



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108430583 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680077588.8

(22)申请日 2016.12.28

(30) 优先权数据

62/275,127 2016.01.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.07.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/068945 2016.12.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/120081 EN 2017.07.13

(71)申请人 阿尔莫生物科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·B·穆姆 I·H·陈

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

代理人 孙涛 肖鹏

(51) Int.Cl.

A61P 35/00(2006.01)

C07K 14/54(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

权利要求书4页 说明书38页

序列表9页 附图2页

(54)发明名称

使用白介素-10治疗疾病和病症的方法

(57)摘要

提供经由施用PEG-IL-10与IL-12剂组合来治疗患有癌症相关疾病、病症或病况的受试者或预防这一疾病、病症或病况的發生的方法。

人IL-12, 铎A(登录号U45 A)-306个氨基酸残基

1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	

人IL-12、纯B(登录号U45 B)-197个氨基酸残基

1 anipwvqdpz gqfzqubhaz nlravanzd qhazqlofy puzwoidz dthkktzv
 01 awqfzqstz nuzobazet xltugazd xktzfnmal nioqyozk aygzfktzv
 001 xltzqdpkz ftdqmalv xltzqmalnf azetvqkza lczfzlykt xltzltbfz
 0001 xltztdvz azvzoz

1. 一种治疗受试者的癌症相关的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用:
 - a) 治疗有效量的IL-12剂,和
 - b) 治疗有效量的PEG-IL-10;其中所述PEG-IL-10的量足以将IL-12相关毒性降低至低于用IL-12单一疗法观察到的水平。
2. 一种治疗受试者的癌症相关的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用:
 - a) 治疗有效量的IL-12剂;和
 - b) 治疗有效量的PEG-IL-10;其中所述量足以i) 实现至少1.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度,和ii) 将IL-12相关毒性降低至低于用IL-12单一疗法观察到的水平。
3. 一种治疗受试者的癌症相关的疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用:
 - a) 治疗有效量的IL-12剂;和
 - b) 治疗有效量的PEG-IL-10;其中所述量足以
 - i) 在一段时间内维持平均IL-10血清谷浓度,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少1.0ng/mL,并且其中所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少90%;和
 - ii) 将所述IL-12相关毒性降低至低于用IL-12单一疗法观察到的水平。
4. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少2.5ng/mL。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少5.0ng/mL。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少7.5ng/mL。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少10.0ng/mL。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少15.0ng/mL。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度为至少20.0ng/mL。
10. 根据权利要求3所述的方法,其中所述时间段为至少12小时。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述时间段为至少24小时。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述时间段为至少48小时。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述时间段为至少72小时。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述时间段为至少1周。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述时间段为至少2周。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述时间段为至少1个月。
17. 根据权利要求3所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少95%。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少98%。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少100%。
20. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10包含成熟人IL-10。
21. 根据权利要求1至19中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10包含成熟人IL-10的变体,并且其中所述变体表现出可与成熟人IL-10的活性相当的活性。
22. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10的量为10.0μg/kg/天至20.0μg/kg/天。

23. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10的量为11.0 μ g/kg/天至19.0 μ g/kg/天。

24. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10的量为12.0 μ g/kg/天至18.0 μ g/kg/天。

25. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10的量为13.0 μ g/kg/天至17.0 μ g/kg/天。

26. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10的量为14.0 μ g/kg/天至16.0 μ g/kg/天。

27. 根据权利要求1至21中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10的量为约15.0 μ g/kg/天。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为0.01 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天。

29. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为0.05 μ g/kg/天至9.5 μ g/kg/天。

30. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为0.1 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天。

31. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为0.1 μ g/kg/天至9.0 μ g/kg/天。

32. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为0.5 μ g/kg/天至8.5 μ g/kg/天。

33. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为1.0 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天。

34. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为1.0 μ g/kg/天至8.0 μ g/kg/天。

35. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为1.5 μ g/kg/天至7.5 μ g/kg/天。

36. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为2.0 μ g/kg/天至7.0 μ g/kg/天。

37. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为2.5 μ g/kg/天至6.5 μ g/kg/天。

38. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为3.0 μ g/kg/天至6.0 μ g/kg/天。

39. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为3.5 μ g/kg/天至5.5 μ g/kg/天。

40. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为4.0 μ g/kg/天至5.0 μ g/kg/天。

41. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法, 其中所述IL-12剂的量为约4.5 μ g/kg/天。

42. 根据权利要求1至41中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10包含共价连接至IL-

10的至少一个亚基的至少一个氨基酸残基的至少一个PEG分子。

43. 根据权利要求1至41中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10包括单-聚乙二醇化IL-10和二-聚乙二醇化IL-10的混合物。

44. 根据权利要求42或43所述的方法,其中所述PEG-IL-10的所述PEG组分具有约5kDa至约20kDa的分子量。

45. 根据权利要求42或43所述的方法,其中所述PEG-IL-10的所述PEG组分具有大于约20kDa的分子量。

46. 根据权利要求42或43所述的方法,其中所述PEG-IL-10的所述PEG组分具有至少约30kDa的分子量。

47. 根据权利要求1至46中任一项所述的方法,其中所述IL-12剂为成熟人IL-12。

48. 根据权利要求1至46中任一项所述的方法,其中所述IL-12剂为成熟人IL-12的变体,并且其中所述变体表现出可与成熟人IL-12的活性相当的活性。

49. 根据权利要求1至48中任一项所述的方法,其中所述癌症相关疾病、病症或病况是实体肿瘤或淋巴瘤。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中所述实体肿瘤选自以下组成的组:乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、胃癌、卵巢癌、肾癌、睾丸癌和黑素瘤。

51. 根据权利要求1至48中任一项所述的方法,其中所述癌症相关疾病、病症或病况是免疫不敏感肿瘤。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述免疫不敏感肿瘤选自结肠癌、胃食管癌、胰腺癌和乳腺癌组成的组。

53. 根据权利要求1至52中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10和所述IL-12剂的作用是相加的。

54. 根据权利要求1至52中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10和所述IL-12剂的作用是协同的。

55. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中每日至少两次向所述受试者施用所述PEG-IL-10。

56. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中每日至少一次向所述受试者施用所述PEG-IL-10。

57. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中至少每72小时向所述受试者施用所述PEG-IL-10。

58. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中每周至少一次向所述受试者施用所述PEG-IL-10。

59. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中至少每2周向所述受试者施用所述PEG-IL-10。

60. 根据权利要求1至54中任一项所述的方法,其中每月至少一次向所述受试者施用所述PEG-IL-10。

61. 根据权利要求1至60中任一项所述的方法,其还包括施用至少一种另外的预防或治疗剂。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述另外的预防或治疗剂是化学治疗剂。

63. 根据权利要求1至62中任一项所述的方法,其中所述受试者为人。
64. 根据权利要求1至63中任一项所述的方法,其中所述施用通过肠胃外注射进行。
65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述肠胃外注射是皮下注射。
66. 一种药物组合物,其包含一定量的根据权利要求1至65中任一项所述的PEG-IL-10和IL-12剂以及药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。
67. 根据权利要求66所述的药物组合物,其中所述赋形剂是等渗注射溶液。
68. 根据权利要求66所述的药物组合物,其中所述组合物适合人施用。
69. 根据权利要求66至68中任一项所述的药物组合物,其还包含至少一种另外的预防或治疗剂。
70. 一种无菌容器,其包含根据权利要求67至69中任一项所述的药物组合物。
71. 根据权利要求70所述的无菌容器,其中所述无菌容器为注射器。
72. 一种试剂盒,其包含根据权利要求70或71所述的无菌容器。
73. 根据权利要求72所述的试剂盒,其还包含第二无菌容器,所述第二无菌容器包含至少一种另外的预防或治疗剂。

使用白介素-10治疗疾病和病症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年1月5日提交的美国临时申请序列号62/275,127的优先权权益,该申请通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用PEG-IL-10与其他药剂组合治疗或预防包括癌症和免疫相关病症的多种疾病和病症的方法。

[0004] 引言

[0005] 细胞因子白介素-10 (IL-10) 是一种通过对T细胞、B细胞、巨噬细胞和抗原呈递细胞 (APC) 的作用来调控多种免疫反应的多效细胞因子。IL-10可以通过抑制IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF α 、GM-CSF和G-CSF在活化的单核细胞和活化的巨噬细胞中的表达来遏制免疫反应,并且其还遏制由NK细胞实现的IFN- γ 产生。尽管IL-10主要在巨噬细胞中表达,但在活化的T细胞、B细胞、肥大细胞和单核细胞中也已经检测到表达。除了遏制免疫反应之外,IL-10还表现出免疫刺激性质,包括刺激IL-2和IL-4处理的胸腺细胞的增殖,增强B细胞的活力和刺激II类MHC的表达。

[0006] 人IL-10是在破坏两个单体亚基之间的非共价相互作用后变得生物学无活性的同源二聚体。从公布的IL-10晶体结构获得的数据指示功能性二聚体表现出与IFN- γ 的某些类似性 (Zdanov等, (1995) Structure (Lond) 3:591-601)。

[0007] 由于其多效活性,IL-10已经与包括炎性病症、免疫相关病症、纤维化病症、代谢病症和癌症的广泛疾病、病症和病况相连。针对许多这类疾病、病症和病况对IL-10进行的临床和临床前评价已经使其治疗潜力具体化。此外,在某些治疗设置中已经显示出聚乙二醇化的IL-10比非聚乙二醇化的IL-10更有效。

[0008] 发明概述

[0009] 本公开预期使用PEG-IL-10 (例如, rHuPEG-IL-10) 及其组合物与IL-12剂 (例如, rHuIL-12) 及其组合物组合用于治疗 and/或预防癌症相关的疾病、病症和病况和/或其症状的方法。这类方法提供在治疗和/或预防本文所述的癌症相关的疾病、病症和病况中的相加和可能是协同的作用的机会。此外,这类组合疗法可以允许降低PEG-IL-10和/或与其组合的IL-12剂的施用量和/或施用频率,这可以最小化或消除任何不利作用。组合疗法涵盖当PEG-IL-10和IL-12剂分开施用 (例如, 两种不同的药物组合物) 或一起施用 (例如, 一种包含PEG-IL-10和IL-12剂两者的药物组合物) 时的共同施用。

[0010] 如本文详细讨论, IL-10被认为是抑制IFN γ 、IL-12和TNF α 的分泌的抗炎且免疫遏制性的细胞因子。它还抑制CD4⁺ T细胞的抗原呈递和后续激活, 并且因此被广泛认为是潜在的免疫遏制性细胞因子。在涉及多种癌症患者群体的临床研究中, 皮下施用PEG-IL-10作为单一疗法产生了有益的结果。

[0011] 特定地讲, 最近的证据表明PEG-IL-10在免疫生理学的背景下发挥免疫刺激作用 (Infante, J.R.等, ASCO Meeting Abstracts, 2015.33 (15_增刊):3017页)。尽管对实施本

公开不需要了解该抗肿瘤作用的具体机制,但已经显示该作用需要CD8⁺ T细胞和内源性IFN γ 两者(Mumm, J.B.等, *Cancer Cell*, 2011.20(6):第781-96页;Emmerich, J.等, *Cancer Res*, 2012.72(14):第3570-81页)。具体地讲,CD8⁺ T细胞暴露于PEG-IL-10引起IFN γ 、粒酶B和穿孔素分泌的增强。IFN γ 和粒酶B两者的分泌依赖于T细胞受体与同源MHC I/抗原复合物的接合(Chan, I.H.等, *J Interferon Cytokine Res*, 2015)。

[0012] 用PEG-rHuIL-10治疗人癌症患者引起显著的单一疗法抗肿瘤应答,该应答的特征在于粒酶B+瘤内CD8⁺ T细胞浸润的显著增加。伴随着这种激活的CD8⁺瘤内T细胞浸润是血清细胞因子IFN γ 、IL-18、IL-7、IL-4、GM-CSF和激活的T细胞标志FasL的可重复增加。此外,用PEG-rHuIL-10治疗降低血清TGF- β 。这些细胞因子是广谱免疫激活的标志。

[0013] 人IL-10是同源二聚体,并且每个单体包含178个氨基酸,其中前18个氨基酸构成信号肽。除非另外指明,否则本文提及的人IL-10是指缺乏信号肽的成熟形式,其中每个单体包含160个氨基酸(参见,例如美国专利6,217,857)。如本文所用,术语“PEG-IL-10”是指表现出与成熟人PEG-IL-10的活性相当的活性的聚乙二醇化人IL-10及其变体,诸如聚乙二醇化鼠IL-10和聚乙二醇化形式的其他IL-10直向同源物。

[0014] 白介素-12(IL-12)是巨噬细胞、B-淋巴细胞、树突状细胞和嗜中性粒细胞响应于抗原刺激天然产生的多效性细胞因子。其参与了天然T细胞向Th1细胞的分化,可以刺激T细胞的生长和功能,并介导NK细胞和CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞的细胞毒活性的增强。如本文进一步讨论,IL-12还刺激由T细胞和NK细胞产生IFN γ 和TNF α ,并降低IL-4介导的IFN γ 遏制。已经显示IFN γ 协调抗癌防御的自然机制(Jakobisiak, M.等, (2013) *Immunol Lett* 90:103-22)。部分地由于其有效刺激IFN γ 产生,IL-12最初被认为代表着肿瘤免疫疗法的理想候选者。然而,在初始临床研究期间全身施用IL-12产生非常窄的治疗指数并产生不可接受的不利作用分布。因此,在肿瘤学设置中作为单一疗法的IL-12的全身施用在很大程度上被认为是不可行的。(参见,例如Teng, M.等, (2015) *Nature Medicine* 21(7):719-29)。

[0015] 如本文所用,术语“IL-12”、“一种或多种IL-12多肽”、“一种或多种IL-12剂”、“一种或多种IL-12分子”等等旨在被广泛解释并且包括例如人和非人IL-12相关多肽,包括同源物、变体(包括突变蛋白)及其片段,以及具有例如前导序列(例如,信号肽)的IL-12多肽。

[0016] 在特定的实施方案中,本公开预期治疗或预防受试者的癌症相关疾病、病症或病况的方法,其包括向所述受试者施用:a)治疗有效量的IL-12剂,和b)治疗有效量的PEG-IL-10;其中PEG-IL-10的量足以将IL-12相关毒性降低至低于用IL-12单一疗法观察到的水平。

[0017] IL-12相关毒性包括流感样症状(例如,头痛、发烧、寒战、疲劳和关节痛);血液学毒性,包括嗜中性白血球减少症和血小板减少症;以及肝毒性,表现为转氨酶、高胆红素血症和低白蛋白血症的剂量依赖性增加。其他IL-12相关副作用包括粘膜炎症(例如,口腔粘膜炎症、口腔炎和结肠炎)、低血压、肾损伤和胃肠道出血。这些毒性作用已经与IFN γ 和TNF α 以及其他细胞因子(例如,IP-10和MIG)的二次产生相关。(参见,例如Lasek等, (2014) *Cancer Immunol Immunother* 63:419-35;Xu等, *Clinical and Developmental Immunology*, 第2010卷,文章编号832454,第9页);Cebon, J.等, *Cancer Immun*, 2003.3:第7页)。

[0018] 在其他实施方案中,本公开预期治疗或预防受试者的癌症相关的疾病、病症或病况的方法,其包括向受试者施用:a)治疗有效量的IL-12剂,和b)治疗有效量的PEG-IL-10,

其中所述PEG-IL-10的量足以i) 达到至少1.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度,和ii) 将IL-12相关毒性降低至低于用IL-12单一疗法观察到的水平。

[0019] 在其他实施方案中,本公开预期治疗或预防受试者的癌症相关的疾病、病症或病况的方法,其包括向受试者施用:a) 治疗有效量的IL-12剂,和b) 治疗有效量的PEG-IL-10,其中该量足以i) 在一段时间内维持平均IL-10血清谷浓度,其中该平均IL-10血清谷浓度为至少1.0ng/mL,并且其中该平均IL-10血清谷浓度维持该时间段的至少90%;和ii) 将IL-12相关毒性降低至低于用IL-12单一疗法观察到的水平。

[0020] 所需IL-10血清谷浓度可以取决于许多因素,包括疾病、病症或病况的性质(例如,局部肿瘤或转移性疾病)、受试者患病的程度(例如,早期疾病相对于晚期疾病)、是否正在施用组合疗法以及患者特异性参数(例如,肝和肾功能)。举例来说,为了观察临床益处,PEG-IL-10和化学治疗剂的共同施用可能仅需要约1ng/mL至2ng/mL范围内的血清谷,而转移性癌症可能需要6ng/mL至10ng/mL或10ng/mL或更多以实现可相当的临床益处(参见,例如WO 2014/172392)。如本领域技术人员将会知道,所需血清谷水平是背景依赖性的(例如,特定癌症的特征)且患者特异性的

[0021] 因此,在本公开的特定实施方案中,平均IL-10血清谷浓度为至少1.0ng/mL、至少1.5ng/mL、至少2.0ng/mL、至少2.5ng/mL、至少3.0ng/mL、至少3.5ng/mL、至少4.0ng/mL、至少4.5ng/mL、至少5.0ng/mL、至少5.5ng/mL、至少6.0ng/mL、至少6.5ng/mL、至少7.0ng/mL、至少7.5ng/mL、至少8.0ng/mL、至少9.0ng/mL、至少10.0ng/mL、至少11.0ng/mL、至少12.0ng/mL、至少13.0ng/mL、至少14.0ng/mL、至少15.0ng/mL、至少16.0ng/mL、至少17.0ng/mL、至少18.0ng/mL、至少19.0ng/mL、至少20.0ng/mL、至少21.0ng/mL、至少22.0ng/mL、或大于22.0ng/mL。

[0022] 在进一步的实施方案中,该时间段为至少12小时、至少24小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少6周、至少2个月、至少3个月或大于3个月。

[0023] 在本公开的特定实施方案中,平均IL-10血清谷浓度维持该时间段的至少85%、至少90%、至少92.5%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0024] 设想足以维持特定的稳态血清谷浓度(例如,2.0ng/mL)的给药方案可以产生高于所需稳态血清谷浓度的初始血清谷浓度。由于IL-10在哺乳动物受试者中的药效学和药代动力学特征,即使给药参数(量和频率)保持恒定,初始谷浓度(例如,通过施用一种或多种负荷剂量,然后施用一系列维持剂量而达到)在一段时间内也逐渐但持续地减小。在该时间段之后,逐渐但持续的减小结束并维持稳态血清谷浓度。

[0025] 举例来说,需要对小鼠(例如,C57BL/6小鼠)肠胃外施用(例如,皮下和静脉内)约0.1mg/kg/天的IL-10剂(例如,mIL-10)来维持例如2.0ng/mL的稳态血清谷浓度。然而,在开始以0.1mg/kg/天给药之后(以及任何一种或多种负荷剂量之后)大约30天,才可能达到稳态血清谷浓度。相反,在达到初始血清谷浓度(例如,2.5ng/mL)之后,该浓度在例如大约30天期间逐渐但持续地减小,此后维持所需稳态血清谷浓度(例如,2.0ng/mL)。本领域技术人员将能够使用例如ADME和患者特异性参数来确定维持所需稳态谷浓度所需要的剂量。

[0026] 在其他实施方案中,本公开的PEG-IL-10可以包含共价连接至IL-10的至少一个亚基的至少一个氨基酸残基的至少一个PEG分子或者包含单-聚乙二醇化和二-聚乙二醇化

IL-10的混合物(例如,1:1)。PEG-IL-10的PEG组分可以具有大于约5kDa、大于约10kDa、大于约15kDa、大于约20kDa、大于约30kDa、大于约40kDa或大于约50kDa的分子量。在一些实施方案中,分子量为约5kDa至约10kDa、约5kDa至约15kDa、约5kDa至约20kDa、约10kDa至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约25kDa、或约10kDa至约30kDa。

[0027] 如本文所指出,在一些实施方案中,PEG-IL-10是成熟人PEG-IL-10,而在其他实施方案中,其是成熟人PEG-IL-10的变体,其表现出可与成熟人PEG-IL-10的活性相当的活性。

[0028] 本公开预期如下实施方案,其中施用给受试者以治疗或预防癌症相关的疾病、病症或病况的组合疗法的PEG-IL-10组分的量为10.0μg/kg/天至20.0μg/kg/天。在一些实施方案中,PEG-IL-10的施用量为12.0μg/kg/天至18.0μg/kg/天。在一些实施方案中,该量小于10.0μg/kg/天,而在其他实施方案中,该量大于20.0μg/kg/天。

[0029] 根据本公开,可以将PEG-IL-10与IL-12剂组合施用以用于治疗受试者的癌症相关的疾病、病症或病况。上述疾病、病症和病况的详细描述在本文其他地方陈述。在一些实施方案中,癌症是实体肿瘤,诸如与乳腺癌、前列腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、胃癌、卵巢癌、肾癌、睾丸癌和黑素瘤相关的肿瘤。在特定的实施方案中,癌症为血液学病症,包括淋巴瘤如B-细胞淋巴瘤,或白血病。

[0030] 在本公开的特定实施方案中,癌症相关的疾病、病症或病况是免疫不敏感肿瘤。对治疗性免疫操作不敏感的肿瘤可以被描述为表现出以下两个特征:1)免疫系统的主动遏制,和2)伴随着由其治疗引起的免疫遏制机制的伴随激活的炎性应答(Galon等,(2013年7月25日)Immunity 39:11-26 (PubMed PMID:23890060))。免疫不敏感肿瘤的实例包括但不限于结肠癌、胃食管癌、胰腺癌和乳腺癌。

[0031] 在本公开的某些实施方案中,PEG-IL-10和IL-12剂的治疗作用是相加的,而在其他实施方案中,它们是协同的。

[0032] PEG-IL-10和IL-12剂可以通过任何有效路径施用。在一些实施方案中,它们通过包括皮下注射的肠胃外注射施用。在特定的实施方案中,PEG-IL-10与IL-12剂分开施用,而在其他实施方案中,PEG-IL-10和IL-12剂一起施用。如本文所指示,为了本公开的目的,PEG-IL-10和IL-12剂被认为是在单独或一起施用时或以一种或多种递送方式(例如小瓶、IV袋或注射器)共同施用。

[0033] 如上所提,用于本公开的组合疗法的各种类型的IL-12剂包括人和非人IL-12相关的多肽,包括同源物、变体(包括突变蛋白)及其片段。本文还预期IL-12复合物的功能活性组分以及活性异二聚体(p70)。在一些实施方案中,IL-12肽具有至少85%、至少87%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的306个氨基酸残基的人IL-12A多肽和/或197个氨基酸残基的人IL-12B多肽。在其他实施方案中,IL-12肽与306个氨基酸残基的人IL-12A多肽和/或197个氨基酸残基的人IL-12B多肽具有至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列同一性。

[0034] 如本文所指示,在一些实施方案中,IL-12剂是成熟人IL-12,而在其他实施方案中,IL-12剂是成熟人IL-12的变体,其表现出可与成熟人IL-12的活性相当的活性。

[0035] 本文还提供了如下实施方案,其中施用给受试者以治疗或预防癌症相关的疾病、病症或病况的组合疗法的IL-12剂的量为0.01μg/kg/天至10.0μg/kg/天、0.1μg/kg/天至

10.0 μ g/kg/天、或1.0 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天。在一些实施方案中,该量小于0.01 μ g/kg/天,而在其他实施方案中,该量大于10.0 μ g/kg/天。

[0036] 在特定的实施方案中,本公开预期给予IL-12剂以使得血清浓度达到峰值并且然后被清除,使得它在被再次施用之前基本上是不可测量的。在一些实施方案中,IL-12治疗以负荷剂量开始,然后是一系列维持剂量,其可以以限定的时间间隔施用。为了避免潜在的毒性,应该调整剂量以使IL-12水平不超过其最大耐受水平。正如PEG-IL-10的施用,IL-12剂的剂量可以取决于许多因素,包括疾病、病症或病况的性质(例如,局部肿瘤或转移性疾病)、受试者患病的程度(例如,早期疾病相对于晚期疾病)、是否正在施用组合疗法以及受试者特异性参数(例如,肝和肾功能)。

[0037] 本公开包括药物组合物,其包含如本文所述的PEG-IL-10和IL-12剂以及药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。在一些实施方案中,PEG-IL-10和IL-12剂存在于各自包含药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的分开的药物组合物中。在一些实施方案中,赋形剂是等渗注射溶液。药物组合物可以适合施用于受试者(例如,人),并且可以包含一种或多种另外的预防或治疗剂。在某些实施方案中,药物组合物包含在一个或多个无菌容器(例如,单次或多次使用的小瓶或注射器)中。试剂盒可以包含一个或多个无菌容器,并且试剂盒还可以包含一个或多个另外的无菌容器,无菌容器包含至少一种另外的预防或治疗剂或可以用于药理学疗法的任何其他药剂。一种或多种另外的预防或治疗剂可以在PEG-IL-10和IL-12剂之前,同时或之后施用。

[0038] 可以与治疗 and/或预防癌症相关的疾病、病症或病况的方法一起使用的另外的预防或治疗剂(本文也称为补充剂等等)包括可以提供一些治疗益处的任何药剂。举例来说,但不限制,预防或治疗剂可以是化学治疗剂、免疫或炎症相关的药剂、代谢剂、抗病毒剂或抗血栓形成剂。本公开的方法还可以与非药理学剂(例如,放射学)组合使用。

[0039] 在特定的实施方案中,另外的预防或治疗剂是化学治疗剂,其实例在本文中陈述。在一些实施方案中,化学治疗剂是基于铂的抗肿瘤剂,也称为铂配位络合物。这些基于铂的抗肿瘤剂交联DNA,从而抑制癌细胞中的DNA修复和/或DNA合成。这类药剂的实例包括顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、沙铂(satraplatin)、吡铂(picoplatin)、奈达铂(nedaplatin)和三铂(triplatin)。

[0040] 用于优化本文所述的PEG-IL-10和IL-12剂的给药方案的方法和模型也被本公开的实施方案所预期。在其他实施方案中,本公开预期用于鉴定最适合本文所述的组合疗法的特定患者群体的方法。在一些实施方案中,某些生物标志的存在和/或程度可以用于这类方法中。

[0041] 技术人员在回顾本公开之后,将显而易见其他方面和实施方案。

[0042] 附图简述

[0043] 图1描绘人IL-12,链A的氨基酸序列(SEQ ID NO:1);和人IL-12,链B的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0044] 图2描绘在4T1荷瘤小鼠中作为单一疗法或作为组合疗法每天皮下施用的PEG-rMuIL-10 (1mg/kg) 和/或rMuIL-12 (0.05mg/kg、0.1mg/kg或0.5mg/kg) 历时21天的作用。研究完成后评估肿瘤重量。

[0045] 图3A和3B描绘对4T1荷瘤小鼠作为单一疗法或作为组合疗法每天皮下施用PEG-

rMuIL-10 (1mg/kg) 和/或rMuIL-12 (0.05mg/kg、0.1mg/kg或0.5mg/kg) 对血清IFN γ (图3A) 和血清TNF α (图3B) 的作用。给药9天后,在施用剂量4小时后评估血清IFN γ 和TNF α 水平。

[0046] 发明详述

[0047] 在进一步描述本公开之前,应当理解,本公开不限于本文陈述的特定实施方案,并且还应当理解,本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,并且并非旨在进行限制。

[0048] 当提供数值范围时,应当理解在该范围的上下限与在该规定范围中的任何其他规定或中间值之间的各个中间值(除非上下文另外明确地规定,否则至下限的单位的十分之一)都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在更小的范围内,并且也涵盖在本发明内,服从该规定范围内任何明确排除在外的界限。在所述规定范围包括所述极限值中的一个或两个的情况下,本发明中还包括排除那些所包括的极限值中的任一个或两个的范围。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本发明所属领域中的普通技术人员通常所理解相同的含义。

[0049] 必须指出,如本文和在所附权利要求书中所使用,单数形式“一个(a)/一种(an)”和“所述(the)”包括复数对象,除非上下文另外清楚地指出。进一步指出,权利要求书可以经拟订以排除任何任选的要素。因此,该表述旨在作为与列举权利要求要素相关使用诸如“单独地”、“仅仅”等的独占性术语或使用“否定”限制的先行基础。

[0050] 仅提供本文中讨论的出版物在本申请的提交日期之前的公开内容。此外,所提供的出版日期可不同于实际出版日期,其可能需要单独证实。

[0051] 综述

[0052] 如本文所述,本公开的发明人已经发现,在某些条件和参数下共同施用PEG-IL-10和IL-12可以缓和IL-12的不想要的不利作用,同时仍保留其有效的抗肿瘤活性。根据该发现,本公开预期使用PEG-IL-10(例如,rHuPEG-IL-10)及其组合物与IL-12剂(例如,rHuIL-12)及其组合物组合用于治疗 and/或预防癌症相关的疾病、病症和病况和/或其症状的方法。这类方法包括特定的给药方案并且提供在治疗和/或预防本文所述的病症方面的相加或协同作用的机会。

[0053] 应当指出的是,结合本公开的多肽和核酸分子对“人”的任何提及并不意在关于获得多肽或核酸的方式或来源方面进行限制,而是仅涉及序列,因为它可以对应于天然存在的人多肽或核酸分子的序列。除了人多肽和编码它们的核酸分子之外,本公开还预期来自其他物种的IL-10和IL-12相关的多肽和相应的核酸分子。

[0054] 定义

[0055] 除非另外指出,下列术语旨在具有以下所述的含义。其他术语在整个说明书的其他地方定义。

[0056] 术语“患者”或“受试者”可互换使用以指人或非人动物(例如,哺乳动物)。

[0057] 术语“施用(administration)”、“施用(administer)”等等在应用于例如受试者、细胞、组织、器官或生物流体时是指例如IL-10或PEG-IL-10)、核酸(例如,编码天然人IL-10的核酸);包含上述物质的药物组合物,或诊断剂与受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。在细胞的情况下,施用包括试剂与细胞的接触(例如,体外或离体),以及试剂与流体的接触,其中流体与细胞接触。

[0058] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等等是指在疾病、病

症或病况或其症状已被诊断出、观察到等等之后引发的作用过程(诸如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物)以便暂时或永久地消除、降低、遏制、缓解或减轻折磨受试者的疾病、病症或病况的至少一种潜在原因或者与折磨受试者的疾病、病症、病况相关的至少一种症状。因此,治疗包括抑制(例如,阻止疾病、病症或病况或与其相关的临床症状的发展或进一步发展)活动性疾病。这些术语也可以用于其他情况,诸如使IL-10或PEG-IL-10在例如流体相或胶体相中接触IL-10受体的情况。

[0059] 如本文所用的术语“需要治疗”是指由医师或其他护理人员做出的受试者需要或将从治疗中受益的判断。这种判断是基于医师或护理人员专业领域中的各种因素作出的。

[0060] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”等等是指通常在倾向于患特定疾病、病症或病况的受试者的情况下以某种方式(例如,在疾病、病症、病况或其症状发作之前)引发的作用过程(诸如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物)以暂时或永久地预防、遏制、抑制或降低受试者发展疾病、病症、病况等等的风险(如通过例如缺乏临床症状所确定)或延迟其发作。在某些情况下,这些术语还指减缓疾病、病症或病况的进展或抑制其进展到有害或其他不期望的状态。

[0061] 如本文所用的术语“需要预防”是指由医师或其他护理人员作出的受试者需要或将从预防护理中受益的判断。这种判断是基于医师或护理人员专业领域中的各种因素作出的。

[0062] 短语“治疗有效量”是指将药剂单独或作为药物组合物的一部分并且以单次剂量或作为一系列剂量的一部分以能够在施用到受试者时对疾病、病症或病况的任何症状、方面或特征具有任何可检测的积极作用的量施用到受试者。治疗有效量可以通过测量相关的生理作用确定,并且可以结合给药方案和受试者的病况的诊断分析等等来调整。举例来说,施用后产生的炎性细胞因子的量的测量值可以指示是否已经使用了治疗有效量。

[0063] 短语“足以实现改变的量”意指在施用特定疗法之前(例如,基线水平)和在之后测量的指标水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观参数(例如,IL-10的血清浓度)或主观参数(例如,受试者的幸福感)。

[0064] 术语“小分子”是指具有小于约10kDa、小于约2kDa或小于约1kDa的分子量的化合物。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子和合成分子。治疗上,与大分子相比,小分子可以更易渗透到细胞,不易降解,并且不太可能触发免疫反应。

[0065] 术语“配体”是指例如可以充当受体的激动剂或拮抗剂的肽、多肽、膜相关的分子或膜结合的分子或其复合物。“配体”涵盖天然和合成的配体,例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和来源于抗体的结合组合物。“配体”还涵盖小分子,例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。该术语还涵盖既不是激动剂也不是拮抗剂,但可以结合受体而不显著影响其生物学性质(例如信号传导或粘附)的药剂。此外,该术语包括已经例如通过化学或重组方法改变为膜结合的配体的可溶型式的膜结合的配体。配体或受体可以完全在细胞内,即它可以位于细胞溶质、细胞核或一些其他细胞内区室中。配体和受体的复合物被称为“配体-受体复合物”。

[0066] 术语“抑制剂”和“拮抗剂”或“活化剂”和“激动剂”分别指例如用于活化例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织或器官的抑制或活化分子。抑制剂是减小、阻断、预防、延迟

活化、灭活、脱敏或下调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。活化剂是增加、活化、有利于、增强活化、敏化或上调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。抑制剂也可以定义为降低、阻断或灭活组成型活性的分子。“激动剂”是与靶标相互作用以引起或促进靶标活化增加的分子。“拮抗剂”是对抗激动剂的一种或多种作用的分子。拮抗剂预防、降低、抑制或中和激动剂的活性,并且拮抗剂还可以预防、抑制或降低靶标如靶标受体的组成型活性,即使在没有鉴定的激动剂的情况下也是如此。

[0067] 术语“调节(modulate)”、“调节(modulation)”等等是指分子(例如,活化剂或抑制剂)直接或间接地增加或减小PEG-IL-10(或编码其的核酸分子)的功能或活性的能力;或增强分子产生可与PEG-IL-10相当的作用的能力。术语“调节剂”意欲广义指可以影响上述活性的分子。举例来说,例如基因、受体、配体或细胞的调节剂是改变基因、受体、配体或细胞的活性的分子,其中活性可以被活化、抑制或改变其调控性质。调节剂可以单独地作用,或者可以使用辅因子,例如蛋白质、金属离子或小分子。术语“调节剂”包括通过与IL-10相同的作用机制发挥作用的试剂(即,以与其类似的方式调节与IL-10相同的信号传导途径的试剂),并且能够触发可与IL-10相当(或更大)的生物学反应。

[0068] 调节剂的实例包括小分子化合物和其他生物有机分子。许多小分子化合物文库(例如,组合文库)可商购获得,并可以作为用于鉴定调节剂的起点。技术人员能够开发一种或多种测定(例如,生物化学或基于细胞的测定),其中可以筛选这类化合物文库以鉴定具有所需性质的一种或多种化合物;此后,熟练的药物化学家能够通过例如合成和评价其类似物和衍生物来优化这一种或多种化合物。合成和/或分子建模研究也可以用于鉴定活化剂。

[0069] 分子的“活性”可以描述或指代分子与配体或受体的结合;催化活性;刺激基因表达或细胞信号传导、分化或成熟的能力;抗原活性;调节其他分子的活性;等等。该术语还可以指调节或维持细胞间相互作用(例如,粘附)的活性或维持细胞结构(例如,细胞膜)的活性。“活性”还可以指具体的活性,例如[催化活性]/[mg蛋白质]或[免疫活性]/[mg蛋白质],生物学区室中的浓度等。术语“增殖活性”涵盖促进(例如)正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育不良、细胞转化、转移和血管发生所必需或与之特异性相关的活性。

[0070] 如本文所用,“可相当的”、“可相当的活性”、“可与……相当的活性”、“可相当的作用”、“可与……相当的作用”等等是可以定量和/或定性来看的相对术语。这些术语的含义通常取决于它们的使用环境。举例来说,从定性观点来看,活化受体的两种试剂可以被视为具有可相当的作用,但是从定量观点来看,如在本领域接受的测定(例如,剂量-反应测定)或本领域接受的动物模型中所确定,如果一种试剂仅能够达到其他试剂的活性的20%,则这两种试剂可以被视为缺乏可相当的作用。当比较一个结果与另一结果(例如,一个结果与参考标准)时,“可相当”通常意指一个结果与参考标准的偏差小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于7%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。在特定的实施方案中,如果一个结果与参考标准的偏差小于15%、小于10%或小于5%,则其与参考标准相当。举例来说,而非限制,活性或作用可以指功效、稳定性、溶解性或免疫原性。

[0071] 例如细胞、组织、器官或生物体的术语“反应”涵盖生物化学或生理学行为的改变,例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移,基因表达的速率或分化状态,其中该改变与活

化、刺激或治疗相关,或者与内部机制如基因编程相关。在某些情况下,术语“活化”、“刺激”等等是指如由内部机制以及由外部或环境因素调控的细胞活化;而术语“抑制”、“下调”等等是指相反的作用。

[0072] 在本文可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的聚合形式的氨基酸,其可以包括基因编码和非基因编码的氨基酸、化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸以及具有修饰的多肽主链的多肽。这些术语包括:融合蛋白,包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白;具有异源和同源前导序列的融合蛋白;具有或不具有N-末端甲硫氨酸残基的融合蛋白;具有免疫标记蛋白的融合蛋白;等等。

[0073] 应当理解,在整个公开中,根据单字母或三字母编码提到氨基酸。为了方便读者,下面提供单字母和三字母氨基酸编码:

[0074]	G	甘氨酸	Gly	P	脯氨酸	Pro
	A	丙氨酸	Ala	V	缬氨酸	Val
	L	亮氨酸	Leu	I	异亮氨酸	Ile
	M	蛋氨酸	Met	C	半胱氨酸	Cys
	F	苯丙氨酸	Phe	Y	酪氨酸	Tyr
	W	色氨酸	Trp	H	组氨酸	His
	K	赖氨酸	Lys	R	精氨酸	Arg
	Q	谷氨酰胺	Gln	N	天冬酰胺	Asn
	E	谷氨酸	Glu	D	天冬氨酸	Asp
	S	丝氨酸	Ser	T	苏氨酸	Thr

[0075] 如本文所用,术语“变体”涵盖天然存在的变体和非天然存在的变体。天然存在的变体包括同源物(在一种物种与另一物种之间分别在氨基酸或核苷酸序列方面不同的多肽和核酸)和等位基因变体(在物种内一种个体与另一个体之间分别在氨基酸或核苷酸序列方面不同的多肽和核苷酸)。非天然存在的变体包括分别包含氨基酸或核苷酸序列的变化多肽和核酸,其中人工引入序列的改变(例如,突变蛋白);例如,改变是由人工干预(“人之手”)在实验室中产生的。因此,在本文中,“突变蛋白”广义地指突变的重组蛋白,其通常携带单个或多个氨基酸取代并且经常来源于已经进行了定点或随机诱变的克隆基因或来源于完全合成的基因。

[0076] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等等在本文中可互换使用以指任何长度的聚合形式的核苷酸,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物。多核苷酸的非限制性实例包括线性和环状核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等等。

[0077] 如本文在多肽结构的上下文中所用,“N-末端”(或“氨基末端”)和“C-末端”(或“羧基末端”)分别是指多肽的极端氨基和羧基末端,而术语“N-末端”和“C-末端”分别是指多肽的氨基酸序列中朝N-末端和C-末端的相对位置,并且分别可以包括N-末端和C-末端的残基。“直接N-末端”或“直接C-末端”是指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中第一氨基酸残基和第二氨基酸残基共价结合以提供连续氨基酸序列。

[0078] “来源于”在氨基酸序列或多核苷酸序列的上下文中(例如,“来源于”IL-10多肽的氨基酸序列)意欲指示多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸(例如,天然存在的IL-10多肽

或编码IL-10的核酸)的序列的序列,并且并不意在关于制备蛋白质或核酸的来源或方法方面的限制。举例来说,术语“来源于”包括参考氨基酸或DNA序列的同源物或变体。

[0079] 在多肽的上下文中,术语“分离的”是指如果天然存在,则处于与可以天然存在的环境不同的环境中的所关注的多肽。“分离的”意欲包括处于大体上富含所关注的多肽和/或其中所关注的多肽得以部分或大体上纯化的样品内的多肽。在多肽不是天然存在的情况下,“分离的”指示该多肽已经从其中其通过合成或重组手段制备的环境中分离出来。

[0080] “富集”意指样品是非天然操作(例如,由科学家)的,因此所关注的多肽是a)与诸如生物学样品(例如,其中天然存在多肽或在施用之后存在多肽的样品)的起始样品中多肽的浓度相比,以更高的浓度存在(例如,至少3倍、至少4倍、至少8倍、至少64倍或更多倍),或b)与制备多肽的环境(例如,如在细菌细胞中)相比,以更高的浓度存在。

[0081] “大体上纯”指示组分(例如,多肽)构成大于组合物总含量的约50%,并且通常大于总多肽含量的约60%。更典型地,“大体上纯”是指其中全部组合物的至少75%、至少85%、至少90%或90%以上是所关注的组分的组合物。在一些情况下,多肽将构成组合物总含量的大于约90%或大于约95%。

[0082] 术语“特异性结合”或“选择性结合”在提及配体/受体、抗体/抗原或其他结合对时指示结合反应,该结合反应确定蛋白质在蛋白质和其他生物制剂的异源群体的存在。因此,在指明的条件下,特异性配体结合特定的受体并且不以显著的量结合样品中存在的其他蛋白质。所预期方法的抗体或者来源于抗体的抗原结合位点的结合组合物与其抗原或其变体或突变蛋白以一定亲和力结合,所述亲和力是任何其他抗体或来源于其的结合组合物的亲和力的至少2倍、至少10倍、至少20倍或至少100倍。在一个特定的实施方案中,抗体将具有大于约 10^9 升/摩尔的亲和力,如通过例如Scatchard分析(Munsen等,1980Analyt.Biochem.107:220-239)所确定。

[0083] IL-10和PEG-IL-10

[0084] 抗炎细胞因子IL-10(也称为人细胞因子合成抑制因子(CSIF))被分类为类型(类)-2细胞因子,即,包括IL-19、IL-20、IL-22、IL-24(Mda-7)和IL-26、干扰素(IFN- α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 κ 、 ω 和 τ)和干扰素样分子(极限素(limitin)、IL-28A、IL-28B和IL-29)的一组细胞因子。

[0085] IL-10是一种在免疫调控和炎症中具有多效作用的细胞因子。其由肥大细胞产生,抵消了这些细胞处于变态反应的位点的炎症作用。虽然IL-10能够抑制诸如IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF α 和GM-CSF的促炎细胞因子的合成,但它对某些T细胞和肥大细胞也有刺激作用,并且刺激B-细胞成熟、增殖和抗体产生。IL-10可以阻断NF- κ B活性并参与JAK-STAT信号传导途径的调控。它还诱导CD8⁺ T细胞的细胞毒性活性和B细胞的抗体产生,并且其遏制巨噬细胞活性和促肿瘤炎症。CD8⁺ T细胞的调控是剂量依赖性的,其中较高的剂量诱导更强的细胞毒性反应。

[0086] 如本文其他地方指示,IL-10被认为是抑制IFN- γ 、IL-12(D' Andrea,A.等(1993)J Exp Med 178(3):1041-48)和TNF α (Armstrong,L.等,(1996)Thorax 51(2):143-49)的分泌的抗炎且免疫遏制性的细胞因子。IL-10还抑制CD4⁺ T细胞的抗原呈递和后续活化(de Waal Malefyt,R.等,(1991)J Exp Med 174(5):1209-20;de Waal Malefyt,R.等,(1991)J Exp Med 174(4):915-24),且因此被广泛认为是有效的免疫遏制性细胞因子。

[0087] 人IL-10是分子量为37kDa的同型二聚体,其中每个18.5kDa单体包含178个氨基酸,其中前18个氨基酸包含信号肽和两个形成两个分子内二硫键的半胱氨酸残基。IL-10二聚体在破坏两个单体亚基之间的非共价相互作用后变得生物学无活性。

[0088] 如本文所用,术语“IL-10”、“一种或多种IL-10多肽”、“一种或多种IL-10分子”、“一种或多种IL-10剂”等等旨在被广义地解释并且包括例如人和非人IL-10相关的多肽,包括同源物、变体(包括突变蛋白)及其片段,以及具有例如前导序列(例如,信号肽)的IL-10多肽以及上述的修饰型式。本公开预期表现出80%同源性的聚乙二醇化形式的人IL-10(NP_000563)和鼠IL-10(NP_034678)以及其用途。此外,本公开的范围包括来自其他哺乳动物物种的聚乙二醇化IL-10直系同源物及其修饰形式,包括大鼠(登录NP_036986.2;GI 148747382);牛(登录NP_776513.1;GI 41386772);羊(登录NP_001009327.1;GI 57164347);狗(登录ABY86619.1;GI 166244598);和兔(登录AAC23839.1;GI 3242896)。

[0089] IL-10受体,为II型细胞因子受体,由还分别被称为R1和R2的 α 亚基和 β 亚基组成。受体活化需要结合 α 和 β 两者。IL-10多肽的一种同二聚体与 α 结合并且相同IL-10多肽的另一同二聚体与 β 结合。

[0090] 如本文所用,术语“聚乙二醇化的IL-10”、“PEG-IL-10”等等是指具有一个或多个通常经由连接子共价连接至IL-10蛋白的至少一个氨基酸残基的聚乙二醇分子的IL-10分子,由此使得附接是稳定的。术语“单聚乙二醇化的IL-10”和“单-PEG-IL-10”指示一个聚乙二醇分子通常经由连接子共价连接至IL-10二聚体的一个亚基上的单个氨基酸残基。如本文所用,术语“二聚乙二醇化IL-10”和“二-PEG-IL-10”指示至少一个聚乙二醇分子通常经由连接子连接至IL-10二聚体的每个亚基上的单个残基。

[0091] 在某些实施方案中,本公开中使用的PEG-IL-10是单-PEG-IL-10,其中1至9个PEG分子经由连接子共价连接至在IL-10二聚体的一个亚基的N-末端处的氨基酸残基的 α 氨基。由于亚基改组(subunit shuffling),一个IL-10亚基上的单PEG化通常产生非聚乙二醇化IL-10、单PEG化IL-10和二PEG化IL-10的非均匀混合物。此外,使聚乙二醇化反应进行至完成通常将产生非特异性且多聚乙二醇化的IL-10,从而降低其生物活性。因此,本公开的特定实施方案包括施用通过本文所述方法产生的单-PEG化IL-10和二-PEG化IL-10的混合物。

[0092] 在特定的实施方案中,PEG部分的平均分子量介于约5kDa与约50kDa之间。虽然PEG连接至IL-10的方法或位点不是关键的,但在某些实施方案中,聚乙二醇化不会改变IL-10肽的活性,或者仅最小程度地改变IL-10肽的活性。在某些实施方案中,半衰期的增加大于生物学活性的任何减小。通常通过评估在用细菌抗原(脂多糖(LPS))激发且用PEG-IL-10处理的受试者血清中炎性细胞因子(例如,TNF α 或IFN γ)的水平来测量PEG-IL-10的生物学活性,如美国专利号7,052,686中所述。

[0093] 可以在考虑包括以下的各种目的下制备IL-10变体:增加血清半衰期、降低对于IL-10的免疫反应、促进纯化或制备、减小IL-10向其单体亚基的转化、改善治疗功效和减轻在治疗使用期间副作用的严重性或发生。氨基酸序列变体通常是自然界中未见到的预定变体,但一些可以是翻译后变体,例如糖基化变体。本公开预期IL-10的任何聚乙二醇化变体的用途,条件是其保留合适水平的IL-10活性。

[0094] 短语“保守性氨基酸取代”是指通过用具有类似酸性、碱性、电荷、极性或侧链大小的侧链的氨基酸置换蛋白质中的一个或多个氨基酸来保持蛋白质的活性的取代。保守性氨

氨基酸取代通常需要取代在下列组内的氨基酸残基:1) L、I、M、V、F; 2) R、K; 3) F、Y、H、W、R; 4) G、A、T、S; 5) Q、N; 和6) D、E。取代、插入或缺失的指导可以基于不同变体蛋白质或来自不同物种的蛋白质的氨基酸序列的比对。因此,除了任何天然存在的IL-10多肽之外,本公开预期具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,通常不超过20、10或5个氨基酸取代,其中该取代通常是保守性氨基酸取代。

[0095] 本公开还预期含有来源于成熟IL-10的连续氨基酸残基的成熟IL-10的活性片段(例如,子序列)的聚乙二醇化形式。肽或多肽子序列的连续氨基酸残基的长度根据衍生子序列的特定天然存在的氨基酸序列而变化。通常,肽和多肽可以是约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸直至全长肽或多肽。

[0096] 另外,IL-10多肽与限定长度的连续氨基酸(例如“比较窗”)上的参考序列相比可以具有确定的序列同一性。比对用于比较的序列的方法为本领域熟知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过以下方法进行:Smith和Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981)的局部同源性算法;Needleman和Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)的同源性比对算法;Pearson和Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)的类似性方法的搜索;这些算法的计算机化实施(在Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis. 中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或人工比对和目视检查(参见,例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等编,1995,增刊))。

[0097] 例如,可以被聚乙二醇化的合适IL-10多肽可以包含与如下连续段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列:约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸的连续段直至全长IL-10肽或多肽。

[0098] 如下面进一步讨论的,IL-10多肽可以从天然来源(例如,除其天然存在的环境以外的环境)分离,并且还可以重组制备(例如,在基因修饰的宿主细胞如细菌、酵母、毕赤酵母属、昆虫细胞等等中),其中基因修饰的宿主细胞用包含编码多肽的核苷酸序列的核酸修饰。IL-10多肽也可以合成产生(例如,通过无细胞化学合成)。

[0099] 本公开预期编码IL-10分子的核酸分子,包括其天然存在和非天然存在的同种型、等位基因变体和剪接变体。本公开还涵盖在一个或多个碱基方面与天然存在的DNA序列不同但由于遗传密码的简并性仍然翻译成对应于IL-10多肽的氨基酸序列的核酸序列。

[0100] IL-12

[0101] 白介素-12 (IL-12) 是巨噬细胞、B-淋巴母细胞、树突状细胞和嗜中性粒细胞响应于抗原刺激天然产生的多效性细胞因子。它首先被描述为由PMA诱导的EBV转化的B细胞系分泌的因子。IL-12参与天然T细胞向Th1细胞的分化,可以刺激T细胞的生长和功能,并介导NK细胞和CD8+细胞毒性T淋巴细胞的细胞毒活性的增强。因此,IL-12激活先天性(NK细胞)和适应性(细胞毒性T淋巴细胞)两者。IL-12还刺激由T细胞和NK细胞产生IFN γ 和TNF α ,并

降低IL-4介导的IFN γ 遏制。

[0102] 如本文其他地方指示,术语“IL-12”、“一种或多种IL-12多肽”、“一种或多种IL-12-剂”、“一种或多种IL-12分子”等等旨在被广泛解释并且包括例如人和非人IL-12相关多肽,包括同源物、变体(包括突变蛋白)及其片段,以及具有例如前导序列(例如,信号肽)的IL-12多肽。

[0103] 在结构上,IL-12包含四个 α 螺旋的复合物。它是由两个独立基因IL-12,链A(p35)和IL-12,链B(p40)编码的异源二聚体细胞因子。人IL-12A是306个氨基酸残基的多肽(图1;登录号1F45_A),而人IL-12B是197个氨基酸残基的多肽(图1;登录号1F45_B)。遵循蛋白质合成形成活性异源二聚体(p70)和p40同源二聚体。IL-12与IL-12受体结合,该IL-12受体是由IL-12R- β 1和IL-12R- β 2形成的异源二聚体受体,其启动包含参与JAK-STAT途径的几种转录因子的信号传导级联。

[0104] 本公开预期包含源自成熟IL-12的连续氨基酸残基的成熟IL-12的活性片段(例如,子序列)。肽或多肽子序列的连续氨基酸残基的长度根据衍生子序列的特定天然存在的氨基酸序列而变化。通常,肽和多肽可以是约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约160个氨基酸、约160个氨基酸至约180个氨基酸、约180个氨基酸至约190个氨基酸、约190个氨基酸至约194个氨基酸、约194个氨基酸至约196个氨基酸、约196个氨基酸至约210个氨基酸、约210个氨基酸至约230个氨基酸、约230个氨基酸至约250个氨基酸、约250个氨基酸至约270个氨基酸、约270个氨基酸至约290个氨基酸、约290个氨基酸至约295个氨基酸、约295个氨基酸至约300个氨基酸、约300个氨基酸至约304个氨基酸、以及约304个氨基酸至约306个氨基酸。

[0105] 另外,IL-12多肽与参考序列在限定长度的连续氨基酸(例如“比较窗”)上相比可以具有确定的序列同一性。用于比较的序列的比对方法为本领域熟知的并且如上文所述。作为实例,合适的IL-12多肽可以包含以下氨基酸序列,所述氨基酸序列与约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约160个氨基酸、约160个氨基酸至约180个氨基酸、约180个氨基酸至约190个氨基酸、约190个氨基酸至约195个氨基酸、约194个氨基酸至约196个氨基酸、约196个氨基酸至约210个氨基酸、约210个氨基酸至约230个氨基酸、约230个氨基酸至约250个氨基酸、约250个氨基酸至约270个氨基酸、约270个氨基酸至约290个氨基酸、约290个氨基酸至约295个氨基酸、约295个氨基酸至约300个氨基酸、约300个氨基酸至约304个氨基酸、以及约304个氨基酸至约306个氨基酸的连续区段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的氨基酸序列同一性。

[0106] 如本文其他地方指示,IL-12多肽可以从天然来源(例如,除其天然存在的环境以外的环境)分离,并且还可以重组制备(例如,在遗传修饰的宿主细胞如细菌、酵母、毕赤酵母属、昆虫细胞等等中),其中遗传修饰的宿主细胞用包含编码多肽的核苷酸序列的核酸修饰。IL-12多肽也可以合成产生(例如,通过无细胞化学合成)。

[0107] 本公开预期编码IL-12分子的核酸分子,包括其天然存在和非天然存在的同种型、

等位基因变体和剪接变体。本公开还涵盖在一个或多个碱基方面与天然存在的DNA序列不同但由于遗传密码的简并性仍然翻译成对应于IL-12多肽的氨基酸序列的核酸序列。

[0108] 已经显示IFN γ 协调抗癌防御的自然机制(Jakobisiak,M.等,(2013) *Immunol Lett* 90:103-22)。通过刺激IFN γ 的产生,IL-12增加可诱导蛋白-10趋化因子(IP-10或CXCL10)的产生,其继而介导IL-12的抗血管生成作用。由于其能够诱导免疫应答及其抗血管生成活性,IL-12已被评估为肿瘤学治疗剂。IL-12可以用于治疗其他病症,包括牛皮癣和炎症性肠病。

[0109] 值得注意的是,抗IL-12/23p40中和抗体(优特克单抗(ustekinumab))已在临床中被评估为用于治疗多种免疫介导病症,包括牛皮癣、强直性脊柱炎、类风湿性关节炎、多发性硬化症、特应性皮炎、原发性胆汁性肝硬化、结节病和全身性红斑狼疮。最先进的研究针对牛皮癣的治疗。(参见,例如Teng,M.等,(2015) *Nature Medicine* 21(7):719-29)。

[0110] 由于其能够使先天性免疫和适应性免疫部分相互关联及其对IFN γ 产生的有效刺激,IL-12最初被认为代表肿瘤免疫疗法的理想候选者。事实上,动物模型的早期研究结果支持其作为癌症治疗剂的潜在用途。然而,全身性施用IL-12的临床研究产生了非常窄的治疗指数,并由于显著增加的血清细胞因子(主要是IFN γ 和TNF α)和自身免疫性肝炎而产生显著的免疫相关毒性。这些细胞因子一起引起剂量限制性致死毒性和每天皮下给予0.3 μ g/kg IL-12的最大耐受剂量(参见Bajetta,E.等,*Clin Cancer Res*,1998.4(1):第75-85页;Motzer,R.J.等,*J Interferon Cytokine Res*,2001.21(4):第257-63页;Cebon,J.等,*Cancer Immun*,2003.3:第7页;Younes,A.等,*Clin Cancer Res*,2004.10(16):第5432-8页;和Ansell,S.M.等,*Blood*,2002.99(1):第67-74页)。因此,在肿瘤学情形中IL-12的全身性施用在很大程度上被认为是不可行的。[参见,例如Teng,M.等(2015) *Nature Medicine* 21(7):719-29]。

[0111] 在试图利用IL-12的抗肿瘤作用并避免其固有的缺点时,已经探索了用于全身施用的替代方法。发现表达IL-12和IL-10的自体失活肿瘤细胞在患有结肠或乳房肿瘤和肺转移的小鼠中诱导有益作用(Lopez等,(2005) *J Immunol* 175:5885-94)。尽管有该明显的积极作用,但2005年的这项研究报告并没有共同努力探索IL-10/IL-12全身性组合疗法-这可能是由于IL-12在临床情形上先前经历的毒性问题。如上所指示,已经观察到的IL-12相关毒性包括流感样症状(例如,头痛、发烧、寒战、疲劳和关节痛);血液学毒性,包括嗜中性白血球减少症和血小板减少症;和肝毒性,表现为转氨酶、高胆红素血症和低白蛋白血症的剂量依赖性增加。其他IL-12相关不利作用包括粘膜炎症(例如,口腔粘膜炎症、口腔炎和结肠炎)、低血压、肾损伤和胃肠道出血。这些毒性作用已经与IFN γ 和TNF α 以及其他细胞因子(例如,IP-10和MIG)的二次产生相关。(参见,例如Lasek等,(2014) *Cancer Immunol Immunother* 63:419-35;Xu等,*Clinical and Developmental Immunology*,第2010卷,文章编号832454,第9页);Cebon,J.等,*Cancer Immun*,2003.3:第7页)。

[0112] 最近利用IL-12在肿瘤学领域的潜在用途的努力已经采取了不同的方向。例如,已经开始了临床研究,其中IL-12作为癌症疫苗中的佐剂在包括局部区域注射IL-12质粒的基因疗法中并且以肿瘤靶向免疫细胞因子的形式应用。其他策略包括与Treg细胞消耗性抗体(例如,抗CD25抗体)、针对免疫遏制性信号的抗体(例如,CTLA-4)和抗癌药物共同施用。(参见,例如Lasek等,(2014) *Cancer Immunol Immunother* 63:419-35;Xu等,*Clinical and*

Developmental Immunology, 第2010卷, 文章编号832454, 第9页))。这些方法进一步明确了肿瘤学界认为IL-10/IL-12全身组合疗法难治的推断。

[0113] IL-10和IL-12的共同施用

[0114] 认为PEG-IL-10和IL-12的组合表现出至少相加, 且可能是协同的抗肿瘤功效。然而, 用IL-12单一疗法观察到的毒性迄今限制了人受试者对这种组合疗法的探索。特定地讲, IL-12表现出有效的免疫刺激生物学, 其限制了其最大耐受剂量(其已被描述为0.5 μ g/kg至1.25 μ g/kg; 参见Cebon, J. 等, Cancer Immun, 2003. 3: 第7页) 到低于其最大有效剂量的量。尽管为了实施本公开不需要了解该现象下面的机制, 但认为其归因于抗原非特异性天然CD4⁺和CD8⁺ T细胞以及抗原特异性CD4⁺和CD8⁺ T细胞以及NK细胞由IL-12激活。尽管IL-12表现出既是抗原特异性又是抗原非特异性的广谱免疫刺激, 但是PEG-IL-10暴露仅激活CD8⁺ T细胞的抗原特异性群体。如下所示, 当组合时, PEG-IL-10可能限制IL-12的非抗原特异性免疫刺激并将IL-12的免疫刺激作用集中到免疫系统的抗原特异性适应性CD8⁺ T细胞部分。

[0115] IL-12的免疫刺激应答部分地包括从这些细胞中诱导IFN γ 和TNF α 分泌, 并且血清IFN γ 的升高以及较少程度上血清TNF α 的升高与免疫相关毒性的发生相关。尽管PEG-IL-10治疗也导致血清IFN γ 水平升高, 但由于在每日皮下给药5 μ g/kg至40 μ g/kg剂量范围内获得的治疗益处, 其MTD尚未建立。

[0116] 如实验部分详细描述, 评估了PEG-IL-10和IL-12对鼠4T1肿瘤模型中肿瘤大小的组合作用。如图2所指示, 与单独施用任一种药剂后观察到的肿瘤重量相比, 施用PEG-rMuIL-10和rMuIL-12的组合引起肿瘤重量更大程度地降低。这些数据代表组合疗法的有益的抗肿瘤作用。

[0117] 接着, 评估由在4T1荷瘤小鼠中PEG-rMuIL-10和rMuIL-12单独或组合诱导的血清IFN γ 和TNF α 水平。数据指示暴露于PEG-rMuIL-10和rMuIL-12两者个别地引起血清IFN γ 和TNF α 的诱导。令人惊讶地, 当组合时, 施用IL-12和PEG-rMuIL-10产生较低的IFN γ 血清水平(图3A) 和TNF α 血清水平(图3B)。特定地讲, IL-12和PEG-rMuIL-10的组合暴露表现出比单独IL-12显著更低的血清IFN γ 。本公开的特定实施方案包括使用PEG-IL-10降低由IL-12治疗诱导的血清细胞因子(IFN γ 和TNF α) 水平以使IL-12解毒, 而同时增强一起施用这两种药剂的抗肿瘤益处。

[0118] 如上所述, 虽然近期有关免疫生理学情形中的IL-10和IL-12组合的报道已报道了潜在的协同抗肿瘤功能, 但没有公开通过这种组合疗法实现对IL-12介导的毒性的潜在控制。因此, 本文报道的数据和其他发现, 如由血清IFN γ 显著降低(相对于在IL-12单一疗法之后观察到的) 既令人惊讶又出人意料所指示, IL-12和PEG-IL-10的组合产生对IL-12相关毒性的控制。

[0119] 血清浓度

[0120] 在本文所述的方法中IL-10的血浆水平可以以若干方式表征, 包括: (1) 平均IL-10血清谷浓度高于某个特定水平或在一定水平范围内; (2) 平均IL-10血清谷浓度高于某一特定水平历时一段时间; (3) 稳态的IL-10血清浓度水平高于或低于某个特定水平或在一定水平范围内; 或(4) 浓度分布的C_{max}高于或低于某个特定水平或在一定水平范围内。如本文所陈述, 已经发现平均血清谷IL-10浓度对于某些适应症中的功效特别重要。IL-12的血浆水

平可以以类似的方式表征。

[0121] 如上文所陈述,所需IL-10血清谷浓度可以取决于许多因素,包括疾病、病症或病况的性质(例如,局部肿瘤或转移性疾病)、受试者患病的程度(例如,早期疾病相对于晚期疾病)、是否正在施用组合疗法以及患者特异性参数(例如,肝和肾功能)。举例来说,为了观察临床益处,PEG-IL-10和化学治疗剂的共同施用可能仅需要约1ng/mL至2ng/mL范围内的血清谷,而转移性癌症可能需要6ng/mL至10ng/mL或10ng/mL以上以实现可相当的临床益处。

[0122] 在本公开的特定实施方案中,平均IL-10血清谷浓度为至少6.0ng/mL、至少7.0ng/mL、至少8.0ng/mL、且至少9.0ng/mL、至少10.0ng/mL、至少11.0ng/mL、至少12.0ng/mL、至少13.0ng/mL、至少14.0ng/mL、至少15.0ng/mL、至少16.0ng/mL、至少17.0ng/mL、至少18.0ng/mL、至少19.0ng/mL、至少20.0ng/mL、至少21.0ng/mL、至少22.0ng/mL或大于22.0ng/mL。

[0123] 在其他特定的实施方案中,平均IL-10血清谷浓度为至少1.0ng/mL、至少1.5ng/mL、至少2.0ng/mL、至少2.5ng/mL、至少3.0ng/mL、至少3.5ng/mL、至少4.0ng/mL、至少4.5ng/mL、至少5.0ng/mL、且至少5.5ng/mL、至少6.0ng/mL、至少6.5ng/mL或大于7ng/mL。

[0124] 在进一步的实施方案中,该时间段为至少12小时、至少24小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少6周、至少2个月、至少3个月或大于3个月。

[0125] 在本公开的特定实施方案中,平均IL-10血清谷浓度维持该时间段的至少85%、该时间段的至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%。

[0126] 在本公开的更进一步的实施方案中,可以产生的血浆和/或血清水平浓度分布包括:如下的平均IL-10血浆和/或血清谷浓度:大于约1.0pg/mL、大于约10.0pg/mL、大于约20.0pg/mL、大于约30pg/mL、大于约40pg/mL、大于约50.0pg/mL、大于约60.0pg/mL、大于约70.0pg/mL、大于约80.0pg/mL、大于约90pg/mL、大于约0.1ng/mL、大于约0.2ng/mL、大于约0.3ng/mL、大于约0.4ng/mL、大于约0.5ng/mL、大于约0.6ng/mL、大于约0.7ng/mL、大于约0.8ng/mL、大于约0.9ng/mL、大于约1.0ng/mL、大于约1.5ng/mL、大于约2.0ng/mL、大于约2.5ng/mL、大于约3.0ng/mL、大于约3.5ng/mL、大于约4.0ng/mL、大于约4.5ng/mL、大于约5.0ng/mL、大于约5.5ng/mL、大于约6.0ng/mL、大于约6.5ng/mL、大于约7.0ng/mL、大于约7.5ng/mL、大于约8.0ng/mL、大于约8.5ng/mL、大于约9.0ng/mL、大于约9.5ng/mL或大于约10.0ng/mL。

[0127] 在本公开的特定实施方案中,平均IL-10血清谷浓度在1.0pg/mL至10ng/mL的范围内。在一些实施方案中,平均IL-10血清谷浓度在1.0pg/mL至100pg/mL的范围内。在其他实施方案中,平均IL-10血清谷浓度在0.1ng/mL至1.0ng/mL的范围内。在其他实施方案中,平均IL-10血清谷浓度在1.0ng/mL至10ng/mL的范围内。应当理解,即使未明确列举这些范围,本公开也预期包含本文所陈述的那些范围所涵盖的任何浓度的范围。举例来说,在一个实施方案中的平均血清IL-10浓度可以在0.5ng/mL至5ng/mL的范围内。进一步举例来说,本公开的特定实施方案包含在以下范围内的平均IL-10血清谷浓度:约0.5ng/mL至约10.5ng/mL、约1.0ng/mL至约10.0ng/mL、约1.0ng/mL至约9.0ng/mL、约1.0ng/mL至约8.0ng/mL、约1.0ng/mL至约7.0ng/mL、约1.5ng/mL至约10.0ng/mL、约1.5ng/mL至约9.0ng/mL、约1.5ng/mL至约8.0ng/mL、约1.5ng/mL至约7.0ng/mL、约2.0ng/mL至约10.0ng/mL、约2.0ng/mL至约

9.0ng/mL、约2.0ng/mL至约8.0ng/mL、以及约2.0ng/mL至约7.0ng/mL。

[0128] 在特定的实施方案中,在治疗期间维持1ng/mL至2ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。本公开还预期如下实施方案,其中在治疗期间平均IL-10血清峰浓度小于或等于约10.0ng/mL。进一步的实施方案预期大于或等于约10.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。最佳平均血清浓度通常是达到所需治疗作用而不引入不期望的不利作用的浓度。

[0129] 本公开的某些实施方案提供一种用于监测接受IL-10疗法的受试者以预测并因此潜在地避免不利作用的方法,该方法包括:(1)测量受试者的IL-10峰浓度;(2)测量受试者的IL-10谷浓度;(3)计算峰-谷波动;以及(4)使用计算出的峰-谷波动来预测受试者中的潜在不良作用。在特定的受试者群体中,较小的峰-谷波动指示该受试者将经历IL-10相关的不良作用的可能性较低。此外,在一些实施方案中,使用特定的给药参数确定治疗特定的疾病、病症和病况的特定峰-谷波动,并且将那些波动用作参考标准。

[0130] 对于大多数药物,血浆药物浓度以多指数方式下降。在静脉内施用之后药物立即在整个初始空间迅速分布(最低限定为血浆体积),然后发生到血管外空间(例如,某些组织)的较慢的平衡性分布。静脉施用IL-10与这种二区室动力学模型相关(参见Rachmawati, H.等,(2004) Pharm. Res. 21 (11):2072-78)。还研究了皮下重组hIL-10的药代动力学(Radwanski, E.等,(1998) Pharm. Res. 15 (12):1895-1901)。因此,在评估适当的IL-10剂量相关参数时,分布容积考虑是相关的。此外,已经探究了将IL-10剂靶向特定细胞类型的努力(参见,例如Rachmawati, H. (2007年5月) Drug Met. Dist. 35 (5):814-21),并且IL-10药代动力学和给药原理的杠杆作用可以证明这些努力的成功是非常有价值的。

[0131] 本公开预期任何剂量的施用和给药方案引起上文所陈述的任何IL-10血清谷浓度的维持。举例来说,而并非限制,当受试者是人时,非聚乙二醇化hIL-10可以以如下剂量施用:大于0.5μg/kg/天、大于1.0μg/kg/天、大于2.5μg/kg/天、大于5μg/kg/天、大于7.5μg/kg/天、大于10.0μg/kg/天、大于12.5μg/kg/天、大于15μg/kg/天、大于17.5μg/kg/天、大于20μg/kg/天、大于22.5μg/kg/天、大于25μg/kg/天、大于30μg/kg/天、或大于35μg/kg/天。此外,举例来说,而并非限制,当受试者是人时,包含相对较小的PEG的聚乙二醇化hIL-10(例如,5kDa单-二-PEG-hIL-10)可以以如下剂量施用:大于0.5μg/kg/天、大于0.75μg/kg/天、大于1.0μg/kg/天、大于1.25μg/kg/天、大于1.5μg/kg/天、大于1.75μg/kg/天、大于2.0μg/kg/天、大于2.25μg/kg/天、大于2.5μg/kg/天、大于2.75μg/kg/天、大于3.0μg/kg/天、大于3.25μg/kg/天、大于3.5μg/kg/天、大于3.75μg/kg/天、大于4.0μg/kg/天、大于4.25μg/kg/天、大于4.5μg/kg/天、大于4.75μg/kg/天或大于5.0μg/kg/天。

[0132] 当PEG-IL-10与IL-12剂组合施用时,技术人员(例如,药理学家)能够确定一种或多种最佳给药方案。举例来说,在一些实施方案中,最佳PEG-IL-10给药方案可能需要降低每剂施用的PEG-IL-10的量(例如,小于1.0μg/kg/天、小于0.75μg/kg/天、小于0.5μg/kg/天、小于0.25μg/kg/天或小于0.125μg/kg/天)。在本公开的某些示例性实施方案中,平均IL-10血清谷浓度可以在约0.1ng/mL至约9.5ng/mL、约0.25ng/mL至约8.0ng/mL、约0.5ng/mL至约7.0ng/mL、约0.75ng/mL至约6.0ng/mL、或约1.0ng/mL至约5.0ng/mL范围内。

[0133] 本公开预期给予IL-12剂以使得血清浓度达到峰值并且然后被清除,使得它在被再次施用之前基本上是不可测量的。举例来说,当每24小时施用PEG-IL-10以维持约10ng/mL的血清谷浓度时,IL-12剂可以以产生低于其MTD的峰然后代谢使得在24小时给药周期结

束时存在不可测量的血清水平的量(例如,5 μ g/kg/天)共同施用。正如PEG-IL-10的施用,IL-12剂的剂量可以取决于许多因素,包括疾病、病症或病况的性质(例如,局部肿瘤或转移性疾病)、受试者患病的程度(例如,早期疾病相对于晚期疾病)、是否正在施用组合疗法以及患者特异性参数(例如,肝和肾功能)。

[0134] 当PEG-IL-10与IL-12剂如本文所述的那些组合施用时,可以修改适用于单一疗法的PEG-IL-10的一个或多个给药参数,同时适用于单一疗法的IL-12剂的给药参数可以保持相同;适用于单一疗法的PEG-IL-10的一个或多个给药参数可以保持相同,同时可以修改适用于单一疗法的IL-12剂的一个或多个给药参数;可以修改适用于单一疗法的PEG-IL-10和IL-12剂的一个或多个给药参数;或者PEG-IL-10和IL-12剂中的每一种的给药参数可以保持相同。

[0135] 产生IL-10的方法

[0136] 本公开的多肽可以通过任何合适的方法产生,包括非重组(例如,化学合成)和重组方法。

[0137] A. 化学合成

[0138] 在化学合成多肽的情况下,合成可以经由液相或固相进行。固相肽合成(SPPS)允许并入非天然氨基酸和/或肽/蛋白质骨架修饰。各种形式的SPPS如9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)和叔丁基氧基羰基(Boc)可用于合成本公开的多肽。化学合成的细节在本领域中是已知的(例如,Ganesan A. (2006) *Mini Rev. Med. Chem.* 6:3-10;和Camarero J.A.等, (2005) *Protein Pept Lett.* 12:723-8)。

[0139] 固相肽合成可以如下所述执行。 α 功能(Na)和任何反应性侧链都被酸不稳定或碱不稳定的基团保护。保护基团在连接酰胺键的条件下是稳定的,但可以容易地裂解而不损害已经形成的肽链。 α -氨基官能团的合适保护基团包括但不限于以下:Boc、苄氧基羰基(Z)、0-氯苄氧基羰基、二苄基异丙氧基羰基、叔戊氧基羰基(Amoc)、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基-苄氧基羰基、邻硝基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧基-羰基、Fmoc、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基(Dde)等等。

[0140] 合适的侧链保护基团包括但不限于:乙酰基、烯丙基(All)、烯丙氧基羰基(Alloc)、苄基(Bzl)、苄氧基羰基(Z)、叔丁氧基羰基(Boc)、苄氧基甲基(Bom)、邻溴苄氧基羰基、叔丁基(tBu)、叔丁基二甲基甲硅烷基、2-氯苄基、2-氯苄氧基羰基、2,6-二氯苄基、环己基、环戊基、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己-1-亚基)乙基(Dde)、异丙基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苄基磺酰基(Mtr)、2,3,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、新戊基、四氢吡喃-2-基、甲苯磺酰基(Tos)、2,4,6-三甲氧基苄基、三甲基甲硅烷基和三苯甲基(Trt)。

[0141] 在固相合成中,C-末端氨基酸与合适的支撑物材料偶联。合适的支撑物材料是对于合成过程的逐步缩合和裂解反应的试剂和反应条件呈惰性并且不溶解于所使用的反应介质中的那些。市售支撑物材料的实例包括已经用反应性基团和/或聚乙二醇改性的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;氯甲基化苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;羟甲基化或氨基甲基化苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;等等。当期望制备肽酸时,可以使用用4-苄氧基苄醇(Wang-锚)或2-氯三苯甲基氯衍生的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。在肽酰胺的情况下,可以使用用5-(4'-氨基甲基)-3',5'-二甲氧基苄氧基)戊酸(PAL-锚定)或对-(2,4-二甲氧基苄基-氨基甲基)-苄氧基(Rink酰胺锚)衍生的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。

[0142] 通过在室温或高温(例如,在40℃至60℃之间)下添加在乙醇、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮或类似溶剂中的活化试剂使C-末端Fmoc保护的氨基酸与支撑物材料反应且历时例如2至72小时的反应时间实现与聚合支撑物的连接。

[0143] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)与PAL、Wang或Rink锚的偶联可以例如借助偶联试剂如N,N'-二环己基碳化二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳化二亚胺(DIC)或其他碳化二亚胺,2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)或其他脲盐,0-酰基-脲,苯并三唑-1-基-三-吡咯烷基-六氟磷酸磷(PyBOP)或其他磷盐,N-羟基琥珀酰亚胺,其他N-羟基酰亚胺或脲在存在或不存在1-羟基苯并三唑或1-羟基-7-氮杂苯并三唑的情况下进行,例如借助于TBTU在添加HOBt的情况下在添加或不添加碱如二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺或N-甲基吗啉(例如二异丙基乙胺)的情况下进行历时2至72小时的反应时间(例如,3小时,过量1.5至3倍的氨基酸和偶联试剂,例如过量2倍且在约10℃至50℃之间的温度下,例如在25℃下在溶剂如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,例如二甲基甲酰胺中)。

[0144] 代替偶联试剂,还可以在上述条件下使用活性酯(例如,五氟苯基、对硝基苯基等)、Na-Fmoc-氨基酸的对称酸酐、其酰基氯或酰基氟。

[0145] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)可以在二氯甲烷中在添加DIEA且具有10分钟至120分钟如20分钟的反应时间下与2-氯三苯甲基树脂偶联,但不限于使用该溶剂和该碱。

[0146] 受保护的氨基酸的连续偶联可以根据肽合成中的常规方法进行,通常在自动肽合成器中进行。在通过用例如在二甲基甲酰胺中的哌啶(10%至50%)处理5至20分钟,例如用在DMF中的50%哌啶处理2×2分钟和用在DMF中的20%哌啶处理1×15分钟在固相上裂解偶联的氨基酸的Na-Fmoc保护基团之后,将过量3至10倍如过量10倍的下一被保护的氨基酸在惰性非水性极性溶剂如二氯甲烷、DMF或二者的混合物中并且在约10℃至50℃之间的温度下,例如在25℃下偶联到先前的氨基酸。先前提到的用于将第一Na-Fmoc氨基酸偶联到PAL、Wang或Rink锚上的试剂适合作为偶联试剂。被保护的氨基酸的活性酯或其氯化物或氟化物或对称酸酐也可以用作替代物。

[0147] 在固相合成结束时,使肽从支撑物材料上裂解,同时裂解侧链保护基团。可以用三氟乙酸或其他强酸性介质在添加5%-20%V/V的清除剂如二甲基硫醚、乙基甲基硫醚、茴香硫醚、硫代甲酚、间甲酚、苯甲醚乙二硫醇、苯酚或水,例如15%v/v二甲基硫醚/乙二硫醇/间甲酚1:1:1的情况下在0.5至3小时内如例如2小时进行裂解。通过用冰醋酸/三氟乙醇/二氯甲烷2:2:6裂解2-氯三苯甲基锚得到具有完全被保护的侧链的肽。被保护的肽可以通过硅胶色谱法纯化。如果肽经由Wang锚连接到固相,并且如果旨在获得具有C-末端烷基酰胺化的肽,则可以通过用烷基胺或氟烷基胺进行氨解来进行裂解。氨解在介于约-10℃与50℃之间的温度(例如,约25℃)和约12小时至24小时之间的反应时间(例如,约18小时)下进行。此外,肽可以通过再酯化如用甲醇从支撑物上裂解。

[0148] 获得的酸性溶液可以与3至20倍量的冷乙醚或正己烷混合,例如与过量10倍的二乙醚混合,以使肽沉淀并因此分离清除剂和保留在乙醚中的裂解的保护基团。进一步的纯化可以通过使肽从冰醋酸中重新沉淀若干次来进行。可以将获得的沉淀物溶于水或叔丁醇

或这两种溶剂的混合物如叔丁醇/水的1:1混合物中,并冷冻干燥。

[0149] 获得的肽可以通过各种色谱方法纯化,这些色谱方法包括在乙酸盐形式的弱碱性树脂上的离子交换;在非衍生化聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物(例如,Amberlite®XAD)上的疏水吸附色谱法;在硅胶上的吸附色谱法;例如在羧甲基纤维素上的离子交换色谱法;例如在Sephadex®G-25上的分配色谱法;逆流分配色谱法;或高压液相色谱法(HPLC),例如在辛基或十八烷基甲硅烷基硅(ODS)相上的反相HPLC。

[0150] B. 重组产生

[0151] 描述人和小鼠IL-10的制备的方法可以在例如美国专利号5,231,012中见到,该专利教导了用于产生具有IL-10活性的蛋白质的方法,包括重组和其他合成技术。IL-10可以是病毒来源的,并且来自Epstein Barr病毒(BCRF1蛋白)的病毒IL-10的克隆和表达公开在Moore等(1990)Science 248:1230中。可以使用本领域已知的标准技术如本文所述的那些以多种方式获得IL-10。重组人IL-10也可以例如从PeproTech, Inc., Rocky Hill, N.J. 商购获得。

[0152] 在使用重组技术产生多肽的情况下,多肽可以使用任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞而作为细胞内蛋白或作为分泌的蛋白产生,这些宿主细胞可以是原核或真核细胞,诸如分别为细菌(例如,大肠杆菌)细胞或酵母宿主细胞。可以用作宿主细胞的真核细胞的其他实例包括昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。在使用哺乳动物宿主细胞的情况下,它们可以包括人细胞(例如,HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(例如,NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类细胞(例如,Cos 1、Cos 7和CV1);和仓鼠细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。

[0153] 根据本领域已知的标准程序,可以采用多种适合表达多肽的宿主-载体系统。参见,例如Sambrook等,1989Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York;和Ausubel等,1995Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons。将遗传材料引入宿主细胞中的方法包括例如转化、电穿孔、缀合、磷酸钙方法等等。可以选择用于转移的方法以提供引入的编码多肽的核酸的稳定表达。编码多肽的核酸可以作为可遗传的附加体元件(例如,质粒)提供或者可以基因组整合。用于产生所关注的多肽的多种适当载体可商购获得。

[0154] 载体可以提供在宿主细胞中的染色体外维持或者可以提供到宿主细胞基因组中的整合。表达载体提供转录和翻译调控序列,并且可以提供诱导型或组成型表达,其中编码区在转录起始区和转录和翻译终止区的转录控制下可操作地连接。通常,转录和翻译调控序列可以包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列及增强子或活化子序列。启动子可以是组成型或诱导型的,并且可以是强组成型启动子(例如,T7)。

[0155] 表达构建体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点以提供编码所关注的蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中具有操作性的可选择标志以有利于含有载体的细胞的选择。此外,表达构建体可以包含另外的元件。例如,表达载体可以具有一个或多个复制系统,因此允许其维持在生物体中,例如维持在哺乳动物或昆虫细胞中以用于表达并且维持在原核宿主中以用于克隆和扩增。此外,表达构建体可以含有可选择的标志基因,以允许转化的宿主细胞的选择。可选择的基因是本领域中熟知的,并且将随所使

用的宿主细胞变化。

[0156] 蛋白质的分离和纯化可以根据本领域中已知的方法实现。例如,蛋白质可以从经基因修饰以组成型和/或在诱导后表达蛋白质的细胞的溶胞产物中分离,或者通过免疫亲和纯化从合成的反应混合物中分离,其通常包括使样品与抗蛋白质抗体接触,洗涤以除去非特异性结合的材料,并洗脱特异性结合的蛋白质。分离的蛋白质可以通过透析和通常用于蛋白质纯化的其他方法进一步纯化。在一个实施方案中,蛋白质可以使用金属螯合物色谱方法分离。蛋白质可以含有修饰以有利于分离。

[0157] 多肽可以以大体上纯或分离的形式(例如,不含其他多肽)制备。多肽可以存在于相对于可以存在的其他组分(例如,其他多肽或其他宿主细胞组分)而言富含多肽的组合物中。例如,可以提供纯化的多肽,使得多肽存在于基本上不含其他表达蛋白的组合物中,该组合物含有例如小于约90%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%或小于约1%的其他表达蛋白。

[0158] IL-10多肽可以使用重组技术产生,以操作本领域已知的不同IL-10相关核酸以提供能够编码IL-10多肽的构建体。应该理解,当提供特定的氨基酸序列时,普通技术人员鉴于例如生物分子学方面的背景和经验将认识到编码这种氨基酸序列的各种不同的核酸分子。

[0159] 酰胺键取代

[0160] 在一些情况下,IL-10包括除肽键以外的一个或多个键联,例如至少两个相邻的氨基酸经由除酰胺键以外的键联接合。例如,为了降低或消除不期望的蛋白水解或其他降解手段,和/或增加血清稳定性,和/或限制或增加构象灵活性,IL-10骨架内的一个或多个酰胺键可以被取代。

[0161] 在另一实例中,IL-10中的一个或多个酰胺键联(-CO-NH-)可以用作为酰胺键联的电子等排体的键联如-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH- (顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-或-CH₂SO-置换。在IL-10中的一个或多个酰胺键联也可以被例如还原的电子等排体假肽键置换。参见Couder等,(1993) Int.J.Peptide Protein Res.41:181-184。这类置换和如何实现为本领域普通技术人员所知。

[0162] 氨基酸取代

[0163] 一个或多个氨基酸取代可以在IL-10多肽中进行。以下为非限制性实例:

[0164] a) 烷基取代的疏水性氨基酸的取代,这些氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、(S)-2-氨基丁酸、(S)-环己基丙氨酸或被来自包括支链、环状和直链烷基、烯基或炔基取代的C₁-C₁₀碳的脂族侧链取代的其他简单α-氨基酸;

[0165] b) 芳族取代的疏水性氨基酸的取代,这些氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、磺基酪氨酸、联苯基丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-苯并噻吩基丙氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、组氨酸,包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤代(氟、氯、溴或碘)或烷氧基(C₁-C₄)-取代形式的上文列出的芳族氨基酸,其说明性实例是:2-、3-或4-氨基苯丙氨酸;2-、3-或4-氯苯丙氨酸;2-、3-或4-甲基苯丙氨酸;2-、3-或4-甲氧基苯丙氨酸;5-氨基-、5-氯-、5-甲基-或5-甲氧基色氨酸;2'-、3'-或4'-氨基-,2'-、3'-或4'-氯-,2-、3-或4-联苯基丙氨酸;2'-、3'-或4'-甲基-,2-、3-或4-联苯基丙氨酸;和2-或3-吡啶基丙氨酸;

[0166] c) 含有碱性侧链的氨基酸的取代,这些氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨

酸、2,3-二氨基丙酸、高精氨酸,包括先前氨基酸的烷基、烯基或芳基取代的(C₁-C₁₀支链、直链或环状)衍生物,取代基在杂原子上(诸如α氮或一个或多个远端氮,或者在α碳原子上,例如在前-R位。充当说明性实例的化合物包括:N-ε-异丙基-赖氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-甘氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-丙氨酸、N,N-γ, γ'-二乙基-高精氨酸。还包括如下化合物,诸如α-甲基-精氨酸、α-甲基-2,3-二氨基丙酸、α-甲基-组氨酸、α-甲基-鸟氨酸,其中烷基占据α-碳的前-R位。还包括由烷基、芳族、杂芳族(其中杂芳族基团单独或组合地具有一个或多个氮、氧或硫原子)形成的酰胺、羧酸或任何许多熟知的活化衍生物,诸如酰氯、活性酯、活性azolide和相关衍生物以及赖氨酸、鸟氨酸或2,3-二氨基丙酸;

[0167] d) 酸性氨基酸的取代,这些酸性氨基酸包括天冬氨酸,谷氨酸,高谷氨酸,酪氨酸,2,4-二氨基丙酸的烷基、芳基、芳基烷基和杂芳基磺酰胺,鸟氨酸或赖氨酸以及四唑取代的烷基氨基酸;

[0168] e) 侧链酰胺残基的取代,这些侧链酰胺残基包括天冬酰胺、谷氨酰胺以及天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳族取代的衍生物;和

[0169] f) 含羟基的氨基酸的取代,这些含羟基的氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、2,3-二氨基丙酸以及丝氨酸或苏氨酸的烷基或芳族取代的衍生物。

[0170] 在一些情况下,IL-10包含一种或多种天然存在的非基因编码的L-氨基酸、合成的L-氨基酸或氨基酸的D-对映异构体。例如,IL-10可以仅包含D-氨基酸。例如,IL-10多肽可以包含一个或多个以下残基:羟基脯氨酸、β-丙氨酸、邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基甲基苯甲酸、2,3-二氨基丙酸、α-氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸(肌氨酸)、鸟氨酸、瓜氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、萘丙氨酸、吡啶丙氨酸3-苯并噻吩基丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉素、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、β-2-噻吩基丙氨酸、甲硫氨酸亚砷、高精氨酸、N-乙酰基赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、rho-氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、ε-氨基己酸、ω-氨基己酸、ω-氨基庚酸、ω-氨基辛酸、ω-氨基癸酸、ω-氨基十四酸、环己基丙氨酸、α, γ-二氨基丁酸、α,β-二氨基丙酸、δ-氨基戊酸和2,3-二氨基丁酸。

[0171] 另外的修饰

[0172] 可以将半胱氨酸残基或半胱氨酸类似物引入IL-10多肽中以提供经由二硫键联与另一肽的连接或提供IL-10多肽的环化。引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物的方法在本领域已知;参见,例如美国专利号8,067,532。

[0173] 可以使IL-10多肽环化。可以将一种或多种半胱氨酸或半胱氨酸类似物引入IL-10多肽中,其中引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以与第二引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物形成二硫键。其他环化手段包括引入肟连接子或羊毛硫氨酸连接子;参见,例如美国专利号8,044,175。可以使用和/或引入可以形成环化键的氨基酸(或非氨基酸部分)的任何组合。环化键可以用具有允许引入桥的官能团的氨基酸(或氨基酸和-(CH₂)_n-CO-或-(CH₂)_n-C₆H₄-CO-)的任何组合产生。一些实例是二硫化物、二硫化物模拟物如-(CH₂)_n-卡巴桥(carba bridge)、硫缩醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫氨酸)和含有酯和醚的桥。在这些实例中,n可以是任何整数,但通常小于10。

[0174] 其他修饰包括例如N-烷基(或芳基)取代(ψ[CONR])或骨架交联以构建内酰胺和其

他环状结构。其他衍生物包括C-末端羟甲基衍生物、*o*-修饰的衍生物(例如,C-末端羟甲基苄基醚)、包括取代的酰胺如烷基酰胺和酰肼的N-末端修饰的衍生物。

[0175] 在一些情况下,在IL-10多肽中的一个或多个L-氨基酸被一个或多个D-氨基酸置换。

[0176] 在一些情况下,IL-10多肽是反转录类似物(参见,例如Sela和Zisman (1997) FASEB J. 11:449)。逆-反式肽类似物是线性多肽的异构体,其中氨基酸序列的方向逆转(逆向),并且其中的一个或多个氨基酸的手性(D-或L-)反转(反向),例如使用D-氨基酸而不是L-氨基酸。(参见,例如Jameson等,(1994) Nature 368:744;和Brady等,(1994) Nature 368:6920。

[0177] IL-10多肽可以包括“蛋白质转导结构域”(PTD),其是指有利于横穿脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜的多肽、多核苷酸、碳水化合物或有机或无机分子。连接至另一分子的PTD有利于分子横穿膜,例如从细胞外空间进入细胞内空间或细胞溶质进入细胞器内。在一些实施方案中,PTD共价连接至IL-10多肽的氨基末端,而在其他实施方案中,PTD共价连接至IL-10多肽的羧基末端。示例性蛋白质转导结构域包括但不限于最小十一氨基酸多肽蛋白质转导结构域(对应于包含YGRKKRRQRRR的HIV-1 TAT的残基47-57;SEQ ID NO:3);包含足以直接进入细胞的数量精氨酸残基(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸)的聚精氨酸序列;VP22结构域(Zender等,(2002) Cancer Gene Ther. 9 (6):489-96);果蝇触角蛋白转导结构域(Noguchi等,(2003) Diabetes 52 (7):1732-1737);截短的人降钙素肽(Trehin等,(2004) Pharm. Research 21:1248-1256);聚赖氨酸(Wender等,(2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR (SEQ ID NO:4);运输蛋白(Transportan) GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO:5);KALAEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (SEQ ID NO:6);以及RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:7)。示例性PTD包括但不限于YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:3)、RKKRRQRRR (SEQ ID NO:8);具有3个精氨酸残基至50个精氨酸残基的精氨酸均聚物;示例性PTD结构域氨基酸序列包括但不限于以下的任何序列:YGRKKRRQRRR (SEQ ID NO:3);RKKRRQRR (SEQ ID NO:9);YARAAARQARA (SEQ ID NO:10);THRLPRRRRRR (SEQ ID NO:11);和GGRRARRRRRR (SEQ ID NO:12)。

[0178] 在IL-10多肽的C-末端的氨基酸的羧基COR₃可以以游离形式(R₃=OH)或以生理学耐受的碱或碱土金属盐如钠盐、钾盐或钙盐的形式存在。羧基还可以用伯醇、仲醇或叔醇如甲醇、支链或无支链的C₁-C₆-烷基醇如乙醇或叔丁醇酯化。羧基还可以用伯胺或仲胺如氨、支链或无支链的C₁-C₆-烷基胺或C₁-C₆二烷基胺如甲胺或二甲胺酰胺化。

[0179] 在IL-10多肽的N-末端的氨基酸NR₁R₂的氨基可以以游离形式(R₁=H且R₂=H)或以生理学耐受的盐如氯化物或乙酸盐的形式存在。氨基还可以用酸乙酰化,使得R₁=H且R₂=乙酰基、三氟乙酰基或金刚烷基。氨基可以以通常用于肽化学中的氨基保护基团如上面提供的那些(例如Fmoc、苄氧基-羰基(Z)、Boc和Alloc)保护的形式存在。氨基可以被N-烷基化,其中R₁和/或R₂=C₁-C₆烷基或C₂-C₈烯基或C₇-C₉芳烷基。烷基残基可以是直链、支链或环状的(例如,分别为乙基、异丙基和环己基)。

[0180] IL-10的聚乙二醇化

[0181] IL-10的聚乙二醇化包括将IL-10多肽序列缀合或连接到各种非蛋白质聚合物中的任一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯。这通常通过与蛋白质和非蛋白质聚

合物如PEG共价结合的连接部分来实现。已经显示这类PEG-缀合的生物分子具有临床上有用的性质,包括更好的物理和热稳定性、防止对酶降解的易感性、增加的溶解性、更长的体内循环半衰期和减小的清除率、降低的免疫原性和抗原性以及降低的毒性。除了聚乙二醇化对药代动力学参数的有益作用外,聚乙二醇化本身可以增强活性。例如,已经显示,与未聚乙二醇化的IL-10相比,PEG-IL-10对某些癌症更有效(参见,例如EP 206636A2)。

[0182] 适合与多肽序列缀合的PEG在室温下通常可溶于水,并具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R为氢或保护基团如烷基或烷醇基团,并且其中n是1至1000的整数。当R是保护基团时,它通常具有1至8个碳。与多肽序列缀合的PEG可以是直链或支链的。本公开预期分支的PEG衍生物,“星形-PEG”和多臂PEG。在本公开中使用的PEG的分子量不限于任何特定的范围,并且实例在本文其他地方陈述;举例来说,某些实施方案具有介于5kDa和20kDa之间的分子量,而其他实施方案具有介于4kDa和10kDa之间的分子量。

[0183] 本公开还预期缀合物的组合物,其中PEG具有不同的n值,并且因此各种不同的PEG以特定比率存在。例如,一些组合物包含其中n=1、2、3和4的缀合物的混合物。在一些组合物中,其中n=1的缀合物的百分比为18-25%,其中n=2的缀合物的百分比为50-66%,其中n=3的缀合物的百分比为12-16%,且其中n=4的缀合物可达5%。这类组合物可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法来产生。整个说明书中描述了示例性反应条件。可以使用阳离子交换色谱法来分离缀合物,并且然后鉴定一种级分,所述级分含有具有例如所需数量的连接PEG的缀合物,经纯化而不含未修饰的蛋白质序列,并且不含具有其他数目的连接PEG的缀合物。

[0184] 聚乙二醇化最常发生在多肽的N-末端的 α 氨基处、赖氨酸残基侧链上的 ϵ 氨基处和组氨酸残基侧链上的咪唑基团处。由于大多数重组多肽具有单个 α 和多个 ϵ 氨基以及咪唑基团,因此根据连接子化学可以产生多种位置异构体。本文中可以申请本领域已知的通用聚乙二醇化策略。

[0185] 两种广泛使用的第一代活化的单甲氧基PEG (mPEG) 是琥珀酰亚胺基碳酸酯PEG (SC-PEG; 参见,例如Zalipsky等,(1992) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15:100-114; 以及Miron和Wilcheck (1993) *Bio-conjug. Chem.* 4:568-569) 和苯并三唑碳酸酯PEG (BTC-PEG; 参见,例如Dolence等,美国专利号5,650,234),其优先与赖氨酸残基反应以形成氨基甲酸酯键联,但也已知其与组氨酸和酪氨酸残基反应。已经显示某些分子(例如,IFN- α) 上与组氨酸残基的键联是水解不稳定的咪唑氨基甲酸酯键联(参见,例如Lee和McNemar,美国专利号5,985,263)。已经设计出第二代聚乙二醇化技术以避免这些不稳定的键联以及在残基反应性方面的选择性的缺乏。使用PEG-醛连接子通过还原胺化作用靶向多肽的N-末端上的单个位点。

[0186] PEG可以经由介导一个或多个多肽序列的游离氨基或羧基与聚乙二醇之间的键的末端反应性基团(“间隔基”)与本公开的多肽结合。具有可以与游离氨基结合的间隔基的PEG包括N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇,其可以通过用N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。另一种可以与游离氨基结合的活化聚乙二醇是2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪,它可以通过使聚乙二醇单甲醚与氰尿酸氯反应来制备。与游离羧基结合的活化的聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0187] 本公开的一种或多种多肽序列与具有间隔基的PEG的缀合可以通过各种常规方法

进行。例如,缀合反应可以在5至10的pH下在4℃至室温的温度下在溶液中利用4:1至30:1的试剂与蛋白质的摩尔比进行30分钟至20小时。可以选择反应条件以引导反应主要产生所需的取代度。通常,低温、低pH(例如,pH=5)和短反应时间倾向于减小连接的PEG的数量,而高温、中性至高pH(例如,pH≥7)和更长的反应时间倾向于增加连接的PEG的数量。可以使用本领域已知的各种手段来终止反应。在一些实施方案中,通过酸化反应混合物并在例如-20℃下冷冻来终止反应。各种分子的聚乙二醇化在例如以下美国专利号中讨论:5,252,714;5,643,575;5,919,455;5,932,462;和5,985,263。PEG-IL-10在例如美国专利号7,052,686中所述。预期用于本文的具体反应条件在实验部分中陈述。

[0188] 本公开还预期使用PEG模拟物。已经开发了重组PEG模拟物,其保留了PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予若干另外的有利性质。举例来说,能够形成类似于PEG的延伸构象的简单多肽链(包含例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser和Thr)可以重组产生,已经与所关注的肽或蛋白质药物融合(例如,Amunix' XTEN technology;Mountain View,CA)。这避免了在制造过程期间需要另外的缀合步骤。此外,已建立的分子生物学技术能够控制多肽链的侧链组成,从而允许优化免疫原性和制造性质。

[0189] 连接子:上面已经描述了连接子及其用途。合适的连接子包括“柔性连接子”,其通常具有足够的长度以容许在修饰的多肽序列和连接的组分和分子之间的一些移动。连接子分子通常长约6-50个原子。连接子分子还可以是例如芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。合适的连接子可以容易地选择并且可以具有任何合适的长度,诸如1个氨基酸(例如,Gly)、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、10-20个、20-30、30-50个或超过50个氨基酸。

[0190] 柔性连接子的实例包括甘氨酸聚合物(G)_n、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物、甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如,(G_mS_o)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:13)、(G_mS_oG_m)_n、(G_mS_oG_mS_oG_m)_n(SEQ ID NO:14)、(GSGGS_m)_n(SEQ ID NO:15)、(GSGS_mG)_n(SEQ ID NO:16)和(GGGS_m)_n(SEQ ID NO:17)及其组合,其中m、n和o各自独立地选自至少1至20的整数,例如1-18、2-16、3-14、4-12、5-10、1-2、3、4、5、6、7、8、9或10)和其他柔性连接子。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可以用作组分之间的中性系链(neutral tether)。柔性连接子的实例包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:18)、GGSGG(SEQ ID NO:19)、GSGSG(SEQ ID NO:14)、GSGGG(SEQ ID NO:20)、GGGSG(SEQ ID NO:21)和GSSSG(SEQ ID NO:22)。

[0191] 柔性连接子的另外实例包括甘氨酸聚合物(G)_n或甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如,(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:13)、(GGGS)_n(SEQ ID NO:23)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:24),其中n=1至50,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50)。示例性柔性连接子包括但不限于GGGS(SEQ ID NO:23)、GGGGS(SEQ ID NO:24)、GGSG(SEQ ID NO:18)、GGSGG(SEQ ID NO:19)、GSGSG(SEQ ID NO:14)、GSGGG(SEQ ID NO:20)、GGGSG(SEQ ID NO:21)和GSSSG(SEQ ID NO:22)。这些连接子序列的多聚体(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30或30-50)可以连接在一起以提供柔性连接子,该柔性连接子可以用以将异源氨基酸序列缀合至本文公开的多肽。

[0192] 治疗性和预防性用途

[0193] 在特定的实施方案中,本公开预期PEG-IL-10和IL-12剂在治疗和/或预防癌症相关的疾病、病症或病况中的用途。尽管下文详细描述了特定的用途,但应理解,本公开不限

于此。

[0194] 可以使用本文公开的组合疗法治疗或预防的代表性癌症包括子宫癌、子宫颈癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、肠胃道癌(例如,食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌或大肠癌、结肠癌或直肠癌)、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头颈癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌(例如,神经胶质瘤)、神经节瘤、中枢神经系统(CNS)癌和外周神经系统(PNS)癌以及免疫系统(例如,脾或胸腺)的癌症。

[0195] 本公开还提供治疗或预防其他癌症相关的疾病、病症或病况的方法,这些其他癌症相关的疾病、病症或病况包括例如免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠肿瘤、病毒诱导的癌症(例如,上皮细胞癌症、内皮细胞癌症、鳞状细胞癌和乳头瘤病毒)、腺癌、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤)、白血病、癌瘤、黑素瘤、骨髓瘤、恶性毒瘤、畸胎瘤、化学诱导的癌症和转移。在特定的实施方案中,肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌或成胶质细胞瘤。

[0196] 在另外的特定实施方案中,癌症是乳腺腺癌、肺泡癌、纤维肉瘤和黑色素瘤的肺转移(Pegram等,(2012) *Advancements in Tumor Immunotherapy and Cancer Vaccines*, Dr.Hilal Arnouk(编), ISBN:978-953-307-998-1, InTech)。探索基于IL-12的治疗在组合疗法或基因疗法中的抗肿瘤作用的临床研究包括治疗以下肿瘤:乳腺癌、胰腺癌、肝癌、肾癌、宫颈癌、胃肠道癌、结肠直肠癌、非霍奇金氏淋巴瘤、黑素瘤(例如,多发性黑素瘤)和AIDS相关的卡波西肉瘤(Lasek等,(2014) *Cancer Immunol Immunother* 63:419-35)。

[0197] 在本公开的特定实施方案中,癌症相关的疾病、病症或病况是免疫不敏感肿瘤。对治疗性免疫操作不敏感的肿瘤可以被描述为表现出以下两个特征:1)免疫系统的主动遏制,和2)伴随着由其治疗引起的免疫遏制机制的伴随激活的炎症应答(Galon等,(2013年7月25日) *Immunity* 39:11-26 (PubMed PMID:238900600))。免疫不敏感肿瘤的实例包括但不限于结肠癌、胃食管癌、胰腺癌和乳腺癌。

[0198] 如本文中其他地方所述,在一些实施方案中,本公开提供用于用PEG-IL-10和IL-12剂与其实例提供在本文中的至少一种另外治疗或诊断剂组合治疗癌症相关的疾病、病症或病况的方法。

[0199] 药物组合物

[0200] 本公开所预期的PEG-IL-10和IL-12剂可以呈适合施用于受试者的组合物的形式。通常,这类组合物是包含PEG-IL-10和/或IL-12剂和一种或多种药学上可接受的或生理学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂的“药物组合物”。在某些实施方案中,PEG-IL-10和IL-12剂各自以治疗可接受的量存在。药物组合物可以用于本公开的方法中;因此,例如,药物组合物可以离体或体内施用于受试者以实施本文所述的治疗和预防方法和用途。

[0201] 在随后对药物组合物及其方面的描述中,药物组合物通常在PEG-IL-10的情形中描述。然而,应当理解,该描述也适用于在包含PEG-IL-10和IL-12剂的组合的药物组合物中或者在仅包含这些组分中的一种的药物组合物中的本公开的IL-12剂。

[0202] 可以将本公开的药物组合物配制与预期的施用方法或路径相容;示例性施用途在本文中陈述。另外,药物组合物可以与本文所述的其他治疗活性剂或化合物组合使用,以治疗或预防如本公开所预期的疾病、病症和病况。

[0203] 药物组合物通常包含治疗有效量的本公开预期的PEG-IL-10和/或IL-12剂以及一

种或多种药理学和生理学上可接受的配制剂。合适的药理学上可接受或生理学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂包括但不限于抗氧化剂(例如,抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如,苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯)、乳化剂、混悬剂、分散剂、溶剂、填料、填充剂、洗涤剂、缓冲剂、媒介物、稀释剂和/或佐剂。例如,合适媒介物可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲的盐水,可能补充有在用于肠胃外施用的药物组合物中常用的其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性媒介物。本领域技术人员将容易地认识到可以用于本文预期的药物组合物和剂型的各种缓冲剂。典型的缓冲剂包括但不限于药理学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。例如,缓冲组分可以是水溶性材料,诸如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)。

[0204] 在已经配制药物组合物之后,其即可以作为溶液、悬浮液、凝胶剂、乳液、固体或者脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。这类配制剂可以以即用形式、使用前需要复水的冻干形式、使用前需要稀释的液体形式或其他可接受的形式储存。在一些实施方案中,药物组合物在一次性使用的容器(例如,一次性使用的小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen®))中提供,而多用途容器(例如,多用途小瓶)在其他实施方案中提供。任何药物递送设备都可以用于递送PEG-IL-10或IL-12剂,包括植入物(例如,可植入泵)和导管系统、缓慢注射泵和装置,所有这些都是技术人员熟知的。通常通过皮下或肌肉内施用的积存注射也可以用于在限定的时间段内释放本文公开的多肽。积存注射通常是基于固体或油的,并且通常包含至少一种本文所陈述的配制组分。本领域的普通技术人员熟悉积存注射的可能配制剂和用途。

[0205] 药物组合物可以呈无菌可注射水性或油性混悬液的形式。该混悬液可以根据已知的技术使用本文提到的那些合适的分散或湿润剂及混悬剂来配制。无菌可注射制剂也可以是在无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,例如,作为在1,3-丁二醇中的溶液。可以采用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格氏溶液(Ringer's solution)、等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物。此外,无菌的固定油通常用作溶剂或悬浮介质。出于该目的,可以采用任何温和的固定油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。此外,诸如油酸的脂肪酸在可注射剂的制备中获得使用。可以通过包括延迟吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现特定的可注射配制剂的延长吸收。

[0206] 含有活性成分的药物组合物可以呈适合口服使用的形式,例如作为片剂、胶囊、糖锭、锭剂、水性或油性混悬液、可分散粉剂或颗粒剂、乳剂、硬质或软质胶囊或糖浆、溶液、微珠或酞剂。在特定的实施方案中,与本文所述的PEG-IL-10和/或IL-12剂共同施用的药剂的活性成分呈适于口服使用的形式。意图用于口服使用的药物组合物可以根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法来制备,并且此类组合物可以含有一种或多种试剂,诸如甜味剂、调味剂、着色剂或防腐剂,以便提供药理学上优良且可口的制剂。片剂、胶囊等等含有与适合片剂制造的非毒性药理学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是例如

稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;成粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0207] 适合口服施用的片剂、胶囊等等可以是不包衣的,或通过已知技术包衣以延迟在肠胃道中的崩解和吸收并且由此提供持续作用。例如,可以采用延时材料,诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们也可以用本领域已知的技术包衣以形成用于控制释放的渗透治疗片剂。其他试剂包括生物可降解或生物相容的粒子或聚合物物质如聚酯、聚酰胺酸、水凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚酐、聚乙醇酸、乙烯-乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白或丙交酯/乙交酯共聚物、聚丙交酯/乙交酯共聚物或乙烯乙酸乙烯酯共聚物以控制施用的组合物的递送。例如,口服剂可以包埋在通过凝聚技术或通过界面聚合,通过分别使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊或聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊制备的微胶囊中或在胶体药物递送系统中。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用于制备上面提到的配制剂的方法对于本领域的技术人员将是显而易见的。

[0208] 用于口服使用的配制剂也可以作为硬质明胶胶囊呈现,其中活性成分与惰性固体稀释剂如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素混合,或作为软质明胶胶囊呈现,其中活性成分与水或油介质如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0209] 水性混悬液含有与适用于制造水性混悬液的赋形剂混合的活性材料。这类赋形剂可为混悬剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟基-丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯基-吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶;分散或润湿剂,例如天然存在的磷脂(例如,卵磷脂),或环氧烷与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧-乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如,十七元环氧乙基十六醇),或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与来源于脂肪酸和己糖醇酐的部分酯的缩合产物(例如,聚乙烯山梨聚糖单油酸酯)。水性混悬液还可以含有一种或多种防腐剂。

[0210] 油性混悬液可以通过使活性成分混悬于诸如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油的植物油中或在诸如液体石蜡的矿物油中来配制。含油混悬液可以包含增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或十六醇。可以添加甜味剂(如以上列出的那些)和调味剂以提供可口的口服制剂。

[0211] 适合于通过添加水来制备水性混悬液的可分散粉剂和颗粒剂提供了与分散剂或润湿剂、混悬剂以及一种或多种防腐剂混合的活性成分。本文中举例说明合适的分散或润湿剂和混悬剂。

[0212] 本公开的药物组合物还可以呈水包油乳液的形式。油相可以是例如橄榄油或花生油的植物油或例如液体石蜡的矿物油或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如阿拉伯树胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂以及来源于脂肪酸的酯或部分酯;己糖醇酐,例如脱水山梨糖醇单油酸酯;以及部分酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0213] 配制剂还可以包含载剂以保护组合物免于从身体中快速降解或消除,诸如控释配制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微胶囊化递送系统。例如,可以采用单独或与蜡组合的诸如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯的延时材料。

[0214] 本公开预期施用呈用于直肠施用的栓剂形式的IL-10多肽。这些栓剂可以通过将

药物与合适的非刺激性赋形剂混合来制备,该非刺激性赋形剂在常温下为固体,但是在直肠温度下为液体,并因此在直肠中将熔融以释放药物。此类材料包括但不限于可可脂和聚乙二醇。

[0215] 本公开预期的PEG-IL-10和IL-12剂可以呈目前已知或将来开发的任何其他合适的药物组合物(例如,用于鼻腔或吸入用途的喷雾剂)的形式。

[0216] 在配制剂中多肽或其片段的浓度可以广泛变化(例如,小于约0.1重量%,通常为或至少约2重量%至多达20重量%至50重量%或更多),并且通常将根据例如所选择的特定施用模式主要基于流体体积、粘度和基于受试者的因素进行选择。

[0217] 施用途径

[0218] 本公开预期以任何适当的方式施用PEG-IL-10和IL-12剂及其组合物。合适的施用途径包括肠胃外(例如,肌内、静脉内、皮下(例如,注射或植入)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(脑实质内)和脑室内)、口服、鼻腔、阴道、舌下、眼内、直肠、局部(例如,透皮)、舌下和吸入。通常通过皮下或肌内施用的积存注射也可以用于在限定的时间段内释放本文公开的多肽。

[0219] 本公开的特定实施方案预期肠胃外施用。在一些实施方案中,肠胃外施用是静脉内施用,并且在其他实施方案中,是皮下施用。

[0220] 补充组合疗法

[0221] 本公开预期使用进一步与一种或多种活性治疗剂或其他预防或治疗形式(例如,辐射)组合的PEG-IL-10和IL-12剂的组合。对于本申请的目的,这类进一步的组合有时被称为“补充组合”、“补充组合疗法”、“与另外的预防或治疗剂的组合”等等,并且添加到PEG-IL-10和IL-12剂的组合中的试剂可以被称为“补充剂”等等。在这类补充组合疗法中,各种补充活性剂通常具有与PEG-IL-10和/或IL-12剂不同的作用机制。这类补充联合疗法可以通过允许这一种或多种试剂的剂量降低而特别有利,由此降低或消除与这一种或多种试剂相关的副作用;另外,此类补充组合疗法可以对潜在的增殖性疾病、病症或病况具有协同治疗或预防作用。在本公开的一些实施方案中,这一种或多种补充剂是一种或多种诊断剂。

[0222] 在特定的实施方案中,本公开提供用于用PEG-IL-10和IL-12剂和至少一种另外的治疗或诊断剂治疗和/或预防癌症相关的疾病、病症或病况的方法。

[0223] 在本公开的一些实施方案中,PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂中的每一种可以在单独的剂型中。举例来说,PEG-IL-10可以在适合于皮下施用的配制剂中,IL-12剂可以在适合静脉内施用的配制剂中,并且补充剂可以在适合口服施用的配制剂中;在这种情况下,每种试剂可以单独地容纳,或者两种或更多种的试剂可以一起容纳(例如,作为试剂盒的不同组分)。在本公开的其他实施方案中,PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂中的两种或更多种在相同的剂型中。例如,PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂可以配制成静脉内施用;在这种情况下,这些试剂中的一种或多种可以共同配制(例如,作为注射器中的活性治疗剂)。

[0224] 在某些实施方案中,PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂(例如,化学治疗剂)依次施用或应用,例如首先施用PEG-IL-10,其次施用IL-12剂,且最后施用补充剂。在其他实施方案中,PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂同时施用,例如,其中它们中的两种同时施用且第三种在此之前或之后施用。无论PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂是

否是顺序地、同时地或者其一些变化地施用,对于本公开的目的,它们被认为是作为补充组合疗法施用。

[0225] 本公开预期使用用于补充组合疗法的任何可能的给药方案,其在这些情况下可以是可接受的、适当的或最佳的。下文所述的方案是示例性的,而不是排他性的。在一个实施方案中,在一段时间内维持用PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂的治疗。在另一实施方案中,在一段时间内降低或继续用PEG-IL-10、IL-12剂和一种或多种补充剂的治疗(例如,当受试者稳定时)。在另一实施方案中,降低或中断用一种或多种补充剂的治疗(例如,当受试者稳定时),而维持在恒定给药方案下用PEG-IL-10和IL-12剂的治疗。在进一步的实施方案中,降低或中断用一种或多种补充剂的治疗(例如,当受试者稳定时),降低用PEG-IL-10的治疗(例如,剂量较低、给药频率较低或治疗方案较短),并且维持在恒定给药方案下用IL-12剂的治疗。在进一步的实施方案中,降低或中断用一种或多种补充剂的治疗(例如,当受试者稳定时),降低用PEG-IL-10的治疗(例如,剂量较低、给药频率较低或治疗方案较短),并且维持在恒定给药方案下用IL-12剂的治疗。

[0226] 在又一实施方案中,维持在恒定给药方案下用一种或多种补充剂和PEG-IL-10的治疗,而降低或中断用IL-12剂的治疗(例如,当受试者稳定时)。在又一实施方案中,维持在恒定给药方案下用一种或多种补充剂和IL-12剂的治疗,而降低或中断用PEG-IL-10的治疗(例如,剂量较低、给药频率较低或治疗方案较短)。其他给药方案的鉴定和使用对于技术人员将是显而易见的。

[0227] 尽管适用于本文公开的PEG-IL-10和IL-12剂的组合的特定试剂在下文中陈述,但应理解,本公开不限于此。举例来说,但不限制,预防或治疗剂可以是化学治疗剂、免疫或炎症相关的药剂、代谢剂、抗病毒剂或抗血栓形成剂。本公开的方法还可以与非药理学剂(例如,放射学)组合使用。

[0228] 在一个特定的实施方案中,本公开预期PEG-IL-10和IL-12剂与一种或多种化学治疗剂一起用于治疗 and/或预防癌症、肿瘤或癌前期或癌症相关的疾病、病症或病况。化学治疗剂的实例包括但不限于烷基化剂,诸如噻替哌及环磷酰胺;磺酸烷酯,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮杂环丙院,诸如苯柔多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、甲基多巴(meturedopa)及普力多巴(uredopa);乙烯亚胺及甲基三聚氰胺(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺及三羟甲基三聚氰胺;氮芥,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酸胺、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸二氯甲基二乙胺氧化物、马法兰(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆固醇(phenesterine)、拨尼氮芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥末;亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福替目丁(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、嘧啶亚硝脲(nimustine)、雷莫司汀(rani mustine);抗生素,诸如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素、蒽霉素(authramycin)、重氮乙酰丝氨酸、博来霉素(bleomycins)、放线菌素(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡拉比辛(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、更生霉素、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正白氨酸、阿霉素、表阿霉素、依索比星

(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、紫菜霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢剂,诸如甲胺蝶呤反5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin),甲胺蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲喋呤(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、氮杂胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、二脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷、5-FU;雄激素,诸如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄院(mepitiostane),去气睾内酯(testolactone);抗肾上腺,诸如胺鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如福林叶酸(frolic acid);醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺(aldophosphamide)葡萄糖苷;氨基乙酰丙酸;安丫啶(amsacrine);贝曲布索(bestrabucil);比山群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);迪氟法迈(defofamine);地美可辛(de mecolcine);地吡醌(diaziquone);艾氟米辛(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓,羟基脲,香菇多糖;氯尼达明(lonidamine);丙酮双脲脲(mitoguazone);米托意醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋胺氮芥(phenamet),吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸;2-乙基胍;甲基胍;雷佐生(razoxane);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三乙撑亚胺苯醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;聚胺酯(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴脱氧己六醇(mitolactol);脉泊溴院(pipobroman);嘉胞苷(gacytosine);阿糖胞苷(Ara-C);环磷酰胺;塞替派;类毒素,例如例如太平洋紫杉醇和多西紫杉醇、苯丁酸氮芥;吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;硫嘌呤;甲胺蝶呤;铂和铂配位复合物,诸如顺铂及卡铂;长春新碱;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;丝裂霉素C;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;异长春花碱;诺消灵(novantrone);替尼泊苷;柔红霉素;氨基喋呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT11;拓扑异构酶抑制剂;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸;埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨;和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0229] 化学治疗剂还包括用于调控或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛西芬(keoxifene)、奥那司酮(onapristone)及托瑞米芬(toremifene);以及抗雄激素,诸如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、醋酸亮丙瑞林及戈舍瑞林(goserelin);和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方案中,组合疗法包括施用激素或相关的激素剂。

[0230] 可用于治疗或预防本文所述的癌性病症的任何其他药剂被预期是补充剂,包括但不限于细胞因子或细胞因子拮抗剂,诸如IL-12、INF α 或抗表皮生长因子受体、放射疗法、针

对另一肿瘤抗原的单克隆抗体、单克隆抗体与毒素的复合物、T-细胞佐剂、骨髓移植或抗原呈递细胞(例如,树突细胞疗法)。本文还提供疫苗(例如,作为可溶性蛋白质或编码蛋白质的核酸)。

[0231] 在特定的实施方案中,另外的预防或治疗剂是化学治疗剂,其实例在本文中陈述。在一些实施方案中,化学治疗剂是基于铂的抗肿瘤剂,也称为铂配位络合物。这些基于铂的抗肿瘤剂交联DNA,从而抑制癌细胞中的DNA修复和/或DNA合成。这类药剂的实例包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、沙铂、吡铂、奈达铂和三铂

[0232] 本公开涵盖任何上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0233] 剂量

[0234] 本公开的PEG-IL-10和IL-12剂可以取决于例如施用目标(例如,所需分辨率);施用配制剂的受试者的年龄、体重、性别以及健康和身体状况;施用途径;以及疾病、病症、病况或其症状的性质的量施用于受试者。给药方案还可以考虑与所施用的一种或多种试剂相关的任何不利作用的存在、性质和程度。有效剂量和给药方案可以容易地由例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)和技术人员已知的其他方法确定。

[0235] 如本文中其他地方所讨论,本公开预期PEG-IL-10和IL-12剂组合疗法的实施方案,其中PEG-IL-10以使得维持所需血清谷浓度(例如, $\geq 10\text{ng/mL}$)的量和频率施用。还预期PEG-IL-10和IL-12剂组合疗法的实施方案,其中给予IL-12剂以使得血清浓度达到峰值并且然后在再次施用之前被清除到不可测量的水平。

[0236] 通常,给药参数决定剂量小于对受试者可能具有不可逆毒性的量(即,最大耐受剂量,“MTD”)并且不小于对受试者产生可测量作用所需要的量。考虑给药路径和其他因素,通过例如与ADME相关的药代动力学和药效学参数确定这样的量。

[0237] 如本文所用,术语“EC50”和短语“半最大有效浓度”具有其通常接受的含义;也就是说,EC50是在某一特定的暴露时间之后诱导在基线和最大值之间一半的的治疗剂(例如,PEG-IL-10)的浓度。技术人员熟悉用于确定治疗剂的EC50的手段。例如,可以在基于细胞的测定中测量治疗剂的某些浓度相关参数之后,使用市售软件(例如,Graphpad Software, Inc.; La Jolla, CA)确定EC50。

[0238] 有效剂量(ED)是在服用它的一部分受试者中产生治疗反应或所需作用的药剂的剂量或量。药剂的“中值有效剂量”或ED50是在施用该药剂的群体的50%中产生治疗反应或所需作用的药剂的剂量或量。尽管ED50通常用作合理预计药剂作用的量度,但考虑到所有相关因素,其未必是临床医生认为合适的剂量。因此,在一些情况下,有效量可以大于计算的ED50,在其他情况下,有效量可以小于计算的ED50,并且在其他情况下,有效量可以与计算的ED50相同。

[0239] 此外,本公开的PEG-IL-10和IL-12剂的有效剂量可以是当以一种或多种剂量施用到受试者时相对于健康受试者产生所要结果的量。例如,对于经历特定病症的受试者,有效剂量可以是使该病症的诊断参数、量度、标志物等改善至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或超过90%的剂量,其中100%被定义为由正常受试者表现出的诊断参数、量度、标志物等等。

[0240] 可以通过本领域已知的活性测定来确定治疗本文所述的疾病、病症或病况所必需

的PEG-IL-10和IL-12剂的量。举例来说,在肿瘤的情形中,合适的IL-10活性包括例如CD8+ T-细胞浸润到肿瘤部位,炎性细胞因子如IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10和RANK-L自这些浸润细胞表达,以及TNF α 或IFN γ 在生物学样品中的水平增加。

[0241] PEG-IL-10的治疗有效量可以在约0.01 μ g蛋白质/kg体重/天至约100 μ g蛋白质/kg体重/天、约0.1 μ g蛋白质/kg体重/天至20 μ g蛋白质/kg体重/天、约0.5 μ g蛋白质/kg体重/天至10 μ g蛋白质/kg体重/天、或约1 μ g蛋白质/kg体重/天至4 μ g蛋白质/kg体重/天范围内。本公开预期如下实施方案,其中组合疗法的PEG-IL-10组分的量为10.0 μ g/kg/天至20.0 μ g/kg/天。在一些实施方案中,PEG-IL-10的施用量为12.0 μ g/kg/天至18.0 μ g/kg/天。

[0242] 在一些实施方案中,施用组合疗法的PEG-IL-10组分(例如,通过连续输注)以提供约50 μ g蛋白质/kg体重/天至800 μ g蛋白质/kg体重/天的递送(例如,约1 μ g蛋白质/kg体重/天至16 μ g蛋白质/kg体重/天的PEG-IL-10)。在通过输注递送的情况下,输注速率可以基于例如不利作用和血细胞计数的评价而变化。本文中其他地方描述了PEG-IL-10的其他具体给药参数。

[0243] 本公开预期如下实施方案,其中施用给受试者以治疗或预防癌症相关的疾病、病症或病况的PEG-IL-10组合疗法的IL-12组分的量为0.01 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天。在其他实施方案中,IL-12剂的量为0.1 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天,并且在其他实施方案中,IL-12剂的量为1.0 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天。在更进一步的实施方案中,施用给受试者以治疗或预防癌症相关的疾病、病症或病况的组合疗法的IL-12组分的量为0.1 μ g/kg/天至15.0 μ g/kg/天。在其他实施方案中,IL-12剂的量为1.0 μ g/kg/天至15.0 μ g/kg/天,并且在其他实施方案中,IL-12剂的量为10.0 μ g/kg/天至15.0 μ g/kg/天。

[0244] 本公开预期PEG-IL-10/IL-12剂组合疗法的实施方案,其中PEG-IL-10的施用量为10.0 μ g/kg/天至20.0 μ g/kg/天;11.0 μ g/kg/天至19.0 μ g/kg/天;12.0 μ g/kg/天至18.0 μ g/kg/天;13.0 μ g/kg/天至17.0 μ g/kg/天;14.0 μ g/kg/天至16.0 μ g/kg/天;或约15.0 μ g/kg/天。本公开预期PEG-IL-10/IL-12剂组合疗法的实施方案,其中IL-12剂的施用量为0.01 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天;0.05 μ g/kg/天至9.5 μ g/kg/天;0.1 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天;0.1 μ g/kg/天至9.0 μ g/kg/天;0.5 μ g/kg/天至8.5 μ g/kg/天;1.0 μ g/kg/天至10.0 μ g/kg/天;1.0 μ g/kg/天至8.0 μ g/kg/天;1.5 μ g/kg/天至7.5 μ g/kg/天;2.0 μ g/kg/天至7.0 μ g/kg/天;2.5 μ g/kg/天至6.5 μ g/kg/天;3.0 μ g/kg/天至6.0 μ g/kg/天;3.5 μ g/kg/天至5.5 μ g/kg/天;4.0 μ g/kg/天至5.0 μ g/kg/天;或4.5 μ g/kg/天,其可以与本文中陈述的任何PEG-IL-10的量组合施用(例如,PEG-IL-10以10.0 μ g/kg/天至20.0 μ g/kg/天;11.0 μ g/kg/天至19.0 μ g/kg/天;12.0 μ g/kg/天至18.0 μ g/kg/天;13.0 μ g/kg/天至17.0 μ g/kg/天;14.0 μ g/kg/天至16.0 μ g/kg/天;或约15.0 μ g/kg/天的量施用)。

[0245] 对于口服剂的施用,组合物可以呈含有1.0毫克至1000毫克的活性成分,尤其是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和1000.0毫克的活性成分的片剂、胶囊等形式来提供。

[0246] 在某些实施方案中,公开的PEG-IL-10和/或IL-12剂的剂量包含在“单位剂型”中。短语“单位剂型”是指物理上离散的单元,每个单元含有足以产生所需作用的单独或与一种或多种另外药剂组合的预定量的本公开的PEG-IL-10和/或IL-12剂。应该理解,单位剂型的

参数将取决于特定的药剂和待实现的作用。

[0247] 试剂盒

[0248] 本公开还预期包含PEG-IL-10和/或IL-12剂及其药物组合物的试剂盒。试剂盒通常呈容纳各种组分的物理结构的形式,如下所述,并且可以用于例如实施上述方法。试剂盒的一种或多种组分可以在无菌容器(例如,无菌小瓶)中。

[0249] 试剂盒可以包括本文公开的PEG-IL-10和/或IL-12剂,其可以呈适合施用到受试者的药物组合物的形式。PEG-IL-10和/或IL-12剂可以以即用形式或以需要例如在施用前复水或稀释的形式提供。当PEG-IL-10和/或IL-12试剂呈需要由使用者复水的形式时,试剂盒还可以包括与PEG-IL-10和/或IL-12剂包装在一起或分开包装的缓冲剂、药学上可接受的赋形剂等等。试剂盒还可以含有如本文所述的PEG-IL-10和IL-12剂两者;试剂盒可以单独地含有若干试剂,或者它们可以已经组合在试剂盒中。类似地,当预期补充疗法(例如,PEG-IL-10、IL-12剂和补充剂)时,试剂盒可以含有单独的若干药剂,或者它们中的两种或更多种可以已经组合在试剂盒中。本公开的试剂盒可以对于适当地维持容纳在其中的组分所需的条件(例如,冷藏或冷冻)所需的条件设计。

[0250] 试剂盒可以含有标签或包装插页,该标签或包装插页包括其中的组分的鉴定信息和使用说明书(例如,给药参数、一种或多种活性成分的临床药理学,包括一种或多种作用机制、药代动力学和药效学、不利作用、禁忌症等)。试剂盒的每种组分都可以封装在一个单独的容器中,并且所有的各种容器都可以在单一包装内。标签或插页可以包括制造商信息,诸如批号和到期日期。标签或包装插页可以例如整合到容纳组分的物理结构中,单独地包含在物理结构内,或者固定到试剂盒的组件(例如,安瓿、注射器或小瓶)。

[0251] 标签或插页可以另外地包括或合并到诸如以下的计算机可读介质中:磁盘(例如,硬盘、卡、存储盘);光盘,诸如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD;MP3;磁带;或电存储介质,诸如RAM和ROM;或者这些的混合,诸如磁/光存储介质、FLASH介质或存储型卡。在一些实施方案中,实际说明书不存在于试剂盒中,但提供用于自远程来源,例如经由因特网获得说明书的方式。

[0252] 实验

[0253] 提出以下实施例以便向本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完整公开和描述,并且并非意图限制本发明人看待其发明的范围,也非意图表示执行以下实验并且不是可以执行的所有实验。应该理解,用现在时写出的示例性描述未必已被执行,而是可以执行描述以产生其中描述的数据等等。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确性,但也应考虑一些实验误差和偏差。

[0254] 除非另外指出,否则份为重量份,分子量为重均分子量,温度以摄氏度(°C)计,并且压力是在大气压下或接近大气压。使用标准缩写,包括以下:s或sec=秒;min=分钟;h或hr=小时;aa=氨基酸;bp=碱基对;kb=千碱基;nt=核苷酸;ng=纳克;μg=微克;mg=毫克;g=克;kg=千克;dL或dL=分升;μL或μL=微升;mL或mL=毫升;l或L=升;nM=纳摩尔;μM=微摩尔;mM=毫摩尔;M=摩尔;kDa=千道尔顿;i.m.=肌肉内;i.p.=腹膜内;SC或SQ=皮下;HPLC=高效液相色谱;BW=体重;U=单位;ns=统计学不显著;PMA=佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯;PBS=磷酸盐缓冲盐水;HSA=人血清白蛋白;DMEM=达尔伯克改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modification of Eagle's Medium);PBMC=初级外周血单核细胞;FBS=胎牛血清;FCS=胎牛血清;HEPES=4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸;LPS=脂多糖;

ATCC=美国典型培养物保藏中心。

[0255] 材料和方法。

[0256] 使用以下通用材料和方法,在指出的情况下,或可以用于下面的实施例中:

[0257] 分子生物学程序。在科学文献中描述了分子生物学中的标准方法(参见,例如 Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;和Ausubel等,(2001) Current Protocols in Molecular Biology,第1至4卷,John Wiley and Sons,Inc.New York,NY,其描述了在细菌细胞中的克隆和DNA诱变(第1卷)、在哺乳动物细胞和酵母中的克隆(第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达(第3卷)和生物信息学(第4卷))。

[0258] 抗体相关过程。描述了多克隆和单克隆抗体的产生、纯化和片段化(例如,Harlow和Lane (1999) Using Antibodies,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY);可以得到用于表征配体/受体相互作用的标准技术(参见,例如Coligan等,(2001) Current Protocols in Immunology,第4卷,John Wiley,Inc.,NY);可以得到包括荧光活化的细胞分选(FACS)的用于流式细胞术的方法(参见,例如Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry,John Wiley and Sons,Hoboken,NJ);并且可以得到适合用于修饰包括核酸引物和探针的核酸、多肽和抗体以便用作诊断试剂的荧光试剂(Molecular Probes (2003) Catalogue,Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR.;Sigma-Aldrich (2003) Catalogue,St.Louis,MO.)。抗体的进一步讨论在本文中的其他地方呈现。

[0259] 软件。可以得到用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库(参见,例如GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc.,San Diego,CA);和DeCypher™(TimeLogic Corp.,Crystal Bay,NV))。

[0260] 聚乙二醇化。如本文所述的聚乙二醇化IL-10可以通过技术人员已知的任何手段合成。已经描述了用于产生单-PEG-IL-10和单-/二-PEG-IL-10混合物的示例性合成方案(参见,例如美国专利号7,052,686;美国专利号2011/0250163;WO 2010/077853)。本公开的特定实施方案包含选择性聚乙二醇化的单-PEG-IL-10和二-PEG-IL-10的混合物。除了利用自己的技术来产生和使用适用于实施本公开的PEG(及其他药物递送技术)之外,技术人员熟悉PEG相关技术的许多商业供应商(例如,NO America Corp(Irvine,CA)和Parchem(New Rochelle,NY))。

[0261] 小鼠。可以结合本公开的教导使用各种小鼠和其他动物品系。例如,免疫活性的Balb/C或B细胞缺陷的Balb/C小鼠可以从The Jackson Lab.,Bar Harbor,ME获得,并根据标准程序使用(参见,例如Martin等,(2001) Infect.Immun.,69(11):7067-73;和Compton等,(2004) Comp.Med.54(6):681-89)。适用于本公开预期的实验工作的其他小鼠品系对于技术人员是已知的,并且通常可从The Jackson Lab或另一供应商得到。

[0262] IL-10浓度。血清IL-10浓度水平和暴露水平可以通过本领域中使用的标准方法来确定。例如,血清暴露水平测定可以通过以下方式执行:将来自小鼠尾部剪切(tail snip)的全血(约50μL/小鼠)收集到普通毛细管中,通过离心分离血清和血细胞,并通过标准ELISA试剂盒和技术确定IL-10暴露水平。

[0263] 以下描述的测定是代表性的,而不是排他性的。

[0264] 体外细胞因子分泌测定。当用PEG-IL-10,然后用抗CD3抗体处理时,活化的原代人

CD8⁺ T-细胞分泌IFN- γ 。以下方案提供检查细胞因子分泌的示例性测定。

[0265] 人PBMC可以根据任何标准方案分离(参见,例如Fuss等,(2009) *Current Protocols in Immunology*, 7.1单元, John Wiley, Inc., NY)。可以根据制造商的方案(Miltenyi Biotec; Auburn, CA)使用Miltenyi Biotec的MACS细胞分离技术分离CD8⁺ T-细胞。对于活化期间的测定,分离的CD8⁺ T-细胞(2×10^6 个细胞/mL,标准96孔板每孔 5×10^5 个细胞)可以用板结合的抗CD3和抗CD28(板用10 μ g/mL抗CD3和2 μ g/mL抗CD28预涂覆; Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)和适当浓度的IL-12或PEG-IL-10在AIM V培养基(Life Technologies; Carlsbad, CA)中活化3天。然后可以收集培养基并根据制造商的方案(Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)使用市售的ELISA试剂盒测定IFN- γ 。对于静息期间的测定,分离的CD8⁺ T-细胞(3×10^6 个细胞/mL,标准24孔板每孔 3×10^6 个细胞)可以用板结合的抗CD3和抗CD28(板用10 μ g/mL抗CD3和2 μ g/mL抗CD28预涂覆; Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)活化3天。活化之后,然后可以收集细胞,重新铺板(2×10^6 个细胞/mL,标准96孔板每孔 5×10^5 个细胞),并用适当浓度的IL-12或PEG-hIL-10在AIM V培养基中处理3天。处理之后,可以收集细胞,重新铺板(2×10^6 个细胞/mL,标准96孔板每孔 5×10^5 个细胞),并用1 μ g/mL可溶性抗CD3在AIM V培养基中处理4小时。然后可以收集培养基并根据制造商的方案使用市售的ELISA试剂盒测定IFN- γ (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)、颗粒酶B和穿孔素(Mabtech; Cincinnati, OH)。

[0266] TNF α 抑制测定。PMA刺激U937细胞(得自Sigma-Aldrich的来自肺的淋巴母细胞人细胞系(#85011440); St. Louis, MO)促使细胞分泌TNF α ,随后用人IL-10处理这些分泌TNF α 的细胞促使TNF α 分泌以剂量依赖性方式减少。示例性TNF α 抑制测定可以使用以下方案执行。

[0267] 在含有10%FBS/FCS和抗生素的RMPI中培养U937细胞之后,在每种条件下一式三份地在96孔平底板(可以使用任何等离子体处理的组织培养板(例如, Nunc; Thermo Scientific, USA)中铺板 1×10^5 个90%活的U937细胞。铺板细胞以提供以下条件(全部至少一式三份;对于“仅培养基”,孔的数量翻倍,因为在用10nM PMA温育之后一半将用于活力):单独的5ng/mL LPS; 5ng/mL LPS+0.1ng/mL rhIL-10; 5ng/mL LPS+1ng/mL rhIL-10; 5ng/mL LPS+10ng/mL rhIL-10; 5ng/mL LPS+100ng/mL rhIL-10; 5ng/mL LPS+1000ng/mL rhIL-10; 5ng/mL LPS+0.1ng/mL PEG-rhIL-10; 5ng/mL LPS+1ng/mL PEG-rhIL-10; 5ng/mL LPS+10ng/mL PEG-rhIL-10; 5ng/mL LPS+100ng/mL PEG-rhIL-10; 和5ng/mL LPS+1000ng/mL PEG-rhIL-10。每孔暴露于200 μ L的10nM PMA中24小时,在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂温育箱中培养,此后将粘附约90%的细胞。可以使三个额外的孔重新悬浮,且对细胞计数以评估活力(大于90%应该是活的)。用新鲜的无PMA的培养基轻轻地彻底洗涤3次,确保细胞仍在孔中。每孔加入100 μ L含有适当浓度(2X,如体积将被稀释100%)的rhIL-10或PEG-rhIL-10的培养基,在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂温育箱中培养30分钟。每孔加入100 μ L的10ng/mL储备LPS以达到每孔中5ng/mL LPS的最终浓度,并在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂温育箱中温育18至24小时。根据制造商的说明书除去上清液并执行TNF α ELISA。在ELISA中一式两份地运行每种调理上清液。

[0268] MC/9细胞增殖测定。向MC/9细胞(可得自Cell Signaling Technology; Danvers, MA的具有肥大细胞特征的鼠细胞系)施用IL-10促使细胞增殖以剂量依赖性方式增加。Thompson-Snipes, L. 等, (1991) *J. Exp. Med.* 173:507-10) 描述了其中MC/9细胞补充有IL3+

IL-10和IL-3+IL-4+IL-10的标准测定方案。供应商(例如,R&D Systems,USA;和Cell Signaling Technology,Danvers,MA)使用该测定作为rhIL-10的批量释放测定。本领域普通技术人员将能够修改Thompson-Snipes,L.等描述的标准测定方案,使得细胞仅用IL-10补充。

[0269] 肿瘤模型和肿瘤分析。任何本领域接受的肿瘤模型、测定等等都可以用于评价本文所述的IL-10分子对各种肿瘤的作用。以下描述的肿瘤模型和肿瘤分析是可以利用的那些的代表。每次肿瘤接种,以 10^4 、 10^5 或 10^6 个细胞皮下或皮内注射同基因小鼠肿瘤细胞。可以使用Ep2乳腺癌、CT26结肠癌、皮肤PDV6鳞状癌和4T1乳腺癌模型(参见,例如Langowski等,(2006) Nature 442:461-465)。可以使用免疫活性Balb/C或B细胞缺陷型Balb/C小鼠。可以将PEG10-mIL-10施用于免疫活性小鼠,而PEG-hIL-10治疗可以在B细胞缺陷型小鼠中。在开始治疗之前,允许肿瘤达到 $100-250\text{mm}^3$ 的大小。在远离肿瘤植入的部位SC施用IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10或缓冲液对照。通常使用电子卡尺每周两次监测肿瘤生长。在各个终点收获肿瘤组织和淋巴器官以测量许多炎性标志物的mRNA表达并对若干炎性细胞标志物执行免疫组织化学。将组织在液氮中快速冷冻并在 -80°C 下储存。通常使用电子卡尺每周两次监测原发性肿瘤生长。肿瘤体积可以使用式(宽度²×长度/2)计算,其中长度是较长的尺寸。在开始治疗之前,允许肿瘤达到 $90-250\text{mm}^3$ 的大小。

[0270] 实施例1

[0271] PEG-IL-10与IL-12组合的抗肿瘤作用

[0272] 该实施例证实了PEG-IL-10和IL-12对鼠4T1肿瘤模型中肿瘤大小的组合作用。

[0273] 简言之,将体积为 $100\mu\text{l}$ 的 1×10^4 个4T1细胞(CRL-2539;ATCC,Manassas,VA)皮下植入4-6周龄雌性BALB/c小鼠(Jackson Laboratory,Bar Harbor,ME)的右下腹侧。一旦可以触及,则每周测量肿瘤生长两次-肿瘤体积可以使用公式(宽度²×长度/2)计算,其中长度是较长的尺寸。当肿瘤体积达到平均 75mm^3 时,将动物分组。

[0274] 对每个群组中的八只小鼠每日皮下施用媒介物和/或 1mg/kg PEG-rMuIL-10(ARMO Biosciences,Redwood City,Ca),和/或 0.05mg/kg 、 0.1mg/kg 或 0.5mg/kg rMuIL-12(R&D Systems,Minneapolis,MN),历时21或28天。每只小鼠接受两次单独的注射(例如,IL-10和媒介物,或IL-10和IL-12,或媒介物和媒介物)。给药21天后,处死每组4只小鼠进行组织和肿瘤分析。给药28天后,将各组剩余的小鼠处死用于组织和肿瘤分析。

[0275] 21天后评估肿瘤重量,并且数据呈现于图2中。X轴上指示rMuIL-12的施用量;如上所述,在施用PEG-rMuIL-10时,剂量为 1mg/kg 。如图2所指示,与单独施用任一种药剂相比,PEG-rMuIL-10和rMuIL-12的每种组合的施用引起肿瘤重量的更大程度降低。该作用在较高剂量的rMuIL-12(即, 0.5mg/kg 和 0.1mg/kg ;*= $P<0.05$)下更显著。图2中的条表示各个小鼠数据的平均值。28天后评估的小鼠表现出相同的总趋势(数据未示出)。

[0276] 实施例2

[0277] PEG-IL-10与IL-12组合对血清细胞因子水平的影响

[0278] 该实施例证实了PEG-IL-10和IL-12对荷瘤小鼠中血清IFN γ 和TNF α 水平的组合作用。如本文所述,分别暴露于IL-10和IL-12中的每一种,且特别是IL-12,引起血清细胞因子IFN γ 和TNF α 的诱导。IFN γ 和TNF α 血清水平增加(尽管主要是IFN γ)与IL-12的全身毒性相关。

[0279] 简而言之,在给药9天后在剂量施用4小时后评估在实施例1中描述的小鼠(即,每天皮下施用媒介物,1mg/kg PEG-rMuIL-10和/或0.05mg/kg、0.1mg/kg或0.5mg/kg rMuIL-12)中IFN γ 和TNF α 水平。使用Meso Scale Discovery的V-PLEX Proinflammatory Panel1 (小鼠)试剂盒(Rockville,Maryland)根据制造商的说明书执行检测血浆细胞因子水平。结果提供在图3A和图3B中。在图3A和图3B中的每一个中的X轴上指示rMuIL-12的施用量;如上所述,在施用PEG-rMuIL-10时,剂量为1mg/kg。

[0280] 如图3A所指示,PEG-rMuIL-10与三种rMuIL-12剂量中的每一种共同施用引起在单独施用这三种rMuIL-12剂量中的每一种后观察到的血清IFN γ 水平降低。此外,当与1mg/kg PEG-rMuIL-10共同施用0.5mg/kg rMuIL-12时,与单独施用0.5mg/kg rMuIL-12相比,血清IFN γ 水平在统计学上显著降低(***=P<0.001)。这些数据代表了当在与IL-12共同施用PEG-IL-10的作用在于由组合疗法产生的增强的抗肿瘤应答(参见图2)没有受损,而与IL-12相关的推定的毒性“指数”降低。

[0281] 如图3B所指示,PEG-rMuIL-10与这三种rMuIL-12剂量中的每一种共同施用引起在单独施用这三种rMuIL-12剂量中的每一种后观察到的血清TNF α 水平降低。此外,当与1mg/kg PEG-rMuIL-10共同施用0.5mg/kg rMuIL-12时,与单独施用0.5mg/kg rMuIL-12相比,血清TNF α 水平在统计学上显著降低(***=P<0.001)。这些数据代表了当在与IL-12共同施用PEG-IL-10的作用在于由组合疗法产生的增强的抗肿瘤应答(参见图2)没有受损,而与IL-12相关的推定的毒性“指数”降低。

[0282] 本文中描述了本发明的特定实施方案,包括为发明者所知用以实施本发明的最佳模式。在阅读前述描述之后,所公开的实施方案的变化对于本领域的个体可能是显而易见的,并且预期那些技术人员可以适当地采用这样的变化。因此,本发明旨在以不同于本文具体描述的方式来实施,并且本发明包括适用法律允许的所附权利要求书中所述的主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾,否则在所有可能变型中的上述元素的任何组合都涵盖在本发明内。

[0283] 在本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号及其他文献都通过引用并入到本文中,如同特别地且单独地指出每一个单个的出版物或专利申请都通过引用并入到本文中。

序列表

<110> J·B·穆姆

I·H·陈

<120> 使用白介素-10治疗疾病和病症的方法

<130> ARM0-022W0

<150> US 62/275,127

<151> 2016-01-05

<160> 24

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 306

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ile	Trp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asp	Val	Tyr	Val	Val	Glu	Leu	Asp	Trp	Tyr
1				5					10					15	
Pro	Asp	Ala	Pro	Gly	Glu	Met	Val	Val	Leu	Thr	Cys	Asp	Thr	Pro	Glu
				20				25					30		
Glu	Asp	Gly	Ile	Thr	Trp	Thr	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Glu	Val	Leu	Gly
			35				40					45			
Ser	Gly	Lys	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Phe	Gly	Asp	Ala	Gly
		50				55				60					
Gln	Tyr	Thr	Cys	His	Lys	Gly	Gly	Glu	Val	Leu	Ser	His	Ser	Leu	Leu
65				70					75					80	
Leu	Leu	His	Lys	Lys	Glu	Asp	Gly	Ile	Trp	Ser	Thr	Asp	Ile	Leu	Lys
				85				90					95		
Asp	Gln	Lys	Glu	Pro	Lys	Asn	Lys	Thr	Phe	Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Lys
			100					105					110		
Asn	Tyr	Ser	Gly	Arg	Phe	Thr	Cys	Trp	Trp	Leu	Thr	Thr	Ile	Ser	Thr
			115				120						125		
Asp	Leu	Thr	Phe	Ser	Val	Lys	Ser	Ser	Arg	Gly	Ser	Ser	Asp	Pro	Gln
			130			135					140				
Gly	Val	Thr	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Arg	Val	Arg	Gly
145				150					155					160	
Asp	Asn	Lys	Glu	Tyr	Glu	Tyr	Ser	Val	Glu	Cys	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala
				165					170				175		
Cys	Pro	Ala	Ala	Glu	Glu	Ser	Leu	Pro	Ile	Glu	Val	Met	Val	Asp	Ala
			180					185					190		

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg		
195	200	205
Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu		
210	215	220
Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp		
225	230	235 240
Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln		
245	250	255
Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr		
260	265	270
Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala		
275	280	285
Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro		
290	295	300
Cys Ser		
305		
<210> 2		
<211> 197		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 2		
Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu		
1	5	10 15
His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys		
20	25	30
Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp		
35	40	45
His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu		
50	55	60
Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr		
65	70	75 80
Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe		
85	90	95
Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr		
100	105	110
Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys		
115	120	125
Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu		
130	135	140

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Lys	Ala	Leu	Ala	Trp	Glu	Ala	Lys	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala
1				5				10						15	
Leu	Ala	Lys	His	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Ala	Lys	Ala	Leu	Lys	Cys	Glu
			20					25						30	

Ala

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys
1				5				10						15	

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Arg
1				5				

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Arg	Lys	Lys	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg
1				5			

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 11

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 12

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该段残基可以重复多达50次。

<400> 13

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 14

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (1)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 这段残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<400> 14
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 该段残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<400> 15
Gly Ser Gly Gly Ser
1 5
<210> 16
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (4)
<223> 该段残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> 该残基可以重复多达20次。
<400> 16
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (4)
<223> 该段残基可以重复多达20次。
<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 该残基可以重复多达20次。

<400> 17

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 18

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Gly Gly Ser Gly Gly

1

5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Gly

1

5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 21

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 22

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (4)

<223> 该段残基可以重复多达50次。

<400> 23

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该段残基可以重复多达50次。

<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

人IL-12, 链A(登录号IF45_A)-306个氨基酸残基

```

1  iwekkdvyy veldwypdap gemvvltdt peedgitwtl dqssevlsg ktlitqvkef
61  gdaggytchk ggevlshsl lhhkkedgiw stdilkdqke pknktflrce aknyagrftc
121 wwlrtistdi tfsvkssrgs sdpggvtcga atlsaervrg dnkeyeysve cqedasacpaa
181 eeslpievmy dvhkklkyen ytssaffirdi ikpdppknlq lkplknsrqv evsweypdtw
241 stphsyfslt fcvqvggksk rekkdrvftd ktsatvicrk nasivragd ryyssswsew
301 asvpos

```

人IL-12, 链B(登录号IF45_B)-197个氨基酸残基

```

1  rnlpvatpdp gmfpcilhshq nilravsnml qkarqtiefy pctseeidhe ditkdktstv
61  easclpleltk nesclnaret sfitngscia srktsfmmal clsaiedlk myqvefktmn
121 skllmdpkrg ifldqnmlyv idelmqainf nsetvpqkss leepdfyktk iklcillhaf
181 riravtidrv msylnas

```

图1

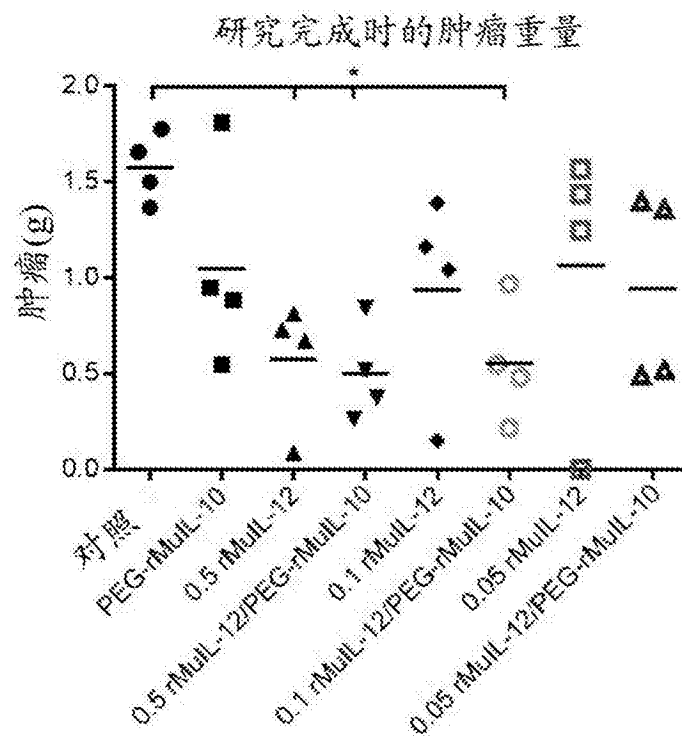


图2

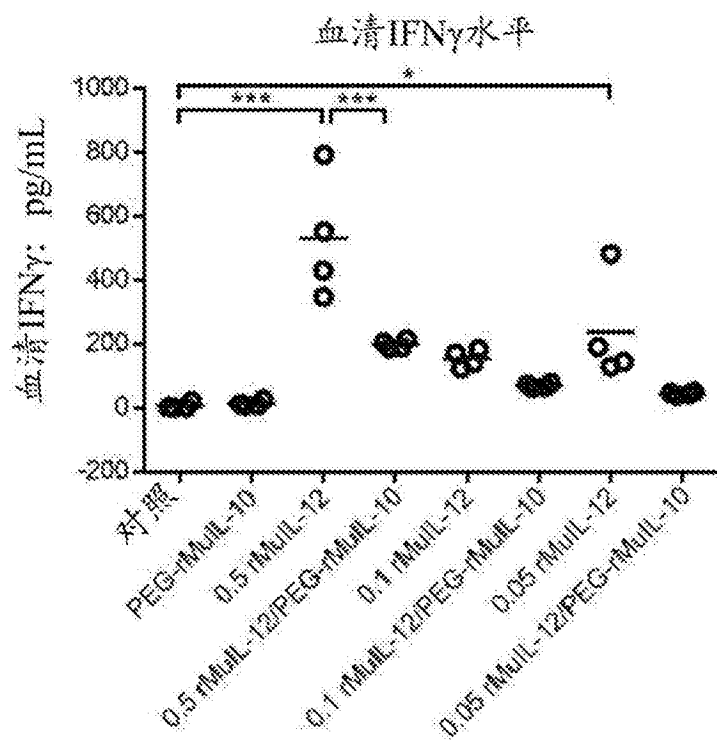


图3A

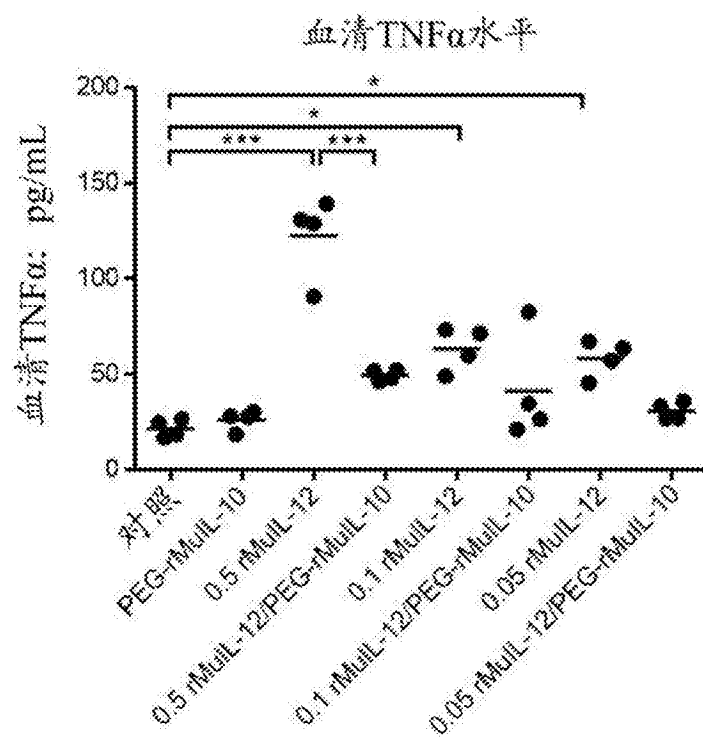


图3B