체적으로 기재된 바와 다르게 실시되고, 본 발명은 적용 가능한 법률에 의해 허용되는 바와 따라 본원에 첨부된 특허청구범위에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함하는 것이 의도된다(게다가, 이들의 모든 가능한 변형에서 상기 기재한 구성요소의 어떤 조합은 본 명세서에 달리 표시되지 않거나 또는 문맥에 의해 달리 명확하게 모순되지 않는다면, 본 발명에 의해 포함된다).

[0384]

본원에 인용된 모든 간행물, 특히 출원, 수탁 번호, 및 기타 참고문헌이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 인용되도록 기재된 것처럼 본원에 참고로 인용된다.

**도면****도면1**

인간 IL-10 (NP\_000563) (서열번호: 28):

```

1      mhssallccl vlltgvrasp gqgtqsen sc thfpgnlpnm lrdldafsr vktffqmkd q
61     ldnl lkesl ledfkgy lgc qalsemiqfy leevmpqaen qdpdikahvn slgenlktr
121    lr lrrchrfl pcenk skave qvknafnklq ekgiykamse fdifinyiea ymtmkirn

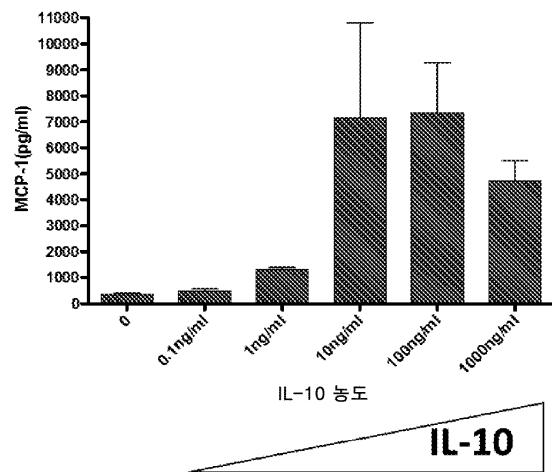
```

마우스 IL-10 (NP\_034678) (서열번호: 29):

```

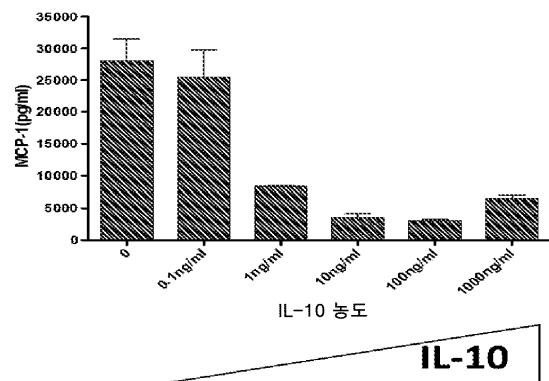
1      mp g sallccl lltgmrir gqysrednnc thfpvgqshm lleltafsq vktffqtkd q
61     ldnl ltdsl mqdfkgy lgc qalsemiqfy lvevmpqaek hgpeikehln slgeklktr
121    mrlrrchrfl pcenk skave qvksdfnklq dqgvykamne fdifincia ymmikmks

```

**도면2a****(-)LPS**

도면2b

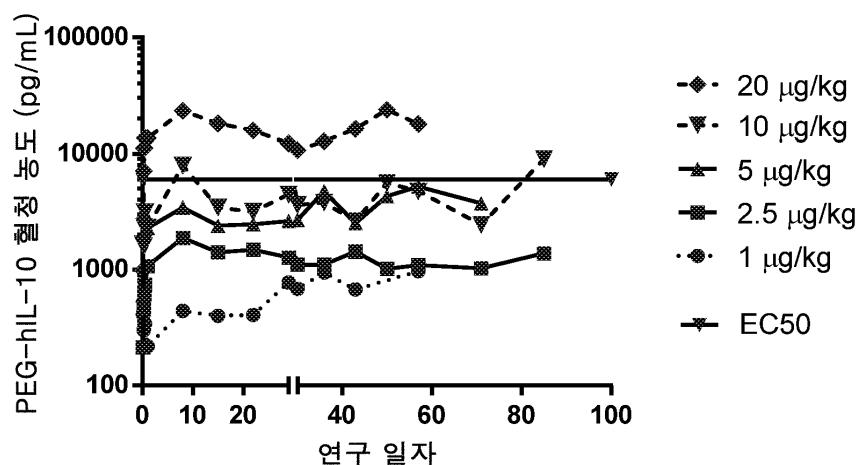
+ LPS



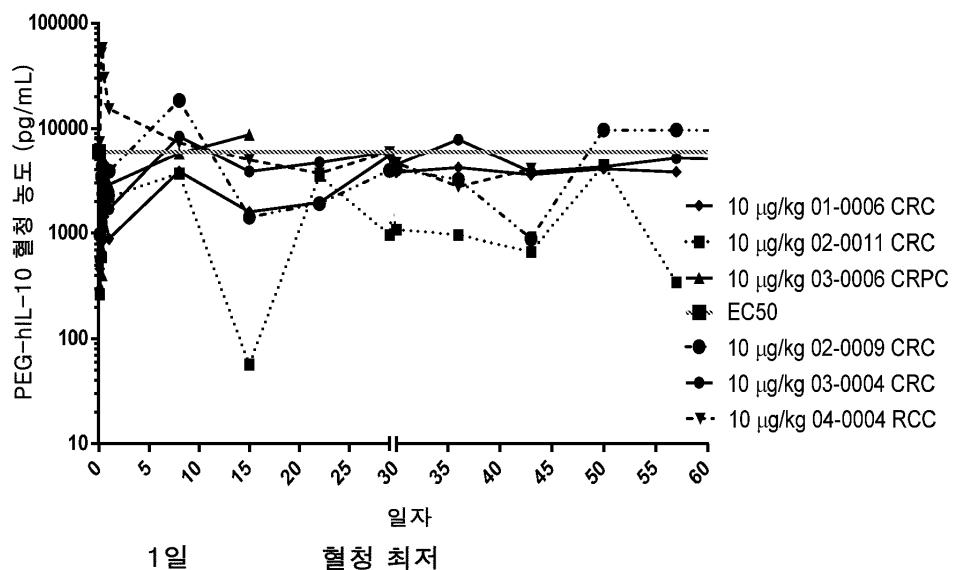
## 도면3

용량 증가 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	등록됨 (n)	평가 가능한 irRC (n)	DCR (SD+PR+CR)	총 양 유형	총 양 총량 (burden) (irRC)	병변 변화		안정 질환의 지속시간
						난소	+16%; +20%; +15%; +16%; +16%; +14%;	
1	4	3	1 (33%)	난소	+16%; +20%; +15%; +16%; +16%; +14%;	8 주 - pt. 중단		
2.5	6	5	1 (20%)	신장	+12%; +0.5%; +95%; +18%; +16%; +14%;	13 주		
5	6	6	2 (33%)	신장	+4%; +3.9%; +15%; -5%;	21 주		
				결장	+8%; +2.8%; +4.4%; -0.5%; +1.3%;	21 + 주		
10	6	5	2 (40%)	결장	+9%; +22%; -3.2%;	8 주		
				결장	+24%; 0%; -5.5%; +48%;	8 주		
20	6	5	4 (80%)	결장	+18%; 0%; -22%; -17%; -7.7%; -6.6%; +47%;	8 주		
				췌장	+9%; 0%; +5.3%; +12%; -2.2%;	8 주		
				흑색종	0%; +42%; +30%; +7%; -4.5%; -87%; -6.2%; -10.5%; -78%; -25%;	16 + 주		
				신장	-12%; -2.4%; -2.6%; -25%;	8 + 주		
총	28	24	10 (42%)					

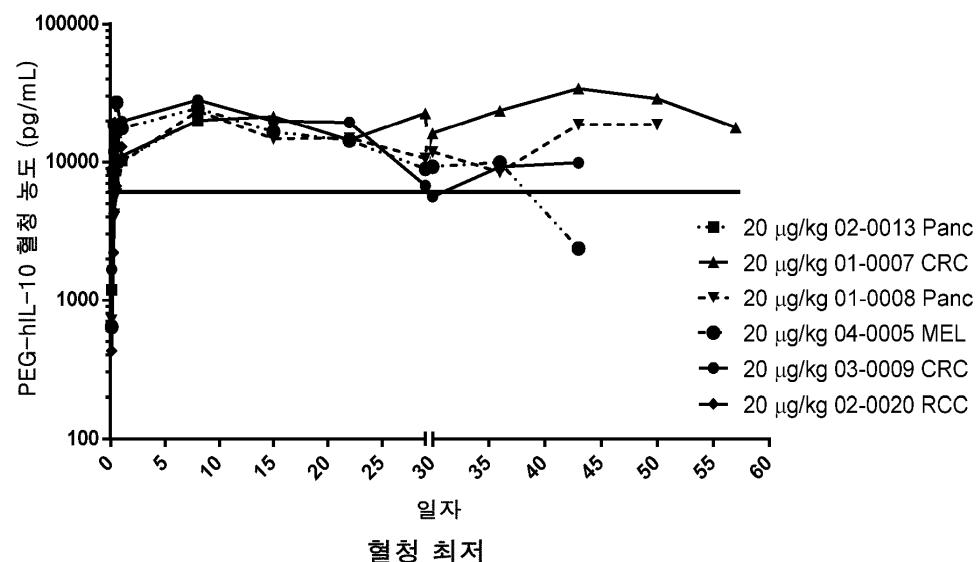
## 도면4



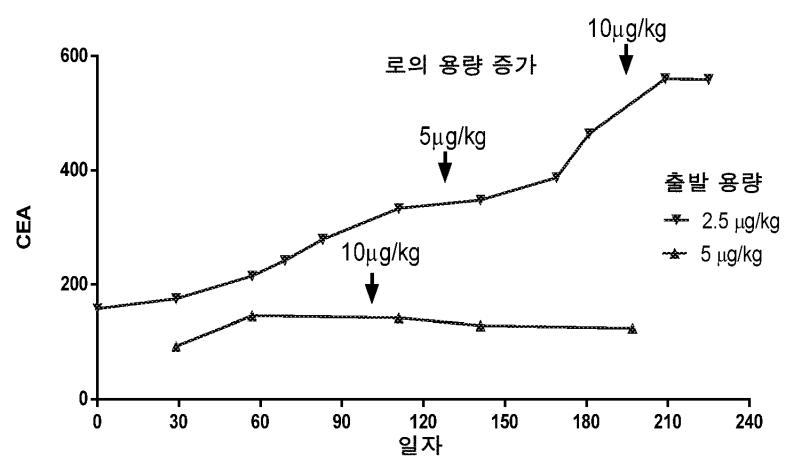
## 도면5a



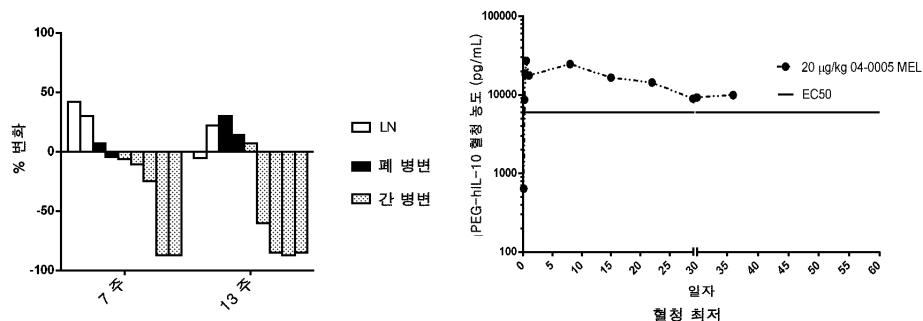
도면5b



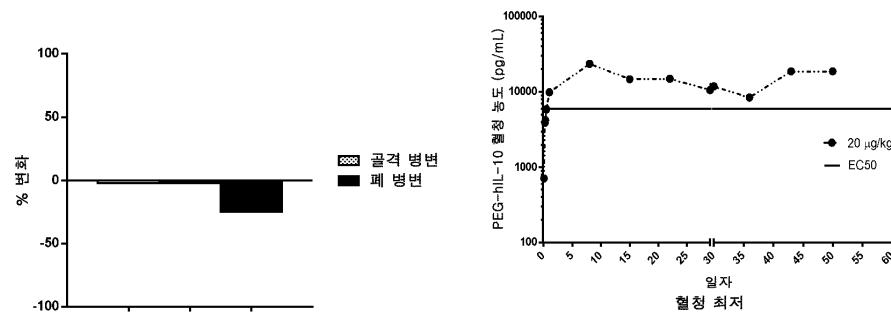
도면6



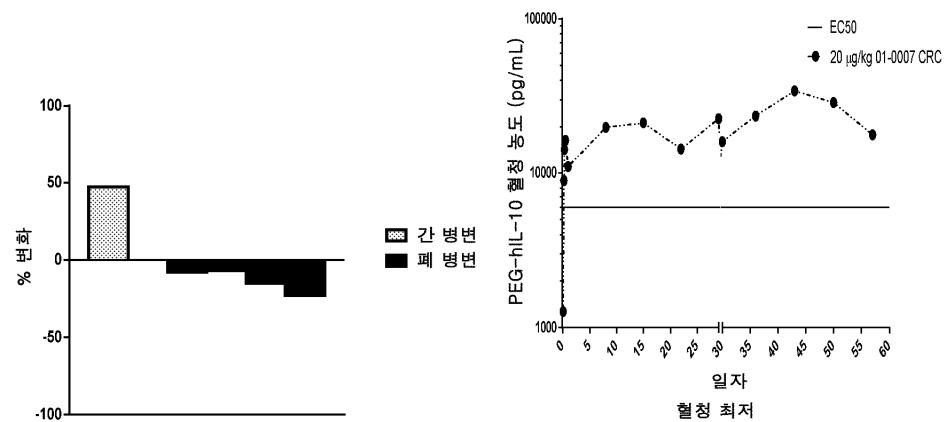
도면7a



## 도면7b



## 도면7c



## 서 열 목록

- <110> ARMO Biosciences, Inc. Oft, Martin
- <120> METHODS OF USING INTERLEUKIN-10 FOR TREATING DISEASES AND DISORDERS
- <130> ARMO-014WO
- <150> US 62/067,337
- <151> 2014-10-22
- <160> 29
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic polypeptide sequence
- <400> 1
- Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
- 1 5 10

<210> 2  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <  
 213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic polypeptide sequence  
 <400> 2

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 3  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 3

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1 5 10 15

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

<210> 4  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic polypeptide sequence  
 <400> 4

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala

1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu

20 25 30

Ala

<210> 5  
 <211> 16  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 5

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 7

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 8

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 9

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 10

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 12

<211> 6

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 12

Arg Gly Val Phe Arg Arg

1 5

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 13

Arg Gly Arg Arg

1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 14

Arg Lys Arg Lys Lys Arg

1 5

<210>

> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 15

Arg Lys Lys Arg

1

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 16

Arg Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)

<223> this residue may be repeated at least once

<400> 17

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> this residue may be repeated at least once

<400> 18

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)

<223> this residue may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> this stretch of residues may be repeated more than once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (2)

<223> this residue may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (3)

<223> this residue may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> this residue may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222>

(5)

<223> this residue may be repeated at least once

<400> 19

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> this stretch of residues may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (5)

<223> this residue may be repeated at least once

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> this stretch of residues may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> this residue may be repeated at least once

<400> 21

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<220

><221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> this stretch of residues may be repeated at least once

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (4)

<223> this residue may be repeated at least once

<400> 22

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 23

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide sequence

<400> 24

Gly Gly Ser Gly Gly

1	5
<210>	25
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	Synthetic polypeptide sequence
<400>	25

Gly Ser Gly Gly Gly

1	5
<210>	26
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	Synthetic polypeptide sequence
<400>	26

Gly Gly Gly Ser Gly

1	5
<210>	27
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	Synthetic polypeptide sequence

<400> 27

Gly Ser Ser Ser Gly

1	5
<210>	28
<211>	178
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens
<400>	28

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val

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

20 25 30  
 Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe  
 35 40 45  
 Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu

50 55 60  
 Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu  
 100 105 110  
 Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg  
 115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn  
 130 135 140  
 Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile  
 165 170 175  
 Arg Asn

<210> 29  
 <211> 178  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 29

Met Pro Gly Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Leu Leu Thr Gly Met

1 5 10 15  
 Arg Ile Ser Arg Gly Gln Tyr Ser Arg Glu Asp Asn Asn Cys Thr His  
 20 25 30  
 Phe Pro Val Gly Gln Ser His Met Leu Leu Glu Leu Arg Thr Ala Phe  
 35 40 45

Ser Gln Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Gln Leu Asp Asn Ile  
 50 55 60  
 Leu Leu Thr Asp Ser Leu Met Gln Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys  
 65 70 75 80  
  
 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Val Glu Val Met Pro  
 85 90 95  
 Gln Ala Glu Lys His Gly Pro Glu Ile Lys Glu His Leu Asn Ser Leu  
 100 105 110  
 Gly Glu Lys Leu Lys Thr Leu Arg Met Arg Leu Arg Arg Cys His Arg  
 115 120 125  
 Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Ser  
 130 135 140  
 Asp Phe Asn Lys Leu Gln Asp Gln Gly Val Tyr Lys Ala Met Asn Glu  
  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Ile Phe Ile Asn Cys Ile Glu Ala Tyr Met Met Ile Lys Met  
 165 170 175  
 Lys Ser