

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-505493

(P2019-505493A)

(43) 公表日 平成31年2月28日(2019.2.28)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
A61K 38/20	(2006.01)	A 61 K 38/20	4 C 0 7 6
A61P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 0 8 4
A61K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00	4 H 0 4 5
A61P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1
A61K 47/60	(2017.01)	A 61 K 47/60	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-531186 (P2018-531186)	(71) 出願人	515286243 アルモ・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア・94063、レッドウッド・シティ、チェサピック・ドライブ・575
(86) (22) 出願日	平成28年12月28日 (2016.12.28)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(85) 翻訳文提出日	平成30年7月3日 (2018.7.3)	(74) 代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(86) 國際出願番号	PCT/US2016/068945	(74) 代理人	100131990 弁理士 大野 玲恵
(87) 國際公開番号	W02017/120081	(74) 代理人	100104282 弁理士 鈴木 康仁
(87) 國際公開日	平成29年7月13日 (2017.7.13)		
(31) 優先権主張番号	62/275,127		
(32) 優先日	平成28年1月5日 (2016.1.5)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】疾患及び障害を治療するためにインターロイキン10を使用する方法

(57) 【要約】

IL-12剤と組み合わせたPEG-IL-10の投与を介して、がん関連の疾患、障害、または病態を有する被験体を治療し、またはこのような疾患、障害、または病態を予防する方法が提供される。

【選択図】図1

Figure 1

Human IL-12, Chain A (accession no. IF45_A) - 306 amino acid residues

```

1 iwlkkdvyv veldwypdap gmvvvltcdt peedqitwl dqssevlgsq ktltlqvkef
61 qdaggytchx ggevishall llhkkadgiw stdllkdqka pknktfirce aknysgrftc
121 wwtttstcdi tfsvksszgs adpggvtca atlsaservrg dkkeyevsve cqedsacpsa
181 eesplievmv davhklkyen ytsffirld ikpdpdknlq lkpklnarqv evsweypdtw
241 stphayfslt fcqvvggkxk rekddrvtd ktaatvicrk nasisvrqad rysssswsew
301 asvpcx

```

Human IL-12, Chain B (accession no. IF45_B) - 197 amino acid residues

```

1 rnlpwatpdp gmeclhhsg nllkvavsmal qkarqtlef yotsseidhe ditkdktsrv
61 eacipleithx nescinset afitngscia srktsmmal classiyedlk myqvefktnu
121 aklimdptkx ifldgmnlav idelmgalnf nsetvpgkxk leepdfyktk ikicilkhaf
181 riravtldr maylnas

```

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被験体におけるがん関連の疾患、障害、または病態を治療または予防する方法であって、前記被験体に対して、

- a) 治療的有効量の I L - 1 2 剤、及び
- b) 治療的有効量の P E G - I L - 1 0

を投与することを含み、

前記 P E G - I L - 1 0 の量は、前記 I L - 1 2 に付随する毒性を、I L - 1 2 単独療法で観察されるよりも低いレベルまで低下させるのに十分である前記方法。

【請求項 2】

被験体におけるがん関連の疾患、障害、または病態を治療または予防する方法であって、前記被験体に対して、

- a) 治療的有効量の I L - 1 2 剤、及び
- b) 治療的有効量の P E G - I L - 1 0

を投与することを含み、

前記量は、

i) 少なくとも 1 . 0 n g / m L の平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度を達成し、かつ

i i) 前記 I L - 1 2 に付随する毒性を、I L - 1 2 単独療法で観察されるよりも低いレベルまで低下させるのに十分である前記方法。

【請求項 3】

被験体におけるがん関連の疾患、障害、または病態を治療または予防する方法であって、前記被験体に対して、

- a) 治療的有効量の I L - 1 2 剤、及び
- b) 治療的有効量の P E G - I L - 1 0

を投与することを含み、

前記量は、

i) 平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度をある期間に亘って維持する（前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度は少なくとも 1 . 0 n g / m L であり、かつ前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度は前記期間の少なくとも 9 0 % に亘って維持される）、

i i) 前記 I L - 1 2 に付随する毒性を、I L - 1 2 単独療法で観察されるよりも低いレベルまで低下させるのに十分である前記方法。

【請求項 4】

前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が少なくとも 2 . 5 n g / m L である、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が少なくとも 5 . 0 n g / m L である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が少なくとも 7 . 5 n g / m L である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が少なくとも 1 0 . 0 n g / m L である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が少なくとも 1 5 . 0 n g / m L である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が少なくとも 2 0 . 0 n g / m L である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

10

20

30

40

50

前記期間が少なくとも 12 時間である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 11】

前記期間が少なくとも 24 時間である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記期間が少なくとも 48 時間である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記期間が少なくとも 72 時間である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記期間が少なくとも 1 週間である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記期間が少なくとも 2 週間である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記期間が少なくとも 1 月である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度が前記期間の少なくとも 95 % に亘って維持される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 18】

前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度が前記期間の少なくとも 98 % に亘って維持される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度が前記期間の 100 % に亘って維持される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 PEG - IL - 10 が成熟ヒト IL - 10 を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記 PEG - IL - 10 が成熟ヒト IL - 10 の変異体を含み、前記変異体が成熟ヒト IL - 10 の活性に匹敵する活性を示す、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 PEG - IL - 10 の量が 10.0 μg / kg / 日 ~ 20.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 23】

前記 PEG - IL - 10 の量が 11.0 μg / kg / 日 ~ 19.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】

前記 PEG - IL - 10 の量が 12.0 μg / kg / 日 ~ 18.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 PEG - IL - 10 の量が 13.0 μg / kg / 日 ~ 17.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

前記 PEG - IL - 10 の量が 14.0 μg / kg / 日 ~ 16.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記 PEG - IL - 10 の量が約 15.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 28】

前記 IL - 12 効の量が 0.01 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日である、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

前記 I L - 1 2 劑の量が 0 . 0 5 μ g / k g / 日 ~ 9 . 5 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 I L - 1 2 劑の量が 0 . 1 μ g / k g / 日 ~ 1 0 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 I L - 1 2 劑の量が 0 . 1 μ g / k g / 日 ~ 9 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 I L - 1 2 劑の量が 0 . 5 μ g / k g / 日 ~ 8 . 5 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 3 3】

前記 I L - 1 2 劑の量が 1 . 0 μ g / k g / 日 ~ 1 0 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記 I L - 1 2 劑の量が、 1 . 0 μ g / k g / 日 ~ 8 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記 I L - 1 2 劑の量が 1 . 5 μ g / k g / 日 ~ 7 . 5 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 3 6】

前記 I L - 1 2 劑の量が 2 . 0 μ g / k g / 日 ~ 7 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 I L - 1 2 劑の量が 2 . 5 μ g / k g / 日 ~ 6 . 5 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記 I L - 1 2 劑の量が 3 . 0 μ g / k g / 日 ~ 6 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 I L - 1 2 劑の量が 3 . 5 μ g / k g / 日 ~ 5 . 5 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 4 0】

前記 I L - 1 2 劑の量が 4 . 0 μ g / k g / 日 ~ 5 . 0 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 I L - 1 2 劑の量が 約 4 . 5 μ g / k g / 日である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 P E G - I L - 1 0 が、 I L - 1 0 の少なくとも 1 つのサブユニットの少なくとも 1 つのアミノ酸残基に共有結合された少なくとも 1 つの P E G 分子を含んでいる、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 4 3】

前記 P E G - I L - 1 0 がモノ P E G 化 I L - 1 0 及びジ P E G 化 I L - 1 0 の混合物を含んでいる、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 P E G - I L - 1 0 の P E G 成分が 約 5 k D a ~ 約 2 0 k D a の分子量を有する、請求項 4 2 または 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 P E G - I L - 1 0 の P E G 成分が 約 2 0 k D a を超える分子量を有する、請求項 50

42または43に記載の方法。

【請求項46】

前記PEG-IL-10のPEG成分が少なくとも約30kDaの分子量を有する、請求項42または43に記載の方法。

【請求項47】

前記IL-12剤が成熟ヒトIL-12である、請求項1～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項48】

前記IL-12剤が成熟ヒトIL-12の変異体であり、前記変異体は成熟ヒトIL-12の活性に匹敵する活性を示す、請求項1～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

前記がん関連の疾患、障害、または病態が固形腫瘍またはリンパ腫である、請求項1～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

前記固形腫瘍が乳癌、前立腺癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、脳癌、胃癌、卵巣癌、腎癌、精巣癌及び黒色腫からなる群から選択される、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記がん関連の疾患、障害または病態が免疫非感受性腫瘍である、請求項1～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

前記免疫非感受性腫瘍が結腸癌、胃食道癌、脾癌及び乳癌からなる群から選択される、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記PEG-IL-10及び前記IL-12剤の効果が相加的である、請求項1～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

前記PEG-IL-10及び前記IL-12剤の効果が相乗的である、請求項1～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

前記PEG-IL-10が少なくとも1日2回、前記被験体に投与される、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】

前記PEG-IL-10が少なくとも1日1回、前記被験体に投与される、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

前記PEG-IL-10が少なくとも72時間毎に前記被験体に投与される、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

前記PEG-IL-10が少なくとも毎週1回、前記被験体に投与される、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

前記PEG-IL-10が少なくとも2週間毎に前記被験体に投与される、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項60】

前記PEG-IL-10が少なくとも毎月1回、前記被験体に投与される、請求項1～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

更に、少なくとも一つの追加の予防剤または治療剤を投与することを含む、請求項1～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項62】

10

20

30

40

50

前記追加の予防剤または治療剤が化学療法剤である、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記被験体がヒトである、請求項 1 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記投与が非経口注射による、請求項 1 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記非経口注射が皮下注射である、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

請求項 1 ~ 6 5 のいずれか 1 項に記載のある量の P E G - I L - 1 0 及び I L - 1 2 剤と、医薬的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤とを含有する医薬組成物。 10

【請求項 6 7】

前記賦形剤が等張注射溶液である、請求項 6 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 8】

前記組成物がヒト投与に適する、請求項 6 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 6 9】

更に、少なくとも 1 つの追加の予防剤または治療剤を含む、6 6 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7 0】

請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を含む滅菌容器。

【請求項 7 1】

前記滅菌容器がシリンジである、請求項 7 0 に記載の滅菌容器。

【請求項 7 2】

請求項 7 0 または 7 1 に記載の滅菌溶液を備えたキット。

【請求項 7 3】

更に、少なくとも一つの追加の予防剤または治療剤を含む第二の滅菌容器を備えた、請求項 7 2 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体を本明細書の一部として援用する 2 0 1 6 年 1 月 5 日に提出された米国仮特許出願第 6 2 / 2 7 5 , 1 2 7 の優先権の利益を主張する。 30

【0 0 0 2】

本発明は、がん及び免疫関連障害を含む多様な疾患及び障害の治療または予防において、他の薬剤と組み合わせて P E G - I L - 1 0 を使用する方法に関する

【背景技術】

【0 0 0 3】

緒言

サイトカインインターロイキン 1 0 (I L - 1 0) は、T 細胞、B 細胞、マクロファージ、及び抗原提示細胞 (A P C) に作用して複数の免疫応答を調節する多面発現性サイトカインである。 I L - 1 0 は、活性化単球及び活性化マクロファージにおける I L - 1 、 I L - 1 、 I L - 6 、 I L - 8 、 T N F 、 G M - C S F 、及び G - C S F の発現を阻害することによって免疫応答を抑制することができ、また N K 細胞による I F N - 細胞の産生を抑制する。 I L - 1 0 は主にマクロファージで発現するが、活性化 T 細胞、B 細胞、肥満細胞、及び単球においても発現が検出されている。 I L - 1 0 は、免疫応答の抑制に加え、 I L - 2 及び I L - 4 処理胸腺細胞の増殖を刺激すること、B 細胞の生存率を増加させること、並びに M H C クラス I I 発現を刺激することを含む免疫刺激特性を示す。 40

【0 0 0 4】

ヒト I L - 1 0 は、2 つの単量体サブユニット間の非共有結合性の相互作用が破壊され

50

ると生物学的に不活性になるホモ二量体である。公開された IL - 10 の結晶構造から得たデータによると、この機能性二量体は IFN - γ と一定の類似性を示していることがわかる (Zdanov et al. (1995) Structure (London) 3 : 591 - 601)。

【0005】

その多面発現活性の結果として、IL - 10 は、炎症病態、免疫関連障害、線維性障害、代謝障害、及びがんを含む広範囲の疾患、障害、及び病態と関連付けられている。複数のそのような疾患、障害、及び病態に対する IL - 10 の臨床的及び前臨床的評価は、IL - 10 の治療的有効性を強固なものにしている。更に、PEG 化 IL - 10 は、ある種の治療環境において非 PEG 化 IL - 10 よりも有効であることが示されている。10

【発明の概要】

【0006】

本開示は、がん関連疾患、障害及び病態、及び / またはその症状の治療及び / または予防のための、IL - 12 剤 (例えば、rHuIL - 12) と組み合わせた PEG - IL - 10 (例えば、rHuPEG - IL - 10) を使用する方法、並びにその組成物を想定している。この方法は、本明細書に記載のがん関連疾患、障害及び病態の治療及び / または予防における相加的な、またおそらく相乗的な効果の機会を提供する。更に、そのような併用療法は、それが組み合わされた PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤の投与量及び / または頻度の低減を可能にし得、その結果、任意の有害作用を最小限にし、または除去することができる。この併用療法は、PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤が別々に投与される (例えば、二つの異なる医薬組成物) または一緒に投与される (例えば、PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤の両者を含有する医薬組成物) ときの同時投与を包含する。20

【0007】

本明細書で詳細に述べるように、IL - 10 は、IFN γ 、IL - 12 及び TNF α の分泌を阻害する抗炎症性及び免疫抑制性サイトカインであると考えられる。それはまた、抗原提示及びその後の CD4 + T 細胞の活性化を阻害し、従って、強力な免疫抑制性サイトカインであると広く考えられている。様々ながん患者集団を含む臨床研究において、単独療法としての PEG - IL - 10 の皮下投与は有益な結果をもたらしてきた。

【0008】

特に、最近の証拠は、PEG - IL - 10 が免疫生物学の関連において免疫刺激効果を発揮することを示している (Infante, J. R., et al., ASCO Meeting Abstracts, 2015. 33 (15_suppl) : p. 3017)。この抗腫瘍効果の特異的メカニズムの理解は本開示を実施するために必要ではないが、その効果は、CD8 + T 細胞及び内在性 IFN γ の両方を必要とすることが示されている (Mumm, J. B., et al., Cancer Cell, 2011. 20 (6) : p. 781 - 96; Emmerich, J., et al., Cancer Res, 2012. 72 (14) : p. 3570 - 81)。詳細に言えば、PEG - IL - 10 に対する CD8 + T 細胞の曝露は、IFN γ 、グランザイム B 及びパーフォリン分泌の増強をもたらす。IFN γ 及びグランザイム B の両方の分泌は、同種の MHC I / 抗原複合体との T 細胞受容体関与に依存する (Chan, I. H., et al., J Interferon Cytokine Res, 2015)。40

【0009】

ヒトがん患者の PEG - rHuIL - 10 による治療は、グランザイム B + 腫瘍内 CD8 + T 細胞浸潤の実質的な増加を特徴とする実質的な単独療法抗腫瘍応答を導く。この活性化された CD8 + 腫瘍内 T 細胞浸潤に付随して、血清サイトカインである IFN γ 、IL - 18 、 IL - 7 、 IL - 4 、 GM - CSF 及び活性化された T 細胞マーカー FasL の再現性のある増加がある。加えて、PEG - rHuIL - 10 による処理は、血清 TG F - β を減少させる。これらのサイトカインは、広域免疫活性化の顕著な特徴である。

【0010】

10

20

30

40

50

ヒトIL-10はホモ二量体であり、各単量体は178個のアミノ酸を含み、その最初の18個にシグナルペプチドを含む。特に記載のない限り、本明細書で参照するヒトIL-10とは、シグナルペプチドを欠失し、各単量体が160個のアミノ酸を含む成熟形態を指す（例えば、米国特許第6,217,857号を参照）。本明細書で使用される場合、用語「PEG-IL-10」とは、成熟ヒトPEG-IL-10の活性と同等の活性を示すPEG化ヒトIL-10及びその変異体、例えばPEG化マウスIL-10及びPEG化形態の他のIL-10オーソログを指す。

【0011】

インターロイキン-12(IL-12)は、抗原刺激に応答して、マクロファージ、B-リンパ芽球様細胞、樹状細胞及び好中球によって天然に產生される多面発現性サイトカインである。これは、ナイーブT細胞のTh1細胞への分化に関与し、T細胞の増殖及び機能を刺激し、NK細胞及びCD8+細胞傷害性Tリンパ球の細胞傷害活性の増強を媒介する。本明細書で更に述べるように、IL-12はまた、T細胞及びNK細胞からのIFN及びTNFの產生を刺激し、IFNのIL-4媒介抑制を低下させる。IFNは、抗がん防御の自然なメカニズムを調整することが示されている(Jakobisia et al.(2013) Immunol Lett 90:103-22)。IL-12は、IFN產生の強力な刺激に一部起因して、最初は腫瘍免疫療法の理想的な候補であると考えられていた。しかしながら、最初の臨床試験におけるIL-12の全身投与は、非常に狭い治療指數をもたらし、許容できない副作用プロフィールをもたらした。結果として、腫瘍学の状況における単剤療法としてのIL-12の全身投与は、ほとんど不可能とみなされた（例えば、Teng, M. et al. (2015) Nature Medicine 21(7):719-29）を参照のこと）。

10

20

30

40

【0012】

本明細書で使用するとき、「IL-12」、「IL-12ポリペプチド（複数可）」、「IL-12剤（複数可）」、「IL-12分子（複数可）」等の用語は広く解釈され、例えば、それらのホモログ、変異体（突然変異タンパク質を含む）、及び断片を含むヒト及び非ヒトIL-12関連ポリペプチド、並びに例えばリーダー配列（例えば、シグナルペプチド）を有するIL-12ポリペプチドを包含する。

【0013】

特定の実施形態において、本開示は、被験体におけるがん関連の疾患、障害または病態を治療または予防する方法であって、被験体に対して、a)治療的有効量のIL-12剤、及びb)の治療敵有効量のPEG-IL-10を投与することを含み、ここでのPEG-IL-10の量は、IL-12関連毒性を、IL-12単独療法で観察されるレベルよりも低いレベルまで低下させるのに十分である方法を想定している。

【0014】

IL-12関連毒性には、インフルエンザ様症状（例えば、頭痛、発熱、悪寒、疲労及び関節痛）；好中球減少症及び血小板減少症を含む血液学的毒性；並びにトランスアミナーゼの用量依存的増加、高ビリルビン血症、及び低アルブミン血症によって現れる肝毒性が含まれる。他のIL-12関連副作用には、粘膜の炎症（例えば、口腔粘膜炎、口内炎及び大腸炎）、低血圧、腎障害及び胃腸出血が含まれる。これらの毒作用は、IFN及びTNF並びに他のサイトカイン（例えば、IP-10及びMIG）の二次的產生に関連している。（例えば下記を参照されたい：Lasek, et al. (2014) Cancer Immunol Immunother 63:419-35; Xu, et al. Clinical and Developmental Immunology, volume 2010, Article ID 832454, 9 pp.; Cebon, J., et al., Cancer Immun, 2003.3:p.7）。

【0015】

他の実施形態において、本開示は、被験体におけるがん関連の疾患、障害または病態を治療または予防する方法であって、前記被験体に対して、a)治療的有効量のIL-12剤、b)治療的有効量のPEG-IL-10を投与することを含み、前記PEG-IL-

50

10の量は、i)少なくとも1.0ng/mLの平均IL-10血清トラフ濃度を達成するため、及びii)IL-12単独療法で観察されるレベルよりも低いレベルまでIL-12関連毒性を低下させるために十分である方法を意図している。

【0016】

更なる実施形態において、本開示は、被験体におけるがん関連の疾患、障害または病態を治療または予防する方法であって、前記被験体に対して、a)治療滴有効量のIL-12剤、及びb)治療的有効量のPEG-IL-10を投与することを含み、前記量は、i)平均IL-10血清トラフ濃度をある期間に亘って維持するために(前記平均IL-10血清トラフ濃度は少なくとも1.0ng/mLであり、かつ少なくとも前記期間の90%に亘って前記平均IL-10血清トラフ濃度を維持する)、及びii)IL-12単独療法で観察されるレベルよりも低いレベルまでIL-12関連毒性を低下させるために十分である方法を意図している。10

【0017】

望ましい前記IL-10血清トラフ濃度は、疾患、障害または病態の性質(例えば、局在化腫瘍または転移性疾患)、被験体が疾患に罹患している程度(例えば、疾患の初期対後期)、併用療法が実施されているかどうか、及び患者の特異的パラメータ(例えば、肝臓及び腎臓機能)を含む多くの因子に依存する場合がある。一例として、PEG-IL-10及び化学療法剤の同時投与は、臨床的利益を観察するために約1~2ng/mLの範囲の血清トラフ値のみを必要とし得るのに対して、転移性がんでは、匹敵する臨床的利益を得るために6~10mg/mL以上を必要とすることがある(例えば、WO2014/172392を参照されたい)。当業者が理解するように、所望の血清トラフレベルは、状況依存的(例えば、特定のがんの特徴)及び患者特異的である。20

【0018】

従って、本開示の特定の実施形態において、平均IL-10血清トラフ濃度は、少なくとも1.0ng/mL、少なくとも1.5ng/mL、少なくとも2.0ng/mL、少なくとも2.5ng/mL、少なくとも3.0ng/mL、少なくとも3.5ng/mL、少なくとも4.0ng/mL、少なくとも4.5ng/mL、少なくとも5.0ng/mL、及び少なくとも5.5ng/mL、少なくとも6.0ng/mL、少なくとも6.5ng/mL、少なくとも7.0ng/mL、少なくとも7.5ng/mL、少なくとも8.0ng/mL、少なくとも9.0ng/mL、少なくとも10.0ng/mL、少なくとも11.0ng/mL、少なくとも12.0ng/mL、少なくとも13.0ng/mL、少なくとも14.0ng/mL、少なくとも15.0ng/mL、少なくとも16.0ng/mL、少なくとも17.0ng/mL、少なくとも18.0ng/mL、少なくとも19.0mg/mL、少なくとも20.0ng/mL、少なくとも21.0ng/mL、少なくとも22.0ng/mL、または22.0ng/mL超である。30

【0019】

更なる実施形態において、前記期間は少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1ヶ月、少なくとも6週間、少なくとも2ヶ月、少なくとも3ヶ月、または3ヶ月超である。40

【0020】

本開示の特定の実施形態において、前記平均IL-10血清トラフ濃度は、前記期間の少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92.5%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%に亘って維持される。

【0021】

特定の定常状態血清トラフ濃度(例えば、2.0ng/mL)を維持するのに十分な投与計画は、所望の定常状態血清トラフ濃度よりも高い初期血清トラフ濃度をもたらし得ることが想定される。哺乳動物被験体におけるIL-10の薬力学的及び薬物動態学的特性の故に、最初のトラフ濃度(例えば、1以上の負荷用量の投与後に一連の維持用量を投与することによって達成される)は、投薬パラメータ(量及び頻度)が一定に保たれている50

ときであっても、ある期間に亘って徐々にかつ継続的に減少する。その期間の後に、前記緩徐なかつ継続的な減少は終了し、定常状態の血清トラフ濃度が維持される。

【0022】

一例として、例えば2.0ng/mLの定常状態血清トラフ濃度を維持するためには、マウス（例えば、C57BL/6マウス）に対して、約0.1mg/kg/日のIL-10剤（例えば、mIL-10）を非経口投与（例えば、SC及びIV）することが必要とされる。しかし、その定常状態の血清トラフ濃度は、0.1mg/kg/日の投薬開始の約30日後（及びいずれかの負荷投与（複数可）後）までは達成されない可能性がある。むしろ、最初の血清トラフ濃度が達成された後（例えば、2.5ng/mL）、その濃度は、例えば約30日間の期間に亘って徐々にかつ連続的に減少し、その後、所望の定常状態血清トラフ濃度（例えば、2.0ng/mL）が維持される。当業者は、例えばADM-E及び患者特異的パラメーターを用いて、所望の定常状態トラフ濃度を維持するために必要な用量を決定できるであろう

10

【0023】

本開示のPEG-IL-10は、IL-10の少なくとも1つのサブユニットの少なくとも1つのアミノ酸残基に共有結合した、少なくとも1つのPEG分子を含んでもよく、または他の実施形態では、モノPEG化及びジPEG化されたIL-10の混合物（例えば、1:1）を含む可能性がある。PEG-IL-10のPEG成分は、約5kDaより大きいか、約10kDaより大きいか、約15kDaより大きいか、約20kDaより大きいか、約30kDaより大きいか、約40kDaより大きいか、または約50kDaより大きい分子量を有し得る。幾つかの実施形態において、前記分子量は、約5kDa～約10kDa、約5kDa～約15kDa、約5kDa～約20kDa、約10kDa～約15kDa、約10kDa～約20kDa、約10kDa～約25kDa、または約10kDa～約30kDaである。

20

【0024】

本明細書に示すように、幾つかの実施形態において、前記PEG-IL-10は成熟ヒトPEG-IL-10であり、他の実施形態において、それは前記成熟ヒトPEG-IL-10の活性に匹敵する活性を示す成熟ヒトPEG-IL-10の変異体である。

【0025】

本開示は、がん関連の疾患、障害または病態を治療または予防するために、被験体に投与される併用療法のPEG-IL-10成分の量が、10.0μg/kg/日～20.0μg/kg/日である実施形態を想定している。幾つかの実施形態において、投与されるPEG-IL-10の量は、12.0μg/kg/日～18.0μg/kg/日である。幾つかの実施形態では、その量は10.0μg/kg/日未満である一方、他の実施形態において、それは20.0μg/kg/日を超える。

30

【0026】

本開示によれば、PEG-IL-10は、被験体におけるがん関連の疾患、障害または病態の治療のために、IL-12剤と組み合わせて投与され得る。上記の疾患、障害及び病態の詳細な説明は、本明細書の他の箇所に記載されている。幾つかの実施形態において、前記がんは、乳癌、前立腺癌、肺癌、肝臓癌、脾臓癌、脳癌、胃癌、卵巣癌、腎癌、精巣癌及び黒色腫に関連する腫瘍等の固形腫瘍である。特定の実施形態において、前記がんは、B細胞リンパ腫等のリンパ腫または白血病を含む血液学的障害である。

40

【0027】

本開示の特定の実施形態において、前記がん関連の疾患、障害または病態は、免疫非感受性腫瘍である。治療的免疫操作に対して感受性でない腫瘍は、1)免疫系の能動的抑制、及び2)その治療に起因した免疫抑制機構の付随的活性化を伴う炎症反応の二つの特徴を示すものとして記載されている(Galon et al. (July 25 2013) Immunity 39: 11-26 (PubMed PMID 23890060))。免疫非感受性腫瘍の例には、結腸癌、胃食道癌、脾癌及び乳癌が含まれるが、これらに限定されない

50

【0028】

本開示の特定の実施形態では、PEG-IL-10及びIL-12剤の治療効果は相加的であるが、他の実施形態では相乗的である

【0029】

PEG-IL-10及びIL-12剤は、任意の有効な経路によって投与することができる。幾つかの実施形態において、それらは、皮下注射を含む非経口注射によって投与される。特定の実施形態において、PEG-IL-10はIL-12剤とは別に投与され、他の実施形態においては、PEG-IL-10及びIL-12剤が一緒に投与される。本明細書に示すように、本開示の目的にとって、PEG-IL-10及びIL-12剤は、別々にまたは一緒に、或いは1以上の送達手段（例えば、バイアル、IVバッグまたはシリジ）で投与されるときに、同時投与されるものとみなされる。

10

【0030】

上記で述べたように、本開示の併用療法に使用するための様々なタイプのIL-12剤には、ヒト及び非ヒトIL-12関連ポリペプチドが含まれ、これにはホモログ、変異体（突然変異タンパク質を含む）及びそれらの断片が含まれる。本明細書では、IL-12複合体の機能的に活性な成分、並びに活性なヘテロ二量体（p70）もまた想定されている。幾つかの実施形態において、IL-12ペプチドは、306アミノ酸残基のヒトIL-12Aポリペプチド及び/または197アミノ酸残基のヒトIL-12Bポリペプチドの、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%を有している。他の実施形態において、前記IL-12ペプチドは、306アミノ酸残基のヒトIL-12Aポリペプチド及び/または197アミノ酸残基のヒトIL-12Bポリペプチドに対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有している。

20

【0031】

本明細書に示すように、幾つかの実施形態において、前記IL-12剤は成熟ヒトIL-12であるのに対して、他の実施形態において、前記IL-12剤は成熟ヒトIL-12の活性に匹敵した活性を示す成熟ヒトIL-12の変異体である。

30

【0032】

本明細書では、がん関連疾患、障害または病態を治療または予防するために被験体に投与される併用療法のIL-12剤の量が、0.01μg/kg/日～10.0μg/kg/日、0.1μg/kg/日～10.0μg/kg/日、または1.0μg/kg/日～10.0μg/kg/日である実施形態もまた提供される。幾つかの実施形態において、その量は0.01μg/kg/日未満であり、他の実施形態では10.0μg/kg/日よりも多い。

【0033】

特定の実施形態において、本開示は、IL-12剤の血清濃度がピークに達した後にクリアされて、再投与される前には本質的に測定不能になるように、IL-12剤を投与することを意図している。幾つかの実施形態において、IL-12治療は負荷用量で開始され、続いて、所定の間隔であり得る一連の維持投与が開始される。潜在的な毒性を避けるために、投薬は、IL-12のレベルがその最大許容レベルを超えないように調節すべきである。PEG-IL-10の投与と同様に、IL-12剤の用量は、疾患、障害または病態の性質（例えば、局在化腫瘍または転移性疾患）、被験体が疾患に罹患している程度（例えば、疾患の初期対後期）、併用療法が投与されているか否か、及び患者特異的パラメータ（例えば肝機能及び腎機能）を含む多くの因子に依存する場合がある。

40

【0034】

本開示は、本明細書に記載のPEG-IL-10及びIL-12剤、並びに医薬的に許

50

容される希釈剤、担体または賦形剤を含む医薬組成物を包含する。幾つかの実施形態において、前記PEG-IL-10及びIL-12剤は、医薬的に許容される希釈剤、担体または賦形剤をそれぞれ含む別個の医薬組成物中に存在する。幾つかの実施形態において、前記賦形剤は等張注射溶液である。前記医薬組成物は、被験体（例えば、ヒト）への投与に適することができ、1以上の追加の予防薬または治療薬を含んでもよい。一定の実施形態において、前記医薬組成物は、1以上の滅菌容器（例えば、単回または複数回使用のバイアルまたはシリンジ）に含まれる。キットは、滅菌容器（複数可）を含んでよく、このキットは、少なくとも1つの追加の予防薬もしくは治療薬または薬理学的療法で使用され得る任意の他の薬剤を含む1以上の追加の滅菌容器を含み得る。PEG-IL-10及びIL-12剤の前、これと同時、またはその後に、1以上の追加の予防薬または治療薬を投与してもよい。

10

【0035】

前記がん関連の疾患、障害または病態を治療及び／または予防する方法と共に使用できる追加の予防薬または治療薬（本明細書では補助薬等とも呼ばれる）には、幾つかの治療的利益を提供する任意の薬剤が含まれる。例として、予防剤または治療剤は、化学療法剤、免疫または炎症関連薬剤、代謝剤、抗ウイルス剤または抗血栓剤であり得るが、これらに限定されない。本開示の方法は、非薬理学的薬剤（例えば、放射線医学）と組み合わせて使用することもできる

20

【0036】

特定の実施形態において、前記追加の予防薬または治療薬は化学療法剤であり、その例は本明細書に記載されている。幾つかの実施形態において、前記化学療法剤は白金系抗腫瘍剤であり、白金系配位複合体とも呼ばれる。これらの白金系抗腫瘍剤はDNAを架橋し、それによりがん細胞におけるDNA修復及び／またはDNA合成を阻害する。そのような薬剤の例には、シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、サトラプラチニン、ピコプラチニン、ネダプラチニン及びトリプラチニンが含まれる

30

【0037】

本明細書に記載のPEG-IL-10及びIL-12剤の投与計画を最適化するための方法及びモデルもまた、本開示の実施形態によって意図されている。他の実施形態において、本開示は、本明細書に記載の併用療法に最適の特定の患者集団を同定する方法を意図している。幾つかの実施形態において、特定のバイオマーカーの存在及び／または程度は、そのような方法において有用性を見出すことができる。

30

【0038】

他の様子及び実施形態は、本開示を検討した後に、当業者には明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】ヒトIL-12鎖Aのアミノ酸配列（配列番号1）、及びヒトIL-12鎖Bのアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

【図2】4T1腫瘍担持マウスにおける単剤療法または併用療法として、21日間毎日SC投与したPEG-rMuIL-10（1mg/kg）及び／またはrMuIL-12（0.05、0.1または0.5mg/kg）の効果を示している。腫瘍重量は研究完了後に評価した。

40

【図3】図3A及び図3Bは、4T1腫瘍保有マウスへ単剤療法または併用療法として毎日SC投与されたPEG-rMuIL-10（1mg/kg）及び／またはrMuIL-12（0.05、0.1、または0.5mg/kg）の、血清IFN（図3A）及び血清TNF（図3B）に対する効果を示している。血清IFN及びTNFのレベルは、投薬の9日後、投薬の4時間後に評価した。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本開示を詳細に説明するに先立ち、本開示は本明細書に記載の特定の実施形態に限定されないと理解すべきであり、また本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記

50

載する目的にのみ使用され、限定することを意図しないことも理解されるべきである。

【0041】

ある範囲の数値が与えられるとき、文脈から特に明示されない限り、この範囲の上限と下限との間の各中間値、並びにこの記載された範囲内の他のいずれの記載値または中間値も下限の単位の10分の1まで本発明に包含されるものと理解されるべきである。これよりも狭い範囲の上限と下限は、その狭い範囲に独立して包含されてもよく、また記載された範囲から何ら明確に除外されていないことを条件として本発明内に包含される。記載された範囲が上限と下限の一方または両方を含む場合、その一方または両方を除外した範囲もまた本発明の範囲内に包含される。特に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は全て、本発明が属する技術分野の当業者に共通して理解されているものと同じ意味を有する。

10

【0042】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「a n」、及び「t h e」は、文脈によって特に明示されない限り、複数の指示被験体物を包含することに留意されたい。更に、任意の構成要素を除外するように特許請求の範囲を起草できることにも留意されたい。そのため、本記載は、特許請求の範囲の構成要素の列挙に関連して、「単独で(s o l e l y)」、「のみ(o n l y)」等のような排他的用語を使用する際、または「否定的」限定を使用する際の前提基準としての役割を果たすことを意図とする。

20

【0043】

本明細書で述べる刊行物は、本出願の出願日に先立つ開示に関してのみ提供される。更に、提示された刊行物の日付は実際の出版日と異なる場合があり、それぞれ確認を要する場合がある。

【0044】

概要

本明細書に記載されるように、本開示の発明者らは、特定の条件及びパラメーターの下でのPEG-IL-10及びIL-12の同時投与が、その強力な抗腫瘍活性を依然として保持しながら、IL-12の有害な副作用を軽減し得ることを発見した。この知見を考慮して、本開示は、がん関連の疾患、障害及び病態、及び/またはその症状の治療及び/または予防のための、IL-12剤(例えば、rHuIL-12)及びその組成物と組み合わせた、PEG-IL-10(例えば、rHuPEG-IL-10)及びその組成物を使用する方法を企図している。この方法は、特定の投与計画を含み、本明細書に記載の障害の治療及び/または予防において相加的または相乗的効果の機会を提供する。

30

【0045】

なお、本開示のポリペプチド分子及び核酸分子との関連での「ヒト」への何らかの言及は、前記リペプチドまたは核酸が得られる方法または供給源に関して限定することを意味するのではなく、それが天然に存在するヒトポリペプチドまたは核酸分子に対応し得るときに、その配列を参照するに過ぎないことが理解されるべきである。前記ヒトポリペプチド及びそれをコードする核酸分子に加えて、本開示は、他の種に由来するIL-10及びIL-12関連のポリペプチド、並びに対応の核酸分子を想定している。

40

【0046】

定義

特に記載のない限り、以下の用語は、下記に記載する意味を有することを意図する。それ以外の用語は、本明細書中の別の箇所で定義する。

【0047】

用語「患者」または「被験体」は、ヒトまたは非ヒト動物(例えば、哺乳動物)を指す場合に同義に使用される。

【0048】

例えば、被験体、細胞、組織、器官、または体液などに適用される場合、用語「投与」、「投与する」などは、例えば、IL-10またはPEG-IL-10、核酸(例えば、

50

天然ヒトIL-10をコードする核酸)、前述のものを含む医薬組成物、または診断薬の、被験体、細胞、組織、器官、または体液への接触を意味する。細胞との関連において、投与は、細胞への試薬の接触(例えば、*in vitro*または*ex vivo*)、並びに体液への試薬の接触を含み、この場合に体液は細胞と接触した状態である。

【0049】

用語「治療する」、「治療すること」、「治療」などは、疾患、障害、もしくは病態、またはそれらの症状の診断、観察などがされた後に、被験体を悩ます疾患、障害、もしくは病態の根本原因の少なくとも1つ、または被験体を悩ます疾患、障害、もしくは病態に関連する症状の少なくとも1つを、一時的にまたは恒常に、消失、低減、抑制、緩和、または改善するために開始される、一連の措置(IL-10、またはIL-10を含む医薬組成物を投与することなど)を指す。従って、治療には、進行中の疾患を阻害すること(例えば、疾患、障害、もしくは病態、またはそれに関連した臨床症状の進行または更なる進行の停止)を含む。この用語はまた、IL-10またはPEG-IL-10が、例えば、液相またはコロイド相においてIL-10受容体に接触する場合等の、他の文脈でも使用される場合がある。

10

【0050】

本明細書で使用される場合、用語「治療を必要とする」とは、被験体が治療を必要とする、または将来的に治療から利益を得るという、医師またはその他の介護者によってなされる判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の範囲である様々な要因に基づいてなされる。

20

【0051】

用語「予防する」、「予防すること」、「予防」などは、(例えば、疾患、障害、病態、またはそれらの症状の発現前に)被験体が疾患、障害、病態などを発症するリスクを、一時的にまたは恒常に(例えば、臨床症状の欠如によって決定されるように)予防、抑制、阻害、または低減する、或いは一般に特定の疾患、障害、または病態を有すると事前に診断された被験体との関連において、その発現を遅延させるような方法で開始される一連の措置(IL-10、またはIL-10を含む医薬組成物を投与することなど)を指す。場合によって、これらの用語はまた、疾患、障害、または病態の進行を緩徐化させる、或いは有害な状態、またはそれ以外の望ましくない状態にまで進行させないことを意味する。

30

【0052】

本明細書で使用される場合、用語「予防を必要とする」とは、被験体が予防治療を必要とする、または将来的に予防治療から利益を得るという、医師またはその他の介護者によってなされる判断を指す。この判断は、医師または介護者の専門知識の範囲である様々な要因に基づいてなされる。

【0053】

「治療的有効量」という語句は、被験体に投与する場合に、疾患、障害、または病態の任意の症状、態様、または性質に、任意の検出可能な正の効果を及ぼすことができる量で、単独でまたは医薬組成物の一部として、及び単回投与または一連の投与の一部として、薬剤を被験体に投与することに関する。治療的有効量は、関連する生理学的效果を測定することによって確認することができ、投与計画及び被験体の病態等の診断分析と関連して調整することができる。一例として、投与後に產生される炎症性サイトカイン量の測定値を、治療的有効量が使用されているかどうかの指標にすることができる。

40

【0054】

「変化をもたらすのに十分な量で」という語句は、特定の療法を実施する前に測定された指標のレベル(例えば、ベースラインレベル)と、特定の療法を実施する後に測定された指標のレベルとの間に検出可能な差が存在することを意味する。指標には、任意の客観的なパラメーター(例えば、IL-10の血清濃度)または主観的なパラメーター(例えば、被験体による健康状態の印象)を含む。

【0055】

50

用語「小分子」とは、約10kDa未満、約2kDa未満、または約1kDa未満である分子量を有する化学化合物を指す。小分子には、無機分子、有機分子、無機成分を含む有機分子、放射性原子を含む分子、及び合成分子を含むが、これらに限定されない。治療上、小分子は、大分子よりも、細胞透過性が高く、分解されにくく、かつ免疫応答を誘発しにくい可能性がある。

【0056】

用語「リガンド」とは、例えば、分子受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができるペプチド、ポリペプチド、膜会合性もしくは膜結合性の分子、またはそれらの複合体を指す。「リガンド」には、天然及び合成リガンド、例えば、サイトカイン、サイトカイン変異体、類似体、変異タンパク質、及び抗体由来の結合組成物を包含する。「リガンド」にはまた、例えば、サイトカインのペプチド模倣体及び抗体のペプチド模倣体といった小分子を包含する。この用語にはまた、アゴニストでもアンタゴニストでもないが、例えばシグナル伝達または接着といった生物学的特性に著しく影響を与えることなく、受容体と結合することができる薬剤を包含する。更に、この用語には、例えば化学的または組換え方法によって、可溶型の膜結合リガンドに改変された膜結合型リガンドが含まれる。リガンドまたは受容体は完全に細胞内性であり得る、すなわちサイトゾル、核、または他の何らかの細胞内区画に存在することができる。リガンドと受容体の複合体を「リガンド・受容体複合体」と称する。

10

【0057】

用語「阻害剤」及び「アンタゴニスト」、または「活性化剤」及び「アゴニスト」とは、それぞれ阻害分子または活性化分子を指し、例えば、リガンド、受容体、補因子、遺伝子、細胞、組織、または器官の活性化のためのものがある。阻害剤は、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、または細胞を減少、遮断、阻止、活性化遅延、不活性化、脱感作、または下方調節させる分子である。活性化剤は、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体、または細胞を増加、活性化、促進、活性化増強、感作、または上方調節させる分子である。阻害剤はまた、構造的活性化を低減、遮断、または不活性化する分子であると定義することができる。「アゴニスト」は、標的と相互作用して、標的の活性化の増加を引き起こすまたは促進する分子である。「アンタゴニスト」は、アゴニストの作用（複数可）に拮抗する分子である。アンタゴニストは、アゴニストの活性を阻止、低減、阻害、または中和し、またアンタゴニストは、同定されたアゴニストが存在しない場合でも、標的、例えば標的受容体の構造的活性を阻止、阻害、または低減することができる。

20

30

【0058】

用語「調節する」、「調節」等は、PEG-IL-10（またはそれをコードする核酸分子）の機能または活性を直接的または間接的に増減する、或いはPEG-IL-10と同等の効果を生む分子の能力を増強する分子（例えば、活性化剤または阻害剤）の能力を指す。用語「モジュレーター」は、上記の活性をもたらすことができる分子を広義に指すことを意味する。例としては、例えば、遺伝子、受容体、リガンド、または細胞のモジュレーターは、遺伝子、受容体、リガンド、または細胞の作用を変える分子であり、その調節する特性の作用を活性化、阻害、または変更することができる。モジュレーターは単独で作用することも、例えばタンパク質、金属イオン、または小分子といった補因子を使用することもできる。「モジュレーター」の用語は、IL-10と同じ作用機序によって作動し（すなわち、IL-10と同じシグナル伝達経路をそれに類似した方法で調節する薬剤）、IL-10と同等の（またはそれを超える）生物学的反応を誘発することができる薬剤を含む。

40

【0059】

モジュレーターの例としては、小分子化合物及びその他の生物有機分子が挙げられる。小分子化合物の多数のライブラリ（例えば、コンビナトリアルライブラリ）が市販されており、モジュレーターを同定する出発点として役立てることができる。当業者は1つ以上のアッセイ（例えば、生化学的アッセイまたは細胞によるアッセイ）を開発することが可

50

能であり、そのような化合物ライブラリをスクリーニングして、所望の特性を有する1つ以上の化合物を同定することができ、その後、医薬品化学分野の当業者が、例えば、類似体及びその誘導体を合成して評価することにより、こうした1つ以上の化合物を最適化することが可能である。合成及び／または分子モデリング試験を活性化剤の同定に利用することもできる。

【0060】

分子の「活性」とは、リガンドまたは受容体への分子の結合；触媒活性；遺伝子発現、または細胞のシグナル伝達、分化、もしくは成熟化を刺激する能力；抗原活性；その他の分子の活性の調節などを表すか、または意味することができる。この用語はまた、細胞間相互作用（例えば、接着）の調節または維持に関する活性、或いは細胞の構造体（例えば、細胞膜）の維持に関する活性を意味することができる。「活性」はまた、例えば[触媒活性]／[mgタンパク質]、または[免疫学的活性]／[mgタンパク質]といった平均比活性、生物学的区画における濃度などを意味することができる。用語「増殖活性」には、例えば、正常な細胞分割、並びにがん、腫瘍、異形成、細胞形質転換、転移、及び血管形成を促進する、すなわちこれらに必要である、或いはこれらに特に関連する活性を包含する。

【0061】

本明細書で使用される場合、「同等の」、「同等の活性」、「と同等の活性」、「同等の効果」、「と同等の効果」などは、定量的及び／または定性的にみなされ得る相対的な用語である。これらの用語の意味は、使用される文脈に依存する場合が多い。例として、技術的に認められたアッセイ（例えば、用量反応アッセイ）または技術的に認められた動物モデルにおいて決定したときに、一方の薬剤が他方の薬剤の活性の20%しか達成できない場合、どちらもある1つの受容体を活性化させる2つの薬剤は、定性的観点からは同等の効果を有するとみなされ得るが、定量的観点からは2つの薬剤には同等の効果がないとみなされ得る。ある結果を別の結果と（例えば、ある結果を参照標準と）比較する場合、「同等の」とは、多くの場合、ある結果が参照標準から35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、または1%未満しか外れていないことを意味する。特定の実施形態では、ある結果が参照標準から15%未満、10%未満、または5%未満しか外れていない場合、ある結果は参照標準と同等である。例として、限定するものではないが、活性または効果は、有効性、安定性、可溶性、または免疫原性を意味し得る。

【0062】

例えば、細胞、組織、器官、または生物の「応答」という用語は、例えば、生物学的区画内における濃度、密度、接着、もしくは遊走、遺伝子発現率、または分化の状態といった生化学的または生理学的挙動の変化を包含し、この場合の変化は、活性化、刺激、もしくは治療、または遺伝的プログラミング等の内部機構と相關する。特定の文脈において、用語「活性化」、「刺激」などは、内部機構によって、並びに外的または環境的要因によって調節される細胞活性化を指し、一方、用語「阻害」、「下方調節」などは、その逆の効果を指す。

【0063】

本明細書で同義に使用される用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸の重合形態を指し、これには、遺伝的にコードされたアミノ酸及び非遺伝的にコードされたアミノ酸、化学的にまたは生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、並びに修飾ポリペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る。こうした用語には、限定されるものではないが、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質；異種及び同種のリーダー配列を有する融合タンパク質；N末端メチオニン残基を有するまたは有しない融合タンパク質；免疫標識されたタンパク質を有する融合タンパク質などを含む、融合タンパク質が含まれる。

【0064】

本開示を通して、1文字または3文字のコードによりアミノ酸が参照されることは理解

10

20

30

40

50

されるであろう。読者の便宜のために、1文字及び3文字のアミノ酸コードを以下に示す。

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

10

20

30

40

50

【0065】

本明細書で使用される場合、用語「変異体」は、天然の変異体及び非天然の変異体を包含する。天然の変異体には、相同体（種ごとに、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド配列が異なるポリペプチド及び核酸）、並びにアレル変異体（ある種の中で個体ごとに、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド配列が異なるポリペプチド及び核酸）を含む。非天然の変異体には、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド配列内に変化を含むポリペプチド及び核酸を含み、配列の変化が人為的に導入される場合（例えば、変異タンパク質）と、例えば変化が実験室において人間の介入（「人間の手」）によって生じる場合とがある。従って、本明細書で「変異タンパク質」とは、広義には、通常は単一のまたは複数のアミノ酸置換を有し、部位特異的もしくは不規則な変異誘発を受けたクローニング遺伝子、または完全な合成遺伝子が多くが由来する、変異した組換えタンパク質を指す。

【0066】

用語「DNA」、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」などは本明細書で同義に使用され、重合形態の、任意の長さのヌクレオチド、すなわちデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド、またはその類似体を指す。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、線状及び環状の核酸、メッセンジャーRNA(mRNA)、相補DNA(cDNA)、組換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが挙げられる。

【0067】

ポリペプチドの構造と関連して本明細書で使用される場合、「N末端(N-terminal)」（または「アミノ末端」）及び「C末端(C-terminal)」（または「カルボキシル末端」）は、それぞれポリペプチドの最端のアミノ末端及びカルボキシル末端を指すが、用語「N末端(N-terminal)」及び「C末端(C-terminal)」は、それぞれポリペプチドのアミノ酸配列におけるN末端側及びC末端側の相対位置を指し、それぞれN末端及びC末端に残基を含み得る。「直接N末端」または「直接C末端」とは、第1及び第2のアミノ酸残基が共有結合されて隣接するアミノ酸配列となる、第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指す。

【0068】

アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列に関連して、「に由来する」（例えば、IL-10ポリペプチド「に由来する」アミノ酸配列）とは、ポリペプチドまたは核酸が、標準ポリペプチドまたは核酸（例えば、天然のIL-10ポリペプチドまたはIL-10をコードする核酸）の配列に基づく配列を有することを示すことを意図し、タンパク質または核酸が作製される供給源または方法に関する限定を意味するものではない。例としては、用語「に由来する」には、標準アミノ酸またはDNA配列の相同体または変異体を含む。

【0069】

ポリペプチドとの関連において、用語「単離された」とは、天然のものである場合、天然で生じ得るものと異なる環境にある目的のポリペプチドを指す。「単離された」とは、目的とするポリペプチドを得るために実質的に濃縮されるサンプル内のポリペプチド、及び／またはその中の目的のポリペプチドが部分的にまたは実質的に精製されるポリペプチドを含むことを意味する。ポリペプチドが天然でない場合、「単離された」とは、ポリペプチドが合成手段または組換え手段によって作製された環境から分離されたことを示す。

【0070】

「濃縮された」とは、目的のポリペプチドが、a) 生体サンプル（例えば、ポリペプチドが天然に存在する、または投与後に存在するサンプル）等の、出発サンプルのポリペプチド濃度よりも高い濃度（例えば、少なくとも3倍超、少なくとも4倍超、少なくとも8倍超、少なくとも64倍超、またはそれ以上）で、またはb) ポリペプチドが作製された環境（例えば、細菌細胞内の環境）よりも高い濃度で存在するように、サンプルが（例えば、科学者によって）人工的に操作されることを意味する。

10

【0071】

「実質的に純粋な」とは、成分（例えば、ポリペプチド）が、組成物総量の約50%超、一般に総ポリペプチド含有量の約60%超を占めることを示す。より一般には、「実質的に純粋な」とは、組成物において総組成物の少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%以上が目的成分であることを指す。場合によって、ポリペプチドは、組成物総量の約90%超、または約95%超を占めることになる。

20

【0072】

リガンド／受容体、抗体／抗原、またはその他の結合対を指す場合、用語「特異的に結合する」または「選択的に結合する」とは、タンパク質及びその他の生物製剤の異種集団においてタンパク質の存在を決定する結合反応を示す。従って、指定された条件下で、特異的リガンドは特定の受容体と結合し、サンプルに存在する他のタンパク質に有意な量で結合することはない。企図された方法の抗体、または抗体の抗原結合部位に由来する結合組成物は、その抗原、またはその変異体もしくは変異タンパク質に、任意の他の抗体、またはそれに由来する結合組成物との親和性よりも少なくとも2倍超、少なくとも10倍超、少なくとも20倍超、または少なくとも100倍超の親和性で結合する。特定の実施形態では、抗体は、例えばスキヤッチャード分析（Munzen, et al. 1980 Analyt. Biochem. 107: 220-239）により測定したとき、約10⁹ リットル／モルを超える親和性を有することになる。

30

【0073】

IL-10 及び PEG-IL-10

ヒトサイトカイン合成阻害因子（CSIF）としても知られる、抗炎症サイトカインIL-10は、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24（Mda-7）、及びIL-26、インターフェロン（IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- ζ ）、並びにインターフェロン様分子（リミチン、IL-28A、IL-28B、及びIL-29）を含む、一連のサイトカインである、タイプ（クラス）2サイトカインに分類される。

40

【0074】

IL-10は、免疫調節及び炎症において多面発現効果を有するサイトカインである。これは肥満細胞によって産生され、アレルギー反応部位で肥満細胞が有する炎症効果を中和する。IL-10は、IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF- α 、及びGM-CSF等の炎症性サイトカインの合成を阻害できると同時に、特定のT細胞及び肥満細胞に対して刺激性であり、B細胞の成熟、増殖、及び抗体産生を刺激する。IL-10はNF-B活性を遮断することができ、JAK-STATシグナル伝達経路の調節に関与する。また、CD8+T細胞の細胞傷害活性及びB細胞の抗体産生を誘発し、マクロファージ活性及び腫瘍促進性の炎症を抑制する。CD8+T細胞の調節は用量依存的であり、用量が高いほど、強い細胞傷害性反応を誘発する。

【0075】

50

本明細書の他の個所で示したように、IL-10は、IFN- γ 、IL-12(D'A
ndrea, A., et al. (1993) J Exp Med 178(3):10
41-48)及びTNF α (Armstrong, L., et al. (1996) Th
orax 51(2):143-49)の分泌を阻害する抗炎症性及び免疫抑制性のサイ
トカインであると考えられている。IL-10はまた、抗原提示及びその後のCD4+T
細胞の活性化を阻害し(de Waal Malefyt, R., et al. (199
1) J Exp Med 174(5):1209-20; de Waal Malef
y whole, R., et al. (1991) J Exp Med 174(4):915-2
4)、従って強力な免疫抑制性サイトカインであると広く考えられている。

【0076】

10

ヒトIL-10は、37kDaの分子質量をもつホモ二量体であり、それぞれ18.5
kDaの単量体が178のアミノ酸を含み、その最初の18個にシグナルペプチド、及び
2つの分子内ジスルフィド結合を形成する2つのシステイン残基を含む。IL-10二量
体は、2つの単量体サブユニット間の非共有結合性の相互作用が破壊されると生物学的に
不活性になる。

【0077】

20

上述のように、用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド（複数可）」、「IL-
10分子（複数可）」、「IL-10薬剤（複数可）」などは広義に解釈されるものと
し、例えばホモログ、変異体（変異タンパク質を含む）、及びそれらの断片を含むヒト及び
非ヒトIL-10関連ポリペプチド、並びに例えばリーダー配列（例えばシグナルペ
プチド）を有するIL-10ポリペプチド及び前述の修飾型を含む。本開示は、80%の相
同性を示す、PEG化形態のヒトIL-10(NP_000563)及びマウスIL-1
0(NP_034678)及びそれらの使用を想定している。加えて、本開示の範囲には、他の哺乳動物種由来のPEG化IL-10オーソロギ及びその修飾型を含み、これには、ラット（アクセッション番号NP_036986.2; GI 148747382）；ウシ（アクセッション番号NP_776513.1; GI 41386772）；ヒツ
ジ（アクセッション番号NP_001009327.1; GI 57164347）；イ
ヌ（アクセッション番号ABY86619.1; GI 166244598）；及びウサ
ギ（アクセッション番号AAC23839.1; GI 3242896）由来のものが含
まれる。

30

【0078】

II型サイトカイン受容体であるIL-10受容体は、それぞれR1及びR2とも呼ば
れるアルファ及びベータサブユニットからなる。受容体の活性化には、アルファとベータ
両方への結合が必要である。IL-10ポリペプチドのホモ二量体の一方はアルファと結合し、同じIL-10ポリペプチドのホモ二量体の他方はベータと結合する。

【0079】

40

本明細書で使用される場合、用語「PEG化IL-10」、「PEG-IL-10」などは、一般にリンカーを介して、IL-10タンパク質の少なくとも1つのアミノ酸残基に結合が安定であるように共有結合した1つ以上のポリエチレングリコール分子を有するIL-10分子を指す。用語「モノPEG化IL-10」及び「モノPEG-IL-10」は、1つのポリエチレングリコール分子が、一般にリンカーを介して、IL-10二量体の1つのサブユニット上の単一アミノ酸残基に共有結合していることを示す。本明細書で使用される場合、用語「ジPEG化IL-10」及び「ジPEG-IL-10」は、少なくとも1つのポリエチレングリコール分子が、一般にリンカーを介して、IL-10二量体の各サブユニット上の単一残基に結合していることを示す。

【0080】

50

ある特定の実施形態では、本開示で使用されるPEG-IL-10はモノPEG-IL
-10であり、これは1~9個のPEG分子がリンカーを介してIL-10二量体の1つ
のサブユニットのN末端にあるアミノ酸残基のアルファアミノ基に共有結合している。1
つのIL-10サブユニットに対するモノPEG化では、一般に、サブユニットの再構成

により、非PEG化IL-10と、モノPEG化IL-10と、ジPEG化IL-10との不均一混合物が生じる。更に、PEG化反応を完了まで進行させると、一般に、非特異的及び多重PEG化IL-10が生じ、その生物活性が低下することになる。従って、本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の方法によって作製されたモノIL-10とジPEG化IL-10との混合物の投与を含む。

【0081】

特定の実施形態では、PEG部位の平均分子量は、約5kDa～約50kDaである。IL-10に対するPEG結合の方法または部位は重要ではないが、ある特定の実施形態では、PEG化がIL-10ペプチドの活性を変化させないか、または最小限にしか変化させない。ある特定の実施形態では、半減期の増加が、生物学的活性の任意の減少よりも大きい。PEG-IL-10の生物学的活性は通常、米国特許第7,052,686号に記載のように、細菌抗原(リポ多糖(LPS))を投与し、PEG-IL-10で処置した被験体の血清中での炎症性サイトカイン(例えば、TNF またはIFN)レベルの評価により測定される。

10

【0082】

IL-10変異体は、血清半減期の増加、IL-10に対する免疫応答の低下、精製または調製の促進、IL-10の単量体サブユニットへの変換の減少、治療有効性の向上、及び治療使用中の副作用の重篤度または発生の軽減を含む、様々な目的を考慮して調製することができる。アミノ酸配列変異体は通常、天然には見られない所定の変異体であるが、場合によって翻訳後変異体、例えばグリコシリ化変異体でもあり得る。本開示は、それが適切なレベルのIL-10活性を保持する限り、IL-10の任意のPEG化変異体の使用を想定している。

20

【0083】

語句「保存的アミノ酸置換」とは、タンパク質中のアミノ酸(複数可)を、側鎖の酸性、塩基性、電荷、極性、または大きさが類似する側鎖を有するアミノ酸で置換することによってタンパク質の活性が保持されている置換を指す。保存的アミノ酸置換は一般に、以下の群のアミノ酸残基内での置換を伴う：1) L、I、M、V、F；2) R、K；3) F、Y、H、W、R；4) G、A、T、S；5) Q、N；及び6) D、E。置換、挿入、または欠失の指針は、異なる変異タンパク質または異なる種のタンパク質のアミノ酸配列のアラインメントに基づくことができる。従って、任意の天然のIL-10ポリペプチドに加えて、本開示は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個、通常は20、10、または5個以下のアミノ酸置換を有し、その置換は通常、保存的アミノ酸置換であることを想定している。

30

【0084】

本開示はまた、成熟IL-10に由來した隣接するアミノ酸残基を含む成熟IL-10の活性断片(例えば、部分配列)のPEG化形態を想定している。ペプチドまたはポリペプチド部分配列の隣接アミノ酸残基の長さは、部分配列が由来する特定の天然アミノ酸配列に応じて変化する。一般に、ペプチド及びポリペプチドは、約20アミノ酸～約40アミノ酸、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約60アミノ酸～約80アミノ酸、約80アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約120アミノ酸、約120アミノ酸～約140アミノ酸、約140アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約155アミノ酸、約155アミノ酸～最大全長ペプチドまたはポリペプチドであり得る。

40

【0085】

更に、IL-10ポリペプチドは、標準配列と比較して、規定の長さの隣接アミノ酸(例えば、「比較枠」)に亘って、規定の配列同一性を有し得る。比較するための配列アラインメント方法は当技術分野で周知である。配列比較に最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci.

50

. U S A 85 : 2444 (1988) の類似性検索法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis. の GAP、BESTFIT、FASTA、及び TFASTA) によって、または手動アラインメント及び目視検査 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement) を参照) によって実施することができる。

【0086】

一例として、PEG化され得る適切な IL-10 ポリペプチドは、約 20 アミノ酸～約 40 アミノ酸、約 40 アミノ酸～約 60 アミノ酸、約 60 アミノ酸～約 80 アミノ酸、約 80 アミノ酸～約 100 アミノ酸、約 100 アミノ酸～約 120 アミノ酸、約 120 アミノ酸～約 140 アミノ酸、約 140 アミノ酸～約 150 アミノ酸、約 150 アミノ酸～約 155 アミノ酸、約 155 アミノ酸～最大全長 IL-10 ペプチドまたはポリペプチドの隣接するストレッチに対して、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、または少なくとも約 99% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。

【0087】

以下で更に述べるように、IL-10 ポリペプチドは、天然源 (例えば、天然に存在する環境以外の環境) から単離することも、(例えば、細菌、酵母、ピキア属、昆虫細胞等の、遺伝子改変された宿主細胞における) 組換えにより作製することもでき、この場合の遺伝子改変された宿主細胞は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸によって修飾される。IL-10 ポリペプチドはまた、(例えば、無細胞化学合成によって) 合成的に產生することができる。

【0088】

天然または非天然のアイソフォーム、アレル変異体、及びスプライス変異体を含む、IL-10 分子をコードする核酸分子が、本開示によって企図される。本開示はまた、天然の DNA 配列から 1 つ以上の塩基が変化しているが、それでもなお、遺伝コードの縮重により IL-10 ポリペプチドに対応するアミノ酸配列に翻訳される核酸配列を包含する。

【0089】

IL-12

インターロイキン-12 (IL-12) は、マクロファージによって天然に產生される多面発現性サイトカインであり、抗原刺激に応答して、B-リンパ芽球様細胞、樹状細胞及び好中球によって天然に產生される。それは、PMA に誘発された EBV 形質転換 B 細胞系統から分泌される因子として最初に記載された。IL-12 は、ナイーブ T 細胞の Th1 細胞への分化に関与しており、T 細胞の増殖及び機能を刺激することができ、NK 細胞及び CD8+ 細胞傷害性 T リンパ球の細胞傷害活性の増強を媒介する。このように、IL-12 は先天性 (NK 細胞) 及び適応性 (細胞傷害性 T リンパ球) の両方を活性化する。IL-12 はまた、T 細胞及び NK 細胞からの IFN 及び TNF の產生を刺激し、IFN の IL-4 媒介抑制を低下させる。

【0090】

本明細書の他の箇所に示されるように、用語「IL-12」、「IL-12 ポリペプチド (複数可)」、「IL-12 剤 (複数可)」、「IL-12 分子 (複数可)」などは、広く解釈されることを意図しており、例えば、ホモログ、変異体 (突然変異タンパク質を含む)、及びそれらの断片を含むヒト及び非ヒト IL-12 関連ポリペプチド、並びに例えばリーダー配列 (例えば、シグナルペプチド) を有する IL-12 ポリペプチドを包含する。

【0091】

構造的に、IL-12 は、4 つのヘリックスの複合体を含む。それは、IL-12、鎖 A (p35)、及び IL-12、鎖 B (p40) の 2 つの別個の遺伝子によってコードされるヘテロ二量体サイトカインである。ヒト IL-12A は 306 アミノ酸残基のポリ

10

20

30

40

50

ペプチドであり（図1；受託番号1F45A）、ヒトIL-12Bは197アミノ酸残基のポリペプチドである（図1；受託番号1F45B）。活性ヘテロ二量体（p70）及びp40のホモ二量体は、タンパク質合成後に形成される。IL-12は、IL-12受容体、即ち、IL-12R-1及びIL-12R-2により形成されるヘテロダイマー受容体に結合し、これはJAK-STATA経路に関する幾つかの転写因子を含んだシグナル伝達カスケードを開始する。

【0092】

本開示は、成熟IL-12に由来する連続したアミノ酸残基を含む成熟IL-12の活性断片（例えば、部分配列）を想定している。ペプチドまたはポリペプチド部分配列の連続するアミノ酸残基の長さは、前記部分配列が由来する特定の天然に存在するアミノ酸配列に依存して変化する。一般に、ペプチド及びポリペプチドは、約20アミノ酸～約40アミノ酸、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約60アミノ酸～約80アミノ酸、約80アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約120アミノ酸、約120アミノ酸～約140アミノ酸、約140アミノ酸～約160アミノ酸、約160アミノ酸～約180アミノ酸、約180アミノ酸～約190アミノ酸、約190アミノ酸～約194アミノ酸、約194アミノ酸～約196アミノ酸、約196アミノ酸～約210アミノ酸、約210アミノ酸～約230アミノ酸、約230アミノ酸～約250アミノ酸、約250アミノ酸～約270アミノ酸、約270アミノ酸～約290アミノ酸、約290アミノ酸～約295アミノ酸、約295アミノ酸～約300アミノ酸、約300アミノ酸～約304アミノ酸、及び約304アミノ酸～約306アミノ酸であることができる。
10

【0093】

更に、IL-12ポリペプチドは、規定された長さの連続したアミノ酸（例えば、「比較ウインドウ」）に亘って、参照配列と比較して規定された配列同一性を有することができる。比較のための配列アラインメントの方法は、当技術分野で周知であり、上記に記載されている。一例として、適切なIL-12ポリペプチドは、約20個～約40個のアミノ酸、約40個～約60個のアミノ酸、約60個～約80個のアミノ酸、約80個～約100個のアミノ酸、約100個～約120個のアミノ酸、約120個～約140個のアミノ酸、約140個～約160個のアミノ酸、約160個～約180個のアミノ酸、約180個～約190個のアミノ酸、約190個～約195個のアミノ酸、約194個～約196個のアミノ酸、約196個～約210個のアミノ酸、約210個～約230個のアミノ酸、約230個～約250個のアミノ酸、約250個～約270個のアミノ酸、約270個～約290個のアミノ酸、約290個～約295個のアミノ酸、約295個～約300個のアミノ酸、約300個～約304個のアミノ酸、及び約304個～約306個のアミノ酸の連続ストレッチに対して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。
20

【0094】

本明細書の他の箇所に示されるように、IL-12ポリペプチドは、天然源（例えば、天然に存在する環境以外の環境）から単離でき、また組換えにより作製することもでき（例えば、例えば遺伝的に改変された宿主細胞、例えば、細菌、酵母、ピキア（Pichia）、昆虫細胞などにおいて）、この場合、例えば遺伝的に改変された宿主細胞が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸で修飾されている。IL-12ポリペプチドはまた、（例えば、無細胞化学合成によって）合成的に產生され得る。
30

【0095】

IL-12分子をコードする核酸分子は、それらの天然及び非天然のアイソフォーム、対立遺伝子変異体及びスプライス変異体を含めて、本開示により想定されている。本開示はまた、天然に存在するDNA配列から1以上の塩基が変化するが、遺伝コードの縮重により、未だIL-12ポリペプチドに対応するアミノ酸配列に翻訳される核酸配列も包含する。

【0096】

10

20

30

40

50

IFN は、抗がん防御の天然のメカニズムを調整することが示されている (Jako bissiak, M. et al. (2013) *Immuno Lett* 90 : 103 - 22)。IL-12 は、IFN の産生を刺激することにより、IL-12 の抗血管新生効果を媒介する誘導性タンパク質 - 10 ケモカイン (IP-10 または CXCL10) の産生を増加させる。IL-12 は、免疫応答及びその抗血管形成活性を誘導する能力のために、腫瘍学的治療薬として評価されている。IL-12 は、乾癬及び炎症性腸疾患を含む他の疾患の治療に有用であり得る。

【0097】

注目すべきことに、抗 IL-12 / 23 p40 中和抗体 (ウステキヌマブ) は、乾癬、強直性脊椎炎、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、アトピー性皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス及び全身性エリテマトーデスを含む幾つかの免疫媒介性疾患の治療について、臨床において評価されてきた。最も進歩した研究は、乾癬の治療に向けられた (例えば、Teng, M. et al. (2015) *Nature Medicine* 21 (7) : 719 - 29 を参照されたい)。

10

【0098】

IL-12 は、先天性及び適応性の免疫アームと、その強力な IFN 産生刺激とを相互連結させる能力のために、当初は、腫瘍免疫療法の理想的な候補であると考えられていた。実際、動物モデルにおける初期の研究結果は、がん治療剤としてのその潜在的用途を支持した。しかしながら、IL-12 が全身投与された臨床試験では、非常に狭い治療指数が得られ、有意に増加した血清サイトカイン (主として IFN 及び TNF) 及び自己免疫性肝炎の両方に起因した実質的な免疫関連毒性が生じた。総合すると、これらのサイトカインは、用量制限的な致死毒性及び毎日皮下投与で 0.3 μg / kg の IL-12 に対する最大耐容用量をもたらす (Bajetta, E., et al., Clin Cancer Res, 1998.4 (1) : p. 75 - 85; Motzer, R. J., et al., J Interferon Cytokine Res, 2001.21 (4) : p. 257 - 63; Cebon, J., et al., Cancer Immun, 2003.3 : p. 7; Younes, A., et al., Clin Cancer Res, 2004.10 (16) : p. 5432 - 8; 及び Ansell, S. M., et al., Blood, 2002.99 (1) : p. 67 - 74 を参照されたい)。結果として、腫瘍学の状況における IL-12 の全身投与は、ほとんど実行不可能とみなされた。[例えば、Teng, M. et al. (2015) *Nature Medicine* 21 (7) : 719 - 29 参照]。

20

【0099】

IL-12 の抗腫瘍効果を利用し、かつその固有の欠点を回避する努力の中で、全身投与に対する代替アプローチが探求されてきた。IL-12 及び IL-10 を発現する自己不活性化腫瘍細胞は、結腸または乳房腫瘍及び肺転移を有するマウスにおいて有益な効果を誘導することが見出され ((Lopez et al. (2005) J Immuno 1175 : 5885 - 94)。この明らかな肯定的効果にもかかわらず、この 2005 年の研究の報告は、IL-10 / IL-12 の全身併用療法を探索するための共同の努力をもたらさなかつたが、これはおそらく、臨床現場において IL-12 で以前経験した毒性問題によると思われる。上記で述べたように、観察された IL-12 関連毒性には、インフルエンザ様症状 (例えば、頭痛、発熱、悪寒、疲労及び関節痛)、好中球減少症及び血小板減少症を含む血液学的毒性、並びにトランスマニナーゼの用量依存的増加、高ビリルビン血症、及び低アルブミン血症により現れる肝臓毒性が含まれる。他の IL-12 関連の副作用には、粘膜の炎症 (例えば、口腔粘膜炎、口内炎及び大腸炎)、低血圧、腎障害及び胃腸出血が含まれる。これらの毒作用は、IFN 及び TNF 並びに他のサイトカイン (例えば、IP-10 及び MIG) の二次的産生に関連している (例えば、Lasiek, et al. (2014) *Cancer Immunol Immunother* 63 : 419 - 35; Xu, et al. *Clinical and Developmental Immunology*, volume 2010, Article ID 50

30

40

50

832454, 9 pp.) ; Cebon, J., et al., Cancer Immun, 2003.3 : p. 7を参照されたい)。

【0100】

腫瘍学におけるIL-12の潜在的有用性を活用するための最近の努力は、異なる方向性で必要とされる。IL-12が、例えば、がんワクチンにおいて、IL-12プラスミドの局所的な注射を含む遺伝子治療において、及び腫瘍標的化免疫サイトカインの形態において、アジュバントとして適用される臨床研究が開始されている。他の戦略には、Treg細胞枯渇抗体（例えば、抗CD25抗体）、免疫抑制シグナル（例えば、CTLA-4）に対する抗体、及び抗がん剤との同時投与が含まれる（例えば、Lasek, et al. (2014) Cancer Immunol Immunother 63 : 419 - 35 ; Xu, et al. Clinical and Developmental Immunology, volume 2010, Article ID 832454, 9 pp. を参照されたい）。これらのアプローチは、腫瘍学会が、IL-10 / IL-12の全身的併用療法は困難であると結論付けていることを更に明らかにしている。

【0101】

IL-10及びIL-12の同時投与

PEG-IL-10及びIL-12の組み合わせは、少なくとも相加的な、おそらくは相乗的な抗腫瘍効果を示すと考えられる。しかし、IL-12の単独療法で観察された毒性は、これまでヒト被験者におけるそのような併用療法の探索を制限してきた。特に、IL-12は強力な免疫刺激性生物学を示し、これはその最大許容用量（0.5 ~ 1.25 μg / kgと記載されている；Cebon, J., et al., Cancer Immun, 2003.3 : p. 7 参照）をその最大有効投与量よりも低い量に制限する。この現象の根底にあるメカニズムの理解は本開示を実施するために必要ではないが、それは、抗原非特異的なナイーブCD4+及びCD8+T細胞並びに抗原特異的CD4+及びCD8+T細胞の両方、並びにNK細胞のIL-12による活性化に起因すると思われる。IL-12は、抗原特異的及び抗原非特異的の両方である広範囲の免疫刺激を示すが、PEG-IL-10曝露は、CD8+T細胞の抗原特異的集団を活性化するのみである。以下に示すように、PEG-IL-10は、組み合わされた場合、IL-12の非抗原特異的免疫刺激を制限して、IL-12の免疫刺激効果を、免疫系の抗原特異的な適応性CD8+T細胞アームに集中させるようである。

【0102】

IL-12の免疫刺激応答は、部分的には、IFN及びこれら細胞からのTNF分泌の誘導を含み、この血清IFNの上昇及び程度が少ない血清TNFの上昇は、免疫関連毒性の発症と相關する。PEG-IL-10治療はまた、血清IFNレベルの上昇を導くが、1日5 ~ 40 μg / kgの範囲の皮下投与用量で得られる治療効果に起因して、そのMTDは確立されていない。

【0103】

実験の項で詳細に記載するように、マウス4T1腫瘍モデルでの腫瘍サイズに対するPEG-IL-10及びIL-12の組み合わせ効果を評価した。図2に示すように、PEG-rMuIL-10及びrMuIL-12の組み合わせの投与は、いずれかの薬剤単独の投与後に観察されるものよりも、腫瘍重量のより大きな減少をもたらした。これらのデータは、併用療法の有益な抗腫瘍効果を表している。

【0104】

次に、4T1腫瘍を有するマウスにおいて、単独または組み合わせでのPEG-rMuIL-10及びrMuIL-12により誘導された、IFN及びTNFの血清レベルを評価した。データは、PEG-rMuIL-10及びrMuIL-12の両方への曝露は、血清IFN及びTNFの誘導を個別に導くことを示す。驚くべきことに、組み合わせたとき、IL-12及びPEG-rMuIL-10の投与は、IFN（図3A）及びTNF（図3B）の血清レベルの低下をもたらした。特に、IL-12及びPEG-

10

20

30

40

50

r Mu IL - 10 の併用曝露は、IL - 12 単独より有意に低い血清 IFN を示した。本開示の特定の実施形態では、PEG - IL - 10 を使用して、IL - 12 を解毒するために、IL - 12 治療によって誘導される血清サイトカイン (IFN 及び TNF) のレベルを低下させる一方で、2つの薬剤と一緒に投与する抗腫瘍効果を同時に高めることを含む。

【0105】

上記のように、免疫腫瘍学的背景における IL - 10 及び IL - 12 の組み合わせに関する最近の報告は、潜在的な相乗的抗腫瘍機能を報告しているが、このような組み合わせ療法による IL - 12 媒介毒性の潜在的抑制の開示は存在しない。従って、IL - 12 及び PEG - IL - 10 の組み合わせが、(IL - 12 単独療法後に観察されるものと比較して) 血清 IFN における有意な減少に示されるように、IL - 12 関連毒性の抑制をもたらすとの本明細書に報告されたデータ及び他の所見は、驚くべき予想外のものであった。

10

【0106】

血清濃度

本明細書に記載の方法における IL - 10 の血漿レベルは、下記を含む幾つかの方法で特徴付けすることができる。即ち、(1) 特定のレベルを上回る、またはある範囲のレベルを上回る平均 IL - 10 血清トラフ濃度、(2) ある程度の時間に亘って特定のレベルを上回る平均 IL - 10 血清トラフ濃度、(3) ある特定のレベルを上回るかまたは下回る定常状態の IL - 10 血清濃度レベル、またはあるレベル範囲内の IL - 10 血清濃度レベル、(4) 特定のレベルを上回るかまたは下回る、またはあるレベル範囲内の濃度プロファイルの C_{max} である。本明細書に記載されるように、平均血清トラフ IL - 10 濃度は、一定の適応症での有効性のために特に重要であることが見出されている。IL - 12 の血漿レベルも同様の方法で特徴付けすることができる。

20

【0107】

上述したように、所望の IL - 10 血清トラフ濃度は、疾患、障害または病態の性質 (例えば、局在化腫瘍または転移性疾患)、被験体が疾患に罹患している程度 (例えば、疾患の初期対後期)、併用療法が実施されているかどうか、及び患者に特異的なパラメータ (例えば、肝臓機能及び腎機能) を含む多くの因子に依存し得る。例としては、PEG - IL - 10 及び化学療法剤の同時投与は、臨床上の利益を観察するためには約 1 ~ 2 ng / mL の範囲の血清トラフしか必要としないのに対して、転移性がんでは同等の臨床的利益を達成するために 6 ~ 10 ng / mL 以上を必要とし得る。

30

【0108】

本開示の特定の実施形態において、前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、少なくとも 6.0 ng / mL、少なくとも 7.0 ng / mL、少なくとも 8.0 ng / mL、及び少なくとも 9.0 ng / mL であり、少なくとも 10.0 ng / mL、少なくとも 11.0 ng / mL、少なくとも 12.0 ng / mL、少なくとも 13.0 ng / mL、少なくとも 14.0 ng / mL、少なくとも 15.0 ng / mL、少なくとも 16.0 ng / mL、少なくとも 17.0 ng / mL、少なくとも 18.0 ng / mL、少なくとも 19.0 ng / mL、少なくとも 20.0 ng / mL、少なくとも 21.0 ng / mL、少なくとも 22.0 ng / mL、または 22.0 ng / mL 超である。

40

【0109】

他の特定の実施形態において、前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、少なくとも 1.0 ng / mL、少なくとも 1.5 ng / mL、少なくとも 2.0 ng / mL、少なくとも 2.5 ng / mL、少なくとも 3.0 ng / mL、少なくとも 3.5 ng / mL、少なくとも 4.0 ng / mL、少なくとも 4.5 ng / mL、少なくとも 5.0 ng / mL、少なくとも 5.5 ng / mL、少なくとも 6.0 ng / mL、少なくとも 6.5 ng / mL、または 7 ng / mL 超である。

【0110】

更なる実施形態において、前記期間は、少なくとも 12 時間、少なくとも 24 時間、少

50

なくとも 48 時間、少なくとも 72 時間、少なくとも 1 週間、少なくとも 2 週間、少なくとも 3 週間、少なくとも 1 月間である、少なくとも 6 週間、少なくとも 2 月、少なくとも 3 月、または 3 月超である。

【0111】

本開示の特定の実施形態において、前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、前記期間の少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、または 100% の間維持される。

【0112】

本開示のなお更なる実施形態において、產生され得る血漿及び／または血清レベルの濃度プロファイルには、約 1.0 pg / mL 超、約 10.0 pg / mL 超、約 20.0 pg / mL 超、約 30 pg / mL 超、約 40 pg / mL 超、約 50.0 pg / mL 超、約 60.0 pg / mL 超、約 70.0 pg / mL 超、約 80 pg / mL 超、約 90 pg / mL 超、約 0.1 ng / mL 超、約 0.2 ng / mL 超、約 0.3 ng / mL 超、約 0.4 ng / 約 0.5 ng / mL 超、約 0.6 ng / mL 超、約 0.7 ng / mL 超、約 0.8 ng / mL 超、約 0.9 ng / mL 超、約 1.0 ng / mL 超、約 1.5 ng / mL 超、約 2.0 ng / mL 超、約 2.5 ng / mL 超、約 3.0 ng / mL 超、約 3.5 ng / mL 超、約 4.0 ng / mL 超、約 4.5 ng / mL 超、約 5.0 ng / mL 超、約 5.5 ng / mL 超、約 6.0 ng / mL 超、約 6.5 ng / mL 超、約 7.0 ng / mL 超、約 7.5 ng / mL 超、約 8.0 超約 8.5 ng / mL 超、約 9.0 ng / mL 超、約 9.5 ng / mL 超、または約 10.0 ng / mL 超の平均 IL - 10 血漿及び／または血清トラフ濃度が含まれる。
10
20

【0113】

本開示の特定の実施形態において、平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、1.0 pg / mL ~ 10 ng / mL の範囲である。幾つかの実施形態において、前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、1.0 pg / mL ~ 100 pg / mL の範囲である。他の実施形態において、前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、0.1 ng / mL ~ 1.0 ng / mL の範囲である。更に別の実施形態において、前記平均 IL - 10 血清トラフ濃度は、1.0 ng / mL ~ 10 ng / mL の範囲である。本開示は、そのような範囲が明示的に列挙されていなくても、本明細書に記載された範囲に包含される如何なる濃度も取り込んだ範囲を想定していることが理解されるべきである。例として、一実施形態における前記平均血清 IL - 10 濃度は、0.5 ng / mL ~ 5 ng / mL の範囲であることができる。更なる例として、本開示の特定の実施形態は、約 0.5 ng / mL ~ 約 10.5 ng / mL、約 1.0 ng / mL ~ 約 10.0 ng / mL、約 1.0 ng / mL ~ 約 9.0 ng / mL、約 1.0 ng / mL ~ 約 8.0 ng / mL、約 1.0 ng / mL ~ 約 7.0 ng / mL、約 1.5 ng / mL ~ 約 10.0 ng / mL、約 1.5 ng / mL ~ 約 9.0 ng / mL、約 1.5 ng / mL ~ 約 8.0 ng / mL、約 1.5 ng / mL ~ 約 7.0 ng / mL、約 2.0 ng / mL ~ 約 10.0 ng / mL、約 2.0 ng / mL ~ 約 9.0 ng / mL、約 2.0 ng / mL ~ 約 8.0 ng / mL、及び約 2.0 ng / mL ~ 約 7.0 ng / mL の範囲の平均 IL - 10 血清トラフ濃度を含んでいる。
30

【0114】

特定の実施形態では、1 ~ 2 ng / mL の平均 IL - 10 血清トラフ濃度が、治療期間に亘って維持される。本開示はまた、平均 IL - 10 血清ピーク濃度が治療期間に亘って約 10.0 ng / mL 以下である実施形態を想定している。更なる実施形態は、約 10.0 ng / mL 以上の平均 IL - 10 血清トラフ濃度を想定する。最適平均血清濃度は一般に、望ましくない有害作用を導入することなく、所望の治療効果が達成される平均血清濃度である。
40

【0115】

本開示の一定の実施形態は、IL - 10 療法を受けている被験体をモニターして、副作用を予測し、潜在的にはこれを回避するための方法を提供するものであり、この方法は、(1) 被験体の IL - 10 のピーク濃度を測定することと、(2) 被験体の IL - 10 の

10

20

30

40

50

トラフ濃度を測定することと、(3)ピーク・トラフ変動を計算することと、(4)この計算されたピーク・トラフ変動を用いて被験者における潜在的な有害作用を予測することを含む。特定の被験者集団において、ピーク・トラフの変動が小さいことは、被験者がIL-10関連の有害作用を経験する確率が低いことを示す。加えて、幾つかの実施形態においては、特定の疾患、障害及び病態の治療のための特定のピーク・トラフ変動が決定され、これらの変動が参照標準として使用される。

【0116】

大多数の薬物について、血漿薬物濃度は多次指數関数様式で低下する。静脈内投与の直後に、薬物は初期空間（血漿体積として最小限に定義される）の全体に迅速に分布し、次いで、血管外空間（例えば、一定の組織）へのより緩慢な平衡分布が生じる。静脈内IL-10投与は、このような2区画動態モデルに関連する（Rachmawati, H. et al. (2004) Pharm. Res. 21(11): 2072-78を参照のこと）。皮下組換えhIL-10の薬物動態も研究されている（Radwanski, E. et al. (1998) Pharm. Res. 15(12): 1895-1901）。従って、適切なIL-10投薬関連パラメーターを評価するときには、分布容積の考慮が関係する。更に、IL-10剤を特定の細胞型にターゲッティングする努力が探求されており（例えば、Rachmawati, H. (May 2007) Drug Met. Dist. 35(5): 814-21を参照されたい）、IL-10の薬物動態学及び投薬原理の活用は、そのような努力の成功にとって非常に貴重であることを証明することができる。10

【0117】

本開示は、上記のIL-10血清トラフ濃度の維持をもたらす任意の用量の投与及び投与計画を想定している。限定的でない例として、被験体がヒトである場合、非ペグ化hIL-10は、0.5 μg / kg / 日超、1.0 μg / kg / 日超、2.5 μg / kg / 日超、5 μg / kg / 日超、7.5 μg / kg 超、10.0 μg / kg 超、12.5 μg / kg 超、15 μg / kg / 日超、17.5 μg / kg 超、20 μg / kg / 日超、22.5 μg / kg / 日超、25 μg / kg / 日超、30 μg / kg / 日超、または35 μg / kg / 日超の用量で投与することができる。加えて、被験体がヒトである場合、限定的でない例として、比較的小さいPEGを含むペグ化hIL-10（例えば、5 kDaのモノジ-PEG-hIL-10）は、0.5 μg / kg / 日超、0.75 μg / kg / 日超、1.0 μg / kg / 日超、1.25 μg / kg / 日超、1.5 μg / kg / 日超、1.75 μg / kg / 日超、2.0 μg / kg / 日超、2.25 μg / kg / 日超、2.5 μg / kg / 日超、2.75 μg / kg / 日超、3.0 μg / kg / 日超、3.25 μg / kg / 日超、3.5 μg / kg / 日超、3.75 μg / kg / 日超、4.0 μg / kg / 日超、4.25 μg / kg / 日超、4.5 μg / kg / 日超、4.75 μg / kg / 日超、または5.0 μg / kg / 日超の用量で投与することができる。20

【0118】

当業者（例えば、薬理学者）は、PEG-IL-10がIL-12剤と組み合わせて投与される場合の最適な投与計画を決定することができる。一例として、幾つかの実施形態において、最適なPEG-IL-10投与計画は、1回の服用で投与されるPEG-IL-10の量の低減を必要とする可能性がある（例えば、1.0 μg / kg / 日未満、0.75 μg / kg / 日未満、0.5 μg / kg / 日未満、0.25 μg / kg / 日未満、または0.125 μg / kg / 日未満）。本開示の特定の例示的実施形態において、平均IL-10血清トラフ濃度は、約0.1 ng / mL ~ 約9.5 ng / mL、約0.25 ng / mL ~ 約8.0 ng / mL、約0.5 ng / mL ~ 約7.0 ng / mL、約0.75 ng / mL ~ 約6.0 ng / mL、または約1.0 ng / mL ~ 約5.0 ng / mLの範囲であり得る。30

【0119】

本開示は、血清濃度がピークに達するようにIL-12剤を投与し、次いで、それが再投与の前に本質的に測定不可能なまでクリアされるように投与することを想定している。40

10

20

30

40

50

例として、PEG - IL - 10 を 24 時間毎に投与して、約 10 ng / mL の血清トラフ濃度を維持する場合、IL - 12 剤は、そのMTDよりも低いピークを生じた後に代謝されて、24 時間の投与サイクルの終わりには測定可能な血清レベルが存在しなくなるような量 (5 µg / kg / 日) で同時投与される。PEG - IL - 10 との投与に際して、IL - 12 剤の用量は、疾患、障害または病態の性質 (例えば、局在化腫瘍または転移性疾患)、被験体が疾患に罹患している程度 (例えば、疾患の初期対後期)、併用療法が実施されているかどうか、及び患者特異的パラメータ (例えば、肝機能及び腎機能) を含む多くの因子に依存し得る。

【0120】

PEG - IL - 10 が、本明細書に記載のような IL - 12 剤と組み合わせて投与される場合、単剤療法に適用可能な PEG - IL - 10 の 1 以上の投与パラメーターは修飾できる一方、単剤療法に適用可能な IL - 12 剤の投与パラメーターは同じままであることができ ; 単剤療法に適用可能な PEG - IL - 10 の 1 以上の投与パラメーターは同じままであることができるのに対して、単独療法に適用可能な IL - 12 剤の 1 以上の投与パラメーターは改変されることができ ; 単独療法に適用可能な PEG - IL - 10 及び IL - 12 剤の投薬パラメーターの 1 以上は改変することができ ; または PEG - IL - 10 及び IL - 12 剤の各々の投薬パラメーターは同じまとまとすることができる。

10

【0121】

IL - 10 の產生方法

本開示のポリペプチドは、非組換え (例えば、化学合成) 及び組換え方法を含む任意の適切な方法によって產生することができる。

20

【0122】

A. 化学合成

ポリペプチドが化学的に合成される場合、この合成は液相または固相を介して進行することができる。固相ペプチド合成 (SPPS) は、非天然アミノ酸及び / またはペプチド / タンパク質主鎖修飾の組み込みを可能にする。本開示のポリペプチドを合成するには、9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 及び t - プチルオキシカルボニル (Boc) 等の様々な形態の SPPS が利用可能である。化学合成の詳細は当技術分野で既知である (例えば Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6 : 3 - 10 ; 及び Camarero J. A. et al., (2005) Protein Pept. Lett. 12 : 723 - 8)。

30

【0123】

固相ペプチド合成は、以下の記載のように実施することができる。アルファ官能基 (N) 及び任意の反応性側鎖を、酸不安定基または塩基不安定基で保護する。保護基は、アミド結合を連結する条件下では安定であるが、形成されたペプチド鎖を損なうことなく容易に開裂することができる。アミノ官能基に適した保護基としては、これらに限定されないが、Boc、ベンジルオキシカルボニル (Z)、O - クロロベンジルオキシカルボニル、ビフェニルイソプロピルオキシカルボニル、tert - アミルオキシカルボニル (Amoc) 、 , -ジメチル - 3 , 5 - ジメトキシベンジルオキシカルボニル、o - ニトロスルフェニル、2 - シアノ - t - プトキシ - カルボニル、Fmoc、1 - (4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソシクロヘキサ (dioxylohex) - 1 - イリデン) エチル (Dde) が挙げられる。

40

【0124】

好適な側鎖保護基としては、これらに限定されないが、アセチル、アリル (Allyl) 、アリルオキシカルボニル (Allo) 、ベンジル (Bzl) 、ベンジルオキシカルボニル (Z) 、t - プチロキシカルボニル (Boc) 、ベンジルオキシメチル (Bom) 、o - プロモベンジルオキシカルボニル、t - プチル (tBu) 、t - プチルジメチルシリル、2 - クロロベンジル、2 - クロロベンジルオキシカルボニル、2 , 6 - ジクロロベンジル、シクロヘキシリ、シクロペンチル、1 - (4 , 4 - ジメチル - 2 , 6 - ジオキソシクロヘキサ - 1 - イリデン) エチル (Dde) 、イソプロピル、4 - メトキシ - 2 , 3 - 6

50

- トリメチルベンジルスルホニル (Mtr)、2,3,5,7,8-ペニタメチルクロマン-6-スルホニル (Pmc)、ピバリル、テトラヒドロピラン-2-イル、トシリ (Tos)、2,4,6-トリメトキシベンジル、トリメチルシリル、及びトリチル (Trt) が挙げられる。

【0125】

固相合成では、C末端アミノ酸が好適な支持物質に連結される。好適な支持物質は、合成プロセスの段階的な縮合及び開裂反応のための試薬及び反応条件に対して不活性であり、使用される反応媒に溶解しないものである。市販の支持物質の例としては、反応性基及び/またはポリエチレングリコールで改質されたスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー；クロロメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマー；ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化スチレン/ジビニルベンゼンコポリマーなどが挙げられる。ペプチド酸の調製が望まれる場合、4-ベンジルオキシベンジル-アルコール (Wang アンカー) または2-クロロトリチルクロリドで誘導体化した、ポリスチレン (1%) - ジビニルベンゼンまたはTentagel (登録商標) を使用することができる。ペプチドアミドの場合、5-(4'-アミノメチル)-3',5'-ジメトキシフェノキシ) 吉草酸 (PAL アンカー) またはp-(2,4-ジメトキシフェニル-アミノメチル)-フェノキシ基 (Rink アミドアンカー) で誘導体化した、ポリスチレン (1%) ジビニルベンゼンまたはTentagel (登録商標) を使用することができる。

10

【0126】

ポリマー支持体への結合は、エタノール、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドン、または類似の溶媒に活性化試薬を添加し、室温または高温(例えば、40 ~ 60)にて、例えば2~72時間の反応時間で、C末端Fmoc保護アミノ酸を支持物質と反応させることにより達成することができる。

20

【0127】

N-保護アミノ酸(例えば、Fmocアミノ酸)のPAL、Wang、またはRink アンカーへの結合は、例えば、N,N'-ジシクロヘキシカルボジイミド (DCC)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIC) またはその他のカルボジイミド、2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (TB TU) または他のウロニウム塩、O-アシル尿素、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス-ピロリジノ-ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (PyBOP) または他のホスホニウム塩、N-ヒドロキシスクシンイミド、その他のN-ヒドロキシイミドまたはオキシム等のカップリング試薬を使用して、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたは1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールの存在下または不在下において、例えば、HOBTを添加したTB TUを使用して、例えば、ジイソプロピルエチルアミン (DEA)、トリエチルアミン、またはN-メチルモルホリン、例えばジイソプロピルエチルアミン等の塩基を添加してまたは添加せずに、2~72時間の反応時間で(例えば、1.5~3倍過剰、例えば2倍過剰のアミノ酸及びカップリング試薬で3時間、約10 ~ 50 の温度、例えば25 度、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、またはジクロロメタン等の溶媒、例えばジメチルホルムアミド中にて)実施することができる。

30

【0128】

カップリング試薬の代わりに、上記条件下において、活性エステル(例えば、ペンタフルオロフェニル、p-ニトロフェニルなど)、N-Fmoc-アミノ酸の対称無水物、その酸塩化物または酸フッ化物を使用することも可能である。

40

【0129】

N-保護アミノ酸(例えば、Fmocアミノ酸)を、DEAを添加して10~120分、例えば20分の反応時間をかけて、ジクロロメタン中で2-クロロトリチル樹脂に結合させることができるが、使用するのはこの溶媒及びこの塩基に限定されない。

【0130】

50

保護アミノ酸の連続カップリングは、ペプチド合成の従来法に従って、通常は自動化ペプチドシンセサイザーで実施することができる。例えば、ジメチルホルムアミド中のピペリジン(10%～50%)による5～20分間の処理、例えば、DMF中の50%ピペリジンによる2分2回の処理、及びDMF中の20%ピペリジンによる15分1回の処理によって、固相に結合されたアミノ酸のN-Fmoc保護基を切断後、3～10倍過剰、例えば10倍過剰の次の保護アミノ酸を、ジクロロメタン、DMF、またはその2つの混合物等の不活性な非水溶性の極性溶媒中で、約10～50の温度、例えば25

度先のアミノ酸と結合させる。最初のN-Fmocアミノ酸をPAL、Wang、またはRinkアンカーに結合するには前述の試薬がカップリング試薬として好適である。また保護アミノ酸の活性エステル、またはその塩化物もしくはフッ化物もしくは対称無水物を代わりに使用することもできる。

10

20

30

40

50

【0131】

固相合成の終了時に、ペプチドを支持物質から切断すると同時に側鎖保護基が切断される。ジメチルスルフィド、エチルメチルスルフィド、チオアニソール、チオクレゾール、m-クレゾール、アニソールエタンジチオール、フェノール、または水等の、5%～20%V/Vのスカベンジャー、例えば15%V/Vのジメチルスルフィド/エタンジチオール/m-クレゾール1:1:1を添加した、トリフルオロ酢酸または他の強い酸性溶媒により、0.5～3時間、例えば2時間以内で切断を実施することができる。冰酢酸/トリフルオロエタノール/ジクロロメタン2:2:6で2-クロロトリチルアンカーを切断することにより、完全に保護された側鎖を有するペプチドが得られる。保護ペプチドは、シリカゲルクロマトグラフィーによって精製することができる。ペプチドがWangアンカーを介して固相に結合されている場合、かつて末端アルキルアミド化によりペプチドを得ることを目的とする場合、アルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンによるアミノ分解によって切断を実施することができる。アミノ分解は、約-10～50(例えば、約25)の温度、約12～24時間(例えば、約18時間)の反応時間で実施される。加えて、例えばメタノールによる再エステル化によって、ペプチドを支持体から切断することができる。

【0132】

得られる酸性溶液を、3～20倍量の冷却エーテルまたはn-ヘキサン、例えば10倍過剰のジエチルエーテルと混合すると、ペプチドが沈殿し、それによりエーテルに残存するスカベンジャー及び切断された保護基を分離することができる。冰酢酸から数回ペプチドを再沈殿させることによって、更に精製を実施することができる。得られる沈殿物を、水もしくはtert-ブタノール、またはこの2つの溶媒の混合物、例えばtert-ブタノール/水の1:1の混合物中に溶解し、凍結乾燥することができる。

【0133】

得られたペプチドは、種々のクロマトグラフ法により精製することができ、この方法として、酢酸塩形態の弱塩基性樹脂でのイオン交換；非誘導体化ポリスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー(例えば、Amberlite(登録商標)XAD)での疎水性吸着クロマトグラフィー；シリカゲルでの吸着クロマトグラフィー；例えばカルボキシメチルセルロースでのイオン交換クロマトグラフィー；例えばSephadex(登録商標)G-25での分配クロマトグラフィー；向流分配クロマトグラフィー；または高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)、例えばオクチルもしくはオクタデシルシリルシリカ(ODS)相での逆相HPLCが挙げられる。

【0134】

B. 組換え產生

ヒト及びマウスIL-10の調製を示した方法は、例えば、米国特許第5,231,012号で参照することができ、これには、組換え及びその他の合成技術を含む、IL-10活性を有するタンパク質の产生方法が教示されている。IL-10はウイルス起源であってもよく、エピスタインバーウィルス(BCRF1タンパク質)からのウイルスIL-10のクローニング及び発現が、Moore et al., (1990) Science

e 248:1230に開示されている。IL-10は、本明細書に記載されたもの等の当技術分野で既知の標準技術を使用した複数の方法で得ることができる。また、組換えヒトIL-10が、例えばProTech, Inc., Rocky Hill, N.J.から市販されている。

【0135】

組換え技術を使用してポリペプチドを產生する場合、任意の好適な構築物及び任意の好適な宿主細胞を使用して、細胞内タンパク質または分泌タンパク質としてポリペプチドを产生することができ、この場合の宿主細胞は原核細胞または真核細胞であってよく、それぞれ細菌（例えば、E. coli）または酵母宿主細胞などであり得る。宿主細胞として使用することができる他の真核細胞の例としては、昆虫細胞、哺乳動物細胞、及び／または植物細胞が挙げられる。哺乳動物宿主細胞を使用する場合、宿主細胞には、ヒト細胞（例えば、HeLa、293、H9、及びJurkat細胞）、マウス細胞（例えば、NIH3T3、L細胞、及びC127細胞）、靈長類細胞（例えば、Cos1、Cos7、及びCV1）、及びハムスター細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）を含み得る。

10

【0136】

ポリペプチドの発現に適した様々な宿主-ベクター系を、当技術分野で既知の標準的手順に従って使用することができる。例えば、Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York；及びAusubel et al. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sonsを参照のこと。宿主細胞への遺伝物質の導入方法としては、例えば形質転換、エレクトロポレーション、コンジュゲート、リン酸カルシウム法などが挙げられる。導入されたポリペプチドをコードする核酸の安定的な発現が得られるように、転写方法を選択することができる。ポリペプチドをコードする核酸は、遺伝性エピソーム成分（例えばプラスミド）として得ることも、またはゲノムに組み込むこともできる。目的のポリペプチドの產生に使用される種々の適切なベクターが市販されている。

20

【0137】

ベクターは、宿主細胞における染色体外での維持を提供することも、または宿主細胞ゲノムへの組み込みを提供することもできる。発現ベクターは転写及び翻訳調節配列を提供し、誘導的または構成的発現を提供することができ、そのコード領域は、転写開始領域並びに転写及び翻訳終結領域の転写制御下で機能的に連結される。一般に、転写及び翻訳調節配列には、限定するものではないが、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始及び終止配列、翻訳開始及び終止配列、並びにエンハンサーまたはアクチベーター配列を含み得る。プロモーターは構成的であっても誘導的であってもよく、強力な構成的プロモーターであってもよい（例えば、T7）。

30

【0138】

発現構築物は一般に、プロモーター配列の近くに位置する利便な制限部位を有しており、これを利用して目的のタンパク質をコードする核酸配列が挿入される。ベクターを含む細胞の選択を容易にするために、発現宿主中で機能する選択マーカーが存在する場合もある。更に、発現構築物は追加要素を含むことができる。例えば、発現ベクターは1つまたは2つの複製系を有することができ、これにより例えば発現には哺乳動物または昆虫細胞、クローニング及び増幅には原核生物宿主といった、複数の生物体でベクターを維持することができる。加えて、発現構築物には、形質転換された宿主細胞を選別するよう、選択マーカー遺伝子を含むことができる。選択遺伝子は当技術分野において周知であり、使用する宿主細胞によって決定する。

40

【0139】

タンパク質の単離及び精製は、当技術分野で既知の方法によって達成することができる。例えば、構成的に及び／または誘導時にタンパク質を発現するように遺伝子改変した細

50

胞溶解物から、またはイムノアフィニティー精製による合成反応混合物から、タンパク質を単離することができるが、イムノアフィニティー精製には一般に、サンプルを抗タンパク質抗体に接触させること、洗浄して非特異的結合物質を除去すること、及び特異的結合タンパク質を溶出させることを伴う。単離したタンパク質を更に、透析、及びタンパク質精製に通常使用されるその他の方法によって精製することができる。一実施形態では、タンパク質は、金属キレートクロマトグラフィー法を用いて単離することができる。タンパク質は、単離を促進するために修飾を含むことができる。

【0140】

ポリペプチドは、実質的に純粋なまたは単離された形態（例えば、他のポリペプチドを含まない）で調製することができる。存在し得る他の成分（例えば、他のポリペプチドまたは他の宿主細胞成分）と比較して、そのポリペプチドが濃縮された組成物にポリペプチドが存在する場合もある。例えば、他の発現タンパク質が実質的に含まれない、例えば、約90%未満、約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満、または約1%未満である組成物中にポリペプチドが存在するように精製されたポリペプチドを得ることができる。

10

【0141】

当技術分野で既知の異なるIL-10関連核酸を操作する組換え技術を使用して、IL-10ポリペプチドを生成し、IL-10ポリペプチドをコードすることができる構築物を提供することができる。特定のアミノ酸配列を提供する場合に、当業者は、例えば分子生物学に関する背景知識及び経験から判断して、そのようなアミノ酸配列をコードする様々な異なる核酸分子を認識することができるであろう。

20

【0142】

アミド結合置換

場合によって、IL-10には、ペプチド結合以外の1以上の結合が含まれ、例えば少なくとも2つの隣接するアミノ酸がアミド結合以外の結合を介して連結される。例えば、望ましくないタンパク質分解またはその他の手段による分解を減少または消失させるため、及び／または血清安定性を増加させるため、及び／または立体配座の柔軟性を制限するまたは増加させるために、IL-10の骨格内の1つ以上のアミド結合を置換することができる。

30

【0143】

別の例では、IL-10の1つ以上のアミド結合（-CO-NH-）を、-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-（シス及びトランス）、-COC_H₂-、-CH(OH)CH₂-、または-CH₂SO-等の、アミド結合の等価体である結合で置換することができる。IL-10の1つ以上のアミド結合を、例えば還元等価体の偽ペプチド結合で置換することができる。Couder et al. (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41: 181-184を参照。そのような置換及びそれを生じさせる方法は、当業者に既知である。

【0144】

アミノ酸置換

IL-10ポリペプチドに1つ以上のアミノ酸置換を施すことができる。以下は非限定的な例である。

40

【0145】

a) 分枝鎖、環式、及び直鎖のアルキル、アルケニル、またはアルキニル置換を含むC₁～C₁₀炭素の脂肪族側鎖によって置換された、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、ノルロイシン、(S)-2-アミノ酪酸、(S)-シクロヘキシリアルアラニン、またはその他の基本アルファアミノ酸を含む、アルキル置換疎水性アミノ酸の置換。

【0146】

b) フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、スルホチロシン、ビフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-ベンゾチエニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、ヒスチジンを含む、上記の芳香族アミノ酸のアミノ、アルキ

50

ルアミノ、ジアルキルアミノ、アザ、ハロゲン化（フルオロ、クロル、ブロモ、またはヨード）、またはアルコキシ（C₁～C₄由来）-置換形態を含む、芳香族置換疎水性アミノ酸の置換。その例示的な例は、2-、3-、または4-アミノフェニルアラニン、2-、3-、または4-クロロフェニルアラニン、2-、3-、または4-メチルフェニルアラニン、2-、3-、または4-メトキシフェニルアラニン、5-アミノ-、5-クロロ-、5-メチル-、または5-メトキシトリプトファン、2'-、3'-、もしくは4'-、アミノ-、2'-、3'-、もしくは4'-クロロ-、2、3、または4-ビフェニルアラニン、2'-、3'-、もしくは4'-メチル-、2-、3-、または4-ビフェニルアラニン、及び2-または3-ピリジルアラニンである。

【0147】

c) アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、2，3-ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニンを含む、先のアミノ酸のアルキル、アルケニル、またはアリール置換（C₁～C₁₀分枝鎖、直鎖、または環式）誘導体を含む、塩基性側鎖をもつアミノ酸の置換。この場合の置換基は、例えばp r o - R配置において、ヘテロ原子（アルファ窒素、または遠位の窒素（複数可）など）にあるかアルファ炭素にあるかを問わない。例示的な例として提供される化合物として、N-イブソロン-イソプロピル-リジン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-グリシン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-アラニン、N,N-ガンマ、ガンマ'-ジエチル-ホモアルギニンが挙げられる。また、アルファ-メチル-アルギニン、アルファ-メチル-2，3-ジアミノプロピオン酸、アルファ-メチル-ヒスチジン、アルファ-メチル-オルニチン等の化合物が挙げられ、この場合のアルキル基は、p r o - R配置のアルファ炭素を占有する。また以下に示す、アルキル、芳香族、複素環式芳香族（この場合の複素環式芳香族基は、1つ以上の窒素、酸素、または硫黄原子を単独でまたは組み合わせて有する）、カルボン酸、または酸塩化物、活性エステル、活性アゾリド、及び関連する誘導体等の多くの周知の活性誘導体のいずれか、並びにリジン、オルニチン、または2，3-ジアミノプロピオン酸から形成されるアミドが挙げられる。

【0148】

d) アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、チロシン、2，4-ジアミノブリオピオン酸のアルキル、アリール、アリールアルキル、及びヘテロアリールスルホニアミド、オルニチンまたはリジン、並びにテトラゾール置換アルキルアミノ酸を含む、酸性アミノ酸の置換。

【0149】

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

【0150】

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

【0151】

場合によって、I L - 10は、1つ以上の天然の非遺伝的にコードされたL-アミノ酸、合成L-アミノ酸、またはアミノ酸のD-エナンチオマーを含む。例えば、I L - 10はD-アミノ酸のみを含み得る。例えば、I L - 10ポリペプチドは、以下の1つ以上の残基を含み得る：ヒドロキシプロリン、-アラニン、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、m-アミノメチル安息香酸、2，3-ジアミノプロピオン酸、-アミノイソ酪酸、N-メチルグリシン（サルコシン）、オルニチン、シトルリン、t-ブチルアラニン、t-ブチルグリシン、N-メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシリアラニン、ノルロイシン、ナフチルアラニン、ピリジルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1，2，3，4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、-2-チエニルアラニ

10

20

30

40

50

ン、メチオニンスルホキシド、ホモアルギニン、N - アセチルリジン、2 , 4 - ジアミノ酪酸、- - アミノフェニルアラニン、N - メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン、- - アミノヘキサン酸、- - アミノヘキサン酸、- - アミノヘプタン酸、- - アミノオクタン酸、- - アミノデカン酸、- - アミノテトラデカン酸、シクロヘキシリアルアラニン、- - - ジアミノ酪酸、- - - ジアミノプロピオン酸、- - アミノ吉草酸、及び2 , 3 - ジアミノ酪酸。

【0152】

付加修飾

システイン残基またはシステイン類似体をIL - 10ポリペプチドに導入して、ジスルフィド結合により別のペプチドとの結合を生じさせる、またはIL - 10ポリペプチドの環化を生じさせることができる。システインまたはシステイン類似体の導入方法は、当技術分野で既知である。例えば米国特許第8 , 067 , 532号を参照のこと。

【0153】

IL - 10ポリペプチドは環化することができる。1つ以上のシステインまたはシステイン類似体をIL - 10ポリペプチドに導入することができ、導入されたシステインまたはシステイン類似体は、第2の導入されたシステインまたはシステイン類似体とジスルフィド結合を形成することができる。その他の環化手段として、オキシムリンカーまたはランチオニンリンカーの導入が挙げられる。例えば、米国特許第8 , 044 , 175号を参照のこと。環化結合を形成することができるアミノ酸（または非アミノ酸部分）の任意の組み合わせを使用及び／または導入することができる。環化結合は、架橋の導入を可能にする官能基をもつアミノ酸の任意の組み合わせ（またはアミノ酸と- (CH₂)_n - CO - または- (CH₂)_n - C₆H₄ - CO - ）によって形成することができる。幾つかの例は、ジスルフィド、ジスルフィド模倣体、例えば- (CH₂)_n - カルバ架橋、チオアセタール、チオエーテル架橋（シスタチオニンまたはランチオニン）、並びにエステル及びエーテルを含む架橋などである。これらの例において、nは任意の整数であり得るが、多くの場合10未満である。

【0154】

その他の修飾として、例えば、N - アルキル（またはアリール）置換（[CONR]）、またはラクタム及び他の環状構造を構成する骨格架橋が挙げられる。他の誘導体として、C末端ヒドロキシメチル誘導体、o - 修飾誘導体（例えば、C末端ヒドロキシメチルベンジルエーテル）、アルキルアミド及びヒドラジド等の置換アミドを含む、N末端修飾誘導体が挙げられる。

【0155】

幾つかの場合、IL - 10ポリペプチドの1つ以上のL - アミノ酸が1つ以上のD - アミノ酸で置換される。

【0156】

幾つかの場合、IL - 10ポリペプチドはレトロインベルソ類似体である（例えば、Selaa and Zisman (1997) FASEB J. 11 : 449を参照）。レトロインベルソペプチド類似体は、直鎖ポリペプチドの異性体であり、ポリペプチド内のアミノ酸配列の方向が逆転しており（レトロ型）、その中の1つ以上のアミノ酸のキラリティー、すなわちD - またはL - が反転しており（インベルソ型）、例えばL - アミノ酸ではなくD - アミノ酸が使用される（例えば、Jameson et al. (1994) Nature 368 : 744; and Brady et al. (1994) Nature 368 : 6920を参照のこと）。

【0157】

IL - 10ポリペプチドは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜、または小胞膜の透過を促進するポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物、または有機もしくは無機分子を指す、「タンパク質形質導入ドメイン」（PTD）を含み得る。別の分子に結合したPTDは、例えば、細胞外空間から細胞内空間への、またはサイトゾルからオルガネラ内への移動といった、分子の膜透過を促進する。幾つかの実施形態では、PTDはIL

10

20

30

40

50

- 10 ポリペプチドのアミノ末端に共有結合し、他の実施形態では、PTDはIL-10ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合される。例示的なタンパク質形質導入ドメインとしては、限定するものではないが、最小のウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン(Y G R K K R R Q R R R : 配列番号3を含むH I V - 1 T A Tの残基47 - 57に対応する) ; 細胞への直接導入に十分な複数のアルギニン残基を含むポリアルギニン配列(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、または10 ~ 50のアルギニン) ; VP22ドメイン(Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9 (6) : 489 - 96) ; Drosophila Antennapediaタンパク質形質導入ドメイン(Noguchi et al. (2003) Diabetologica 52 (7) : 1732 - 1737) ; 短縮ヒトカルシトニンペプチド(Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21 : 1248 - 1256) ; ポリリジン(Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 : 13003 - 13008) ; RRQRRTSKLMKR(配列番号4) ; トランスポータンGWTLN SAGYLLGKINLKALAA LAKKL(配列番号5) ; KALAWEAALKLAKALAKALAKHLAKALAKALAKLC(配列番号: 6) ; 及びRQIKIWFQNRRMKWKK(配列番号7)が挙げられる。例示的なPTDとしては、限定するものではないが、Y G R K K R R Q R R R(配列番号3)、R K K R R Q R R R(配列番号8) ; 3アルギニン残基 ~ 50アルギニン残基のアルギニンホモポリマーが挙げられ、例示的なPTDドメインアミノ酸配列には、限定するものではないが、以下のいずれかが含まれる : Y G R K K R R Q R R R(配列番号3) ; R K K R R Q R R(配列番号9) ; YARAAARQARA(配列番号10) ; THRLP R R R R R(配列番号11) ; 及びGGRRAR R R R R R(配列番号12)。

【0158】

IL-10ポリペプチドのC末端部のアミノ酸のカルボキシル基COR₃は、遊離形態(R₃=OH)、または、例えばナトリウム、カリウム、もしくはカルシウム塩等の、生理学的に許容されるアルカリ塩もしくはアルカリ土類塩の形態で存在し得る。またカルボキシル基は、例えば、メタノール、分枝または非分枝のC₁ ~ C₆アルキルアルコール、例えば、エチルアルコールまたはtert-ブタノール等の、一級、二級、または三級アルコールでエステル化することもできる。またカルボキシル基は、アンモニア、分枝もしくは非分枝のC₁ ~ C₆アルキルアミン、またはC₁ ~ C₆ジアルキルアミン、例えばメチルアミンまたはジメチルアミン等の、一級または二級アミンでアミド化することもできる。

【0159】

IL-10ポリペプチドのN末端にあるアミノ酸NR₁R₂のアミノ基は、遊離形態(R₁=H及びR₂=H)で、または、例えば塩化物もしくは酢酸塩等の生理学的に許容される塩の形態で存在し得る。またアミノ基は、R₁=H及びR₂=アセチルとなるような酸、トリフルオロアセチル、またはアダマンチルでアセチル化することもできる。アミノ基は、上記に示したもの(例えば、Fmoc、ベンジルオキシ-カルボニル(Z)、Boc、及びAlaoc)等の、ペプチド化学において従来使用されるアミノ保護基によって保護された形態で存在し得る。アミノ基をN-アルキル化することができ、この場合、R₁及び/またはR₂=C₁ ~ C₆アルキルまたはC₂ ~ C₈アルケニルまたはC₇ ~ C₉アラルキルである。アルキル残基は、直鎖、分枝鎖、または環式(例えば、それぞれエチル、イソプロピル、及びシクロヘキシル)であり得る。

【0160】

IL-10のPEG化

IL-10のPEG化には、IL-10ポリペプチド配列を様々な非タンパク質性ポリマー、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのいずれかにコンジュゲートまたは連結することが含まれる。これは多くの場合、タンパク質と非タンパク質性ポリマー(例えばPEG)の両方に共有結合す

10

20

30

40

50

る連結部分によって生じる。このようなPEGコンジュゲート生体分子は、良好な物理的及び熱的安定性、酵素分解による影響からの保護、溶解性の増加、in vivo血中半減期の延長及びクリアランスの低下、免疫原性及び抗原性の緩和、並びに毒性の緩和を含む、臨床的に有用な特性を有することが示されている。PEG化が薬物動態パラメーターに及ぼす有益な効果に加えて、PEG化自体が活性を増強することができる。例えば、PEG-IL-10は、非PEG化IL-10よりもある種のがんに対してより有効であることが示されている（例えば、EP206636A2を参照されたい）。

【0161】

ポリペプチド配列へのコンジュゲーションに適したPEGは一般に、室温で水に可溶性であり、一般式R(O-CH₂-CH₂)_nO-R（式中、Rは水素、またはアルキルもしくはアルカノール基等の保護基であり、nは1～1000の整数である）を有する。Rが保護基である場合、一般にそれは1～8個の炭素を有する。ポリペプチド配列にコンジュゲートされたPEGは、直鎖状であっても分枝状であってもよい。分枝状のPEG誘導体、「スターPEG」及びマルチアームPEGは、本開示によって企図される。本開示で使用されるPEGの分子量は、任意の特定の範囲に限定されない。例を本明細書で別記する。例として、ある特定の実施形態は5kDa～20kDaの分子量を有する一方、他の実施形態は4kDa～10kDaの分子量を有する。

10

【0162】

本開示はまた、PEGが異なるn値を有し、その結果、様々な異なるPEGが特定の比で存在するコンジュゲートの組成物を想定している。例えば、一部の組成物は、n=1、2、3、及び4であるコンジュゲートの混合物を含む。幾つかの組成物では、n=1であるコンジュゲートのパーセント比は18～25%であり、n=2であるコンジュゲートのパーセント比は50～66%であり、n=3であるコンジュゲートのパーセント比は12～16%であり、n=4であるコンジュゲートのパーセント比は最大5%である。このような組成物は、当技術分野で既知の反応条件及び精製方法によって作製することができる。例示的な反応条件は、本明細書を通して説明される。カチオン交換クロマトグラフィーを使用してコンジュゲートを分離し、次に、例えば、目的の数のPEG結合を有するコンジュゲートを含有し、未修飾タンパク質配列、及び目的以外の数のPEG結合を有するコンジュゲートを含まないように精製されている画分が同定される。

20

【0163】

PEG化は、ポリペプチドのN末端のアルファアミノ基、リジン残基の側鎖のイブシロンアミノ基、及びヒスチジン残基の側鎖のイミダゾール基で最も頻繁に生じる。大部分の組換えポリペプチドは単一のアルファ基、並びに複数のイブシロンアミノ基及びイミダゾール基を有するので、リンカーの化学的性質に依存して多数の位置異性体が生成される可能性がある。当技術分野で既知の一般的なPEG化手法を本明細書に応用することができる。

30

【0164】

広く使用されている2つの第1世代活性化モノメトキシPEG(mPEG)は、スクシンイミジルカルボネートPEG(SC-PEG；例えば、Zalipsky, et al. (1992) Biotechnol. Appl. Biochem. 15:100-114；及びMiron and Wilcheck (1993) Bio-conjug. Chem. 4:568-569を参照)、及びベンゾトリアゾールカルボネートPEG(BC-PEG；例えばDolence, et al. 米国特許第5,650,234号を参照)であり、これらはリジン残基と優先的に反応してカルバメート結合を形成するが、ヒスチジン残基及びチロシン残基と反応することも知られている。ある特定の分子（例えば、IFN-）上のヒスチジン残基への結合は、加水分解に対して不安定なイミダゾールカルバメート結合であることが示されている（例えば、Lee and McNemar, 米国特許第5,985,263号を参照）。第2世代PEG化技術は、これらの不安定な結合並びに残基反応性に関する選択性の欠如を回避するように設計されている。PEG-アルデヒドリンカーを使用すると、還元的アミノ化によって、ポリペプチドのN末端

40

50

にある単一部位が標的化される。

【0165】

1つ以上のポリペプチド配列の遊離アミノ基またはカルボキシル基とポリエチレングリコールとの間の結合を仲介する末端反応基（「スペーサー」）を介して、本開示のポリペプチドにPEGを結合することができる。遊離アミノ基に結合することができるスペーサーを有するPEGとして、N-ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールがあり、これは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルをN-ヒドロキシスクシニルイミドで活性化することにより調製することができる。遊離アミノ基に結合することができる別の活性化ポリエチレングリコールは、2,4-ビス(0-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンであり、これはポリエチレングリコールモノメチルエーテルを塩化シアヌルと反応させることにより調製することができる。遊離カルボキシル基に結合する活性化ポリエチレングリコールには、ポリオキシエチレンジアミンが含まれる。

10

【0166】

本開示の1つ以上のポリペプチド配列と、スペーサーを有するPEGとのコンジュゲーション反応は、様々な従来の方法によって実施することができる。例えば、コンジュゲーション反応は、試薬対タンパク質を4:1~30:1のモル比で使用して、pH5~10の溶液中にて温度4~室温で30分~20時間かけて実施することができる。所望の置換度が優位にもたらされるように反応が進む反応条件を選択することができる。一般に、低温、低pH（例えば、pH=5）で、反応時間が短い場合、結合するPEGの数が減少する傾向にあり、対して、高温、中性~高pH（例えば、pH=7）で、反応時間が長い場合、結合するPEGの数が増加する傾向にある。当技術分野で既知の様々な手段を使用して、反応を停止させることができる。幾つかの実施形態では、反応混合物を酸性化し、例えば-20で凍結させることにより反応を終了させる。種々の分子のPEG化は、例えば、米国特許第5,252,714号；同第5,643,575号；同第5,919,455号；同第5,932,462号；及び同第5,985,263号に記載されている。PEG-IL-10については、例えば米国特許第7,052,686号に記載されている。本明細書での使用が企図される具体的な反応条件を実施例のセクションに記載する。

20

【0167】

本開示はまた、PEG模倣体の使用も想定している。PEGの属性（例えば、血清半減期の延長）を保持しつつ、幾つかの有利な特性を追加で付与する組換えPEG模倣体が開発されている。例として、目的のペプチドまたはタンパク質薬剤にあらかじめ融合された、PEGと同様の伸長配座を形成することができる単純なポリペプチド鎖（例えば、Ala、Glu、Gly、Pro、Ser、及びThrを含む）を組換えで產生することができる（例えば、Amunix'XTEN技術；Mountain View, CA）。これは、製造工程中の追加のコンジュゲートステップを不要にする。更に、分子生物学技術の確立により、ポリペプチド鎖の側鎖組成の制御が可能になり、免疫原性及び製造特性の最適化が可能になっている。

30

【0168】

リンカー：リンカー及びその使用については上記で述べられている。好適なリンカーには、一般に、修飾ポリペプチド配列と、結合される成分及び分子との間の幾らかの移動を可能にするのに十分な長さがある「可動性リンカー」を含む。リンカー分子は一般に、約6~50原子長である。リンカー分子はまた、例えば、アリールアセチレン、2~10単量体単位を含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二塩基酸、アミノ酸、またはそれらの組み合わせであってもよい。好適なリンカーは容易に選択することができ、1アミノ酸（例えば、Gly）、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10~20、20~30、30~50、または50超のアミノ酸等の任意の好適な長さであり得る。

40

【0169】

例示的な可動性リンカーとしては、グリシンポリマー(G_n)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、グリシン-セリンポリマー（例えば、(G_mS_n)）

50

n 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号13）、 $(G_mS_oG_m)_n$ 、 $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ （配列番号14）、 $(GSGGS_m)_n$ （配列番号15）、 $(GSGS_mG)_n$ （配列番号16）、及び $(GGGS_m)_n$ （配列番号17）、及びこれらの組み合わせ（式中、 m 、 n 、及び o はそれぞれ独立して少なくとも1～20、例えば1～18、2～16、3～14、4～12、5～10、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10の整数から選択される）、並びに他の可動性リンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは比較的構造化されておらず、そのため成分間のニュートラルなテザーとして機能することができる。例示的な可動性リンカーとしては、 $GGSG$ （配列番号18）、 $GGSGG$ （配列番号19）、 $GSGSG$ （配列番号14）、 $GSGGG$ （配列番号20）、 $GGGS G$ （配列番号21）、及び $GSSSG$ （配列番号22）が挙げられるが、これらに限定されない。
10

【0170】

追加の可動性リンカーとしては、グリシンポリマー(G) n またはグリシン-セリンポリマー（例えば、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ （配列番号13）、 $(GGGS)_n$ （配列番号23）、及び $(GGGGS)_n$ （配列番号24）（式中、 $n = 1 \sim 50$ 、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、30～50））が挙げられる。例示的な可動性リンカーとしては、 $GGGS$ （配列番号23）、 $GGGG S$ （配列番号24）、 $GGSG$ （配列番号18）、 $GGSGG$ （配列番号19）、 $GSG SG$ （配列番号14）、 $GSGGG$ （配列番号20）、 $GGGS G$ （配列番号21）、及び $GSSSG$ （配列番号22）が挙げられるが、これらに限定されない。これらのリンカー配列の多量体（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、または30～50）を一緒に結合させて得られる可動性リンカーを使用して、本明細書に開示されたポリペプチドに異種アミノ酸配列をコンジュゲートしてもよい。
20

【0171】

治療的及び予防的使用

特定の実施形態において、本開示は、がん関連の疾患、障害、または病態の治療及び/または予防において、PEG-IL-10及びIL-12剤を使用することを想定している。特定の用途を以下で詳細に記載するが、本開示はそれに限定されないことが理解されるべきである。

【0172】

本明細書に開示する併用療法を用いて治療または予防できる代表的ながんとしては、子宮、子宮頸部、卵巣、乳房、前立腺、精巣、消化管（例えば、食道、口腔咽頭、胃、小腸または大腸、結腸または直腸）、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髄、皮膚、頭頸部、肝臓、胆嚢、心臓、肺、脾臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳（例えば、神経膠腫）、神経節、中枢神経系(CNS)、及び末梢神経系(PNS)の癌、並びに免疫系（例えば、脾臓または胸腺）の癌が挙げられる。
30

【0173】

本開示はまた、例えば、免疫原性腫瘍、非免疫原性腫瘍、休眠腫瘍、ウイルス誘発性がん（例えば、上皮細胞癌、内皮細胞癌、扁平上皮細胞癌、及びパピローマウイルス）、腺癌、リンパ腫（例えば、B細胞リンパ腫）、白血病、がん腫、黒色腫、骨髄腫、肉腫、悪性奇形腫、化学物質が誘発するがん、及び転移を含む、他のがん関連の疾患、障害または病態を治療または予防する方法をも提供する。特定の実施形態において、前記腫瘍またはがんは結腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、または膠芽腫である。
40

【0174】

更なる特定の実施形態において、前記がんは乳腺癌、肺胞癌、線維肉腫、及び黑色腫の肺転移である(Pegram et al (2012) Advancements in Tumor Immunotherapy and Cancer Vaccines, Dr. Hilal Arnouk (Ed.), ISBN: 978-953-307-998-1, Intech)。併用療法及び遺伝子療法におけるIL-12に基づいた治療の抗腫瘍効果を探求する臨床研究には、下記の腫瘍、即ち乳房、脾臓、肝臓、腎臓、子
50

宮頸部、胃腸癌、結腸直腸、非ホジキンリンパ腫、黒色腫（例えば、多発性黒色腫）、及びAIDS関連カポジ肉腫（Lasek et al. (2014) Cancer Immunol Immunother 63: 419 - 35）の治療が含まれる。

【0175】

本開示の特定の実施形態において、前記がん関連の疾患、障害または病態は、免疫非感受性腫瘍である。治療的免疫操作に感受性でない腫瘍は、1) 免疫系の能動的抑制、及び2) その治療に起因する免疫抑制機構の付随的活性化を伴う炎症反応の二つの特徴を示すものとして記載され得る（Galon et al. (July 25 2013) Immunity 39: 11 - 26 (PubMed PMID: 238900600)）。免疫非感受性腫瘍の例には、結腸癌、胃食道癌、肺癌及び乳癌が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0176】

本明細書の他の箇所に記載されているように、幾つかの実施形態において、本開示はPEG-IL-10及びIL-12剤を、少なくとも1つの追加の治療剤または診断剤と組み合わせて用いてがん関連の疾患、障害または病態を治療するための方法を提供するものであり、その例は本明細書において与えられる。

【0177】

医薬組成物

本開示によって企図されるPEG-IL-10及びIL-12剤は、被験体への投与に適した組成物の形態であり得る。一般に、そのような組成物は、PEG-IL-10及び/またはIL-12剤、並びに1種以上の医薬的に許容可能もしくは生理学的に許容可能な希釈剤、担体、もしくは賦形剤を含む「医薬組成物」である。ある特定の実施形態では、PEG-IL-10及びIL-12剤はそれぞれ、治療上許容される量で存在する。この医薬組成物は、本開示の方法において使用することができる。従って、例えば、本明細書に記載の治疗方法及び予防方法、並びに使用を実施するために、医薬組成物をex vivoまたはin vivoで被験体に投与することができる。

20

【0178】

以降の医薬組成物及びその態様の記載において、前記医薬組成物は一般にPEG-IL-10に関連して記載される。しかしながら、この記載はまた、PEG-IL-10及びIL-12剤の組み合わせを含む医薬組成物、または1種の成分のみを含む医薬組成物のいずれにおいても、本開示のIL-12剤に適用されるものと理解されるべきである。

30

【0179】

本開示の医薬組成物は、意図された投与方法または投与経路に適合するように製剤化することができる。例示的な投与経路は本明細書に記載する。更に、医薬組成物は、本開示によって企図される疾患、障害、及び病態を治療または予防するために、本明細書に記載の他の治療的な活性薬剤または化合物と組み合わせて使用することができる。

【0180】

前記医薬組成物は通常、本開示によって企図される治療的有効量のPEG-IL-10及び/またはIL-12剤、並びに1種以上の医薬的及び生理学的に許容される製剤を含む。好適な医薬的に許容されるまたは生理学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤としては、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸及び重硫酸ナトリウム）、防腐剤（例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチルプロピルまたはn-プロピル、p-ヒドロキシ安息香酸）、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、溶媒、增量剤、充填剤、洗浄剤、緩衝剤、ビヒクル、希釈剤、及び/またはアジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、好適なビヒクルは、生理食塩水またはクエン酸緩衝生理食塩水であり得、場合により非経口投与のための医薬組成物に一般的な他の物質を補充することができる。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、更なる例示的なビヒクルである。当業者は、本明細書で企図される医薬組成物及び剤形に使用できる様々な緩衝液を容易に判断できるはずである。通常の緩衝剤としては、医薬的に許容される弱酸、弱塩基、またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。一例として、緩衝

40

50

剤成分は、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、及びこれらの塩等の水溶性物質であり得る。許容される緩衝剤としては、例えば、Tri s 緩衝液、N - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - N' - (2 - エタンスルホン酸) (HEPES)、2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES)、2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩 (MES)、3 - (N - モルホリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS)、及びN - ト里斯 [ヒドロキシメチル] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 (TAPS) が挙げられる。

【0181】

医薬組成物は、製剤化された後、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水粉末もしくは凍結乾燥粉末として、滅菌バイアル中で保存することができる。このような製剤は、すぐ使用できる形態、使用前に再構成が必要な凍結乾燥形態、使用前に希釈が必要な液体形態、またはその他の許容される形態のいずれでも保存することもできる。幾つかの実施形態において、前記医薬組成物は、単回使用容器（例えば、単回使用バイアル、アンプル、シリンジ、または自己シリンジ（例えば、EpiPen（登録商標））に類するもの）で提供される一方、他の実施形態では、複数回使用容器（例えば、複数回使用バイアル）が提供される。任意の薬物送達装置を使用して、PEG - IL - 10 または IL - 12 剤を送達することができ、これには移植植物（例えば、埋込ポンプ）及びカテーテルシステム、低速注入ポンプ及びデバイスを含み、いずれも当業者に周知である。また、規定された期間に亘って本明細書に開示されるポリペプチドを放出するために、一般に皮下または筋肉内に投与されるデポ注射を使用してもよい。デポ注射は通常、固体系またはオイル系のいずれかであり、一般に少なくとも 1 つの本明細書に記載の製剤成分を含む。当業者は、可能なデポ注射の製剤及び使用法を熟知している。

10

20

30

【0182】

医薬組成物は、水性または油性の滅菌注射用懸濁液の形態であり得る。この懸濁液は、本明細書で述べた好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤を使用して、既知の技術に従って製剤化することができる。滅菌注射用製剤はまた、非毒性の非経口に許容される希釈剤または溶媒中の、例えば 1 , 3 - ブタンジオール溶液としての滅菌注射用溶液または懸濁液であってもよい。用いることができる許容される希釈剤、溶媒、及び分散媒としては、水、リングル液、等張性塩化ナトリウム溶液、Cremophor EL（商標）(BASF、Parisippany, NJ) またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレン glycol、及び液体ポリエチレングリコール）、及びこれらの好適な混合物が挙げられる。加えて、従来から滅菌不揮発性油が溶媒または懸濁媒として使用されている。この目的では、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の無刺激の不揮発性油を使用することができる。更に、オレイン酸等の脂肪酸も注射液の調製に使用されている。吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチン）を含めることによって、特定の注射用製剤の持続的な吸収を達成することができる。

【0183】

活性成分を含有する医薬組成物は、経口使用に好適な形態、例えば、錠剤、カプセル、トローチ剤、口内錠、水性もしくは油性懸濁液、分散性の散剤もしくは顆粒剤、エマルジョン、硬質もしくは軟質カプセル、またはシロップ、溶液、マイクロビーズ、またはエリキシル剤であり得る。特定の実施形態において、本明細書に記載のPEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤と同時投与される薬剤の活性成分は、経口使用に適した形態である。経口使用を意図した医薬組成物は、医薬組成物を製造するための当技術分野で既知の任意の方法に従って調製することができ、そのような組成物には、製薬上、上質で口当たりのよい製剤になるように、例えば、甘味剤、矯味剤、着色剤、及び保存剤等の 1 種以上の薬剤を含有することができる。錠剤、カプセル剤などは、錠剤の製造に適した非毒性の医薬的に許容される賦形剤と混合された活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウム、またはリン酸ナトリウム等の希釈剤；造粒剤及び崩壊剤、例えばコーンスタークまたはアルギン酸；結合剤、例え

40

50

ばデンプン、ゼラチン、またはアカシア、及び滑沢剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクを含み得る。

【0184】

経口投与に適した錠剤、カプセル剤などは、胃腸管における崩壊及び吸収を遅延させ、それによって持続作用をもたらすために、既知の技術によってコーティングされても、コーティングされていなくてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリル等の時間遅延物質を使用することができる。これらはまた、当技術分野で既知の技術によってコーティングして、制御放出に適した浸透性治療錠剤を形成することもできる。追加の薬剤としては、投与された組成物の送達を制御するために、生分解性または生体適合性の粒子またはポリマー物質、例えばポリエステル、ポリアミン酸、ヒドロゲル、ポリビニルピロリドン、ポリ無水物、ポリグリコール酸、エチレン・酢酸ビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミン、またはラクチド／グリコリドコポリマー、ポリラクチド／グリコリドコポリマー、またはエチレン酢酸ビニルコポリマーが挙げられる。例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって、それぞれヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセル、またはポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセルを使用して作製されたマイクロカプセルに、またはコロイド薬物送達系に経口薬剤を封入することができる。コロイド分散系としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、マイクロビーズ、及び脂質ベース系が挙げられ、それには水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、及びリポソームを含む。上記の製剤の調製方法は、当業者には明らかであろう。

10

20

30

【0185】

経口使用のための製剤はまた、活性成分が不活性固体希釈剤、例えば炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリン、または微結晶性セルロースと混合されている硬質ゼラチンカプセルとして、または活性成分が水もしくは油媒体、例えばピーナッツ油、流動パラフィン、もしくはオリーブ油と混合されている軟質ゼラチンカプセルとして提示することもできる。

【0186】

水性懸濁液は、その製造に適した賦形剤と混合された活性物質を含有する。そのような賦形剤は、懸濁剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントゴム、及びアカシアゴム；分散剤または湿潤剤、例えば、天然ホスファチド(例えば、レシチン)、または脂肪酸とアルキレンオキシドの縮合物(例えば、ステアリン酸ポリオキシエチレン)、または長鎖脂肪族アルコールとエチレンオキシドの縮合物(例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール)、または脂肪酸及びヘキシトール由来の部分エステルとエチレンオキシドの縮合物(例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレート)、または脂肪酸及びヘキシトール無水物由来の部分エステルとエチレンオキシドの縮合物(例えば、ポリエチレンソルビタンモノオエレート)であり得る。水性懸濁液はまた、1種以上の防腐剤を含有することができる。

【0187】

油性懸濁液は、植物油、例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油、またはヤシ油に、または流動パラフィン等の鉛油に活性成分を懸濁させることにより製剤化することができる。油性懸濁液は、増粘剤、例えばミツロウ、硬質パラフィン、またはセチルアルコールを含有することができる。上述のような甘味剤、及び矯味剤を添加して、口当たりのよい経口製剤を提供することができる。

40

【0188】

水を添加して水性懸濁液を調製する場合に適した分散性の散剤及び顆粒剤では、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤、及び1種以上の防腐剤と混合して活性成分を提供する。好適な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤は、本明細書に例示されている。

【0189】

本開示の医薬組成物はまた、水中油型エマルジョンの形態であってもよい。油相は、植

50

物油、例えばオリーブ油もしくはラッカセイ油、または鉱油、例えば流動パラフィン、またはこれらの混合物であり得る。好適な乳化剤は、天然ゴム、例えば、アラビアゴムまたはトラガントゴム；天然リン脂質、例えば、ダイズ、レシチン、及び脂肪酸由来のエステルまたは部分エステル；ヘキシトール無水物、例えば、ソルビタンモノオレエート；及びエチレンオキシドと部分エステルの縮合物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。

【0190】

製剤はまた、急速な分解または体外への排出から組成物を保護するために、移植物、リポソーム、ヒドロゲル、プロドラッグ、及びマイクロカプセル化送達系を含む制御放出製剤等の担体を含むことができる。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはステアリン酸グリセリル等の時間遅延物質を単独で、またはワックスと組み合わせて使用することができる。

10

【0191】

本開示は、直腸投与に適した坐剤形態でのIL-10ポリペプチドの投与を想定している。常温では固体であるが直腸温度では液体であり、その結果、直腸内で溶解して薬物を放出する好適な非刺激性賦形剤と薬物を混合することによって坐剤を調製することができる。このような物質としては、カカオバター及びポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0192】

本開示によって企図されるPEG-IL-10及びIL-12剤は、現在既知であるかまたは将来開発される任意の他の好適な医薬組成物（例えば、鼻スプレーまたは吸入用スプレー）の形態であり得る。

20

【0193】

製剤中のポリペプチドまたはその断片の濃度は、広範に（例えば、約0.1重量%未満から、通常は約2重量%もしくは少なくとも約2重量%ないし20重量%～50重量%またはそれ以上まで）変更でき、通常は主に液体量、粘度、及び被験体に応じた要因に基づいて、例えば選択された特定の投与方式に従って選択される。

30

【0194】

投与経路

本開示は、任意の適切な方法でのPEG-IL-10及びIL-12剤、並びにその組成物の投与を想定している。好適な投与経路としては、非経口（例えば、筋肉内、静脈内、皮下（例えば、注入または埋込み）、腹腔内、囊内、関節内、腹腔内、脳内（実質内、及び脳室内）、経口、経鼻、経膣、舌下、眼内、直腸内、局所（例えば、経皮）、舌下、及び吸入が挙げられる。また、規定された期間に亘って本明細書に開示されるポリペプチドを放出するために、一般に皮下または筋肉内に投与されるデポ注射を使用してもよい。

【0195】

本開示の特定の実施形態は、非経口投与を意図している。非経口投与は、幾つかの実施形態において静脈内投与であり、他の実施形態では皮下投与である。

40

【0196】

補助的併用療法

本開示は、1種以上の活性な治療薬または他の予防法もしくは治療法（例えば、放射線）と更に組み合わせた、PEG-IL-10及びIL-12剤の併用を意図している。本出願の目的では、そのような更なる組み合わせを、「補助的組み合わせ」、「補助的併用療法」、「追加の予防薬または治療薬との組み合わせ」などと称する場合があり、PEG-IL-10及びIL-12剤の組み合わせに追加する薬剤を「補助的薬剤」などと称することがある。そのような補助的な併用療法では、種々の補助活性剤（複数可）がPEG-IL-10及び/またはIL-12剤とは異なる作用機序を有している場合が多い。そのような補助的併用療法の特に有利な点として、1以上の薬剤の用量の低減を可能にし、それにより1以上の薬剤に付随する副作用を緩和または消失させることができる。更に、そのような補助的な併用療法は、原因となる増殖性の疾患、障害または病態に対して相乗

50

的な治療または予防効果を有し得る。本開示の幾つかの実施形態において、補助的薬剤（複数可）は診断薬（複数可）である。

【0197】

特定の実施形態において、本開示は、PEG-IL-10及びIL-12剤、並びに少なくとも1種の追加の治療薬または診断薬を用いてがん関連の疾患、障害または病態を治療及び／または予防する方法を提供する。

【0198】

本開示の幾つかの実施形態では、PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）のそれぞれを個別の剤形にすることができる。例として、PEG-IL-10がSC投与に適した製剤であり、IL-12剤がIV投与に適した製剤であり、補助的薬剤が経口投与に適した製剤であってもよい。これに関連して、薬剤のそれぞれを個別に収容することも、或いは2以上の薬剤を（例えば、キットの個々の構成要素として）一緒に収容することもできる。本開示の他の実施形態では、2以上のPEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）を同じ剤形にすることができる。例えば、PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）をIV投与のために製剤化することができる。これに関連して、1種以上の薬剤を（例えば、シリンジ中の活性な治療薬として）共製剤化することができる。

10

【0199】

一定の実施形態において、PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）（例えば、化学療法剤）を逐次的に投与または適用し、その場合、例えばPEG-IL-10を最初に投与し、IL-12剤を次に投与し、補助的薬剤を最後に投与する。他の実施形態において、PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）は、同時に投与され、その場合、例えば、それらのうち2つが同時に投与され、3つ目がその前または後に投与される。PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）は、逐次的に、同時に、またはその変形法で投与されるかどうかを問わず、本開示では補助的な併用療法として投与されるものとみなされる。

20

【0200】

本開示は、その状況下で許容可能、適切または最適であり得る補助的併用療法に適した、任意の実施可能な投与計画の使用を意図している。以降に記載するレジメンは例示的なものであり、排他的ではない。一実施形態において、PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）による治療は、ある期間に亘って維持される。別の実施形態において、PEG-IL-10、IL-12剤、及び補助的薬剤（複数可）による治療は、ある期間に亘って低減されるか、または継続される（例えば、被験体が安定している場合）。別の実施形態において、補助的薬剤（複数可）による治療は低減されるかまたは中止される一方（例えば、被験体が安定している場合）、PEG-IL-10及びIL-12剤による治療は一定の投与計画で維持される。更なる実施形態においては、補助的薬剤（複数可）による治療は低減されるかまたは中止され（例えば、被験体が安定している場合）、PEG-IL-10による治療は低減され（例えば、用量の減少、投与頻度の減少、または治療レジメンの短縮）、IL-12剤による治療は一定の投与計画で維持される。更なる実施形態において、補助的薬剤（複数可）による治療は低減されるかまたは中止され（例えば、被験体が安定している場合）、PEG-IL-10による治療は低減され（例えば、用量の減少、投与頻度の減少、または治療レジメンの短縮）、IL-12剤による治療は一定の投与計画で維持される。

30

【0201】

更に別の実施形態において、補助的薬剤（複数可）及びPEG-IL-10による治療は一定の投与計画で維持される一方、IL-12剤による治療は低減されるかまたは中止される（例えば、被験体が安定している場合）。なお更なる実施形態では、補助的薬剤（複数可）及びIL-12剤による治療が一定の投与計画で維持される一方、PEG-IL-10による治療は低減されるかまたは中止される（例えば、用量の減少、投与頻度の減少、または治療レジメンの短縮）。他の投与計画の同定及び使用は、当業者に明らかであ

40

50

ろう。

【0202】

本明細書で開示されるPEG-IL-10及びIL-12剤との併用に適した具体的な薬剤を以下に示すが、本開示はそれに限定されないと理解されるべきである。例として、予防薬または治療薬は、化学療法剤、免疫もしくは炎症関連薬剤、代謝薬、抗ウイルス薬、または抗血栓薬であり得るが、これらに限定されない。本開示の方法は、非薬理学的薬剤（例えば、放射線医学）と組み合わせて使用することもできる。

【0203】

特定の実施形態において、本開示は、がん、腫瘍、または前がん症状、またはがん関連の疾患、障害、もしくは病態の治療及び／または予防のために、PEG-IL-10及びIL-12剤と共に化学療法剤（複数可）を使用することを想定している。化学療法剤の例としては、チオテバ及びシクロホスファミド等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン等のアルキルスルホネート；ベンゾドopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、及びウレドパ（uredopa）等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド（triethylenethiophosphoaramide）、及びトリメチロールメラミン（trimethylololomelamine）を含むエチレンイミン及びメチラメラミン（methylalamine）；クロラムブシリ、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphate）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミノキシド塩酸塩、メルファラン、ノボエンビキン、フェネステリン（phenesterine）、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスター等のナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン等のニトロソウレア；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン（carabacin）、カミノマイシン（camino mycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン（detorubicin）、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペブロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン等の抗生物質；メトレキサート及び5-フルオロウラシル（5-FU）等の代謝拮抗薬；デノブテリン、メトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカブトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎薬；フロリン酸（frolinic acid）等の葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシリ；ビサントレン；エダトラキセート（edatraxate）；デフォファミン（defofamine）；デメコルシン；ジアジクオン；エルフォルミチン（elfor mitrine）；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウリア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロ

10

20

30

40

50

マン；ガシトシン（gacytostine）；アラビノシド（Arabinoside）；シクロホスファミド；チオテバ；タキソイド、例えば、パクリタキセル及びドセタキセル（docetaxel）；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカブトプリン；メトトレキサート；シスプラチニン及びカルボプラチニン等の白金及び白金配位錯体；ビンプラスチン；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサンtron；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン（novantrone）；テニポシド；ダウノマイシン；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロネット；CPT11；トポイソメラーゼ阻害剤；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタビン；並びに上記のいずれかの医薬的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0204】

化学療法剤にはまた、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、オナブリストン、及びトレミフェンを含む抗エストロゲン薬；フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、リュープロリド、及びゴセレリン等の抗アンドロゲン薬；並びに上記のいずれかの医薬的に許容される塩、酸、または誘導体など、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン薬も含まれる。一定の実施形態において、併用療法にはホルモン剤または関連ホルモン剤の投与が含まれる。

20

【0205】

本明細書に記載されるがん病態の治療または予防に有用な何らかの他の薬剤が、補助薬剤として想定され、これにはIL-12、INF、もしくは抗上皮成長因子受容体等のサイトカインもしくはサイトカインアンタゴニスト、放射線療法、別の腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体、モノクローナル抗体と毒素の複合体、T細胞アジュバント、骨髄移植、または抗原提示細胞（例えば、樹状細胞療法）が含まれるが、これらに限定されない。ワクチン（例えば、可溶性タンパク質、またはタンパク質をコードする核酸の形態）もまた、本明細書において提供される。

20

【0206】

特定の実施形態において、追加の予防薬または治療薬は化学療法剤であり、その例は本明細書に記載されている。幾つかの実施形態において、前記化学療法剤は白金系抗腫瘍剤であり、白金配位錯体とも呼ばれる。これらの白金系抗腫瘍剤はDNAを架橋し、それにより、がん細胞におけるDNA修復及び/またはDNA合成を阻害する。そのような薬剤の例としては、シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、サトラプラチニン、ピコプラチニン、ネダプラチニン、及びトリプラチニンが挙げられる。

30

【0207】

本開示は、上記いずれかの医薬的に許容される塩、酸、または誘導体を包含する。

【0208】

用量

本発明のPEG-IL-10及びIL-12剤は、例えば、投与の目標（例えば、望まれる消散度）；製剤を投与する被験体の年齢、体重、性別、健康状態及び体調；投与経路；並びに疾患、障害、病態、またはその症状の性質に応じた量で、被験体に投与することができる。または、投与計画は、投与する薬剤（複数可）に付随する何らかの副作用の存在、性質、及び範囲を考慮することができる。例えば、安全性及び用量漸増試験、in vivo試験（例えば、動物モデル）、及び当業者に既知の他の方法から、有効投与量及び用量投与計画を容易に決定することができる。

40

【0209】

本明細書の他の何処かで述べるように、本開示は、PEG-IL-10及びIL-12剤の併用療法の実施形態であって、望ましい血清トラフ濃度（例えば、10ng/mL以上）が維持されるような量及び頻度でPEG-IL-10が投与される実施形態を想定している。また、血清濃度がピークに達するようにIL-12剤を投与し、その後、薬剤がクリアランスされ、再投与される前には測定不能なレベルとなるPEG-IL-10及び

50

I L - 1 2 剤の併用療法の実施形態も想定される。

【 0 2 1 0 】

一般に、投与パラメーターは、投与量が、被験体に対して不可逆的に有毒であり得る量よりも低い(即ち、最大耐容用量、「M T D」)であり、被験体に対して測定可能な効果を生じさせるのに必要な量以上となるように規定する。このような量は、投与経路及び他の因子を考慮して、例えば、A D M E と関係する薬物動態パラメーター及び薬力学的パラメーターによって決定する。

【 0 2 1 1 】

本明細書中で使用される場合、用語「E C 5 0」及び語句「半最大有効濃度」は、それらの一般的に受け入れられた意味を有する。即ち、E C 5 0 は、特定の曝露時間後にベースラインと最大値の中間的な応答を誘発する治療剤(例えば、P E G - I L - 1 0)の濃度である。当業者は、治療剤のE C 5 0 を決定するための手段に精通している。例えば、E C 5 0 は、細胞ベースのアッセイにおいて治療剤の一定の濃度関連パラメーターを測定した後、市販のソフトウェア(例えば、G r a p h p a d S o f t w a r e , I n c . ; L a J o l l a , C A)を用いて決定することができる。

10

【 0 2 1 2 】

有効量(E D)は、薬剤を摂取する被験体が、ある程度の割合で治療反応または望ましい効果を示す薬剤の用量または量である。薬剤の「5 0 % 有効量」、即ちE D 5 0 は、投与される集団の5 0 % に治療反応または望ましい作用が生じる薬剤の用量または量である。E D 5 0 は、薬剤の効果の妥当な期待値として一般的に使用されているが、必ずしも臨床医が全ての関連要因を考慮した上で適切とみなしえた用量であるとは限らない。従って、状況によっては、有効量は算出されたE D 5 0 を超え、他の状況では、有効量は算出されたE D 5 0 未満であり、更に他の状況では、有効量は算出されたE D 5 0 と同じであり得る。

20

【 0 2 1 3 】

加えて、本開示のP E G - I L - 1 0 及びI L - 1 2 剤の有効量は、1 以上の用量で被験体に投与される場合に、健康な被験体と比較して望ましい結果を生じる量であり得る。例えば、特定の障害に罹患している被験体の場合、有効量とは、その疾患の診断パラメーター、測定値、マーカーなどが、少なくとも約5 % 、少なくとも約1 0 % 、少なくとも約2 0 % 、少なくとも約2 5 % 、少なくとも約3 0 % 、少なくとも約4 0 % 、少なくとも約5 0 % 、少なくとも約6 0 % 、少なくとも約7 0 % 、少なくとも約8 0 % 、少なくとも約9 0 % 、または9 0 % 超改善する量であることができ、ここでの1 0 0 % とは、正常な被験体が示す診断パラメーター、測定値、マーカー等として定義される。

30

【 0 2 1 4 】

本明細書に記載の疾患、障害、または病態の治療に必要なP E G - I L - 1 0 及びI L - 1 2 剤の量は、当技術分野で既知の活性アッセイによって決定することができる。例として、腫瘍の場合において、好適なI L - 1 0 活性には、例えば、腫瘍部位へのC D 8 + T 細胞の浸潤、これらの浸潤細胞からのI F N - 、I L - 4 、I L - 6 、I L - 1 0 、及びR A N K - L 等の炎症性サイトカインの発現、及び生物学的サンプル中のT N F またはI F N レベルの増加が挙げられる。

40

【 0 2 1 5 】

P E G - I L - 1 0 の治療的有効量は、約0 . 0 1 ~ 約1 0 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日、約0 . 1 ~ 2 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日、約0 . 5 ~ 1 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日、または約1 ~ 4 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日の範囲であり得る。本開示は、前記併用療法のP E G - I L - 1 0 成分の量が、1 0 . 0 μ g / k g / 日 ~ 2 0 . 0 μ g / k g / 日である実施形態を想定する。幾つかの実施形態において、前記投与されるP E G - I L - 1 0 の量は、1 2 . 0 μ g / k g / 日 ~ 1 8 . 0 μ g / k g / 日である。

【 0 2 1 6 】

幾つかの実施形態において、前記併用療法のP E G - I L - 1 0 成分は、約5 0 ~ 8 0

50

0 μg タンパク質 / kg 体重 / 日（例えば、約 1 ~ 16 μg タンパク質 / kg 体重 / 日の PEG - IL - 10）を送達するために（例えば、連続注入により）投与される。注入により送達する場合、注入速度は、例えば、有害作用及び血液細胞数の評価に基づいて変更することができる。PEG - IL - 10 に関する他の具体的な投与パラメーターは、本明細書において別途記載される。

【0217】

本開示は、がん関連の疾患、障害、または病態を治療または予防するために被験体に投与される前記 PEG - IL - 10 併用療法の IL - 12 成分の量が、0.01 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日である実施形態を想定している。他の実施形態において、前記 IL - 12 剤の量は 0.1 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日であり、更に他の実施形態では、前記 IL - 12 剤の量は 1.0 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日である。なお更なる実施形態において、がん関連の疾患、障害、または病態を治療または予防するために被験体に投与される前記併用療法の IL - 12 成分の量は、0.1 μg / kg / 日 ~ 15.0 μg / kg / 日である。他の実施形態では、前記 IL - 12 剤の量は 1.0 μg / kg / 日 ~ 15.0 μg / kg / 日であり、更に他の実施形態では、前記 IL - 12 剤の量は 10.0 μg / kg / 日 ~ 15.0 μg / kg / 日である。

【0218】

本開示は、投与される PEG - IL - 10 の量が 10.0 μg / kg / 日 ~ 20.0 μg / kg / 日、11.0 μg / kg / 日 ~ 19.0 μg / kg / 日、12.0 μg / kg / 日 ~ 18.0 μg / kg / 日、13.0 μg / kg / 日 ~ 17.0 μg / kg / 日、14.0 μg / kg / 日 ~ 16.0 μg / kg / 日、または約 15.0 μg / kg / 日である、PEG - IL - 10 / IL - 12 剤の併用療法の実施形態を想定している。本開示は、投与される IL - 12 剤の量が、0.01 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日、0.05 μg / kg / 日 ~ 9.5 μg / kg / 日、0.1 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日、0.1 μg / kg / 日 ~ 9.0 μg / kg / 日、0.5 μg / kg / 日 ~ 8.5 μg / kg / 日、1.0 μg / kg / 日 ~ 10.0 μg / kg / 日、1.0 μg / kg / 日 ~ 8.0 μg / kg / 日、1.5 μg / kg / 日 ~ 7.5 μg / kg / 日、2.0 μg / kg / 日 ~ 7.0 μg / kg / 日、2.5 μg / kg / 日 ~ 6.5 μg / kg / 日、3.0 μg / kg / 日 ~ 6.0 μg / kg / 日、3.5 μg / kg / 日 ~ 5.5 μg / kg / 日、4.0 μg / kg / 日 ~ 5.0 μg / kg / 日、または 4.5 μg / kg / 日であり、それが本明細書で提示される任意の量の PEG - IL - 10（例えば 10.0 μg / kg / 日 ~ 20.0 μg / kg / 日、11.0 μg / kg / 日 ~ 19.0 μg / kg / 日、12.0 μg / kg / 日 ~ 18.0 μg / kg / 日、13.0 μg / kg / 日 ~ 17.0 μg / kg / 日、14.0 μg / kg / 日 ~ 16.0 μg / kg / 日、または約 15.0 μg / kg / 日の量で投与される PEG - IL - 10）と組み合わせて投与され得るような、PEG - IL - 10 / IL - 12 剤併用療法の実施形態を想定している。

【0219】

経口薬の投与の場合、前記組成物は、1.0 ~ 1000 ミリグラムの活性成分、特に 1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0、及び 1000.0 ミリグラムの活性成分を含有する錠剤、カプセル剤等の形態で提供することができる。

【0220】

一定の実施形態においては、前記開示された PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤の投与量が「単位剤形」に含有される。語句「単位剤形」とは、望ましい効果を生じさせるのに十分な、所定量の本開示の PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤を単独で、または 1 以上の追加薬剤と組み合わせて、それぞれの単位に含有する物理的な別個の単位を指す。単位剤形のパラメーターは、特定の薬剤及び達成すべき効果に依存することが理解されるであろう。

【0221】

10

20

30

40

50

キット

本開示はまた、PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤、並びにその医薬組成物を含むキットを想定している。キットは一般に、以下に記載の様々な成分を収容する物理的構造体の形態であり、例えば、上記の方法を実施するのに利用することができる。キットの 1 以上の成分は、滅菌容器（例えば、滅菌バイアル）の中に収めることができる。

【0222】

キットには、本明細書で開示される PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤を含めることができ、これは被験体への投与に適した医薬組成物の形態であり得る。PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤は、すぐに使用できる形態、または例えば投与前に再構成もしくは希釈が必要な形態で提供することができる。PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤が、使用者による再構成が必要な形態である場合、キットにはまた、PEG - IL - 10 及び / または IL - 12 剤と共に包装された、またはそれらとは別に包装された、緩衝液、医薬的に許容される賦形剤などを含めることができる。キットにはまた、本明細書に記載の PEG - IL - 10 と IL - 12 剤の両方を収容することができる。このキットには複数の製剤が個別に収容されてよく、またはそれら製剤が既にキットに組み合わせられていてもよい。同様に、補助的療法（例えば、PEG - IL - 10、IL - 12 剤、及び補助的薬剤）を想定する場合、このキットには複数の製剤が個別に収容されてよく、またはそれらの 2 以上が既にキットに組み合わせられていてもよい。本開示のキットは、その中に収容された成分を適切に維持するのに必要な条件（例えば、冷蔵または冷凍）に合わせて設計することができる。

10

20

30

【0223】

キットは、その中の成分に関する識別情報及びその使用方法に関する説明（例えば、投与パラメーター、活性成分（複数可）の臨床薬理、例えば作用機序（複数可）、薬物動態及び薬力学、有害作用、禁忌など）を含むラベルまたは添付文書を含むことができる。キットの各成分は個別の容器内に封入することができ、また種々の容器の全部を単一のパッケージに収めることもできる。ラベルまたは添付文書には、ロット番号及び有効期限等の製造業者情報を含むことができる。ラベルまたは添付文書は、例えば、成分を収容する物理的構造体と一体化されても、物理的構造体内に個別に収容されていても、またはキットの構成要素（例えば、アンプル、シリンジ、またはバイアル）に貼付されていてもよい。

【0224】

ラベルまたは添付文書は、ディスク等のコンピューター読み取り可能な媒体（例えば、ハードディスク、カード、メモリーディスク）、CD - ROM / RAM もしくは DVD - ROM / RAM 等、DVD、MP3 のような光ディスク、磁気テープ、もしくは RAM 及び ROM 等の電子記憶媒体、または磁気 / 光記憶媒体、フラッシュメディアもしくはメモリー型カードのようなこれらのハイブリッドを追加で含むことができ、或いはこれらに組み込むこともできる。幾つかの実施形態においては、キット中に実際の説明書は存在していないが、遠隔の情報源から、例えばインターネットを介して説明書を得る手段が提供される。

40

【実施例】

【0225】

以下の実施例は、本発明の作製及び使用方法の完全な開示及び説明を当業者に提供するために記載するものであり、本発明者等が発明とみなすものの範囲を限定することを意図せず、また以下の実験が実施されたこと、及び実施できる実験の全てであることを示すことも意図しない。現在時制で記述された例示的な説明事項は、必ずしも実施されなかつたわけではなく、むしろその説明事項は、実施例に記載するデータ等を生成するためにを実施できると理解されるべきである。使用した数字（例えば、量、温度など）に関しては正確性を確保するよう努めたが、多少の実験誤差及び偏差が考慮されるべきである。

【0226】

特に記載のない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏

50

() であり、圧力は大気圧または大気圧付近である。以下を含む標準的な略語を使用する： s または sec = 秒（複数可）； min = 分（複数可）； hr = 時間（複数可）； aa = アミノ酸（複数可）； bp = 塩基対（複数可）； kb = キロベース（複数可）； nt = ヌクレオチド（複数可）； ng = ナノグラム； μg = マイクログラム； mg = ミリグラム； g = グラム； kg = キログラム； dl または dL = デシリットル； μl または μL = マイクロリットル； mL または mL = ミリリットル； l または L = リットル； nM = ナノモル； μM = マイクロモル； mM = ミリモル； M = モル； kDa = キロダルトン； i.m. = 筋肉内（に）； i.p. = 腹腔内（に）； SC または SQ = 皮下（に）； HPLC = 高速液体クロマトグラフィー； BW = 体重； U = 単位； ns = 統計的有意差なし； PMA = ホルボール 12 - ミリステート 13 - アセテート； PBS = リン酸緩衝生理食塩水； HSA = ヒト血清アルブミン； DMEM = ダルベッコ改変イーグル培地； PBMC = 初代末梢血単核細胞； FBS = ウシ胎児血清； FCS = ウシ胎児血清； HEPEs = 4 - (2 - ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸； LPS = リポ多糖； ATCC = アメリカン・タイプ・カルチャーワークスコレクション（アメリカ培養細胞系統保存機関）。

10

【0227】

材料及び方法 以下の一般的な材料及び方法は、指示した場合には使用したし、または以下の実施例において使用することができる。

【0228】

分子生物学手順。分子生物学における標準方法は、科学文献に記載されている [例えば、Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. ; 及び Ausubel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1 - 4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y. (細菌細胞のクローニング及びDNA変異誘発 (Vol. 1)、哺乳動物細胞及び酵母のクローニング (Vol. 2)、糖複合体及びタンパク質発現 (Vol. 3)、並びにバイオインフォマティクス (Vol. 4) について記載されている) を参照されたい)] 。

20

【0229】

抗体関連プロセス。ポリクローナル及びモノクローナル抗体の产生、精製、断片化について記載されている [例えば、Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY] ; リガンド / 受容体相互作用を特性決定するための標準技術を利用可能である [例えば、Colligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., NY を参照されたえい] ; 蛍光活性化細胞選別 (FACS) を含むフローサイトメトリーの方法を利用可能である [例えば、Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ を参照されたい] ; 例えば、診断試薬として使用される、核酸プライマー及びプローブ、ポリペプチド、並びに抗体を含む、核酸の修飾に適した蛍光試薬を利用可能である [Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR. ; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO.] 。抗体の更なる考察については、本明細書において別記する。

30

【0230】

ソフトウェア。例えば、抗原性断片、リーダー配列、タンパク質の折り畳み、機能的ドメイン、グリコシル化部位、及び配列アラインメントを決定するソフトウェアパッケージ及びデータベースを利用可能である [例えば、GCG Wisconsin Package] 。

40

50

ge (Accelrys, Inc., San Diego, CA)；及びDecypher (商標) (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV)を参照されたい】。

【0231】

PEG化。本明細書に記載のPEG化IL-10は、当業者に既知の任意の手段によって合成することができる。モノPEG-IL-10及びモノ/ジPEG-IL-10の混合物を作製するための例示的な合成スキームが記載されている（例えば、米国特許第7,052,686号；米国特許公開2011/0250163；WO2010/077853を参照されたい）。本開示の特定の実施形態には、選択的にPEG化されたモノ及びジPEG-IL-10の混合物が含まれる。当業者は、本開示の実施に適したPEGの作製及び使用（並びに他の薬物送達技術）において自分の専門知識を活用することに加え、多くの市販業者のPEG関連技術を熟知している（例えば、NO America Corp (Irvine, CA) 及びParchem (New Rochelle, NY)）。

【0232】

マウス。種々のマウス及び他の動物の株を本開示の教示と関連して使用することができる。例えば、免疫適合性のBalb/CまたはB細胞欠損Balb/CマウスをThe Jackson Lab., Bar Harbor, MEから入手することができ、これを標準的な手順に従って使用することができる[例えば、Martin et al. (2001) Infect. Immun., 69(11):7067-73及びCompton et al. (2004) Comp. Med. 54(6):681-89を参照されたい]。本開示によって想定される実験作業に適した他のマウス系統が当業者に既知であり、一般にJackson Labまたは別の供給者から入手可能である。

【0233】

IL-10の濃度。血清IL-10濃度レベルと曝露レベルは、当技術分野で使用される標準方法によって決定することができる。例えば、血清曝露レベルアッセイは、マウス尾切片からブレーンの毛細管に全血（約50 μL / マウス）を採取し、遠心分離により血清細胞と血液細胞を分離し、標準的なELISAのキット及び技術によってIL-10の曝露レベルを決定することにより行われる。

【0234】

本明細書に記載のアッセイは代表的なものであり、排他的なものではない。

【0235】

in vitroサイトカイン分泌アッセイ。活性化された初代ヒトCD8+T細胞は、PEG-IL-10で、次いで抗CD3抗体で処理されたときにIFN- γ を分泌する。以下のプロトコルは、サイトカイン分泌を調べるための例示的アッセイを示している。

【0236】

ヒトPBMCは、任意の標準的なプロトコルに従って単離することができる[例えば、Fuss et al. (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NYを参照されたい]。CD8+T細胞は、製造業者のプロトコル (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) に従ってMiltenyi Biotec's MACS細胞分離技術を使用して単離することができる。活性化時のアッセイの場合、単離されたCD8+T細胞 (2×10^6 細胞 / mL、標準的な96ウェルプレートのウェル当たり 5×10^5 細胞) を、プレートに結合された抗CD3及び抗CD28（プレートは10 μg / mLの抗CD3及び2 μg / mLの抗CD28でプレコーティングされている；Affymetrix eBioscience; San Diego, CA）、並びに適切な濃度のIL-12またはPEG-IL-10により、AIM-V培地 (Life Technologies; Carlsbad, CA) 中にて3日間で活性化することができる。次いで培地を回収し、製造業者のプロトコル (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA) に従って市販のELISAキットを使用し、IFN-

10

20

30

40

50

についてアッセイすることができる。休眠段階時のアッセイの場合、単離された C D 8 + T 細胞 (3×10^6 細胞 / mL、標準的な 24 ウェルプレートのウェル当たり 3×10^6 細胞) を、プレートに結合された抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 (プレートは $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ の抗 C D 3 及び $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ の抗 C D 2 8 でプレコーティングされている; Affymetrix eBioscience; San Diego, CA) により 3 日間で活性化することができる。活性化後、細胞を採取して再度プレーティングし (2×10^6 細胞 / mL、標準的な 96 ウェルプレートのウェル当たり 5×10^5 細胞)、適切な濃度の I L - 1 2 または P EG - h I L - 1 0 により、A IM · V 培地中にて 3 日間で処理することができる。処理後、細胞を採取して再度プレーティングし (2×10^6 細胞 / mL、標準的な 96 ウェルプレートのウェル当たり 5×10^5 細胞)、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ の可溶性抗 C D 3 により、A IM · V 培地中にて 4 時間処理することができる。次いで培地を回収し、製造業者のプロトコルに従って市販の E L I S A キットを使用し、I FN - (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)、グランザイム B、及びバーフォリン (Mabtech; Cincinnati, OH) についてアッセイすることができる。
10

【0237】

T NF 阻害アッセイ。U 9 3 7 細胞 [Sigma-Aldrich (#85011440); St. Louis, MO から入手可能な、肺由来のリンパ芽球ヒト細胞株] を P MA で刺激すると、細胞が T NF を分泌し、この T NF 分泌細胞を引き続きヒト I L - 1 0 で処理すると、T NF の分泌が用量依存的に減少する。例示的な T NF 阻害アッセイは、以下のプロトコルを使用して実施することができる。
20

【0238】

1 0 % F B S / F C S 及び抗生素質を含有する R M P I 中で U 9 3 7 細胞を培養した後、96 ウェル平底プレート [任意の血漿処理された組織培養プレート [例えば、Nunc; Thermo Scientific, USA] が使用可能] に、90 % 生存 U 9 3 7 細胞 1×10^5 を、条件ごとに三重にプレーティングする。以下の条件になるように細胞をプレーティングする (全て少なくとも三重; 「培地単独」については、ウェルの数を 2 倍にするが、これは、半分を 10nM の P MA とのインキュベーション後の生存性に使用するためである): $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS 単独、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $0.1 \text{ng} / \text{mL}$ の r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $1 \text{ng} / \text{mL}$ の r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $10 \text{ng} / \text{mL}$ の r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $100 \text{ng} / \text{mL}$ の r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $1000 \text{ng} / \text{mL}$ の r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $0.1 \text{ng} / \text{mL}$ の P EG - r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $1 \text{ng} / \text{mL}$ の P EG - r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $10 \text{ng} / \text{mL}$ の P EG - r h I L - 1 0 、 $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $100 \text{ng} / \text{mL}$ の P EG - r h I L - 1 0 、及び $5 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS + $1000 \text{ng} / \text{mL}$ の P EG - r h I L - 1 0 。各ウェルを $200 \mu\text{L}$ の 10nM · P MA に 24 時間曝露し、 $5 \% \text{CO}_2$ インキュベーターにて 37 度培養すると、その後の細胞は約 90 % が付着しているはずである。3 つの予備ウェルを再懸濁し、細胞を計数して生存性を評価する (90 % 超が生存しているはずである)。新鮮な P MA 非含有培地で、ウェル中に未だ細胞が存在することを保証するよう緩やかに、しかし完全に 3 回洗浄する。適切な濃度 (容積を 100 % 希釈するので 2 倍) の r h I L - 1 0 または P EG - r h I L - 1 0 を含有する培地を、ウェル当たり $100 \mu\text{L}$ 添加し、 $5 \% \text{CO}_2$ インキュベーターにて 37 度 30 分間インキュベートする。
30

$10 \text{ng} / \text{mL}$ の L PS 原液をウェル当たり $100 \mu\text{L}$ で添加し、各ウェルにおける L PS の最終濃度を $5 \text{ng} / \text{mL}$ にし、 $5 \% \text{CO}_2$ インキュベーターにて 37 度 $18 \sim 24$ 時間インキュベートする。上清を取り出し、製造業者の指示に従って T NF の E L I S A を実施する。E L I S A では、各コンディショニングした上清について二重に実行する。
40

【0239】

M C / 9 細胞増殖アッセイ。M C / 9 細胞 (Cell Signaling Tech nology; Danvers, MA から入手可能な肥満細胞の特性を有するマウス細胞
50

系統)にIL-10を投与すると、細胞増殖の用量依存的な増加を引き起す。Thompson-Snipes, L. et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 507-10)には、MC/9細胞にIL3+IL-10及びIL-3+IL-4+IL-10を補充する標準アッセイのプロトコルが記載されている。供給業者(例えば、R&D Systems, USA; 及びCell Signaling Technology, Danvers, MA)は、このアッセイをrhIL-10のロット出荷アッセイとして使用している。当業者は、Thompson-Snipes, L. et alに記載されている標準のアッセイプロトコルを、細胞にIL-10のみを補充するように変更することができる。

【0240】

10

腫瘍モデル及び腫瘍解析。任意の当技術分野で認められた腫瘍モデル、アッセイなどを使用して、様々な腫瘍に対する本明細書に記載のIL-10分子の効果を評価することができる。後述する腫瘍モデル及び腫瘍分析は、利用できるものの代表例である。同系マウス腫瘍細胞に、腫瘍接種当たり 10^4 、 10^5 、または 10^6 細胞を皮下または皮内に注射する。Ep2乳癌モデル、CT26結腸癌モデル、PDV6皮膚扁平上皮癌モデル、及び4T1乳癌モデルを使用することができる[例えば、Langowski et al. (2006) Nature 442: 461-465を参照されたい]。免疫適格性のBalb/CまたはB細胞欠損Balb/Cマウスを使用することができる。PEG10-mIL-10を前記免疫適格マウスに投与することができる一方、PEG-hIL-10治療はB細胞欠損マウスにおいて可能である。治療を開始する前に、腫瘍は $100\sim250\text{ mm}^3$ の大きさに達するようになる。IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10、または緩衝液対照を、腫瘍移植から離れた部位にSCで投与する。腫瘍の成長は通常、電子ノギスを使用して毎週2回モニターする。各種エンドポイントにおいて腫瘍組織及びリンパ器官を採取し、炎症マーカーの数でmRNAの発現を測定し、複数の炎症性細胞マーカーの免疫組織染色を実施する。組織を液体窒素中で急速凍結し、-80

20

で保存する。原発腫瘍の成長は通常、電子ノギスを使用して毎週2回モニターする。腫瘍体積は、式($\text{幅}^2 \times \text{長さ} / 2$)を使用して算出することができる(式中の長さは、長い方の寸法である)。腫瘍は、治療を開始する前に $90\sim250\text{ mm}^3$ の大きさに達するようになる。

【0241】

30

実施例1

IL-12と組み合わせたPEG-IL-10の抗腫瘍効果

この実施例は、マウス4T1腫瘍モデルにおいて、腫瘍サイズに対するPEG-IL-10及びIL-12の組み合わせの効果を実証する。

【0242】

40

簡潔に言えば、 $100\mu\text{L}$ 容量中の 1×10^4 個の4T1細胞(CRL-2539; ATCC、Manassas、VA)を、4~6週齢の雌のBALB/cマウス(Jackson Laboratory、Bar Harbor、ME)の右下脇腹にSCで移植した。触診可能になったときに腫瘍増殖を週2回測定し、腫瘍体積は、式($\text{幅}^2 \times \text{長さ} / 2$)を用いて計算することができ、ここで長さはより長い方の寸法である。腫瘍の体積が平均 75 mm^3 に達したときに、動物を階層化した。

【0243】

50

コホートあたり8匹のマウスに担体、及び/または 1 mg/kg のPEG-rMuIL-10(ARMO Biosciences, Redwood City, CA)、及び/または 0.05 、 0.1 もしくは 0.5 mg/kg のrMuIL-12(R&D Systems, Minneapolis, MN)をSCで21日間または28日間毎日投与した。各マウスは、2回の別々の注射(例えば、IL-10及び担体、またはIL-10及びIL-12、または担体及び担体)を受けた。投与の21日後に、組織及び腫瘍分析のために各群から4匹のマウスを屠殺した。投与の28日後に、各群の残りのマウスを組織及び腫瘍分析のために屠殺した。

【0244】

腫瘍重量を21日後に評価した。そのデータを図2に示す。投与されたrMuIL-12の量はX軸に示されている。上記のように、PEG-rMuIL-10を投与した場合、用量は1mg/kgであった。図2に示すように、PEG-rMuIL-10及びrMuIL-12の各組み合わせの投与は、いずれかの薬剤単独の投与よりも腫瘍重量の大きな減少をもたらした。この効果は、より高い用量のrMuIL-12(すなわち、0.5及び0.1mg/kg; * = P < 0.05)において更に顕著であった。図2におけるバーは、個々のマウスデータの平均を表す。28日後に評価したマウスは、同じ一般的の傾向を示した(データは示さず)。

【0245】

実施例2

IL-12と組み合わせたPEG-IL-10の血清サイトカインレベルに対する効果

この実施例は、腫瘍を有するマウスの血清IFN 及びTNF レベルに対する、PEG-IL-10及びIL-12の組み合わせの効果を実証する。本明細書に記載されるように、IL-10及びIL-12の各々、特にIL-12への曝露は、血清サイトカイン IFN 及びTNF の誘導を導く。IFN 及びTNF (主としてIFN)の血清レベルの上昇には、IL-12の全身毒性が伴う。

【0246】

簡潔に言えば、実施例1に記載のマウス(即ち、担体、1mg/kgのPEG-rMuIL-10、及び/または0.05、0.1または0.5mg/kgのrMuIL-12をSCで毎日投与されたマウス)において、投与の9日後、4時間後にIFN 及びTNF レベルを評価した。血漿サイトカインレベルを、Meso Scale Discov eryのV-PLEXプロリン炎症パネル1(マウス)キット(Rockville、Maryland)を用い、製造者の指示に従って検出した。結果を図3A及び図3Bに示す。投与されたrMuIL-12の量は、それぞれ図3A及び図3BのX軸に示されている。上記のように、PEG-rMuIL-10を投与したとき、その用量は1mg/kgであった。

【0247】

図3Aに示すように、PEG-rMuIL-10と3種のrMuIL-12用量の各々との同時投与は、3種のrMuIL-12用量のそれぞれ単独の投与後に観察された血清IFN レベルの低下をもたらした。更に、0.5mg/kgのrMuIL-12を1mg/kgのPEG-rMuIL-10と同時投与した場合、0.5mg/kgのrMuIL-12単独投与と比較して、血清IFN レベルは統計的に有意に減少した(** = P < 0.001)。これらのデータは、IL-12と同時投与されたときのPEG-IL-10が有する効果、即ち、併用療法から生じる増強された抗腫瘍応答(図2参照)は損なわれない一方で、IL-12に付随する推定上の毒性「指標」は低下することを表している。

【0248】

図3Bに示すように、3種のrMuIL-12用量の各々とのPEG-rMuIL-10の同時投与は、3種のrMuIL-12の用量をそれぞれ単独で投与した後に観察された血清TNF レベルの低下をもたらした。更に、0.5mg/kgのrMuIL-12を1mg/kgのPEG-rMuIL-10と同時投与した場合、0.5mg/kgのrMuIL-12単独の投与と比較して、血清TNF レベルは統計学的に有意に減少した(** = P < 0.001)。これらのデータは、IL-12と同時投与されたときにPEG-IL-10が有する効果、即ち、併用療法から生じる増強された抗腫瘍応答(図2参照)が損なわれない一方で、IL-12に付随する推定毒性「指標」は低下することを表している。

【0249】

発明者に既知である本発明を実施するための最良の形態を含め、本発明の具体的な実施

10

20

30

40

50

形態が本明細書に記載される。前述の説明を読めば、開示された実施形態の変形例は当業者に明白になり得るものであり、当業者はこのような変形例を適宜用い得ることが推測される。従って、本発明は、本明細書で具体的に記載されたものと別 の方法で実施されること、及び適用される法が許可するように、本発明は、本明細書に添付された特許請求の範囲に列挙される主題の全ての変更及び均等物を含むことを意図している。更に、本明細書で特に記載のない限り、または文脈上で明らかな矛盾がない限り、上記要素の可能な変形例全てにおいて、上記の要素のあらゆる組み合わせが本発明によって包含される。

【 0 2 5 0 】

本明細書で引用される刊行物、特許出願、アクセッション番号、及びその他の参考文献は全て、個々の刊行物または特許出願がそれぞれ具体的かつ個別に参照により本明細書に組み込まれる旨を指示されたのと同様に、本明細書の一部として援用される。

10

〔 1 〕

ヒト I L - 12. 條 A (アクセッショニ番号 I F 45_A) - 306アミノ酸残基

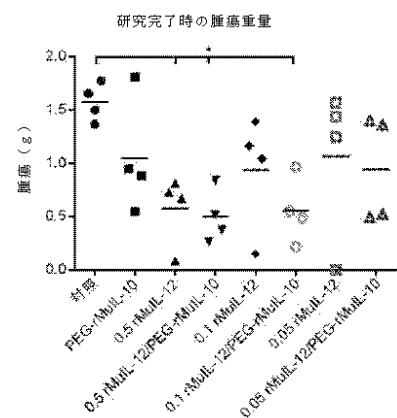
1 weikhdvuy veldhypdab qemwlicdt pseidylwti dgasevlygg kltiqykef
61 qdsgrytobk ggewisral llihktedgiw stdiikyke pknctfcie abnygript
111 wuutitstl dslodgrytobk atslerxwz shayekwyve ceqesipras
181 eskipwipw davkhlyken ytsafzndi kphqphnlg lkplknpwz ewavetwew
241 stpshwz tcvayrgkz rekkdrvifd krtstvluzt nadisvixsd ryyseswew
301 sepcos

ヒト IL-12, 鮫 B (アクセ

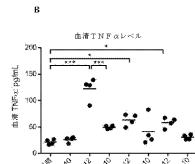
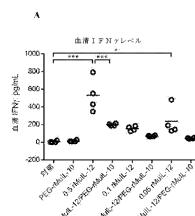
1 znpvptcpq qmfpclhbq nllravensl qkzqtlefy pctsse
61 esclplalkt nesclqasret ejfitngscs pxtsfymal clxsi

121 skllmfpqk ifldgmlnf idelmglnhf nsstvpgkss leepdfyktk ihcicllhaf
122 ricavtidiyx raylles

(図 2)



(四 3)



【配列表】

2019505493000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/68945
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13^{ter}.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13^{ter}.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13^{ter}.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/68945						
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)								
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:								
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:							
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:							
3.	<input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 20-73 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).							
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)								
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:								
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.							
2.	<input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.							
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:							
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:							
Remark on Protest <table border="0"> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/68945
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61P 35/00; C07K 14/54; A61K 38/00 (2017.01) CPC - C07K 14/5428, 5434; A61K 38/208, 38/2066 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> IPC(8): A61P 35/00; C07K 14/54; A61K 38/00 (2017.01) <small>CPC: C07K 14/5428, 5434; A61K 38/208, 38/2066</small>		
<small>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</small> <small>CPC: C07K 14/5428, 5434; A61K 38/208, 38/2066 (text search)</small> <small>USPC: 530/352; 435/62.52, 62.51</small>		
<small>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</small> <small>Electronic data bases: PatBase; Google Patents; Google Scholar</small> <small>Search terms: PEG IL-10, IL-12, pegylated peptide, anti-tumor, combination chemotherapy, cancer or cancer-related disease, IL-12 side effects and toxicity, serum trough, serum half-life</small>		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2014/172392 A1 (Armo Biosciences, Inc.) 23 October 2014 (23.10.2014). Especially para [0007], [0008], [0015], [0016], [0017], [0235]	1-19
Y	TUGUES et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. Cell Death Differ February 2015 Vol 22 No 2 Pages 237-246. Especially abstract, pg 237 col 2 para 2, pg 238 col 1 para 4, pg 240 col 1 para 2.	1-19
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
<small>* Special categories of cited documents:</small> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed <small>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small> <small>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</small> <small>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</small> <small>"&" document member of the same patent family</small>		
Date of the actual completion of the international search 01 March 2017	Date of mailing of the international search report 24 MAR 2017	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
C 0 7 K 14/54 (2006.01)	C 0 7 K 14/54	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(72)発明者 マム, ジョン・ブライアン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94022、ロス・アルトス・ヒルズ、ページ・ミル・ロード
・12121

(72)発明者 チャン, アイヴァン・ホー

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94063、レッドウッド・シティ、ベラ・アベニュー・12
4エー

F ターム(参考) 4C076 AA11 BB11 BB16 EE59 FF02 FF04 FF14 GG43
4C084 AA01 AA02 AA03 AA19 BA42 BA44 DA12 MA02 MA17 MA66
NA05 NA14 ZB261 ZB271 ZC751
4H045 BA10 BA57 CA40 DA02 EA20