(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7636323号
(P7636323)

(45)発行日　令和7年2月26日(2025.2.26)

(24)登録日　令和7年2月17日(2025.2.17)

(51)国際特許分類

C07K 14/54 (2006.01)	C07K	14/54		ZNA
C12N 15/63 (2006.01)	C12N	15/63	Z	
A61K 38/20 (2006.01)	A61K	38/20		
A61K 47/64 (2017.01)	A61K	47/64		
A61K 47/60 (2017.01)	A61K	47/60		

FI

請求項の数　21　（全95頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-523935(P2021-523935)
(86)(22)出願日　令和1年11月7日(2019.11.7)
(65)公表番号　特表2022-506531(P2022-506531A)
(43)公表日　令和4年1月17日(2022.1.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/060261
(87)国際公開番号　WO2020/097325
(87)国際公開日　令和2年5月14日(2020.5.14)
審査請求日　令和4年11月4日(2022.11.4)
(31)優先権主張番号　62/757,690
(32)優先日　平成30年11月8日(2018.11.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　62/911,036
(32)優先日　令和1年10月4日(2019.10.4)
最終頁に続く

(73)特許権者　519050543
シンソークス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９２０３７， ラ ホヤ， ノース トリー パインズ ロード １１０９９， スイート ２９０
(74)代理人　100127926
弁理士　結田 純次
(74)代理人　100216105
弁理士　守安 智
(72)発明者　カロリーナ・イー・カッファーロ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７．ラ・ホーヤ．ノース・トーリー・パインズ・ロード１１０９９．スイート１９０
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　インターロイキン１０コンジュゲートおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

少なくとも１つのコンジュゲート化部分に共有結合した少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む修飾されたインターロイキン１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドであって、

該ＩＬ－１０ポリペプチドは配列番号１のアミノ酸３３～１５８と９９％同一であるアミノ酸配列を含み、

該少なくとも１つの非天然アミノ酸はリジン誘導体を含むアジドであり、該少なくとも１つの非天然アミノ酸は配列番号１のＮ８２、Ｋ９９、Ｋ１２５、Ｎ１２９、およびＫ１３０から選択されるアミノ酸位置に位置し、

該コンジュゲート化部分は水溶性ポリマーを含む、前記修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。

【請求項２】

アミノ酸配列は配列番号１のアミノ酸１～１６０と少なくとも９５％同一である、請求項１に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。

【請求項３】

アミノ酸配列は配列番号１のアミノ酸１～１６０と少なくとも９７％同一である、請求項１に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。

【請求項４】

アミノ酸配列は配列番号１のアミノ酸１～１６０と少なくとも９８％同一である、請求項１に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。

【請求項５】
アミノ酸配列は１３個のリジンアミノ酸残基を含む、請求項１に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項６】
前記ＩＬ－１０ポリペプチドは、アミノ酸位置が前記少なくとも１つの非天然アミノ酸に修飾されている配列番号１のアミノ酸配列を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項７】
少なくとも１つの非天然アミノ酸はＮ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む、請求項１～６のいずれか１項に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項８】
前記水溶性ポリマーはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項９】
前記ＰＥＧは約１０キロダルトン～約８５キロダルトンの分子量を有する、請求項８に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項１０】
前記ＰＥＧは約２０キロダルトンの分子量を有する、請求項９に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項１１】
修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは単離および精製される、請求項１～１０のいずれか１項に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド。
【請求項１２】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、および薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項１３】
医薬組成物が全身送達用に製剤化される、請求項１２に記載の医薬組成物。
【請求項１４】
請求項１～１１のいずれか１項に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドのうちの２つを含む、修飾されたＩＬ－１０ホモ二量体。
【請求項１５】
ＩＬ－１０受容体（ＩＬ－１０Ｒ）に結合した請求項１４に記載の修飾されたＩＬ－１０ホモ二量体の複合体を含む、組成物。
【請求項１６】
それを必要とする対象における増殖性疾患または状態を治療において使用するための、請求項１２または１３に記載の医薬組成物。
【請求項１７】
増殖性疾患または状態はがんである、請求項１６に記載の医薬組成物。
【請求項１８】
がんは固形腫瘍がんである、請求項１７に記載の医薬組成物。
【請求項１９】
固形腫瘍がんは、膀胱がん、骨がん、脳がん、乳がん、大腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんである、請求項１８に記載の医薬組成物。
【請求項２０】
少なくとも１つの非天然アミノ酸を含むアミノ酸配列を含むＩＬ－１０ポリペプチドをコードする核酸分子であって、
該アミノ酸配列は配列番号１のアミノ酸３３～１５８と９９％同一であり、該少なくとも１つの非天然アミノ酸はリジン誘導体を含むアジドであるポリペプチドであり、

該少なくとも１つの非天然アミノ酸は配列番号１のＮ８２、Ｋ９９、Ｋ１２５、Ｎ１２９、およびＫ１３０から選択されるアミノ酸位置に位置する、前記核酸分子。
【請求項２１】
請求項２０に記載の核酸分子を含むベクター。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
本出願は、２０１８年１１月８日に出願された米国仮特許出願第６２／７５７，６９０号、および２０１９年１０月４日に出願された米国仮特許出願第６２／９１１，０３６号の利益を主張し、これらはともにそれらの全体が参照によって本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出され、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０１９年１１月４日に作製された上記ＡＳＣＩＩコピーは、４６０８５－７２７＿８５１＿ＳＬ．ｔｘｔという名称であり、サイズは４，１５７バイトである。
【背景技術】
【０００３】
Ｔ細胞の別々の集団が、免疫ホメオスタシスおよび免疫寛容を維持するために免疫系を調節する。例えば、制御性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞は、病的自己反応性を防ぐことによって免疫系による不適切な応答を防ぎ、一方、細胞傷害性Ｔ細胞は、感染細胞および／またはがん細胞を標的とし、破壊する。いくつかの例では、Ｔ細胞の異なる集団の調節は、疾患または症状の治療のための選択肢を提供する。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００４】
本明細書には、特定の実施形態では、インターロイキン１０（ＩＬ－１０）コンジュゲート、および１つまたはそれ以上の適応症の治療におけるそれらの使用が開示される。一部の実施形態では、本明細書には、がんを治療するためのＩＬ－１０コンジュゲートが開示される。追加の場合において、本明細書には、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートを含む医薬組成物およびキットが開示される。
【０００５】
本明細書には、一部の実施形態では、少なくとも１つのコンジュゲート化部分に結合した少なくとも１つの非天然アミノ酸を含むアミノ酸配列を含む修飾されたインターロイキン１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドが開示され、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸３３～１５８と９９．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸１～１６０と少なくとも９５．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸１～１６０と少なくとも９７．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸１～１６０と少なくとも９８．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、１３個のリジンアミノ酸残基を含む。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、配列番号１内のＥ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択されるアミノ酸位置に位置される。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、またはＮ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、および８２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０、および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５

、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０、および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０、および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は：ａ）リジン類似体であり；ｂ）芳香族側鎖を含み；ｃ）アジド基を含み；ｄ）アルキン基を含み；またはｅ）アルデヒドもしくはケトン基を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、芳香族側鎖を含まない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－Ｄｏｐａ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対によって、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドに取り込まれる。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対の直交性ｔＲＮＡは、少なくとも１つの非天然核酸塩基を含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化し、それによって２つの非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０二量体を生成する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸は、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸とは異なる残基位置に位置される。一部の実施形態では、両方の非天然アミノ酸は、それぞれのＩＬ－１０ポリペプチド中の同じ残基位置に位置される。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、少なくとも１つのコンジュゲート化部分は、水溶性ポリマー、脂質、タンパク質、またはペプチドを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）分子を含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒド

ロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーはＰＥＧ分子を含む。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は直鎖状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は分枝状ＰＥＧである。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは多糖を含む。一部の実施形態では、多糖は、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパラン硫酸（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。一部の実施形態では、脂質は脂肪酸を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は、約６～約２６個の炭素原子、約６～約２４個の炭素原子、約６～約２２個の炭素原子、約６～約２０個の炭素原子、約６～約１８個の炭素原子、約２０～約２６個の炭素原子、約１２～約２６個の炭素原子、約１２～約２４個の炭素原子、約１２～約２２個の炭素原子、約１２～約２０個の炭素原子、または約１２～約１８個の炭素原子を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は飽和脂肪酸である。一部の実施形態では、タンパク質は、アルブミン、トランスフェリンまたはトランスチレチンを含む。一部の実施形態では、タンパク質は、抗体またはその結合断片を含む。一部の実施形態では、抗体またはその結合断片は、抗体のＦｃ部分を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、ＸＴＥＮペプチド、グリジンに富むホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、リンカーを介して、修飾されたＩＬ－１０の少なくとも１つの非天然アミノ酸に間接的に結合している。一部の実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカー、ゼロ長リンカー、切断可能もしくは切断不可能なジペプチドリンカー、マレイミド基、スペーサー、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは：ａ）全長ＩＬ－１０ポリペプチドの機能的に活性な断片；ｂ）組換えＩＬ－１０ポリペプチド；またはｃ）組換えヒトＩＬ－１０ポリペプチドである。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｎ末端欠失、Ｃ末端欠失、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Ｎ末端欠失は、Ｎ末端からの最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、または３０残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、Ｃ末端欠失は、Ｃ末端からの最後の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０個、またはそれ以上の残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号１と約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体は、ＩＬ－１０Ｒに結合して、ＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体を形成する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、約９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、または３０日である。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０ポリペプチドの二量体化を実質的に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０二量体のＩＬ－１０Ｒへの結合を有意に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％未満損なう。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、細胞がＳｔａｔ３をリン酸化し、および／またはＩＬ－１０Ｒシグナル伝達を活性化する能力によって定義されるＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を

有意に損なわない。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、単離および精製される。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、薬学的に許容される賦形剤を含む医薬製剤として製剤化される。一部の実施形態では、医薬製剤は、全身送達用に製剤化される。

【０００６】

本明細書には、一部の実施形態では、請求項１に記載の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドのうちの２つを含む修飾されたＩＬ－１０ホモ二量体が開示される。

【０００７】

本明細書には、一部の実施形態では、ＩＬ－１０受容体（ＩＬ－１０Ｒ）に結合した本開示の修飾されたホモ二量体の複合体を含む組成物が開示される。

【０００８】

本明細書には、一部の実施形態では、本開示の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの治療的に有効な量を対象に投与することを含む、それを必要とする対象における増殖性疾患または状態を治療する方法が開示される。一部の実施形態では、増殖性疾患または状態はがんである。一部の実施形態では、がんは固形腫瘍がんである。一部の実施形態では、固形腫瘍がんは、膀胱がん、骨がん、脳がん、乳がん、大腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんである。

【０００９】

本明細書には、一部の実施形態では、本開示の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドをコードする核酸分子が開示される。

【００１０】

本明細書には、一部の実施形態では、本開示の核酸分子を含むベクターが開示される。

【００１１】

本明細書には、特定の実施形態では、インターロイキン１０（ＩＬ－１０）受容体との相互作用を有意に変化させることなく、血漿半減期を増大させるポリペプチド上の位置に少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む、単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドが開示され、増大された血漿半減期は、野生型ＩＬ－１０タンパク質の血漿半減期と比較される。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥに位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥの表面露出位置に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９またはＮ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９および８２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸３３～１５８と少なくともまたは約９９．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、または１３個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８、およびＫ１５７のうちの１つまたはそれ以上における野生型リジ

ンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７のうちの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は：ａ）リジン類似体であり；ｂ）芳香族側鎖を含み；ｃ）アジド基を含み；ｄ）アルキン基を含み；またはｅ）アルデヒドもしくはケトン基を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、芳香族側鎖を含まない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－Ｄｏｐａ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対によって、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドに取り込まれる。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対の直交性ｔＲＮＡは、少なくとも１つの非天然核酸塩基を含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化し、それによって２つの非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０二量体を生成する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸は、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸とは異なる残基位置に位置される。一部の実施形態では、両方の非天然アミノ酸は、それぞれのＩＬ－１０ポリペプチド中の同じ残基位置に位置される。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してコンジュゲート化部分に共有結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、水溶性ポリマー、脂質、タンパク質またはペプチドを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポ

リホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーはＰＥＧ分子を含む。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は直鎖状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は分枝状ＰＥＧである。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは多糖を含む。一部の実施形態では、多糖は、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパラン硫酸（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。一部の実施形態では、脂質は脂肪酸を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は、約６～約２６個の炭素原子、約６～約２４個の炭素原子、約６～約２２個の炭素原子、約６～約２０個の炭素原子、約６～約１８個の炭素原子、約２０～約２６個の炭素原子、約１２～約２６個の炭素原子、約１２～約２４個の炭素原子、約１２～約２２個の炭素原子、約１２～約２０個の炭素原子、または約１２～約１８個の炭素原子を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は飽和脂肪酸である。一部の実施形態では、タンパク質は、アルブミン、トランスフェリンまたはトランスチレチンを含む。一部の実施形態では、タンパク質は、抗体またはその結合断片を含む。一部の実施形態では、抗体またはその結合断片は、抗体のＦｃ部分を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、ＸＴＥＮペプチド、グリジンに富むホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、リンカーを介して、修飾されたＩＬ－１０の少なくとも１つの非天然アミノ酸に間接的に結合している。一部の実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカー、ゼロ長リンカー、切断可能もしくは切断不可能なジペプチドリンカー、マレイミド基、スペーサー、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは：ａ）全長ＩＬ－１０ポリペプチドの機能的に活性な断片；ｂ）組換えＩＬ－１０ポリペプチド；またはｃ）組換えヒトＩＬ－１０ポリペプチドである。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｎ末端欠失、Ｃ末端欠失、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Ｎ末端欠失は、Ｎ末端からの最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、または３０残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、Ｃ末端欠失は、Ｃ末端からの最後の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０個、またはそれ以上の残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号１と約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体は、ＩＬ－１０Ｒに結合して、ＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体を形成する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、約９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、または３０日である。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０ポリペプチドの二量体化を実質的に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０二量体のＩＬ－１０Ｒへの結合を有意に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％未満損なう。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、細胞がＳｔａｔ３をリン酸化し、および／またはＩＬ－１０Ｒシグナル伝達を活性化する能力によって定義されるＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を有意に損なわない。

【００１２】
本明細書には、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、８８、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２９位に対応する。

【００１３】
本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００１４】
本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、８８、１２９、１３０および１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３０および１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３０および１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－

リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００１５】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２、Ｎ１２９またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２、１２９、１３２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００１６】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２またはＮ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２および１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００１７】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８２位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００１８】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態において、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２９位に対応し、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００１９】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチ

ドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してコンジュゲート化部分に共有結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、水溶性ポリマー、脂質、タンパク質、またはペプチドを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。

【００２０】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してＰＥＧ分子に共有結合される。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は直鎖状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は分枝状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧの重量平均分子量は、約１００ダルトン～約１５０，０００ダルトンである。例示的な範囲としては、例えば、５，０００ダルトン超～約１００，０００ダルトンまでの範囲、約６，０００ダルトン～約９０，０００ダルトンの範囲、約１０，０００ダルトン～約８５，０００ダルトンの範囲、約１０，０００ダルトン超～約８５，０００ダルトンの範囲、約２０，０００ダルトン～約８５，０００ダルトンの範囲、約５３，０００ダルトン～約８５，０００ダルトンの範囲、約２５，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲、約２９，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲、約３５，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲、および約４０，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲の重量平均分子量が挙げられる。ＰＥＧの例示的な重量平均分子量には、約１００ダルトン、約２００ダルトン、約３００ダルトン、約４００ダルトン、約５００ダルトン、約６００ダルトン、約７００ダルトン、約７５０ダルトン、約８００ダルトン、約９００ダルトン、約１，０００ダルトン、約１，５００ダルトン、約２，０００ダルトン、約２，２００ダルトン、約２，５００ダルトン、約３，０００ダルトン、約４，０００ダルトン、約４，４００ダルトン、約４，５００ダルトン、約５，０００ダルトン、約５，５００ダルトン、約６，０００ダルトン、約７，０００ダルトン、約７，５００ダルトン、約８，０００ダルトン、約９，０００ダルトン、約１０，０００ダルトン、約１１，０００ダルトン、約１２，０００ダルトン、約１３，０００ダルトン、約１４，０００ダルトン、約１５，０００ダルトン、約２０，０００ダルトン、約２２，５００ダルトン、約２５，０００ダルトン、約３０，０００ダルトン、約３５，０００ダルトン、約４０，０００ダルトン、約４５，０００ダルトン、約５０，０００ダルトン、約５５，０００ダルトン、約６０，０００ダルトン、約６５，０００ダルトン、約７０，０００ダルトン、および約７５，０００ダルトンが挙げられる。前述のいずれかの総分子量を有する分岐状バージョンのＰＥＧ（例えば、２つの２０，０００ダルトンポリマーで構成される分岐状の４０，０００ダルトンＰＥＧ）もまた使用することができる。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約５，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約７，５００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約８，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約９，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１１，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１２，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１３，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１４，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１５，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１６，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１７，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１８，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１９，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約２０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子

量は約２１，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約２２，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約２３，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約２５，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約３０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約４０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約５０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約６０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約７０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約８０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約９０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１００，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１２０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１３０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１４０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１５０，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約１７５，０００ダルトンである。一部の実施形態では、ＰＥＧの分子量は約２００，０００ダルトンである。

【００２１】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、単糖または多糖に共有結合される。特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、単糖に共有結合される。特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、多糖に共有結合される。特定の実施形態では、単糖または多糖は、ポリペプチド中のシステインまたはアスパラギン残基を介してリンカーによりＩＬ－１０ポリペプチドに結合される。特定の実施形態では、単糖または多糖は、ポリペプチド中のシステイン残基を介してリンカーによりＩＬ－１０ポリペプチドに結合される。特定の実施形態では、単糖または多糖は、ポリペプチド中のアスパラギン残基を介してリンカーによりＩＬ－１０ポリペプチドに結合される。

【００２２】

本明細書に開示されるように、特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してＰＥＧ分子に共有結合され、ポリペプチド中の別のアミノ酸を介して単糖または多糖に共有結合される。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は直鎖状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は分枝状ＰＥＧである。特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してＰＥＧ分子に共有結合され、ポリペプチド中の別のアミノ酸を介して単糖に共有結合される。特定の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してＰＥＧ分子に共有結合され、ポリペプチド中の別のアミノ酸を介して多糖に共有結合される。特定の実施形態では、単糖または多糖は、ポリペプチド中のシステインまたはアスパラギン残基を介してリンカーによりＩＬ－１０ポリペプチドに結合される。特定の実施形態では、単糖または多糖は、ポリペプチド中のシステイン残基を介してリンカーによりＩＬ－１０ポリペプチドに結合される。特定の実施形態では、単糖または多糖は、ポリペプチド中のアスパラギン残基を介してリンカーによりＩＬ－１０ポリペプチドに結合される。

【００２３】

本明細書には、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む単離および修飾されたインターロイキン１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドが開示され、単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、ＩＬ－１０受容体（ＩＬ－１０Ｒ）に結合してＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体を形成する生物学的に活性なＩＬ－１０ポリペプチドである。一部の実施形態では、生物学的に活性なＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０タンパク質の血漿半減期と比較して、実質的に増大された血漿半減期を有する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥに位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥの表面露出位置に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６

７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９またはＮ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９および８２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸３３～１５８と少なくともまたは約９９．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、または１３個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８、およびＫ１５７のうちの１つまたはそれ以上における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７のうちの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は：ａ）リジン類似体であり；ｂ）芳香族側鎖を含み；ｃ）アジド基を含み；ｄ）アルキン基を含み；またはｅ）アルデヒドもしくはケトン基を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、芳香族側鎖を含まない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－Ｄｏｐａ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プ

ロパン酸、またはセレノシステインを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対によって、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドに取り込まれる。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対の直交性ｔＲＮＡは、少なくとも１つの非天然核酸塩基を含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化し、それによって２つの非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０二量体を生成する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸は、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸とは異なる残基位置に位置される。一部の実施形態では、両方の非天然アミノ酸は、それぞれのＩＬ－１０ポリペプチド中の同じ残基位置に位置される。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してコンジュゲート化部分に共有結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、水溶性ポリマー、脂質、タンパク質またはペプチドを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーはＰＥＧ分子を含む。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は直鎖状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は分枝状ＰＥＧである。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは多糖を含む。一部の実施形態では、多糖は、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパラン硫酸（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。一部の実施形態では、脂質は脂肪酸を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は、約６～約２６個の炭素原子、約６～約２４個の炭素原子、約６～約２２個の炭素原子、約６～約２０個の炭素原子、約６～約１８個の炭素原子、約２０～約２６個の炭素原子、約１２～約２６個の炭素原子、約１２～約２４個の炭素原子、約１２～約２２個の炭素原子、約１２～約２０個の炭素原子、または約１２～約１８個の炭素原子を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は飽和脂肪酸である。一部の実施形態では、タンパク質は、アルブミン、トランスフェリンまたはトランスチレチンを含む。一部の実施形態では、タンパク質は、抗体またはその結合断片を含む。一部の実施形態では、抗体またはその結合断片は、抗体のＦｃ部分を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、ＸＴＥＮペプチド、グリジンに富むホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、リンカーを介して、修飾されたＩＬ－１０の少なくとも１つの非天然アミノ酸に間接的に結合している。一部の実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカー、ゼロ長リンカー、切断可能もしくは切断不可能なジペプチドリンカー、マレイミド基、スペーサー、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは：ａ）全長ＩＬ－１０ポリペプチドの機能的に活性な断片；ｂ）組換えＩＬ－１０ポリペプチド；またはｃ）組換えヒトＩＬ－１０ポリペプチドである。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｎ末端欠失、Ｃ末端欠失、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Ｎ末端欠失は、Ｎ末端からの最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、または３０残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、Ｃ末端欠失は、Ｃ末端からの最後の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０個、またはそれ以上の残基の欠失を含み、残基位置は、配列番

号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号１と約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体は、ＩＬ－１０Ｒに結合して、ＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体を形成する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、約９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、または３０日である。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０ポリペプチドの二量体化を実質的に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０二量体のＩＬ－１０Ｒへの結合を有意に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％未満損なう。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を有意に損なわない。

【００２４】

本明細書には、特定の実施形態では、複数の腫瘍細胞の腫瘍浸潤性免疫細胞への曝露を増大するポリペプチド上の位置に少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む単離および修飾されたインターロイキン１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドが開示され、複数の腫瘍細胞の増大した曝露は、野生型ＩＬ－１０タンパク質の存在下での複数の腫瘍細胞の曝露と比較される。一部の実施形態では、本明細書には、腫瘍浸潤性免疫細胞の細胞傷害性および／またはクローン性増殖を増大および／または維持するポリペプチド上の位置に少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む単離および修飾されたインターロイキン１０（ＩＬ－１０）ポリペプチドもまた記載され、増大された細胞傷害性およびクローン性増殖は、同用量の野生型ＩＬ－１０タンパク質から生じる腫瘍浸潤性免疫細胞の曝露と比較される。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥに位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥの表面露出位置に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９またはＮ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９および８２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸３３～１５８と少なくともまたは約９９．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、または１３個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４

９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８、およびＫ１５７のうちの１つまたはそれ以上における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７のうちの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は：ａ）リジン類似体であり；ｂ）芳香族側鎖を含み；ｃ）アジド基を含み；ｄ）アルキン基を含み；またはｅ）アルデヒドもしくはケトン基を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、芳香族側鎖を含まない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、ＢＣＮ－Ｌ－リジン、ノルボルネンリジン、ＴＣＯ－リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、２－アミノ－８－オキソオクタン酸、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｍ－アセチルフェニルアラニン、２－アミノ－８－オキソノナン酸、ｐ－プロパルギルオキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｌ－Ｄｏｐａ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－アリルチロシン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、ホスホノチロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、２－アミノ－３－（（２－（（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸、またはセレノシステインを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対によって、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドに取り込まれる。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対の直交性ｔＲＮＡは、少なくとも１つの非天然核酸塩基を含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化し、それによって２つの非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０二量体を生成する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸は、第２の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの非天然アミノ酸とは異なる残基位置に位置される。一部の実施形態では、両方の非天然アミノ酸は、それぞれのＩＬ－１０ポリペプチド中の同じ残基位置に位置される。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を介してコンジュゲート化部分に共有結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、水溶性ポリマー、脂質、タンパク質またはペプチドを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポリ（プロピレングリコール）（ＰＰＧ）、エチレングリコールとプロピレングリコールのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリド

ン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（ＰＯＺ）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、水溶性ポリマーはＰＥＧ分子を含む。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は直鎖状ＰＥＧである。一部の実施形態では、ＰＥＧ分子は分枝状ＰＥＧである。一部の実施形態では、水溶性ポリマーは多糖を含む。一部の実施形態では、多糖は、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパラン硫酸（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）を含む。一部の実施形態では、脂質は脂肪酸を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は、約６～約２６個の炭素原子、約６～約２４個の炭素原子、約６～約２２個の炭素原子、約６～約２０個の炭素原子、約６～約１８個の炭素原子、約２０～約２６個の炭素原子、約１２～約２６個の炭素原子、約１２～約２４個の炭素原子、約１２～約２２個の炭素原子、約１２～約２０個の炭素原子、または約１２～約１８個の炭素原子を含む。一部の実施形態では、脂肪酸は飽和脂肪酸である。一部の実施形態では、タンパク質は、アルブミン、トランスフェリンまたはトランスチレチンを含む。一部の実施形態では、タンパク質は、抗体またはその結合断片を含む。一部の実施形態では、抗体またはその結合断片は、抗体のＦｃ部分を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、ＸＴＥＮペプチド、グリジンに富むホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、ＰＡＳポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）、ＣＴＰペプチド、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーを含む。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、リンカーを介して、修飾されたＩＬ－１０の少なくとも１つの非天然アミノ酸に間接的に結合している。一部の実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカー、ゼロ長リンカー、切断可能もしくは切断不可能なジペプチドリンカー、マレイミド基、スペーサー、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは：ａ）全長ＩＬ－１０ポリペプチドの機能的に活性な断片；ｂ）組換えＩＬ－１０ポリペプチド；またはｃ）組換えヒトＩＬ－１０ポリペプチドである。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｎ末端欠失、Ｃ末端欠失、またはそれらの組み合わせを含む。一部の実施形態では、Ｎ末端欠失は、Ｎ末端からの最初の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０、２５、または３０残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、Ｃ末端欠失は、Ｃ末端からの最後の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０個、またはそれ以上の残基の欠失を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号１と約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体は、ＩＬ－１０Ｒに結合して、ＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体を形成する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体の増大した血漿半減期は、約９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、または３０日である。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０ポリペプチドの二量体化を実質的に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０二量体のＩＬ－１０Ｒへの結合を有意に妨げない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％未満損なう。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグ

ナル伝達を有意に損なわない。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｓｔａｔ３のリン酸化によって、および／またはＩＬ－１０Ｒシグナル伝達の活性化によって測定した場合、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を損なわない。

【００２５】

本明細書には、特定の実施形態では、本明細書に記載される修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドをコードするポリ核酸ポリマーが開示される。

【００２６】

本明細書には、特定の実施形態では、本明細書に記載されるポリ核酸ポリマーを含むベクターが開示される。

【００２７】

本明細書には、特定の態様では、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含むインターロイキン１０（ＩＬ－１０）ポリペプチド、および少なくとも１つの非天然アミノ酸に結合したコンジュゲート化部分を含むＩＬ－１０コンジュゲートが開示される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、少なくとも１つの非天然アミノ酸に直接的に結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、リンカーを介して、少なくとも１つの非天然アミノ酸に間接的に結合している。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥに位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥの表面露出位置に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９またはＮ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９および８２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０および１３２位に対応する。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号１のアミノ酸３３～１５８と少なくともまたは約９９．０％同一である。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、または１３の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８、およびＫ１５７のうちの１つまたはそれ以上における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７のうちの少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１または１２個の野生型リジンを含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、Ｋ３４、Ｋ４０、Ｋ４９、Ｋ５７、Ｋ８８、Ｋ９９、Ｋ１１７、Ｋ１１９、Ｋ１２５、Ｋ１３０、Ｋ１３４、Ｋ１３８およびＫ１５７における野生型リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位に位置する。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、２つまたはそれ以上の非天然アミノ酸を含

む。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む第２のＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含まない第２のＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体は、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分を含み、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分の各々は、それぞれのＩＬ－１０単量体内の同じ残基位置に位置する非天然アミノ酸に結合される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体は、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分を含み、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分の各々は、ＩＬ－１０二量体内の異なる残基位置に位置する非天然アミノ酸に結合される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、増大された血漿半減期を含み、増大された血漿半減期は、野生型ＩＬ－１０タンパク質の血漿半減期と比較される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＩＬ－１０受容体（ＩＬ－１０Ｒ）に結合してＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体を形成し、ＩＬ－１０Ｒシグナル伝達経路を活性化する生物学的に活性なＩＬ－１０ポリペプチドである。

【００２８】

本明細書には、特定の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む修飾されたＩＬ－１０二量体とＩＬ－１０Ｒとを含むＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体が開示され、修飾されたＩＬ－１０二量体は、野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期と比較して増大した血漿半減期を有する。一部の実施形態では、修飾されたＩＬ－１０二量体は、さらに、少なくとも１つの非天然アミノ酸に共有結合したコンジュゲート化部分を含む。

【００２９】

本明細書には、特定の実施形態では、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、または本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート；ならびに薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が開示される。一部の実施形態では、医薬組成物は、全身送達用に製剤化される。一部の実施形態では、医薬組成物は、非経口投与用に製剤化される。

【００３０】

本明細書には、特定の実施形態では、それを必要とする対象における増殖性疾患または状態を治療する方法が開示され、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート；または本明細書に記載される医薬組成物の治療有効量を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、増殖性疾患または状態はがんである。一部の実施形態では、がんは固形腫瘍がんである。一部の実施形態では、固形腫瘍がんは、膀胱がん、骨がん、脳がん、乳がん、大腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんである。一部の実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。一部の実施形態では、血液悪性腫瘍が、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、節辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、非バーキット高悪性度Ｂ細胞リンパ腫、原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＬ）、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Ｂリンパ芽球性リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔（胸腺）大Ｂ細胞リンパ腫、血管内大Ｂ細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症である。一部の実施形態では、本方法は、追加の治療剤を投与する工程をさらに含む。一部の実施形態では、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート；または本明細書に記載される医薬組成物および追加の治療剤は、同時に投与されるかまたは同時に製剤化される。一部の実施形態では、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート；または本明細書に記載される医薬組成物

および追加の治療剤は、連続的に投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート；または本明細書に記載される医薬組成物は、追加の治療剤の前に投与される。一部の実施形態では、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート；または本明細書に記載される医薬組成物は、追加の治療剤の投与後に投与される。

【００３１】

本明細書には、特定の実施形態では、本明細書に記載される単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲート、または本明細書に記載される医薬組成物を含むキットが開示される。

【００３２】

本開示の種々の態様は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載される。本開示の特徴および利点のより良い理解は、本開示の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の詳細な説明、およびその添付の図面を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。この図は、Ｙｏｕｎｇら、「Ｂｅｙｏｎｄ ｔｈｅ ｃａｎｏｎｉｃａｌ ２０ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ：ｅｘｐａｎｄｉｎｇ ｔｈｅ ｇｅｎｅｔｉｃ ｌｅｘｉｃｏｎ」、Ｊ．ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、２８５巻（１５号）：１１０３９～１１０４４頁（２０１０年）の図２から採用される。

【図２Ａ】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。図２Ａは、例示的なリジン誘導体を示す。図２Ｂは、例示的なフェニルアラニン誘導体を示す。

【図２Ｂ】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。図２Ｂは、例示的なフェニルアラニン誘導体を示す。

【図３Ａ】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。これらの非天然アミノ酸（ＵＡＡ）はタンパク質に遺伝的にコードされている（図３Ａ－ＵＡＡ＃１－４２；図３Ｂ－ＵＡＡ＃４３－８９；図３Ｃ－ＵＡＡ＃９０－１２８；図３Ｄ－ＵＡＡ＃１２９－１６７。図３Ａ－図３Ｄは、Ｄｕｍａｓら、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１５年、６巻、５０～６９頁から採用される。

【図３Ｂ】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。これらの非天然アミノ酸（ＵＡＡ）はタンパク質に遺伝的にコードされている（図３Ａ－ＵＡＡ＃１－４２；図３Ｂ－ＵＡＡ＃４３－８９；図３Ｃ－ＵＡＡ＃９０－１２８；図３Ｄ－ＵＡＡ＃１２９－１６７。図３Ａ－図３Ｄは、Ｄｕｍａｓら、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１５年、６巻、５０～６９頁から採用される。

【図３Ｃ】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。これらの非天然アミノ酸（ＵＡＡ）はタンパク質に遺伝的にコードされている（図３Ａ－ＵＡＡ＃１－４２；図３Ｂ－ＵＡＡ＃４３－８９；図３Ｃ－ＵＡＡ＃９０－１２８；図３Ｄ－ＵＡＡ＃１２９－１６７。図３Ａ－図３Ｄは、Ｄｕｍａｓら、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１５年、６巻、５０～６９頁から採用される。

【図３Ｄ】例示的な非天然アミノ酸を示す図である。これらの非天然アミノ酸（ＵＡＡ）はタンパク質に遺伝的にコードされている（図３Ａ－ＵＡＡ＃１－４２；図３Ｂ－ＵＡＡ＃４３－８９；図３Ｃ－ＵＡＡ＃９０－１２８；図３Ｄ－ＵＡＡ＃１２９－１６７。図３Ａ－図３Ｄは、Ｄｕｍａｓら、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ ２０１５年、６巻、５０～６９頁から採用される。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、腫瘍壊死因子、ならびに自然免疫および適応免疫細胞ホメオスタシスにおいて役割を果たす他の増殖因子などの細胞シグナル伝達タンパク質のファミリーを含む。サイトカインは

、免疫細胞、例えば、マクロファージ、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球および肥満細胞、内皮細胞、線維芽細胞、および様々な間質細胞などによって生成される。いくつかの例では、サイトカインは、体液性免疫応答と細胞性免疫応答との間のバランスを調節する。

【００３５】

インターロイキンは、Ｔリンパ球およびＢリンパ球、単球系細胞、好中球、好塩基球、好酸球、巨核球、ならびに造血細胞の発生および分化を調節するシグナル伝達タンパク質である。インターロイキンは、ヘルパーＣＤ４　ＴおよびＢリンパ球、単球、マクロファージ、内皮細胞、ならびに他の組織常在細胞によって産生される。場合によっては、約１５種類のインターロイキンであるインターロイキン１～１３、インターロイキン１５、インターロイキン１７が存在する。

【００３６】

ＩＬ－１０は、腫瘍浸潤性ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化、ＣＤ８＋Ｔ細胞の細胞増殖、腫瘍細胞上のＭＨＣクラスＩおよびマクロファージ上のＭＨＣクラスＩＩを増加させるＩＦＮ－γの誘導、ならびに標的細胞溶解を媒介する細胞傷害性タンパク質の誘導によって腫瘍免疫を生じさせる。ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＴ細胞受容体刺激の増加は、抗アポトーシスおよび増殖シグナルを提供する。腫瘍微小環境（ＴＭＥ）におけるＩＬ－１０の予期せぬ役割は、抗腫瘍エフェクター細胞応答の抑制をもたらす腫瘍関連炎症に関与する炎症促進性Ｔｈ１７細胞およびサイトカインの阻害である。前臨床研究では、ＩＬ－１０欠乏は腫瘍発生率を増加させ、免疫監視を低下させることが示されている。さらに、ペグ化ＩＬ－１０を用いたＨｅｒ２トランスジェニックマウスの処理は、腫瘍拒絶をもたらしたが、ＩＦＮ－γおよびグランザイムを発現するＣＤ８＋Ｔ細胞の発現を必要とし、腫瘍中のＣＤ８ａ／ｂ＋Ｔ細胞の有意な増加を伴う。

【００３７】

ＩＬ－１０は、体内での血清半減期が比較的短い。実際、マウスにおける半減期は、インビトロでのバイオアッセイによって、または敗血症性ショックモデル系での有効性によって測定した場合［Ｓｍｉｔｈら、Ｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　１７３巻：２０７～２１４頁（１９９６年）を参照されたい］、約２～６時間である。

【００３８】

本明細書には、特定の実施形態では、増大された血漿半減期を有する修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドが開示される。一部の実施形態では、本明細書にはまた、二量体化により、複数の腫瘍細胞の腫瘍浸潤性免疫細胞への曝露を増大する、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドが記載される。他の実施形態では、本明細書にはさらに、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体を形成する、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドが記載される。

【００３９】

さらに記載されるものには、ＩＬ－１０ポリペプチドコンジュゲート、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドの１つまたはそれ以上を含む医薬組成物、および疾患または適応症を治療する方法が含まれる。

【００４０】

修飾されたＩＬ－１０ポリペプチド

一部の実施形態では、本明細書には、アミノ酸位置で修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドが記載される。いくつかの例では、修飾は天然アミノ酸への変更である。いくつかの例では、修飾は非天然アミノ酸への変更である。いくつかの例では、本明細書には、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む、単離および修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドが記載される。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、単離され精製された哺乳動物ＩＬ－１０、例えば、げっ歯類ＩＬ－１０タンパク質、またはヒトＩＬ－１０タンパク質である。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドはヒトＩＬ－１０タンパク質である。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号１と約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは配列番号１の配列を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは配列番号１の配列からなる。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、配列

番号２と約８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を含む。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号２の配列を含む。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、配列番号２の配列からなる。

【００４１】

いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、切断された変異体である。いくつかの例では、切断はＮ末端欠失である。他の例では、切断はＣ末端欠失である。追加の例では、切断は、Ｎ末端とＣ末端の両方の欠失を含む。例えば、切断は、Ｎ末端もしくはＣ末端、または両方の末端からの少なくともしくは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０またはそれ以上の残基の欠失であり得る。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともしくは約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、２０またはそれ以上の残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともしくは約１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約２残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約３残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約４残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約５残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約６残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約７残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約８残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約９残基のＮ末端欠失を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、少なくともまたは約１０残基のＮ末端欠失を含む。

【００４２】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、機能的に活性な断片である。場合によっては、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域５～１６０、１０～１６０、１５～１６０、２０～１６０、１～１５５、５～１５５、１０～１５５、１５～１５５、２０～１５５、１～１５０、５～１５０、１０～１５０、１５～１５０、または２０～１５０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域５～１６０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１０～１６０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１５～１６０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域２０～１６０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１～１５５を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域５～１５５を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１０～１５５を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１５～１５５を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域２０～１５５を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１～１５０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域５～１５０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１０～１５０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域１５～１５０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。いくつかの例では、機能的に活性な断片は、ＩＬ－１０領域２０～１５０を含み、残基位置は、配列番号１の位置を基準にする。

【００４３】

一部の実施形態では、本明細書には、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０ポリペプチドが記載される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸が螺旋Ｃ、ＤまたはＥに位置する。場合によっては、螺旋Ｃは残基Ｌ６０～Ｎ８２を含み、その位置は配列番号１の位置を基準にする。場合によっては、螺旋Ｄは残基Ｉ８７～Ｃ１０８を含み、その位置は配列番号１の位置を基準にする。場合によっては、螺旋Ｅは残基Ｓ１１８～Ｌ１３１を含み、その位置は配列番号１の位置を基準にする。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、螺旋Ｃ、ＤまたはＥの表面露出位置に位置する。

【００４４】

一部の実施形態では、本明細書には、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択される位置に少なくとも１つの非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０ポリペプチドが記載され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９またはＮ８２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９および８２位に対応する。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２から選択され、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０および１３２位に対応する。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ６７から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７０から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ７４から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｅ７５から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ７９から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ８２から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ８８から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１２５から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２６から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｎ１２９から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｋ１３０から選択される。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、Ｑ１３２から選択される。

【００４５】

いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端の近位に位置する。本明細書で使用される場合、近位とは、Ｎ末端残基から少なくとも１残基離れ、Ｎ末端残基から最大約５０残基離れて位置する残基を指す。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基からの最初の１０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基からの最初の２０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基からの最初の３０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基からの最初の４０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基からの最初の５０残基内に位置する。

【００４６】

いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端残基である。

【００４７】

いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位に位置する。本明細書で使用される場合、近位とは、Ｃ末端残基から少なくとも１残基離れ、Ｃ末端残基から最大約５０残基離れて位置する残基を指す。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基からの最初の１０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基からの最初の２０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基からの最初の３０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基からの最初の４０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基からの最初の５０残基内に位置する。

【００４８】

いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端残基である。

【００４９】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＩＬ－１０Ｒに結合することができ、シグナル伝達経路を活性化する機能的に活性な単量体である。場合によっては、機能的に活性なＩＬ－１０単量体は、増大された血漿半減期を有する。場合によっては、増大された血漿半減期は、野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期と比較される。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドの増大した血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０タンパク質の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドの増大した血漿半減期は、野生型ＩＬ－１０タンパク質の血漿半減期と比較して、約９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、または３０日である。

【００５０】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＩＬ－１０二量体、例えば、生物学的に活性な二量体を形成する。場合によっては、ＩＬ－１０二量体（例えば、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体）は、少なくとも１つの非天然アミノ酸を含む。他の場合には、ＩＬ－１０二量体（例えば、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体）は、少なくとも２つまたはそれ以上の非天然アミノ酸を含む。追加の場合において、ＩＬ－１０二量体（例えば、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体）は、少なくとも３、４、５、６、７、８個、またはそれ以上の非天然アミノ酸を含む。

【００５１】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体（例えば、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体）は、２つの非天然アミノ酸を含む。場合によっては、両方の非天然アミノ酸は、同じＩＬ－１０ポリペプチド上に位置する。他の場合には、ＩＬ－１０ポリペプチドの各々は、１つの非天然アミノ酸を含む。このような例では、非天然アミノ酸の各々は、ＩＬ－１０ポリペプチドの異なる残基位置に位置する（すなわち、非天然アミノ酸の１つは、ＩＬ－１０ポリペプチドの１つの第１の残基位置に位置し、第２の非天然アミノ酸は、他のＩＬ－１０ポリペプチドの第２の残基位置に位置し、第２の残基位置は、第１の残基位置とは異なる）。さらなる例では、非天然アミノ酸の各々は、それぞれのＩＬ－１０ポリペプチドの同じ残基位置に位置する。

【００５２】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０二量体（例えば、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体）は、１つの非天然アミノ酸を含む。このような場合には、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。場合によっては、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドは、天然アミノ酸を有する突然変異を含む。他の場合には、非天然アミノ酸を含まないＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｉ

Ｌ－１０変異体、例えば、切断型ＩＬ－１０タンパク質である。いくつかの例では、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドは、野生型ＩＬ－１０ポリペプチドと二量体化する。

【００５３】

いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０ポリペプチドの二量体化を実質的に妨げない。

【００５４】

場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置はさらに、ＩＬ－１０二量体のＩＬ－１０Ｒへの結合を有意に妨げない。

【００５５】

一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を８０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を７０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を６０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を５０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を４０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を３０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を２０％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を１０％未満損なう。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を５％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を２％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を１％未満損なう。いくつかの例では、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を有意に損なわない。追加の場合において、少なくとも１つの非天然アミノ酸の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を損なわない。

【００５６】

いくつかの例では、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、増大された血漿半減期を有する。場合によっては、増大された血漿半減期は、野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期と比較される。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも９０分である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも２時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも３時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも４時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも５時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも６時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも１０時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも１２時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－

１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも１８時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも２４時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも３６時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも４８時間である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも３日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも４日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも５日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも６日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも７日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも１０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも１２日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも１４日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも２１日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも２８日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０二量体の増大された血漿半減期は、少なくとも３０日である、または野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期より長い。

【００５７】

いくつかの例では、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、または３０日の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約９０分の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約２時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約３時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約４時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約５時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約６時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約７時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約７時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約８時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約９時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１０時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１１時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１２時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１８時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約２４時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約３６時間の増大された血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約４８時間の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量

体は、約３日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約４日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約５日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約６日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約７日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１０日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１２日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約１４日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約２１日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約２８日の増大した血漿半減期を有する。場合によっては、生物学的に活性なＩＬ－１０二量体は、約３０日の増大した血漿半減期を有する。

【００５８】

ＩＬ－１０コンジュゲート

特定の実施形態では、本明細書には、ＩＬ－１０コンジュゲートが記載される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、少なくとも１つの非天然アミノ酸、および少なくとも１つの非天然アミノ酸に結合したコンジュゲート化部分を含むＩＬ－１０ポリペプチドを含む。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、少なくとも１つの非天然アミノ酸に直接的に結合される。他の例では、コンジュゲート化部分は、下記に記載されるリンカーを介して少なくとも１つの非天然アミノ酸に間接的に結合している。

【００５９】

上述したように、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、場合により、螺旋Ｃ、ＤまたはＥ、例えば、表面接近可能残基に位置する。場合によっては、残基は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２を含み、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。場合によっては、残基は、Ｅ６７、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｅ７５、Ｑ７９またはＮ８２を含み、残基位置は、配列番号１に示される６７、７０、７４、７５、７９および８２位に対応する。場合によっては、残基は、Ｋ８８、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２を含み、残基位置は、配列番号１に示される８８、１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。場合によっては、残基は、Ｋ１２５、Ｎ１２６、Ｎ１２９、Ｋ１３０、またはＱ１３２を含み、残基位置は、配列番号１に示される１２５、１２６、１２９、１３０および１３２位に対応する。場合によっては、残基は、Ｑ７０、Ｅ７４、Ｎ８２、Ｋ８８、Ｎ１２６、Ｋ１３０、またはＱ１３２を含み、残基位置は、配列番号１に示される７０、７４、８２、８８、１２６、１３０および１３２位に対応する。

【００６０】

一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端の近位（例えば、Ｎ末端残基の近位）に位置する。例えば、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、場合により、Ｎ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ末端に位置する（すなわち、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、ＩＬ－１０ポリペプチドのＮ末端残基である）。

【００６１】

他の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端の近位（例えば、Ｃ末端残基の近位）に位置する。例えば、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、場合により、Ｃ末端からの最初の１０、２０、３０、４０、または５０残基内に位置する。場合によっては、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｃ末端に位置する（すなわち、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、ＩＬ－１０ポリペプチドのＣ末端残基である）。

【００６２】

いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、非天然アミノ酸に結合した１つのコンジュゲート化部分を含む。

【００６３】
いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＩＬ－１０Ｒシグナル伝達経路を活性化することができるＩＬ－１０単量体を含む。他の例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、機能的に活性であるＩＬ－１０二量体を含む。
【００６４】
いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分を含み、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分の各々は、異なる非天然アミノ酸に結合される。場合によっては、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分は、同じＩＬ－１０ポリペプチド（例えば、機能的に活性なＩＬ－１０単量体である、または機能的に活性なＩＬ－１０二量体中におけるものである）にコンジュゲートされる。他の場合には、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分は、各々、ＩＬ－１０二量体内の異なるＩＬ－１０ポリペプチドにコンジュゲートされる。追加の場合において、ＩＬ－１０コンジュゲートは、３、４、５、６個、またはそれ以上のコンジュゲート化部分を含み、コンジュゲート化部分の各々は、異なる非天然アミノ酸に結合される。このような例では、二量体内の２つのＩＬ－１０ポリペプチドは、コンジュゲート化部分の不均一な分布を有し、例えば、１つのＩＬ－１０ポリペプチドは１つのコンジュゲート化部分を有し、他方のＩＬ－１０ポリペプチドは２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分を有する。
【００６５】
いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分を含む。場合によっては、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分の各々は、それぞれのＩＬ－１０単量体内の同じ残基位置にある非天然アミノ酸に結合される。他の場合には、２つまたはそれ以上のコンジュゲート化部分の各々は、ＩＬ－１０二量体内の異なる残基位置に位置する非天然アミノ酸に結合される。
【００６６】
いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０ポリペプチドの二量体化を実質的に妨げない。
【００６７】
場合によっては、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０二量体のＩＬ－１０Ｒへの結合を有意に妨げない。
【００６８】
一部の実施形態では、コンジュゲート化部分の位置は、９０％、８０％、７０％、６０％、５０％、４０％、３０％、２０％、１０％、５％、４％、３％、２％、１％、またはそれ未満までＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を８０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を７０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を６０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を５０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を４０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を３０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を２０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を１０％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を５％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を２％未満損なう。いくつかの例では、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を１％未満損なう。場合によっては、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を有意に損なわない。追加の場合において、コンジュゲート化部分の位置は、ＩＬ－１０Ｒのシグナル伝達を損なわない。
【００６９】
いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、増大された血漿半減期を有する。場

合によっては、増大された血漿半減期は、野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期と比較される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも９０分、２時間、３時間、４時間、５時間、６時間、７時間、８時間、９時間、１０時間、１１時間、１２時間、１８時間、２４時間、３６時間、４８時間、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１４日、２１日、２８日、３０日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも９０分である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも２時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも３時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも４時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも５時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも６時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも１０時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも１２時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも１８時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも２４時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも３６時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも４８時間である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも３日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも４日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも５日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも６日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも７日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも１０日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも１２日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも１４日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも２１日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも２８日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートの増大された血漿半減期は、少なくとも３０日である、または野生型ＩＬ－１０コンジュゲートの血漿半減期より長い。

【００７０】

一部の実施形態では、本明細書にはまた、少なくとも１つの非天然アミノ酸およびＩＬ－１０Ｒを含む修飾されたＩＬ－１０二量体を含むＩＬ－１０／ＩＬ－１０Ｒ複合体が記載され、修飾されたＩＬ－１０二量体は、野生型ＩＬ－１０二量体の血漿半減期と比較して増大された血漿半減期を有する。いくつかの例では、修飾されたＩＬ－１０二量体は、さらに、少なくとも１つの非天然アミノ酸に共有結合したコンジュゲート化部分を含む。

【００７１】

ＩＬ－１０コンジュゲート前駆体

本明細書には、修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドを含むＩＬ－１０コンジュゲート前駆体が記載され、１つまたはそれ以上のアミノ酸が野生型アミノ酸から突然変異されている。このような前駆体は、疾患または状態の治療のために、しばしば、本明細書に記載される方法とともに使用される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０前駆体はコンジュゲートされない。このような突然変異は、様々に、付加、欠失、または置換を含む。

【００７２】

天然アミノ酸および非天然アミノ酸

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアミノ酸残基（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチド内）は、コンジュゲート化部分に結合する（またはそれと反応する）前に、リジン、システイン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、またはチロシンに突然変異される。例えば、リジン、システイン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、またはチロシンの側鎖は、本明細書に記載されるコンジュゲート化部分に結合することができる。いくつかの例では、アミノ酸残基が、システイン、リジン、またはヒスチジンに突然変異される。場合によっては、アミノ酸残基が、システインに突然変異される。場合によっては、アミノ酸残基は、リジンに突然変異される。場合によっては、アミノ酸残基は、ヒスチジンに突然変異される。場合によっては、アミノ酸残基は、チロシンに突然変異される。場合によっては、アミノ酸残基は、トリプトファンに突然変異される。いくつかの例では、アミノ酸残基は、Ｎ末端またはＣ末端の近位に、Ｎ末端またはＣ末端に、または内部残基位置に位置する。いくつかの例では、アミノ酸残基は、Ｎ末端またはＣ末端残基であり、突然変異は、システインまたはリジンに対する。いくつかの例では、アミノ酸残基は、Ｎ末端残基またはＣ末端残基の近位（例えば、Ｎ末端残基またはＣ末端残基から５０、４０、３０、２０、または１０残基以内）に位置し、突然変異は、システインまたはリジンに対する。

【００７３】

いくつかの例では、アミノ酸残基は、Ｎ末端またはＣ末端残基に付加され、すなわち、ＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｎ末端またはＣ末端のいずれかで追加のアミノ酸残基を含み、および追加のアミノ酸残基は、システインまたはリジンである。場合によっては、追加のアミノ酸残基はシステインである。場合によっては、追加のアミノ酸は、コンジュゲート化部分にコンジュゲートされる。

【００７４】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアミノ酸残基（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチド内）は、非天然アミノ酸に突然変異される。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、コンジュゲート化部分とコンジュゲートされない。一部の実施形態では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、非天然アミノ酸を含み、ＩＬ－１０は、タンパク質にコンジュゲートされ、結合点は、非天然アミノ酸ではない。

【００７５】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアミノ酸残基（例えば、ＩＬ－１０ポリペプチド内）は、コンジュゲート化部分に結合する前に、非天然アミノ酸に突然変異される。場合によっては、非天然アミノ酸への突然変異は、免疫系の自己抗原応答を防ぎ、または最小限にする。本明細書で使用される場合、用語「非天然アミノ酸」は、タンパク質に天然に存在する２０個のアミノ酸以外のアミノ酸を指す。非天然アミノ酸の非制限的な例には、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－メトキシフェニルアラニン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、ｐ－プロパルギルオキシフェニ

ルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－Ｄｏｐａ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ボロノフェニルアラニン、Ｏ－プロパルギルチロシン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、セレノシステイン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、チロシンアミノ酸の非天然類似体；グルタミンアミノ酸の非天然類似体；フェニルアラニンアミノ酸の非天然類似体；セリンアミノ酸の非天然類似体；スレオニンアミノ酸の非天然類似体；アルキル、アリール、アシル、アジド、シアノ、ハロ、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシル、アルケニル、アルキニル、エーテル、チオール、スルホニル、セレノ、エステル、チオ酸、ホウ酸塩、ボロン酸塩、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、複素環、エノン、イミン、アルデヒド、ヒドロキシルアミン、ケト、またはアミノ置換アミノ酸、またはそれらの組み合わせ；光活性化可能な架橋剤を含むアミノ酸；スピン標識アミノ酸；蛍光アミノ酸；金属結合アミノ酸；金属含有アミノ酸；放射性アミノ酸；光ケージ化および／または光異性化可能なアミノ酸；ビオチンもしくはビオチン類似体を含むアミノ酸；ケト含有アミノ酸；ポリエチレングリコールまたはポリエーテルを含むアミノ酸；重原子置換アミノ酸；化学的に開裂可能なもしくは光開裂可能なアミノ酸；伸長した側鎖を有するアミノ酸；毒性基を含むアミノ酸；糖置換アミノ酸；炭素連結した糖含有アミノ酸；酸化還元活性アミノ酸；α－ヒドロキシ含有酸；アミノチオ酸；α，α二置換アミノ酸；β－アミノ酸；プロリンまたはヒスチジン以外の環状アミノ酸、およびフェニルアラニン、チロシンまたはトリプトファン以外の芳香族アミノ酸が含まれる。

【００７６】

非天然アミノ酸の他の例としては、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、およびＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンが含まれる。

【００７７】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、選択的反応基、または標的ポリペプチドの部位選択的標識のための反応基を含む。いくつかの例では、化学反応は、生体直交性反応（例えば、生体適合性および選択的反応）である。場合によっては、化学は、Ｃｕ（Ｉ）触媒または「銅を含まない」アルキン－アジドトリアゾール生成反応、シュタウジンガーライゲーション、逆電子要求ドディールス・アルダー（ＩＥＤＤＡ）反応、「光クリック」化学反応、またはオレフィンメタセシスおよびＳｕｚｕｋｉ－Ｍｉｙａｕｒａまたはソノガシラ交差カップリングなどの金属媒介プロセスである。

【００７８】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、光反応性基を含み、例えば、ＵＶとの照射時に架橋する。

【００７９】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、光ケージ化アミノ酸を含む。

【００８０】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、パラ置換、メタ置換、またはオルト置換アミノ酸誘導体である。

【００８１】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ｐ－アセチル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジドメチル－Ｌ－フェニルアラニン（ｐＡＭＦ）、ｐ－ヨード－Ｌ－フェニルアラニン、Ｏ－メチル－Ｌ－チロシン、ｐ－メトキシフェニルアラニン、ｐ－プロパルギルオキシフ

ェニルアラニン、ｐ－プロパルギル－フェニルアラニン、Ｌ－３－（２－ナフチル）アラニン、３－メチル－フェニルアラニン、Ｏ－４－アリル－Ｌ－チロシン、４－プロピル－Ｌ－チロシン、トリ－Ｏ－アセチル－ＧｌｃＮＡｃｐ－セリン、Ｌ－Ｄｏｐａ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アジド－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－アシル－Ｌ－フェニルアラニン、ｐ－ベンゾイル－Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、ｐ－ブロモフェニルアラニン、ｐ－アミノ－Ｌ－フェニルアラニン、またはイソプロピル－Ｌ－フェニルアラニンを含む。

【００８２】

場合によっては、非天然アミノ酸は、３－アミノチロシン、３－ニトロチロシン、３，４－ジヒドロキシフェニルアラニン、または３－ヨードチロシンである。

【００８３】

場合によっては、非天然アミノ酸は、フェニルセレノシステインである。

【００８４】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ベンゾフェノン、ケトン、ヨウ化物、メトキシ、アセチル、ベンゾイル、またはフェニルアラニン誘導体を含有するアジドである。

【００８５】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、リジン誘導体を含有するベンゾフェノン、ケトン、ヨウ化物、メトキシ、アセチル、ベンゾイル、またはアジドである。

【００８６】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、芳香族側鎖を含む。

【００８７】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、芳香族側鎖を含まない。

【００８８】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、アジド基を含む。

【００８９】

一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）を含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。一部の実施形態では、少なくとも１つの非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む。

【００９０】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｍｉｃｈａｅｌ－アクセプタ基を含む。いくつかの例では、マイケル－アクセプタ基は、１，２－付加反応を介して共有結合を形成することができる不飽和部分を含む。いくつかの例では、マイケル－アクセプタ基は、電子欠損アルケンまたはアルキンを含む。いくつかの例では、マイケル－アクセプタ基には、限定されないが、α、β不飽和：ケトン、アルデヒド、スルホキシド、スルホン、ニトリル、イミン、または芳香族が含まれる。

【００９１】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、デヒドロアラニンである。

【００９２】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、アルデヒドまたはケトン基を含む。

【００９３】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、アルデヒドまたはケトン基を含むリジン誘導体である。

【００９４】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ベータ、ガンマ、またはデルタ位置に１つまたはそれ以上のＯ、Ｎ、Ｓｅ、またはＳ原子を含むリジン誘導体である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ガンマ位置にＯ、Ｎ、Ｓｅ、またはＳ原子を含むリジン誘導体である。

【００９５】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、イプシロンＮ原子が酸素原子で置換されたリジン誘導体である。

【００９６】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、天然に存在する翻訳後修飾リジンではないリジン誘導体である。

【００９７】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、側鎖を含むアミノ酸であり、アルファ位からの６番目の原子はカルボニル基を含む。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、側鎖を含むアミノ酸であり、アルファ位からの６番目の原子はカルボニル基を含み、アルファ位からの５番目の原子は窒素である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、側鎖を含むアミノ酸であり、アルファ位置からの７番目の原子は酸素原子である。

【００９８】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、セレンを含むセリン誘導体である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、セレノセリン（２－アミノ－３－ヒドロセレノプロパン酸）である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－３－（（（２－（３－（ベンジルオキシ）－３－オキソプロピル）アミノ）エチル）セラニル）プロパン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－３－（フェニルセラニル）プロパン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、セレンを含み、セレンの酸化は、アルケンを含む非天然アミノ酸の形成をもたらす。

【００９９】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、シクロオクチニル基を含む。

【０１００】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、トランスシクロテニル基を含む。

【０１０１】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ノルボルネニル基を含む。

【０１０２】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、シクロプロペニル基を含む。

【０１０３】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ジアジリン基を含む。

【０１０４】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、テトラジン基を含む。

【０１０５】

いくつかの例では、非天然アミノ酸はリジン誘導体であり、側鎖窒素はカルバミル化される。いくつかの例では、非天然アミノ酸はリジン誘導体であり、側鎖窒素はアシル化される。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（ｔｅｒｔ－ブトキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－Ｂｏｃ－Ｎ６－メチルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－アセチルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ピロリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－トリフルオロアセチルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（ベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非

天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（ｐ－ヨードベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（ｐ－ニトロベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－プロリルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（シクロペンチルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（シクロペンタンカルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（テトラヒドロフラン－２－カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（３－エチニルテトラヒドロフラン－２－カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（プロパ－２－ｙｎ－１－イルオキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（２－アジドシクロペンチルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（２－ニトロベンジルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－｛［（２－シクロオクチルオキシ）カルボニル］アミノ｝ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（２－アミノブタ－３－イノイル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－６－（（２－アミノブタ－３－イノイル）オキシ）ヘキサン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（アリルオキシカルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（ブテニル－４－オキシカルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（ペンテニル－５－オキシカルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（ブタ－３－ｙｎ－１－イルオキシ）カルボニル）－リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（ペンタ－４－ｙｎ－１－イルオキシ）カルボニル）－リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（チアゾリジン－４－カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－８－オキソノナン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－８－オキソオクタン酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（２－オキソアセチル）リジンである。

【０１０６】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－プロピオニルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－ブチリルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（ブタ－２－エノイル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（ビシクロ［２．２．１］ヘプタ－５－エン－２－イルオキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（スピロ［２．３］ヘキサ－１－エン－５－イルメトキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（（４－（１－（トリフルオロメチル）シクロプロパ－２－エン－１－イル）ベンジル）オキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（ビシクロ［２．２．１］ヘプタ－５－エン－２－イルメトキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、システイニルリジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（１－（６－ニトロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－イル）エトキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（２－（３－メチル－３Ｈ－ジアジリン－３－イル）エトキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（３－（３－メチル－３Ｈ－ジアジリン－３－イル）プロポキシ）カルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（メタニトロベニルオキシ）Ｎ６－メチルカルボニル）リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（ビシクロ［６．１．０］ノン４－ｙｎ－９－イルメトキシ）カルボニル）－リジンである。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｎ６－（（シクロヘプト－３－エン－１－イルオキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンである。

【０１０７】
いくつかの例では、非天然アミノ酸は、２－アミノ－３－（（（（（ベンジルオキシ）カルボニル）アミノ）メチル）セラニル）プロパン酸である。
【０１０８】
一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、別の用途で使用するアンバー、オパール、またはオーカー終止コドンによってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。
【０１０９】
一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、４塩基コドンによってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。
【０１１０】
一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、別の用途で使用する希少センスコドンによってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。
【０１１１】
一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、非天然核酸を含む合成コドンによってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。
【０１１２】
いくつかの例では、非天然アミノ酸は、直交する修飾されたシンテターゼ／ｔＲＮＡ対によってＩＬ－１０に組み込まれる。このような直交した対は、ａ）他の内因性アミノ酸の非天然ｔＲＮＡ上への付加、およびｂ）非天然アミノ酸の他の内因性ｔＲＮＡ上への付加を最小限にしながら、非天然ｔＲＮＡに非天然アミノ酸を付加することができる非天然シンテターゼを含む。このような直交した対は、内因性シンテターゼによって他の内因性アミノ酸を付加されることを避けながら、非天然シンテターゼによる付加を受けることが可能なｔＲＮＡを含む。一部の実施形態では、このような対は、細菌、酵母、古細菌、またはヒト供給源などの種々の生物から同定される。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対は、単一の生物由来の成分を含む。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対は、２つの異なる生物由来の成分を含む。一部の実施形態では、直交性シンテターゼ／ｔＲＮＡ対、修飾前に２つの異なるアミノ酸の翻訳を促進する成分を含む。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたアラニンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたアルギニンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたアスパラギンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたアスパラギン酸シンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたシステインシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたグルタミンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたグルタミン酸シンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたアラニングリジンである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたヒスチジンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたロイシンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたイソロイシンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたリジンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたメチオニンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたフェニルアラニンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたプロリンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたセリンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたスレオニンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたトリプトファンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたチロシンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたバリンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性シンテターゼは、修飾されたホスホセリンシンテターゼである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたアラニンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ＲＮＡは、修飾された

アルギニンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交ｔＲＮＡは、修飾されたアスパラギンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたアスパラギン酸ｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたシステインｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたグルタミンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたグルタミン酸ｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたアラニングリジンである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたヒスチジンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたロイシンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたイソロイシンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたリジンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたメチオニンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたフェニルアラニンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたプロリンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたセリンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたスレオニンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたトリプトファンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたチロシンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたバリンｔＲＮＡである。一部の実施形態では、直交性ｔＲＮＡは、修飾されたホスホセリンｔＲＮＡである。

【０１１３】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、アミノアシル（ａａＲＳまたはＲＳ）－ｔＲＮＡシンテターゼ－ｔＲＮＡ対によってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。例示的なａａＲＳ－ｔＲＮＡ対には、限定されないが、メタノカルドコックス・ヤンナスキイ（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ　ｊａｎｎａｓｃｈｉｉ）（Ｍｊ－Ｔｙｒ）ａＲＳ／ｔＲＮＡ対、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／バチルス・ステアロサーモフィラス（Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対、大腸菌ＬｅｕＲＳ（Ｅｃ－Ｌｅｕ）／バチルス・ステアロサーモフィラスｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対が含まれる。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｍｊ－ＴｙｒＲＳ／ｔＲＮＡ対によってサイトカイン（例えば、ＩＬポリペプチド）に組み込まれる。Ｍｊ－ＴｙｒＲＳ／ｔＲＮＡ対によって組み込むことができる例示的なＵＡＡとしては、限定されないが、パラ置換フェニルアラニン誘導体、例えば、ｐ－アミノフェニルアラニンおよびｐ－メトキシフェニルアラニン；メタ置換チロシン誘導体、例えば、３－アミノチロシン、３－ニトロチロシン、３，４－ジヒドロキシフェニルアラニン、および３－ヨードチロシン；フェニルセレノシステイン；ｐ－ボロノフェニルアラニン；およびｏ－ニトロベンジルチロシンが挙げられる。

【０１１４】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｅｃ－Ｔｙｒ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$またはＥｃ－Ｌｅｕ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対によってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。Ｅｃ－Ｔｙｒ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$またはＥｃ－Ｌｅｕ／ｔＲＮＡ$_{ＣＵＡ}$対によって組み込まれ得る例示的なＵＡＡとしては、限定されないが、ベンゾフェノン、ケトン、ヨウ化物、またはアジド置換基を含むフェニルアラニン誘導体；Ｏ－プロパルギルチロシン；α－アミノカプリル酸、Ｏ－メチルチロシン、Ｏ－ニトロベンジルシステイン；および３－（ナフタレン－２－イルアミノ）－２－アミノ－プロパン酸が挙げられる。

【０１１５】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ピロリシルｔＲＮＡ対によってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。場合によっては、ＰｙｌＲＳは、古細菌、例えば、メタン生成古細菌から得られる。場合によっては、ＰｙｌＲＳは、メタノサルキナ・バルケリ（Ｍｅｔｈａｎｏｓａｒｃｉｎａ　ｂａｒｋｅｒｉ）、メタノサルキナ・マゼイ（Ｍｅｔｈａｎｏｓａｒｃｉｎａ　ｍａｚｅｉ）、またはメタノサルキナ・アセチボランス（Ｍｅｔｈａｎｏｓａｒｃｉｎａ　ａｃｅｔｉｖｏｒａｎｓ）から得られる。ピロリシルｔＲＮＡ対によって組み込まれ得る例示的なＵＡＡとしては、限定されないが、アミドおよびカルバメート置換リジン、例えば、２－アミノ－６－（（（Ｒ）－テトラヒドロフラン－２－カル

ボキサミド）ヘキサン酸、Ｎ－ε－Ｄ－プロルイル－Ｌ－リジンおよびＮ－ε－シクロペンチルオキシカルボニル－Ｌ－リジン；Ｎ－ε－アクリロイル－Ｌ－リジン；Ｎ－ε－［（１－（６－ニトロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－５－イル）エトキシ）カルボニル］－Ｌ－リジン；およびＮ－ε－（１－メチルシクロプロ－２－エンカルボキサミド）リジンが挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートは、Ｍ．バルケリ（Ｍ．ｂａｒｋｅｒｉ）ピロリシル－ｔＲＮＡシンテターゼ（Ｍｂ　ＰｙｌＲＳ）によって、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）などの非天然アミノ酸が選択的に付加されたＭ．マゼイ（Ｍ．ｍａｚｅｉ）ｔＲＮＡの使用により製造される。Ｚｈａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ　２０１７年、５５１巻（７６８２号）：６４４～６４７頁に開示されるものなどの他の方法が当業者に公知である。使用される非天然アミノ酸の他の例としては、限定されないが、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンが挙げられる。

【０１１６】

いくつかの例では、米国特許第９，９８８，６１９号および米国特許第９，９３８，５１６号に開示されるシンテターゼによって、非天然アミノ酸はＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。このようなシンテターゼによって組み込まれる例示的なＵＡＡとしては、パラ－メチルアジド－Ｌ－フェニルアラニン、アラルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアラルキル非天然アミノ酸、および他が挙げられる。一部の実施形態では、このようなＵＡＡは、ピリジル、ピラジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、チオフェニル、または他の複素環を含む。一部の実施形態におけるこのようなアミノ酸は、アジド、テトラジン、または水溶性部分などのカップリングパートナーへのコンジュゲーションが可能な他の化学基を含む。一部の実施形態では、このようなシンテターゼを発現させ、使用して、インビボでＵＡＡをサイトカインに組み込む。一部の実施形態では、このようなシンテターゼを使用して、無細胞翻訳系を用いてＵＡＡをサイトカインに組み込む。

【０１１７】

本明細書に開示される構築物またはベクターが導入される宿主細胞は、ｔＲＮＡ、ｔＲＮＡシンテターゼおよび目的のタンパク質が産生されるように、適切な培地中で培養または維持される。培地はまた、目的のタンパク質が非天然アミノ酸（単数または複数）を組み込むように、非天然アミノ酸（単数または複数）を含む。一部の実施形態では、細菌、植物または藻類からのヌクレオシド三リン酸トランスポーター（ＮＴＴ）もまた宿主細胞中に存在する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートは、ＮＴＴを発現する宿主細胞の使用により製造される。一部の実施形態では、宿主細胞において使用されるヌクレオチドヌクレオシド三リン酸トランスポーターは、ＴｐＮＴＴ１、ＴｐＮＴＴ２、ＴｐＮＴＴ３、ＴｐＮＴＴ４、ＴｐＮＴＴ５、ＴｐＮＴＴ６、ＴｐＮＴＴ７、ＴｐＮＴＴ８（Ｔ．シュードナナ（Ｔ．ｐｓｅｕｄｏｎａｎａ））、ＰｔＮＴＴ１、ＰｔＮＴＴ２、ＰｔＮＴＴ３、ＰｔＮＴＴ４、ＰｔＮＴＴ５、ＰｔＮＴＴ６（Ｐ．トリコニウタム（Ｐ．ｔｒｉｃｏｒｎｕｔｕｍ））、ＧｓＮＴＴ（ガルディエリア・スルフラリア（Ｇａｌｄｉｅｒｉａ　ｓｕｌｐｈｕｒａｒｉａ））、ＡｔＮＴＴ１、ＡｔＮＴＴ２（シロイヌナズナ（Ａｒａｂｉｄｏｐｓｉｓ　ｔｈａｌｉａｎａ））、ＣｔＮＴＴ１、ＣｔＮＴＴ２（クラミジア・トラコマチス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ））、ＰａｍＮＴＴ１、ＰａｍＮＴＴ２（プロトクラミジア・アモエボフィラ（Ｐｒｏｔｏｃｈｌａｍｙｄｉａ　ａｍｏｅｂｏｐｈｉｌａ））、ＣｃＮＴＴ（カエジバクター・カリオフィルス（Ｃａｅｄｉｂａｃｔｅｒ　ｃａｒｙｏｐｈｉｌｕｓ））、ＲｐＮＴＴ１（発疹チフスリケッチア（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ　ｐｒｏｗａｚｅｋｉｉ））から選択される。一部の実施形態では、ＮＴＴは、ＰｔＮＴＴ１、ＰｔＮＴＴ２、ＰｔＮＴＴ３、ＰｔＮＴＴ４、ＰｔＮＴＴ５、およびＰｔＮＴＴ６から選択される。一部の実施形態では、Ｎ

ＴＴはＰｔＮＴＴ１である。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ２である。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ３である。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ４である。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ５である。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ６である。使用される他のＮＴＴは、Ｚｈａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ ２０１７年、５５１巻（７６８２号）：６４４～６４７頁；Ｍａｌｙｓｈｅｖら、Ｎａｔｕｒｅ ２０１４年、５０９巻（７５００号）、３８５～３８８頁；Ｚｈａｎｇら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、２０１７年、１１４巻：１３１７～１３２２頁に開示される。

【０１１８】

一部の実施形態では、ＮＴＴおよびｔＲＮＡシンテターゼを発現する細胞系において、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートを製造する方法が提供される。本明細書に記載される一部の実施形態では、ＮＴＴは、ＰｔＮＴＴ１、ＰｔＮＴＴ２、ＰｔＮＴＴ３、ＰｔＮＴＴ４、ＰｔＮＴＴ５、およびＰｔＮＴＴ６から選択され、ｔＲＮＡシンテターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ ｊａｎｎａｓｃｈｉｉ）、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス（Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）およびＭ．マゼイから選択される。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ１であり、ｔＲＮＡシンテターゼはメタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ２であり、ｔＲＮＡシンテターゼはメタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ３であり、ｔＲＮＡシンテターゼはメタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ３であり、ｔＲＮＡシンテターゼはメタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ４であり、ｔＲＮＡシンテターゼはメタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ５であり、ｔＲＮＡシンテターゼは、メタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。一部の実施形態では、ＮＴＴはＰｔＮＴＴ６であり、ｔＲＮＡシンテターゼはメタノコッカス・ヤンナスキイ、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／Ｂ．ステアロサーモフィルス、またはＭ．マゼイに由来する。

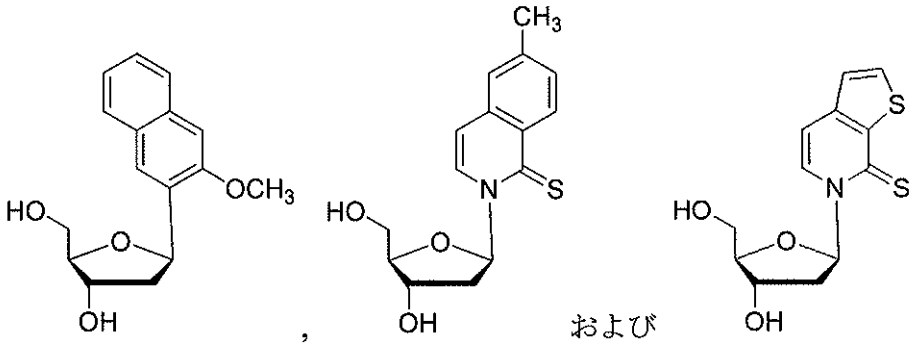
【０１１９】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートは、（ａ）ヌクレオチド三リン酸トランスポーターＰｔＮＴＴ２（全長タンパク質の最初の６５アミノ酸残基が欠失されている切断型変異体を含む）、（ｂ）所望のアミノ酸配列を有するＩＬ－１０変異体をコードし、第１の非天然ヌクレオチドおよび第２の非天然ヌクレオチドを含む非天然塩基対を含有する二本鎖オリゴヌクレオチドを含むプラスミドであって、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンなどの非天然アミノ酸が組み込まれる所望の位置でコドンを提供するプラスミド、（ｃ）Ｍ．マゼイに由来するｔＲＮＡをコードし、非天然ヌクレオチドを含むプラスミドであって、その天然配列の代わりに、認識されたアンチコドンを（ＩＬ－１０変異体のコドンに）提供するプラスミド、および（ｄ）ｔＲＮＡをコードする同じプラスミド、または異なるプラスミドであり得るＭ．バルケリ由来のピロリシルｔＲＮＡシンテターゼ（Ｍｂ ＰｙｌＲＳ）をコードするプラスミドを含む大腸菌などの細胞において製造される。一部の実施形態では、細胞は、１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むデオキシリボ三リン酸を

さらに補充される。一部の実施形態では、細胞は、１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むリボ三リン酸をさらに補充される。一部の実施形態では、細胞は、Ｎ６－（（２－アジドエトキシ）－カルボニル）－Ｌ－リジン（ＡｚＫ）、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンなどの１つまたはそれ以上の非天然アミノ酸をさらに補充される。一部の実施形態では、所望のＩＬ－１０変異体のアミノ酸配列をコードする二本鎖オリゴヌクレオチドは、例えば、配列番号１を有するタンパク質をコードする配列の６７、７０、７４、７５、７９、８２、８８、１２５、１２６、１２９、１３０、または１３２位でコドンＡＸＣを含み、Ｘは、ＮａＭなどの本明細書に開示されるような非天然ヌクレオチドである。一部の実施形態では、細胞は、さらに、その天然配列の代わりに、ＡＸＣ適合アンチコドンＧＹＴを含むＭ．マゼイ由来の直交性ｔＲＮＡ遺伝子をコードする、タンパク質発現プラスミドまたは別のプラスミドであり得るプラスミドを含み、Ｙは、相補的であり、コドン中の非天然ヌクレオチドと同じであるかまたは異なり得る、ＴＰＴ３などの、本明細書に開示される非天然ヌクレオチドである。一部の実施形態では、コドン中の非天然ヌクレオチドは、アンチコドン中の非天然ヌクレオチドとは異なり、それに対して相補的である。一部の実施形態では、コドン中の非天然ヌクレオチドは、アンチコドン中の非天然ヌクレオチドと同じである。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド中に非天然塩基対を含む第１および第２の非天然ヌクレオチドは、

【０１２０】

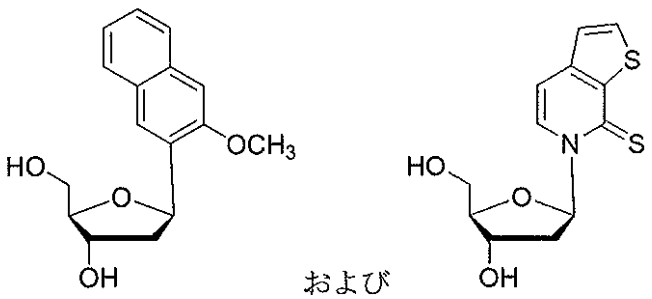
【化１】



に由来し得る。一部の実施形態では、二本鎖オリゴヌクレオチド中に非天然塩基対を含む第１および第２の非天然ヌクレオチドは、

【０１２１】

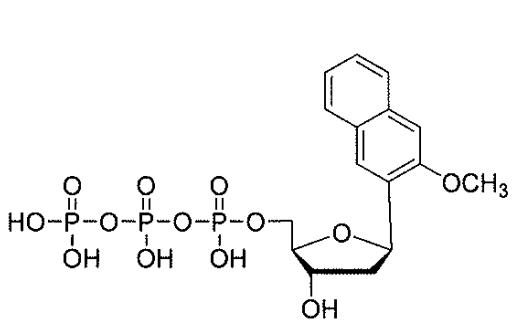
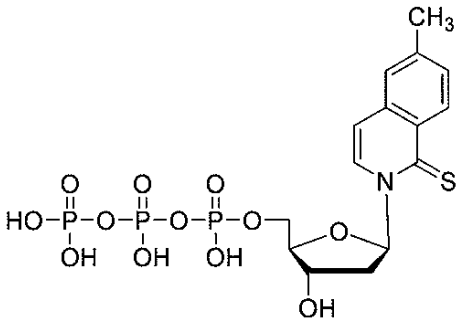
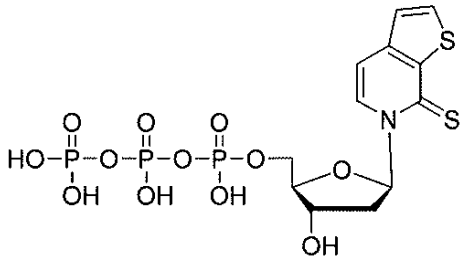
【化２】



に由来し得る。一部の実施形態では、第１および第２の非天然ヌクレオチドの三リン酸は、

【０１２２】

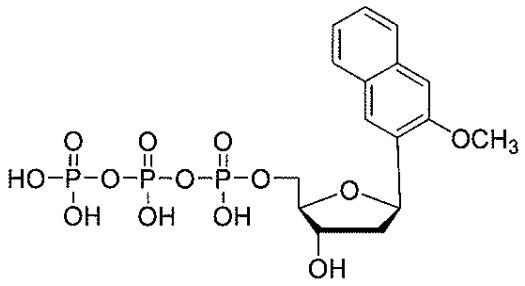
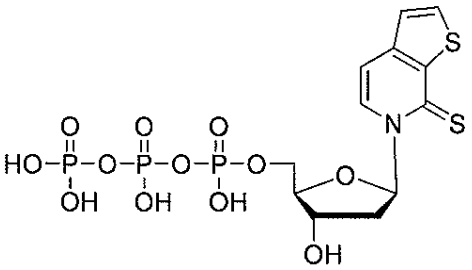
【化３】


,

および


またはその塩を含む。一部の実施形態では、第１および第２の非天然ヌクレオチドの三リン酸は、

【０１２３】

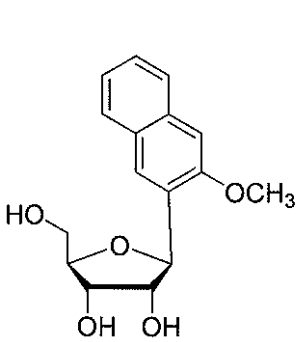
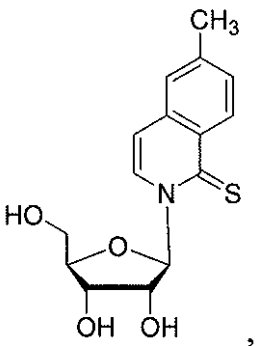
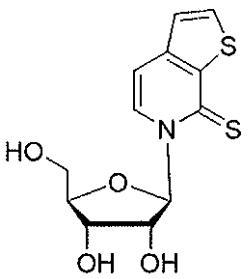
【化４】


,および


またはその塩を含む。一部の実施形態では、第１の非天然ヌクレオチドおよび第２の非天然ヌクレオチドを含む二本鎖オリゴヌクレオチドに由来するｍＲＮＡは、

【０１２４】

【化５】

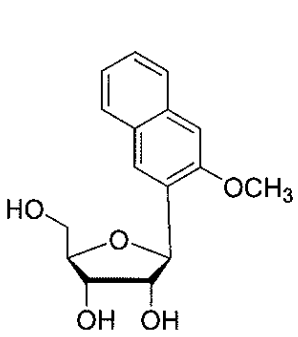

,

,および


に由来する非天然ヌクレオチドを含むコドンを含み得る。一部の実施形態では、Ｍ．マゼイｔＲＮＡは、ｍＲＮＡの非天然ヌクレオチドを含むコドンを認識する非天然ヌクレオチ

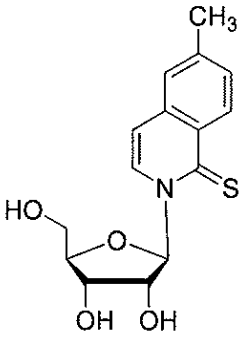
ドを含むアンチコドンを含み得る。Ｍ．マゼイｔＲＮＡ中のアンチコドンは、

【０１２５】

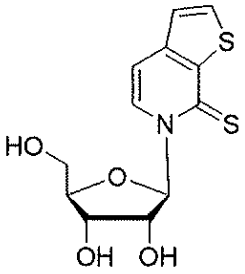
【化６】



,



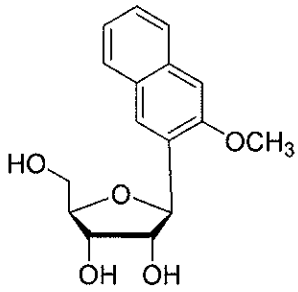
, および



に由来する非天然ヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、

【０１２６】

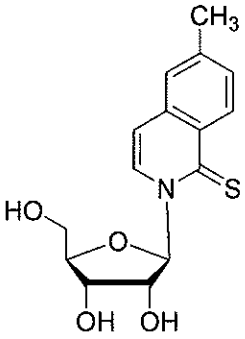
【化７】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、

【０１２７】

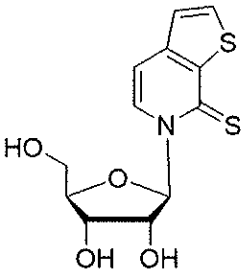
【化８】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、

【０１２８】

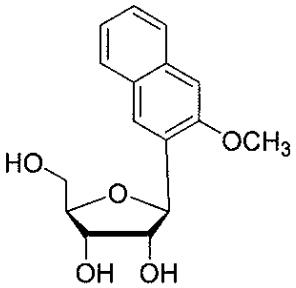
【化９】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｔＲＮＡは、

【０１２９】

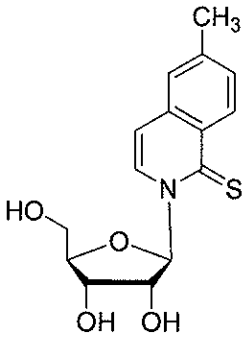
【化１０】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｔＲＮＡは、

【０１３０】

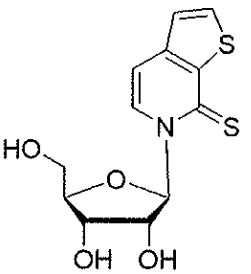
【化１１】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｔＲＮＡは、

【０１３１】

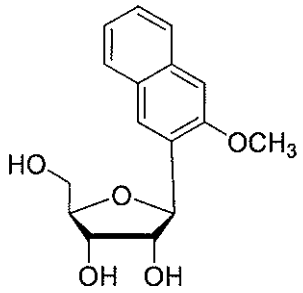
【化１２】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、

【０１３２】

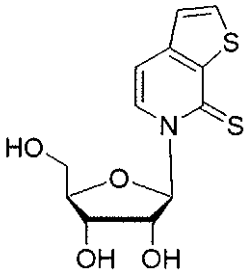
【化１３】



に由来する非天然ヌクレオチドを含み、ｔＲＮＡは、

【０１３３】

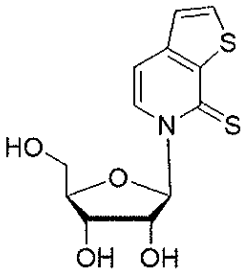
【化１４】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。一部の実施形態では、ｍＲＮＡは、

【０１３４】

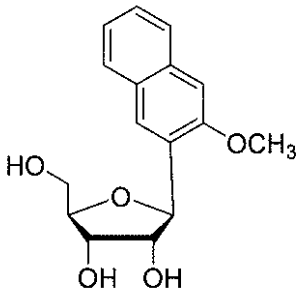
【化１５】



に由来する非天然ヌクレオチドを含み、ｔＲＮＡは、

【０１３５】

【化１６】



に由来する非天然ヌクレオチドを含む。宿主細胞は、適切な栄養を含有する培地中で培養され、（ａ）コドンを有するサイトカイン遺伝子をコードするプラスミド（単数または複数）の複製に必要とされる１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むデオキシリボヌクレオシドの三リン酸、（ｂ）（ｉ）サイトカインのコード配列に対応し、１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むコドンを含有するｍＲＮＡと、（ｉｉ）１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むアンチコドンを含有するｔＲＮＡとの転写に必要とされる１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むリボヌクレオシドの三リン酸、ならびに（ｃ）目的のサイトカインのポリペプチド配列に組み込まれる非天然アミノ酸（単数または複数）を補充される。次に、宿主細胞は、目的のタンパク質の発現を可能にする条件下で維持される。

【０１３６】

１つまたはそれ以上の非天然アミノ酸、ＡｚＫ、Ｎ６－（プロパルギルエトキシ）－Ｌ－リジン（ＰｒａＫ）、Ｎ６－（（（２－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、Ｎ６－（（（３－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジン、またはＮ６－（（（４－アジドベンジル）オキシ）カルボニル）－Ｌ－リジンを含む得られたタンパク質は、例えば、発現されるが、当業者に公知である方法によって精製され、次に、当業者に公知である条件下で、本明細書に開示される所望の平均分子量を有するＰＥＧ鎖を含むＤＢＣＯなどのアルキンと反応させることができ、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートを与える。Ｚｈａｎｇら、Ｎａｔｕｒｅ　２０１７年、５５１巻（７６８２号）：６４４～６４７頁；国際公開第ＷＯ２０１５１５７５５５号；国際公開第ＷＯ２０１５０２１４３２号；国際公開第ＷＯ２０１６１１５１６８号；国際公開第ＷＯ２０１７１０６７６７号；国際公開第ＷＯ２０１７２２３５２８号；国際公開第ＷＯ２０１９０１４２６２号；国際公開第ＷＯ２０１９０１４２６７号；国際公開第ＷＯ２０１９０２８４１９号；国際公開第ＷＯ２０１９／０２８４２５号に開示されるものなどの他の方法が当業者に公知である。

【０１３７】

あるいは、非天然アミノ酸（単数または複数）を含むサイトカイン（例えば、ＩＬ－１０）ポリペプチドは、ｔＲＮＡおよびアミノアシルｔＲＮＡシンテターゼを含み、１つまたはそれ以上のインフレーム直交性（終止）コドンを有する目的の核酸配列を含む、本明細書に記載される核酸構築物を宿主細胞に導入することによって製造される。宿主細胞は、適切な栄養を含有する培地中で培養され、（ａ）新しいコドンおよびアンチコドンを有するサイトカイン遺伝子をコードするプラスミド（単数または複数）の複製に必要とされる１つまたはそれ以上の非天然塩基を含むデオキシリボヌクレオシドの三リン酸、（ｂ）（ｉ）コドンを含有するサイトカイン配列と、（ｉｉ）アンチコドンを含有する直交性ｔＲＮＡとに対応するｍＲＮＡの転写に必要とされるリボヌクレオシドの三リン酸、ならびに（ｃ）非天然アミノ酸（単数または複数）を補充される。次に、目的のタンパク質の発現を可能にする条件下で、宿主細胞を維持する。非天然アミノ酸（単数または複数）は、非天然コドンに応答してポリペプチド鎖に組み込まれる。例えば、１つまたはそれ以上の非天然アミノ酸がサイトカイン（例えば、ＩＬ－１０）ポリペプチドに組み込まれる。あるいは、２つまたはそれ以上の非天然アミノ酸が、タンパク質中の２つまたはそれ以上の部位でサイトカイン（例えば、ＩＬ－１０）ポリペプチドに組み込まれる。

【０１３８】

一旦、非天然アミノ酸（単数または複数）を組み込んだサイトカイン（例えば、ＩＬ－１０）ポリペプチドが宿主細胞内に生成されると、それは、酵素的、化学的ならびに／または浸透圧溶解および物理的破壊を含む、当該技術分野において公知である種々の技術によって、宿主細胞から抽出することができる。サイトカイン（例えば、ＩＬ－１０）ポリペプチドは、分取イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、または当業者に公知である任意の他の適切な技術などの当該技術分野において公知である標準技術によって精製することができる。

【０１３９】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、天然に存在するシンテターゼによってＩＬ－１

０ポリペプチドに組み込まれる。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、１つまたはそれ以上のアミノ酸に栄養要求性である生物によってサイトカインに組み込まれる。一部の実施形態では、栄養要求性アミノ酸に対応するシンテターゼは、対応するｔＲＮＡに非天然アミノ酸を付加することができる。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、セレノシステイン、またはその誘導体である。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、セレノメチオニン、またはその誘導体である。一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、芳香族アミノ酸であり、芳香族アミノ酸は、ヨウ化物などのハロゲン化アリールを含む。実施形態では、非天然アミノ酸は、構造的に要求性栄養素アミノ酸に類似している。

【０１４０】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、図１に示された非天然アミノ酸を含む。

【０１４１】

いくつかの例では、非天然アミノ酸は、リジンもしくはフェニルアラニン誘導体または類似体を含む。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、リジン誘導体またはリジン類似体を含む。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、ピロリジン（Ｐｙｌ）を含む。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、フェニルアラニン誘導体またはフェニルアラニン類似体を含む。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、Ｗａｎら、「Ｐｙｒｒｏｌｙｓｙｌ－ｔＲＮＡ ｓｙｎｔｈｅｔａｓｅ： ａｎ ｏｒｄｉｎａｒｙ ｅｎｚｙｍｅ ｂｕｔ ａｎ ｏｕｔｓｔａｎｄｉｎｇ ｇｅｎｅｔｉｃ ｃｏｄｅ ｅｘｐａｎｓｉｏｎ ｔｏｏｌ」、Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １８４４巻（６号）：１０５９～４０７０頁（２０１４年）に記載される非天然アミノ酸である。いくつかの例では、非天然アミノ酸は、図２（例えば、図２Ａおよび図２Ｂ）に示される非天然アミノ酸を含む。

【０１４２】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、図３Ａ～図３Ｄに示される非天然アミノ酸を含む（Ｄｕｍａｓら、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ、２０１５年、６巻、５０～６９頁から採用される）。

【０１４３】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれた非天然アミノ酸は、米国特許第９，８４０，４９３号；米国特許第９，６８２，９３４号；米国特許出願公開第２０１７／０２６０１３７号；米国特許第９，９３８，５１６号；または米国特許出願公開第２０１８／００８６７３４号に開示される。このようなシンテターゼによって組み込まれる例示的なＵＡＡとしては、パラ－メチルアジド－Ｌ－フェニルアラニン、アラルキル、ヘテロシクリル、およびヘテロアラルキル、およびリジン誘導体の非天然アミノ酸が挙げられる。一部の実施形態では、このようなＵＡＡは、ピリジル、ピラジニル、ピラゾリル、トリアゾリル、オキサゾリル、チアゾリル、チオフェニル、または他の複素環を含む。一部の実施形態におけるこのようなアミノ酸は、アジド、テトラジン、または水溶性部分などのカップリングパートナーへのコンジュゲーションが可能な他の化学基を含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アルキルリンカーを介して芳香族部分に結合したアジドを含む。一部の実施形態では、アルキルリンカーは、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{10}$リンカーである。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アルキルリンカーを介して芳香族部分に結合したテトラジンを含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アミノ基を介して芳香族部分に結合したテトラジンを含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アルキルアミノ基を介して芳香族部分に結合したテトラジンを含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アルキル鎖を介してアミノ酸側鎖の末端窒素（例えば、リジン誘導体のＮ６、またはより短いアルキル側鎖を含む誘導体のＮ５、Ｎ４、もしくはＮ３）に結合したアジドを含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アルキル鎖を介してアミノ酸側鎖の末端窒素に結合したテトラジンを含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、アルキルリンカーを介してアミドに結合したアジドまたはテトラジンを含む。一部の実施形態では、ＵＡＡは、３－アミノアラニン、セリン、リジン、またはそれらの誘導体のアジドまたはテトラジン含有カルバメートまたはアミドである。一部の実施形態では、このようなＵＡＡは、インビボでサイトカインに組み込まれる。一部の実施形態では、このようなＵＡＡは、無細胞系においてサイトカインに組み込まれる。

【０１４４】
コンジュゲート化部分
特定の実施形態では、本明細書には、上述の１つまたはそれ以上の修飾されたＩＬ－１０ポリペプチドに結合されるコンジュゲート化部分が開示される。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０とその受容体との相互作用を撹乱する分子である。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０に結合した場合、ＩＬ－１０コンジュゲートが免疫応答を調節することを可能にする任意の分子である。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、共有結合を介してＩＬ－１０に結合される。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０は、トリアゾール基を有するコンジュゲート化部分に結合される。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０は、ジヒドロピリダジンまたはピリダジン基を有するコンジュゲート化部分に結合される。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、水溶性ポリマーを含む。他の例では、コンジュゲート化部分は、タンパク質またはその結合断片を含む。追加の例において、コンジュゲート化部分はペプチドを含む。追加の例において、コンジュゲート化部分は核酸を含む。追加の例において、コンジュゲート化部分は小分子を含む。追加の例において、コンジュゲート化部分は、バイオコンジュゲート（例えば、ＴＬＲアゴニスト、例えばＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、もしくはＴＬＲ９アゴニスト；または合成リガンド、例えばＰａｍ３Ｃｙｓ、ＣＦＡ、ＭＡＬＰ２、Ｐａｍ２Ｃｙｓ、ＦＳＬ－１、Ｈｉｂ－ＯＭＰＣ、ポリ　Ｉ：Ｃ、ポリＡ：Ｕ、ＡＧＰ、ＭＰＬ　Ａ、ＲＣ－５２９、ＭＤＦ２β、ＣＦＡ、もしくはフラジェリン）を含む。場合によっては、コンジュゲート化部分は、血清半減期を増加させ、および／または安定性を改善する。場合によっては、コンジュゲート化部分は、１つまたはそれ以上のサイトカイン受容体ドメインまたはサブユニットとのサイトカイン相互作用を減少させる。追加の場合において、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０と、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０ドメインもしくはサブユニットと、またはその同族受容体（単数または複数）との相互作用を遮断する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、複数のコンジュゲート化部分を含む。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０ポリペプチド中の非天然または天然アミノ酸に結合される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、天然アミノ酸に結合したコンジュゲート化部分を含む。一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、サイトカインペプチド中の非天然アミノ酸に結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０ポリペプチドのＮまたはＣ末端アミノ酸に結合される。種々の組み合わせ部位が本明細書に開示されており、例えば、第１のコンジュゲート化部分はＩＬ－１０ポリペプチド中の非天然または天然アミノ酸に結合され、第２のコンジュゲート化部分はＩＬ－１０ポリペプチドのＮまたはＣ末端アミノ酸に結合される。一部の実施形態では、単一のコンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０ポリペプチドの複数の残基（例えば、ステープル）に結合される。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０ポリペプチドのＮとＣ末端アミノ酸の両方に結合される。

【０１４５】
水溶性ポリマー
一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲート化部分は、水溶性ポリマーである。いくつかの例では、水溶性ポリマーは、非ペプチド性、非毒性、および生体適合性である。本明細書で使用される場合、生体組織（例えば、患者への投与）に関連する物質の単独での使用または他の物質（例えば、ＩＬ－１０部分などの活性剤）との使用に関連付けられる有益な効果が、臨床医、例えば、医師、毒性学者または臨床開発専門家によって評価されるような任意の有害な効果を上回る場合、物質は生体適合性とみなされる。いくつかの例では、水溶性ポリマーはさらに免疫原性ではない。いくつかの例では、物質は、インビボでの物質の意図された使用が望ましくない免疫応答（例えば、抗体の形成）を生じない場合、または免疫応答が生じた場合、このような応答が臨床医、例えば、医師、毒性学者、または臨床開発専門家によって評価されるように、臨床的に顕著または重要

であるとみなされない場合、非免疫原性とみなされる。

【０１４６】

いくつかの例では、水溶性ポリマーは、約２～約３００末端を有するものとして特徴付けられる。例示的な水溶性ポリマーは、限定されないが、ポリ（アルキレングリコール）、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）（「ＰＰＧ」）、エチレングリコールとプロピレングリコールなどのコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリアクリルアミド（ＰＡＡｍ）、ポリ（Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド）（ＰＨＰＭＡ）、ポリジメチルアクリルアミド（ＰＤＡＡｍ）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（「ＰＯＺ」）（国際公開第ＷＯ２００８／１０６１８６号に記載される）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、および前述のいずれかの組み合わせが含まれる。

【０１４７】

場合によっては、水溶性ポリマーは、特定の構造に限定されない。場合によっては、水溶性ポリマーは、直鎖状（例えば、末端がキャップされた、例えば、アルコキシＰＥＧまたは二官能性ＰＥＧ）、分枝状または多腕状（例えば、フォーク状ＰＥＧ、またはポリオールコアに結合したＰＥＧ）、樹枝状（または星状）構造であり、各々は、１つまたはそれ以上の分解性連結を有するか否かを問わない。さらに、水溶性ポリマーの内部構造は、任意の数の異なる繰り返しパターンで組織化することができ、ホモポリマー、交互共重合体、ランダム共重合体、ブロック共重合体、交互トリポリマー、ランダムトリポリマー、およびブロックトリポリマーからなる群から選択することができる。

【０１４８】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲート中の水溶性ポリマーの重量－平均分子量は、約１００ダルトン～約１５０，０００ダルトンである。例示的な範囲としては、例えば、５，０００ダルトン超～約１００，０００ダルトンの範囲、約６，０００ダルトン～約９，０００ダルトンの範囲、約１０，０００ダルトン～約８５，０００ダルトンの範囲、約１０，０００ダルトン超～約８５，０００ダルトンの範囲、約２０，０００ダルトン～約８５，０００ダルトンの範囲、約５３，０００ダルトン～約８５，０００ダルトンの範囲、約２５，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲、約２９，０００ダルトン～ら約１２０，０００ダルトンの範囲、約３５，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲、および約４０，０００ダルトン～約１２０，０００ダルトンの範囲の重量－平均分子量が挙げられる。

【０１４９】

水溶性ポリマーに関する例示的な重量－平均分子量には、約１００ダルトン、約２００ダルトン、約３００ダルトン、約４００ダルトン、約５００ダルトン、約６００ダルトン、約７００ダルトン、約７５０ダルトン、約８００ダルトン、約９００ダルトン、約１，０００ダルトン、約１，５００ダルトン、約２，０００ダルトン、約２，２００ダルトン、約２，５００ダルトン、約３，０００ダルトン、約４，０００ダルトン、約４，４００ダルトン、約４，５００ダルトン、約５，０００ダルトン、約５，５００ダルトン、約６，０００ダルトン、約７，０００ダルトン、約７，５００ダルトン、約８，０００ダルトン、約９，０００ダルトン、約１０，０００ダルトン、約１１，０００ダルトン、約１２，０００ダルトン、約１３，０００ダルトン、約１４，０００ダルトン、約１５，０００ダルトン、約２０，０００ダルトン、約２２，５００ダルトン、約２５，０００ダルトン、約３０，０００ダルトン、約３５，０００ダルトン、約４０，０００ダルトン、約４５，０００ダルトン、約５０，０００ダルトン、約５５，０００ダルトン、約６０，０００ダルトン、約６５，０００ダルトン、約７０，０００ダルトン、および約７５，０００ダルトンが含まれる。前述のいずれかの総分子量を有する水溶性ポリマー（例えば、２つの２０，０００ダルトンのポリマーで構成される分岐状４０，０００ダルトン水溶性ポリマー）の分岐状バージョンもまた使用することができる。１つまたはそれ以上の実施形態で

は、コンジュゲートは、約６，０００ダルトン未満の重量平均分子量を有するＰＥＧと直接的または間接的に結合した任意のＰＥＧ部分を有しない。

【０１５０】

ＰＥＧは、典型的には、多数の（OCH_2CH_2）モノマー［または（CH_2CH_2O）モノマー、ＰＥＧがどのように定義されるかに応じて］を含む。本明細書で使用される場合、繰り返し単位の数は、「（OCH_2CH_2）$_n$」の下付き文字「ｎ」によって同定される。したがって、（ｎ）の値は、典型的には、以下の範囲：２～約３４００、約１００～約２３００、約１００～約２２７０、約１３６～約２０５０、約２２５～約１９３０、約４５０～約１９３０、約１２００～約１９３０、約５６８～約２７２７、約６６０～約２７３０、約７９５～約２７３０、約９０９～約２７３０、および約１，２００～約１，９００の１つまたはそれ以上に含まれる。分子量が公知である任意の所与のポリマーについて、ポリマーの総重量－平均分子量を繰り返しモノマーの分子量で割ることによって、繰り返し単位の数（すなわち、「ｎ」）を決定することが可能である。

【０１５１】

いくつかの例では、水溶性ポリマーは、末端キャップポリマー、すなわち、比較的不活性な基、例えば、低級C_{1-6}アルコキシ基、またはヒドロキシル基でキャップされた少なくとも１つの末端を有するポリマーである。ポリマーがＰＥＧである場合、例えば、メトキシ－ＰＥＧ（一般的には、ｍＰＥＧと称される）を使用することができ、これは、ポリマーの一方の末端がメトキシ（－OCH_3）基であるＰＥＧの直鎖状形態であり、他方の末端は、ヒドロキシル、または場合により化学的に修飾される他の官能基である。

【０１５２】

一部の実施形態では、例示的な水溶性ポリマーとしては、限定されないが、Ｑｕａｎｔａ Ｂｉｏｄｅｓｉｇｎ，Ｌｔｄ．からの直鎖状または分枝状の別個のＰＥＧ（ｄＰＥＧ）；Ｎｅｋｔａｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓからの直鎖状、分枝状またはフォーク状のＰＥＧ；ＪｅｎＫｅｍ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙからの直鎖状、分枝状またはＹ字のＰＥＧ誘導体が挙げられる。

【０１５３】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、ポリ（アルキレングリコール）、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）（「ＰＰＧ」）、エチレングリコールとプロピレングリコール等のコポリマー、ポリ（オキシエチル化ポリオール）、ポリ（オレフィンアルコール）、ポリ（ビニルピロリドン）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリルアミド）、ポリ（ヒドロキシアルキルメタクリレート）、多糖、ポリ（α－ヒドロキシ酸）、ポリ（ビニルアルコール）（ＰＶＡ）、ポリアクリルアミド（ＰＡＡｍ）、ポリジメチルアクリルアミド（ＰＤＡＡｍ）、ポリ（Ｎ－（２－ヒドロキシプロピル）メタクリルアミド）（ＰＨＰＭＡ）、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン（「ＰＯＺ」）、ポリ（Ｎ－アクリロイルモルホリン）、およびそれらの組み合わせから選択される水溶性ポリマーにコンジュゲートされる。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＥＧ（例えば、ＰＥＧ化された）にコンジュゲートされる。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＰＧにコンジュゲートされる。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＯＺにコンジュゲートされる。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＶＰにコンジュゲートされる。

【０１５４】

いくつかの例では、水溶性ポリマーは、ポリグリセリン（ＰＧ）を含む。場合によっては、ポリグリセリンは、高分岐状ＰＧ（ＨＰＧ）（例えば、Ｉｍｒａｎら、「Ｉｎｆｌｕｅｎｃｅ ｏｆ ａｒｃｈｉｔｅｃｔｕｒｅ ｏｆ ｈｉｇｈ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｗｅｉｇｈｔ ｌｉｎｅａｒ ａｎｄ ｂｒａｎｃｈｅｄ ｐｏｌｙｇｌｙｃｅｒｏｌｓ ｏｎ ｔｈｅｉｒ ｂｉｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ ｂｉｏｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ」、Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ、３３巻：９１３５～９１４７頁（２０１２年）に記載される）である。他の場合には、ポリグリセリンは直鎖状ＰＧ（ＬＰＧ）である。追加の場合において、ポリグリセリンは、中機能性ＰＧ、直鎖状－ブロック－超分岐状ＰＧ（例え

ば、Ｗｕｒｍら、「Ｓｑｕａｒｉｃ ａｃｉｄ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ａ ｌｉｂｒａｒｙ ｏｆ ｌｉｎｅａｒ ａｎｄ ｈｙｐｅｒｂｒａｎｃｈｅｄ ｐｏｌｙ（ｇｌｙｃｅｒｏｌ）－ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」、Ｂｉｏｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅｓ、１３巻：１１６１～１１７１頁（２０１２年）に記載される）、または側鎖機能性ＰＧ（例えば、Ｌｉら、「Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ｏｆ ｌｉｎｅａｒ ｐｏｌｙｅｔｈｅｒ ｐｏｌｙｏｌ ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ ａｓ ｎｅｗ ｍａｔｅｒｉａｌｓ ｆｏｒ ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ」、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ.、２０巻：７８０～７８９頁（２００９年）に記載される）である。

【０１５５】

いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＧ、例えば、ＨＰＧ、ＬＰＧ、中機能性ＰＧ、直鎖状－ブロック－超分岐状ＰＧ、または側鎖機能性ＰＧにコンジュゲートされる。

【０１５６】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、分解性の合成ＰＥＧ代替物である。代表的な分解性の合成ＰＥＧ代替物としては、限定されないが、ポリ［オリゴ（エチレングリコール）メチルメタクリレート］（ＰＯＥＧＭＡ）；テレケリックまたは二末端官能化ＰＥＧベースのマクロモノマーの重合によって生じる骨格修飾されたＰＥＧ誘導体；ポリ［（エチレンオキシド）－ｃｏ－（メチレンエチレンオキシド）］［Ｐ（ＥＯ－ｃｏ－ＭＥＯ）］などの分解性連結を含むコモノマーを含むＰＥＧ誘導体、ＯＥＧＭＡと共重合された５，６－ベンゾ－２－メチレン－１，３－ジオキセパン（ＢＭＤＯ）、２－メチレン－１，３－ジオキセパン（ＭＤＯ）、および２－メチレン－４－フェニル－１，３－ジオキソラン（ＭＰＤＬ）などの環状ケテンアセタール；ポリ－（ε－カプロラクトン）－グラフト－ポリ（エチレンオキシド）（ＰＣＬ－ｇ－ＰＥＯ）が挙げられる。

【０１５７】

いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、分解性の合成ＰＥＧ代替物、例えば、ＰＯＥＧＭ；テレケリックまたは二末端官能化ＰＥＧベースのマクロモノマーの重合により生じる骨格修飾されたＰＥＧ誘導体；Ｐ（ＥＯ－ｃｏ－ＭＥＯ）；ＯＥＧＭＡと共重合されるＢＭＤＯ、ＭＤＯおよびＭＰＤＬなどの環状ケテンアセタール；またはＰＣＬ－ｇ－ＰＥＯにコンジュゲートされる。

【０１５８】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリ（双性イオン）を含む。例示的なポリ（双性イオン）としては、限定されないが、ポリ（スルホベタインメタクリレート）（ＰＳＢＭＡ）、ポリ（カルボキシベタインメタクリレート）（ＰＣＢＭＡ）、およびポリ（２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン）（ＰＭＰＣ）が挙げられる。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＳＢＭＡ、ＰＣＢＭＡ、またはＰＭＰＣなどのポリ（双性イオン）にコンジュゲートされる。

【０１５９】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリカーボネートを含む。例示的なポリカーボネートとしては、限定されないが、ペンタフルオロフェニル５－メチル－２－オキソ－１，３－ジオキサン－５－カルボン酸塩（ＭＴＣ－ＯＣ$_6$Ｆ$_5$）が挙げられる。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、ＭＴＣ－ＯＣ$_6$Ｆ$_5$などのポリカーボネートにコンジュゲートされる。

【０１６０】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーには、ポリマーハイブリッド、例えば、ポリカーボネート／ＰＥＧポリマーハイブリッド、ペプチド／タンパク質－ポリマーコンジュゲート、またはヒドロキシル含有および／もしくは双性イオン誘導体化ポリマー（例えば、ヒドロキシル含有および／もしくは双性イオン誘導体化ＰＥＧポリマー）が含まれる。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、ポリマーハイブリッド、例えば、ポリカーボネート／ＰＥＧポリマーハイブリッド、ペプチド／タンパク質－ポ

リマーコンジュゲート、またはヒドロキシル含有および／もしくは双性イオン誘導体化ポリマー（例えば、ヒドロキシル含有および／もしくは双性イオン誘導体化ＰＥＧポリマー）にコンジュゲートされる。

【０１６１】

いくつかの例では、水溶性ポリマーは、多糖を含む。例示的な多糖には、限定されないが、デキストラン、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸（ＨＡ）、アミロース、ヘパリン、ヘパラン硫酸（ＨＳ）、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）が挙げられる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは多糖にコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドはデキストランにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドはＰＳＡにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＨＡにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、アミロースにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ヘパリンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＨＳにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、デキストリンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＨＥＳにコンジュゲートされる。

【０１６２】

場合によっては、水溶性ポリマーは、グリカンを含む。例示的な種類のグリカンとしては、Ｎ－連結型グリカン、Ｏ－連結型グリカン、糖脂質、Ｏ－ＧｌｃＮＡｃ、およびグリコサミノグリカンが挙げられる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、グリカンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｎ－連結型グリカンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｏ－連結型グリカンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、糖脂質にコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、Ｏ－ＧｌｃＮＡｃにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、グリコサミノグリカンにコンジュゲートされる。

【０１６３】

一部の実施形態では、水溶性ポリマーは、ポリオキサゾリンポリマーを含む。ポリオキサゾリンポリマーは、直鎖状合成ポリマーであり、ＰＥＧと同様に、低多分散性を含む。いくつかの例では、ポリオキサゾリンポリマーは、平均分子量で特徴付けられる多分散性ポリオキサゾリンポリマーである。場合によっては、ポリオキサゾリンポリマーの平均分子量には、例えば、１０００、１５００、２０００、２５００、３０００、３５００、４０００、４５００、５０００、５５００、６０００、６５００、７０００、７５００、８０００、１０，０００、１２，０００、２０，０００、３５，０００、４０，０００、５０，０００、６０，０００、１００，０００、２００，０００、３００，０００、４００，０００、または５００，０００Ｄａが含まれる。いくつかの例では、ポリオキサゾリンポリマーは、ポリ（２－メチル２－オキサゾリン）（ＰＭＯＺ）、ポリ（２－エチル２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）、またはポリ（２－プロピル２－オキサゾリン）（ＰＰＯＺ）を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ポリオキサゾリンポリマーにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＭＯＺにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＥＯＺにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＰＯＺにコンジュゲートされる。

【０１６４】

いくつかの例では、水溶性ポリマーは、ポリアクリル酸ポリマーを含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ポリアクリル酸ポリマーにコンジュゲートされる。

【０１６５】

いくつかの例では、水溶性ポリマーは、ポリアミンを含む。ポリアミンは、２つ以上の第一級アミノ基を含む有機ポリマーである。一部の実施形態では、ポリアミンは、分枝状ポリアミン、直鎖状ポリアミン、または環状ポリアミンを含む。場合によっては、ポリアミンは、低分子量直鎖状ポリアミンである。例示的なポリアミンとしては、プトレシン、

カダベリン、スペルミジン、スペルミン、エチレンジアミン、１，３－ジアミノプロパン、ヘキサメチレンジアミン、テトラエチルメチレンジアミン、およびピペラジンが挙げられる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ポリアミンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、プトレシン、カダベリン、スペルミジン、スペルミン、エチレンジアミン、１，３－ジアミノプロパン、ヘキサメチレンジアミン、テトラエチルメチレンジアミン、またはピペラジンにコンジュゲートされる。

【０１６６】

いくつかの例では、水溶性ポリマーが米国特許第７，７４４，８６１号、第８，２７３，８３３号、および第７，８０３，７７７号に記載される。いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、米国特許第７，７４４，８６１号、第８，２７３，８３３号、または第７，８０３，７７７号に記載されるリンカーにコンジュゲートされる。

【０１６７】

脂質

一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲート化部分は、脂質である。いくつかの例では、脂質は脂肪酸である。場合によっては、脂肪酸は飽和脂肪酸である。他の場合には、脂肪酸は不飽和脂肪酸である。例示的な脂肪酸には、限定されないが、約６～約２６個の炭素原子、約６～約２４個の炭素原子、約６～約２２個の炭素原子、約６～約２０個の炭素原子、約６～約１８個の炭素原子、約２０～約２６個の炭素原子、約１２～約２６個の炭素原子、約１２～約２４個の炭素原子、約１２～約２２個の炭素原子、約１２～約２０個の炭素原子、または約１２～約１８個の炭素原子を含む脂肪酸が含まれる。場合によっては、脂質は、１つまたはそれ以上の血清タンパク質に結合し、それによって血清の安定性および／または血清半減期を増加させる。

【０１６８】

一部の実施形態では、脂質は、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドにコンジュゲートされる。いくつかの例では、脂質は、脂肪酸、例えば、飽和脂肪酸または不飽和脂肪酸である。場合によっては、脂肪酸は、約６～約２６個の炭素原子、約６～約２４個の炭素原子、約６～約２２個の炭素原子、約６～約２０個の炭素原子、約６～約１８個の炭素原子、約２０～約２６個の炭素原子、約１２～約２６個の炭素原子、約１２～約２４個の炭素原子、約１２～約２２個の炭素原子、約１２～約２０個の炭素原子、または約１２～約１８個の炭素原子である。場合によっては、脂肪酸は、長さが約６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、または２６個である炭素原子を含む。場合によっては、脂肪酸は、カプロン酸（ヘキサン酸）、エナント酸（ヘプタン酸）、カプリル酸（オクタン酸）、ペラルゴン酸（ノナン酸）、カプリン酸（デカン酸）、ウンデシル酸（ウンデカン酸）、ラウリン酸（ドデカン酸）、トリデシル酸（トリデカン酸）、ミリスチン酸（テトラデカン酸）、ペンタデシル酸（ペンタデカン酸）、パルミチン酸（ヘキサデカン酸）、マルガリン酸（ヘプタデカン酸）、ステアリン酸（オクタデカン酸）、ノナデシル酸（ノナデカン酸）、アラキジン酸（エイコサン酸）、ヘネイコシル酸（ヘネイコサン酸）、ベヘン酸（ドコサン酸）、トリコシル酸（トリコサン酸）、リグノセリン酸（テトラコサン酸）、ペンタコシル酸（ペンタコサン酸）、またはセロチン酸（ヘキサコサン酸）が含まれる。

【０１６９】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０脂質コンジュゲートは、血清安定性および／または血清半減期を増大させる。

【０１７０】

タンパク質

一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲート化部分は、タンパク質またはその結合断片である。例示的なタンパク質としては、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスチレチンが挙げられる。いくつかの例では、タンパク質またはその結合断片は、抗体またはその結合断片を含む。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、タンパク質またはその結合断片を含む。場合によっては、タンパク質またはその結合断片

を含むＩＬ－１０コンジュゲートは、増加した血清半減期および／または安定性を有する。場合によっては、タンパク質またはその結合断片を含むＩＬ－１０コンジュゲートは、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０Ｒサブユニットとの減少したＩＬ－１０相互作用を有する。追加の場合において、タンパク質またはその結合断片は、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０Ｒサブユニットとの ＩＬ－１０相互作用を遮断する。

【０１７１】

一部の実施形態では、コンジュゲート化部分はアルブミンである。アルブミンは、水溶性球状タンパク質のファミリーである。血漿中によく見られ、全血漿タンパク質の約５５～６０％を占める。ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）は、３次構造が３つのドメイン、ドメインＩ（アミノ酸残基１～１９５）、ドメインＩＩ（アミノ酸残基１９６～３８３）、およびドメインＩＩＩ（アミノ酸残基３８４～５８５）に分割される５８５アミノ酸ポリペプチドである。各ドメインは、さらに、長鎖および中鎖脂肪酸、ビリルビン、もしくはヘミンなどの内因性リガンド、または複素環化合物もしくは芳香族化合物などの外因性化合物と可逆的または不可逆的に相互作用し得る結合部位を含む。

【０１７２】

場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、アルブミンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）にコンジュゲートされる。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、アルブミンの機能的断片にコンジュゲートされる。

【０１７３】

一部の実施形態では、コンジュゲート化部分はトランスフェリンである。トランスフェリンは、大きさが約８０ｋＤａである６７９アミノ酸ポリペプチドであり、一方がＮ末端ドメインに、他方がＣ末端ドメインにある２つのFe^{3+}結合部位を含む。いくつかの例では、ヒトトランスフェリンは、約７～１２日の半減期を有する。

【０１７４】

いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、トランスフェリンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ヒトトランスフェリンにコンジュゲートされる。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、トランスフェリンの機能的断片にコンジュゲートされる。

【０１７５】

一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、トランスチレチン（ＴＴＲ）である。トランスサイレチンは、血清および脳脊髄液に局在する輸送タンパク質であり、甲状腺ホルモンチロキシン（T_4）、およびレチノールに結合したレチノール結合タンパク質を輸送する。

【０１７６】

いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、（その末端の１つを介して、または内部ヒンジ領域を介して）トランスチレチンにコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、トランスチレチンの機能的断片にコンジュゲートされる。

【０１７７】

一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、抗体、またはその結合断片である。いくつかの例では、抗体またはその結合断片は、ヒト化抗体もしくはその結合断片、マウス抗体もしくはその結合断片、キメラ抗体もしくはその結合断片、モノクローナル抗体もしくはその結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Fab_2、$F(ab)'_3$断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ビス－ｓｃＦｖ、$(scFv)_2$、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、トリアボディ、テトラボディ、ヒューマボディ、ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（ｄｓＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＩｇＮＡＲ、ラクダ抗体もしくはその結合断片、二重特異性抗体もしくはその結合断片、またはその化学的に修飾された誘導体を含む。

【０１７８】

いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、ｓｃＦｖ、ビス－ｓｃＦｖ、$(scFv)_2$、ｄｓＦｖ、またはｓｄＡｂを含む。場合によっては、コンジュゲート化部分はｓｃ

Ｆｖを含む。場合によっては、コンジュゲート化部分はビス－ｓｃＦｖを含む。場合によっては、コンジュゲート化部分は（ｓｃＦｖ）$_2$を含む。場合によっては、コンジュゲート化部分はｄｓＦｖを含む。場合によっては、コンジュゲート化部分はｓｄＡｂを含む。

【０１７９】

いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、抗体のＦｃ部分、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ、またはＩｇＤのＦｃ部分を含む。いくつかの例では、部分は、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_3$、またはＩｇＧ$_4$）のＦｃ部分を含む。

【０１８０】

場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、抗体またはその結合断片にコンジュゲートされる。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ヒト化抗体もしくはその結合断片、マウス抗体もしくはその結合断片、キメラ抗体もしくはその結合断片、モノクローナル抗体もしくはその結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ$_2$、Ｆ（ａｂ）’$_3$断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ビス－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）$_2$、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、トリアボディ、テトラボディ、ヒューマボディ、ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（ｄｓＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＩｇＮＡＲ、ラクダ抗体もしくはその結合断片、二重特異性抗体もしくはその結合断片、またはその化学的に修飾された誘導体にコンジュゲートされる。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、抗体のＦｃ部分にコンジュゲートされる。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_3$、またはＩｇＧ$_4$）のＦｃ部分にコンジュゲートされる。

【０１８１】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、水溶性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）および抗体またはその結合断片にコンジュゲートされる。場合によっては、抗体またはその結合断片は、ヒト化抗体もしくはその結合断片、マウス抗体もしくはその結合断片、キメラ抗体もしくはその結合断片、モノクローナル抗体もしくはその結合断片、一価Ｆａｂ’、二価Ｆａｂ$_2$、Ｆ（ａｂ）’$_3$断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、ビス－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）$_2$、ダイアボディ、ミニボディ、ナノボディ、トリアボディ、テトラボディ、ヒューマボディ、ジスルフィド安定化Ｆｖタンパク質（ｄｓＦｖ）、単一ドメイン抗体（ｓｄＡｂ）、ＩｇＮＡＲ、ラクダ抗体もしくはその結合断片、二重特異性抗体もしくはその結合断片、またはその化学的に修飾された誘導体を含む。場合によっては、抗体またはその結合断片は、ｓｃＦｖ、ビス－ｓｃＦｖ、（ｓｃＦｖ）$_2$、ｄｓＦｖ、またはｓｄＡｂを含む。場合によっては、抗体またはその結合断片は、ｓｃＦｖを含む。場合によっては、抗体またはその結合断片は、ＩＬ－１０コンジュゲートを目的の標的細胞に導き、水溶性ポリマーは安定性および／または血清半減期を増加させる。

【０１８２】

いくつかの例では、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０ポリペプチド－水溶性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）コンジュゲートは、抗体またはその結合断片にさらに結合される。いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲート対抗体の比は、約１：１、２：１、３：１、４：１、５：１、６：１、７：１、８：１、９：１、１０：１、１１：１または１２：１である。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲート対抗体の比は、約１：１である。他の場合には、ＩＬ－１０コンジュゲート対抗体の比は、約２：１、３：１、または４：１である。追加の場合において、ＩＬ－１０コンジュゲート対抗体の比は、約６：１以上である。

【０１８３】

一部の実施形態では、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０ポリペプチド－水溶性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）コンジュゲートは、抗体またはその結合断片に直接結合される。他の例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、リンカーを用いて、抗体またはその結合断片に間接的に結合される。例示的なリンカーとしては、ホモ二官能性リンカー、ヘテロ二官能性リンカー、マレイミド系リンカー、ゼロトレースリンカー、自己不浸透性リンカー、スペーサーなどが挙げられる。

【０１８４】
一部の実施形態では、抗体またはその結合断片は、ＩＬ－１０ポリペプチド－水溶性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）コンジュゲートのＩＬ－１０ポリペプチド部分に直接的または間接的に結合される。このような場合、ＩＬ－１０ポリペプチドへの抗体のコンジュゲーション部位は、ＩＬ－１０ポリペプチドとＩＬ－１０Ｒとの結合を妨げない部位にある。追加の場合において、ＩＬ－１０ポリペプチドへの抗体のコンジュゲーション部位は、ＩＬ－１０ポリペプチドのＩＬ－１０Ｒとの結合を部分的に遮断する部位にある。他の実施形態では、抗体またはその結合断片は、ＩＬ－１０ポリペプチド－水溶性ポリマー（例えば、ＰＥＧ）コンジュゲートの水溶性ポリマー部分に直接的または間接的に結合される。
【０１８５】
ペプチド
一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲート化部分は、ペプチドである。いくつかの例では、ペプチドは、非構造化ペプチドである。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ペプチドにコンジュゲートされる。場合によっては、ペプチドを含むＩＬ－１０コンジュゲートは、増加した血清半減期および／または安定性を有する。場合によっては、ペプチドを含むＩＬ－１０コンジュゲートは、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０Ｒサブユニットとの減少したＩＬ－１０相互作用を有する。追加の場合において、ペプチドは、１つまたはそれ以上のＩＬ－１０ＲサブユニットとのｌＬ－１０相互作用を遮断する。
【０１８６】
いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、ＸＴＥＮ（商標）ペプチド（Ａｍｕｎｉｘ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｉｎｃ．）であり、修飾は、ＸＴＥＮイル化と呼ばれる。ＸＴＥＮイル化は、目的のポリペプチドをコードする核酸と、ＸＴＥＮ（商標）ペプチド（Ａｍｕｎｉｘ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｉｎｃ．）をコードする核酸との遺伝的融合であり、６つのアミノ酸：Ａｌａ、Ｇｌｕ、Ｇｌｙ、Ｓｅｒ、およびＴｈｒの異なるパーセンテージを含む長い非構造化親水性ペプチドである。いくつかの例では、ＸＴＥＮ（商標）ペプチドは、目的のポリペプチドと組み合わせて、発現、遺伝的安定性、溶解性、凝集抵抗性、増大した半減期、増加された効力、および／または増加したインビトロ活性などの特性に基づいて選択される。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＸＴＥＮペプチドにコンジュゲートされる。
【０１８７】
いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、グリジンに富むホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）であり、修飾は、ＨＡＰイル化と呼ばれる。ＨＡＰイル化は、目的とするポリペプチドをコードする核酸と、グリジンに富むホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）をコードする核酸との遺伝的融合である。いくつかの例では、ＨＡＰポリマーは、（Gly_4Ser）$_n$反復モチーフ（配列番号３）を含み、時には、長さは約５０、１００、１５０、２００、２５０、３００、またはそれ以上の残基である。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＨＡＰにコンジュゲートされる。
【０１８８】
一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、ＰＡＳポリペプチドであり、修飾はＰＡＳイル化と呼ばれる。ＰＡＳイル化は、目的のポリペプチドをコードする核酸とＰＡＳポリペプチドをコードする核酸との遺伝的融合である。ＰＡＳポリペプチドは、Ｐｒｏ、ＡｌａおよびＳｅｒ残基からなる親水性の非荷電ポリペプチドである。いくつかの例では、ＰＡＳポリペプチドの長さは、少なくとも約１００、２００、３００、４００、５００または６００アミノ酸である。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＰＡＳポリペプチドにコンジュゲートされる。
【０１８９】
一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）であり、修飾は、ＥＬＰイル化と呼ばれる。ＥＬＰイル化は、目的とするポリペプチドをコードする核酸と、エラスチン様ポリペプチド（ＥＬＰ）をコードする核酸との遺伝的融

合である。ＥＬＰは、ｘがプロリンを除く任意のアミノ酸であるＶＰＧｘＧ反復モチーフ（配列番号４）を含む。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＥＬＰにコンジュゲートされる。

【０１９０】

一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は、ＣＴＰペプチドである。ＣＴＰペプチドは、３１アミノ酸残基ペプチドＦＱＳＳＳＳ＊ＫＡＰＰＰＳ＊ＬＰＳＰＳ＊ＲＬＰＳＧＰＳ＊ＤＴＰＩＬＰＱ（配列番号５）を含み、Ｓ＊はＯ－グリコシル化部位（ＯＰＫＯ）を示す。いくつかの例では、ＣＴＰペプチドは、ＩＬ－１０ポリペプチドに遺伝的に融合される。場合によっては、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ＣＴＰペプチドにコンジュゲートされる。

【０１９１】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。グルタミル化（またはポリグルタミル化）は、グルタミン酸の可逆的翻訳後修飾であり、グルタミン酸のγ－カルボキシ基が、遊離グルタミン酸のアミノ基とペプチド様結合を形成し、α－カルボキシ基がポリグルタミン酸鎖に伸長する。

【０１９２】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、ゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）ポリマーによって修飾される。いくつかの例では、ＧＬＫポリマーは、Ｇｌｙ－Ｘａａ－Ｙａａの複数の反復を含み、ＸａａおよびＹａａは、それぞれ、主にプロリンおよび４－ヒドロキシプロリンを含む。場合によっては、ＧＬＫポリマーは、アミノ酸残基Ｐｒｏ、Ｇｌｙ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ、Ａｓｎ、Ｓｅｒ、およびＬｙｓをさらに含む。場合によっては、ＧＬＫポリマーの長さは、約２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、１１０、１２０、１５０残基またはそれ以上である。

【０１９３】

追加のコンジュゲート化部分

いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、細胞外バイオマーカーを含む。いくつかの例では、細胞外バイオマーカーは、腫瘍抗原である。いくつかの例では、例示的な細胞外バイオマーカーとしては、ＣＤ１９、ＰＳＭＡ、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ６、ＣＤ７０、ＣＥＡ、ＣＳＰＧ４、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥｐｈＡ３、ＥｐＣＡＭ、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ２）、ＦＡＰ、ＦＲα、ＧＤ２、ＧＤ３、ルイス－Ｙ、メソテリン、Ｍｕｃ１、Ｍｕｃ１６、ＲＯＲ１、ＴＡＧ７２、ＶＥＧＦＲ２、ＣＤ１１、Ｇｒ－１、ＣＤ２０４、ＣＤ１６、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８、およびＢ２２０が挙げられる。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、ＩＬ－１０に結合させるかまたはコンジュゲートする。場合によっては、コンジュゲート化部分は、例えば、ＩＬ－１０のＮ末端またはＣ末端で遺伝的に融合される。

【０１９４】

いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、翻訳後修飾からの分子を含む。いくつかの例では、翻訳後修飾の例には、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化（またはプレニル化）（例えば、ファルネシル化またはゲラニルゲラニル化）、グリピル化、アシル化（例えば、Ｏ－アシル化、Ｎ－アシル化、Ｓ－アシル化）、アルキル化（例えば、メチルまたはエチル基などのアルキル基の付加）、アミド化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、ヌクレオチド付加、酸化、リン酸化、スクシニル化、硫酸化、糖化、カルバミル化、グルタミル化、または脱アミド化が含まれる。いくつかの例では、ＩＬ－１０は、ミリストイル化、パルミトイル化、イソプレニル化（またはプレニル化）（例えば、ファルネシル化またはゲラニルゲラニル化）、グリピル化、アシル化（例えば、Ｏ－アシル化、Ｎ－アシル化、Ｓ－アシル化）、アルキル化（例えば、メチルまたはエチル基などのアルキル基の付加）、アミド化、グリコシル化、ヒドロキシル化、ヨード化、ヌクレオチド付加、酸化、リン酸化、スクシニル化、硫酸化、糖化、カルバミル化、グルタミル化、または脱アミド化などの翻訳後修飾によって修飾される。

【０１９５】

コンジュゲーション
リンカー
一部の実施形態では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドにコンジュゲート化部分をコンジュゲートまたは結合させるための有用な官能性反応基は、例えば、ゼロまたは高次リンカーを含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるインターロイキンに組み込まれた非天然アミノ酸は、官能性反応基を含む。いくつかの例では、リンカーは、本明細書に記載されるインターロイキンに組み込まれた非天然アミノ酸と反応する官能反応性基を含む。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、本明細書に記載されるインターロイキンに組み込まれた非天然アミノ酸と反応する官能反応基を含む。いくつかの例では、コンジュゲート化部分は、本明細書に記載されるリンカー（場合により、サイトカインペプチドに予め結合している）と反応する官能性反応基を含む。一部の実施形態では、リンカーは、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチド中の天然アミノ酸と反応する反応基を含む。場合によっては、高次リンカーは、ホモ二官能性リンカーまたはヘテロ二官能性リンカーなどの二官能性リンカーを含む。例示的なホモ二官能性リンカーとしては、限定はされないが、Ｌｏｍａｎｔ試薬ジチオビス（プロピオン酸スクシンイミジル）ＤＳＰ、３’３’－ジチオビス（プロピオン酸スルホスクシンイミジル）（ＤＴＳＳＰ）、スベリン酸ジスクシンイミジル（ＤＳＳ）、スベリン酸ビス（スルホスクシンイミジル）（ＢＳ）、酒石酸ジスクシンイミジル（ＤＳＴ）、酒石酸ジスルホスクシンイミジル（スルホＤＳＴ）、エチレングリコビス（コハク酸スクシンイミジル）（ＥＧＳ）、炭酸ジスクシンイミジル（ＤＳＧ）、炭酸Ｎ，Ｎ’－ジスクシンイミジル（ＤＳＣ）、アジピン酸ジメチル（ＤＭＡ）、ピメリミジン酸ジメチル（ＤＭＰ）、スベリミン酸ジメチル（ＤＭＳ）、ジメチル－３，３’－ジチオビスプロピオンイミデート（ＤＴＢＰ）、１，４－ジ－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド）ブタン（ＤＰＤＰＢ）、ビスマレイミドヘキサン（ＢＭＨ）、ハロゲン化アリール含有化合物（ＤＦＤＮＢ）、例えば、１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンもしくは１，３－ジフルオロ－４，６－ジニトロベンゼン、４，４’－ジフルオロ－３，３’－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）、ビス－［β－（４－アジドサリチルアミド））エチル］ジスルフィド（ＢＡＳＥＤ）、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、１，４－ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、ｏ－トルイジン、３，３’－ジメチルベンジジン、ベンジジン、α，α’－ｐ－ジアミノジフェニル、ジヨード－ｐ－キシレンスルホン酸、Ｎ，Ｎ’－エチレン－ビス（ヨードアセトアミド）、またはＮ，Ｎ’－ヘキサメチレン－ビス（ヨードアセトアミド）が挙げられる。

【０１９６】
一部の実施形態では、二官能性リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。例示的なヘテロ二官能性リンカーには、限定されないが、アミン反応性およびスルフヒドリル架橋リンカー、例えば、プロピオン酸Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）（ｓＰＤＰ）、プロピオン酸長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）（ＬＣ－ｓＰＤＰ）、プロピオン酸水溶性長鎖Ｎ－スクシンイミジル３－（２－ピリジルジチオ）（スルホ－ＬＣ－ｓＰＤＰ）、スクシンイミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ｓＭＰＴ）、スルホスクシンイミジル－６－［α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルアミド］ヘキサノエート（スルホ－ＬＣ－ｓＭＰＴ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、スルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢｓ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＭＢｓ）、Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノ安息香酸塩（ｓＩＡＢ）、スルホスクシンイミジル（４－ヨードアセチル）アミノ安息香酸塩（スルホ－ｓＩＡＢ）、スクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（ｓＭＰＢ）、スルホスクシンイミジル－４－（ｐ－マレイミドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＭＰＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）

スクシンイミドエステル（ＧＭＢ）、Ｎ－（γ－マレイミドブチリルオキシ）スルホスクシンイミドエステル（スルホ－ＧＭＢ）、スクシンイミジル６－（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＸ）、スクシンイミジル６－［６－（（（ヨードアセチル）アミノ）ヘキサノイル）アミノ］ヘキサノエート（ｓＩＡＸＸ）、スクシンイミジル４－（（（（ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＩＡＣ）、スクシンイミジル６－（（（（４－ヨードアセチル）アミノ）メチル）シクロヘキサン－１－カルボニル）アミノ）ヘキサノエート（ｓＩＡＣＸ）、ｐ－ニトロフェニルヨードアセテート（ＮＰＩＡ）、カルボニル反応性およびスルフヒドリル反応性架橋リンカー、例えば、４－（４－Ｎ－マレイミドフェニル）ブタン酸ヒドラジド（ＭＰＢＨ）、４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシル－ヒドラジド－８（M_2C_2H）、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオニルヒドラジド（ＰＤＰＨ）、アミン反応性および光反応性架橋リンカー、例えば、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（ＮＨｓ－ＡｓＡ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドサリチル酸（スルホ－ＮＨｓ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－（４－アジドサリチルアミド）ヘキサノエート（スルホ－ＮＨｓ－ＬＣ－ＡｓＡ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｐ－アジドサリチルアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡｓＤ）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（ＨｓＡＢ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミジル－４－アジドベンゾエート（スルホ－ＨｓＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（ｓＡＮＰＡＨ）、スルホスクシンイミジル－６－（４’－アジド－２’－ニトロフェニルアミノ）ヘキサノエート（スルホ－ｓＡＮＰＡＨ）、Ｎ－５－アジド－２－ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド（ＡＮＢ－ＮＯｓ）、スルホスクシンイミジル－２－（ｍ－アジド－ｏ－ニトロベンズアミド）－エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＮＤ）、Ｎ－スクシンイミジル－４（４－アジドフェニル）１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＤＰ）、Ｎ－スルホスクシンイミジル（４－アジドフェニル）－１，３’－ジチオプロピオネート（スルホ－ｓＡＤＰ）、スルホスクシンイミジル４－（ｐ－アジドフェニル）ブチレート（スルホ－ｓＡＰＢ）、スルホスクシンイミジル２－（７－アジド－４－メチルクマリン－３－アセトアミド）エチル－１，３’－ジチオプロピオネート（ｓＡＥＤ）、スルホスクシンイミジル７－アジド－４－メチルクメイン－３－アセテート（スルホ－ｓＡＭＣＡ）、ｐ－ニトロフェニルジアゾピルベート（ｐＮＰＤＰ）、ｐ－ニトロフェニル－２－ジアゾ－３，３，３－トリフルオロプロピオネート（ＰＮＰ－ＤＴＰ）、スルフヒドリル反応性および光反応性架橋リンカー、例えば、１－（ｐ－アジドサリチルアミド）－４－（ヨードアセトアミド）ブタン（ＡｓＩＢ）、Ｎ－［４－（ｐ－アジドサリチルアミド）ブチル］－３’－（２’－ピリジルジチオ）プロピオンアミド（ＡＰＤＰ）、ベンゾフェノン－４－ヨードアセトアミド、ベンゾフェノン－４－マレイミドカルボニル反応性および光反応性架橋リンカー、例えば、ｐ－アジドベンゾイルヒドラジド（ＡＢＨ）、カルボキシレート反応性および光反応性架橋リンカー、例えば、４－（ｐ－アジドサリチルアミド）ブチルアミン（ＡｓＢＡ）、およびアルギニン反応性および光反応性架橋リンカー、例えば、ｐ－アジドフェニルグリオキサール（ＡＰＧ）が含まれる。

【０１９７】

いくつかの例では、反応性官能基は、結合部分（例えば、コンジュゲート化部分またはＩＬ－１０上）に存在する求電子基に対して反応性である求核基を含む。例示的な求電子基には、カルボニル基、例えば、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、エノン、ハロゲン化アシルまたは酸無水物が含まれる。一部の実施形態では、反応性官能基は、アルデヒドである。例示的な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるインターロイキンに組み込まれる非天然アミノ酸は、求電子性基を含む。

【０１９８】

一部の実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、

切断可能なリンカーは、ジペプチドリンカーである。一部の実施形態では、ジペプチドリンカーは、バリン－シトルリン（Ｖａｌ－Ｃｉｔ）、フェニルアラニン－リジン（Ｐｈｅ－Ｌｙｓ）、バリン－アラニン（Ｖａｌ－Ａｌａ）およびバリン－リジン（Ｖａｌ－Ｌｙｓ）である。一部の実施形態では、ジペプチドリンカーは、バリン－シトルリンである。

【０１９９】

一部の実施形態では、リンカーは、例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０個、またはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドリンカーである。いくつかの例では、ペプチドリンカーは、せいぜい２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０個、またはそれ以下のアミノ酸を含む。追加の場合において、ペプチドリンカーは、約２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、または５０個のアミノ酸を含む。

【０２００】

一部の実施形態では、リンカーは、自己免疫性リンカー部分を含む。一部の実施形態では、自己免疫性リンカー部分は、ｐ－アミノベンジルアルコール（ＰＡＢ）、ｐ－アミノベンジオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）、またはそれらの誘導体もしくは類似体を含む。一部の実施形態では、リンカーは、ジペプチドリンカー部分および自己免疫性リンカー部分を含む。一部の実施形態では、自己免疫性リンカー部分は、米国特許第９０８９６１４号、およびＷＩＰＯ出願公開第ＷＯ２０１５０３８４２６号に記載されているようなものである。

【０２０１】

一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、グルクロニドである。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、酸切断可能なリンカーである。一部の実施形態では、酸切断可能なリンカーは、ヒドラジンである。一部の実施形態では、切断可能なリンカーは、還元性リンカーである。

【０２０２】

一部の実施形態では、リンカーは、マレイミド基を含む。いくつかの例では、マレイミド基は、マレイミドスペーサーとも呼ばれる。いくつかの例では、マレイミド基は、カプロン酸をさらに含み、マレイミドカプロイル（ｍｃ）を形成する。場合によっては、リンカーは、マレイミドカプロイル（ｍｃ）を含む。場合によっては、リンカーはマレイミドカプロイル（ｍｃ）である。他の例では、マレイミド基は、マレイミドメチル基、例えば、上記のスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ｓＭＣＣ）、またはスルホスクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（スルホ－ｓＭＣＣ）を含む。

【０２０３】

一部の実施形態では、マレイミド基は、自己安定化マレイミドである。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、ジアミノプロピオン酸（ＤＰＲ）を利用して、マレイミドに隣接する塩基性アミノ基を組み込み、チオスクシンイミド環加水分解の分子内触媒を提供し、それにより、逆マイケル反応を介して脱離反応を受けるマレイミドを除去する。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、Ｌｙｏｎら、「Ｓｅｌｆ－ｈｙｄｒｏｌｙｚｉｎｇ ｍａｌｅｉｍｉｄｅｓ ｉｍｐｒｏｖｅ ｔｈｅ ｓｔａｂｉｌｉｔｙ ａｎｄ ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ」、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、３２巻（１０号）：１０５９～１０６２頁（２０１４年）に記載されるマレイミド基である。いくつかの例では、リンカーは、自己安定化マレイミドを含む。いくつかの例では、リンカーは、自己安定化マレイミドである。

【０２０４】

コンジュゲーション化学

種々のコンジュゲーション反応を用いて、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれるリンカー、コンジュゲーション部分、および非天然アミノ酸をコンジュ

ゲートする。このようなコンジュゲーション反応は、しばしば、「生体直交性」反応などの水性条件と適合する。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、リンカー、コンジュゲーション部分、または非天然アミノ酸上に見出される触媒、光、または反応性化学基などの化学試薬によって媒介される。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、酵素によって媒介される。一部の実施形態では、本明細書で使用されるコンジュゲーション反応は、Ｇｏｎｇ，Ｙ．、Ｐａｎ，Ｌ．、Ｔｅｔｔ．Ｌｅｔｔ．、２０１５年、５６巻、２１２３頁に記載されている。一部の実施形態では、本明細書で使用されるコンジュゲーション反応は、Ｃｈｅｎ，Ｘ．；Ｗｕ．Ｙ－Ｗ．、Ｏｒｇ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２０１６年、１４巻、５４１７頁に記載される。

【０２０５】

本明細書に記載される一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、ケトンまたはアルデヒドと求核剤との反応を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、ケトンとアミノキシ基との反応を含み、オキシムを形成する。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、ケトンとアリールまたはヘテロアリールアミン基との反応を含み、イミンを形成する。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、アルデヒドとアリールまたはヘテロアリールアミン基との反応を含み、イミンを形成する。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、オキシムを介して結合されたリンカーまたはコンジュゲーション部分を含むＩＬ－１０ポリペプチドをもたらす。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、アルデヒドまたはケトンとトリプタミン求核剤とのＰｉｃｔｅｔ－Ｓｐｅｎｇｌｅｒ反応を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、ヒドラジノ－Ｐｉｃｔｅｔ－Ｓｐｅｎｇｌｅｒ反応を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、Ｐｉｃｔｅｔ－Ｓｐｅｎｇｌｅｒライゲーションを含む。

【０２０６】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドおよびホスフィンの反応（シュタウジンガーライゲーション）を含む。一部の実施形態では、ホスフィンは、アリールホスフィンである。一部の実施形態では、アリールホスフィンは、オルトエステル基を含む。一部の実施形態では、ホスフィンは、メチル２－（ジフェニルホスファニル）安息香酸エステルの構造を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アリールアミドを介して結合されたリンカーまたはコンジュゲーション部分を含むＩＬ－１０ポリペプチドをもたらす。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アミドを介して結合されたリンカーまたはコンジュゲーション部分を含むＩＬ－１０ポリペプチドをもたらす。

【０２０７】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、１，３－双極性環状付加反応を含む。一部の実施形態では、１，３－双極性環状付加反応は、アジドとホスフィンとの反応（「クリック」反応）を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、銅によって触媒される。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、トリアゾールを介して結合されたリンカーまたはコンジュゲーション部分を含むＩＬ－１０ポリペプチドをもたらす。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドと歪んだオレフィンとの反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドと歪んだアルキンとの反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドとシクロアルキン、例えば、ＯＣＴ、ＤＩＦＯ、ＤＩＦＢＯ、ＤＩＢＯ、ＢＡＲＡＣ、ＴＭＴＨ、または他の歪んだシクロアルキンとの反応を含み、その構造はＧｏｎｇ，Ｙ．、Ｐａｎ，Ｌ．、Ｔｅｔｔ．Ｌｅｔｔ．、２０１５年、５６巻、２１２３頁に示される。一部の実施形態では、１，３－双極子環状付加反応は、光（「光クリック」）によって触媒される。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、末端アリル基とテトラゾールおよび光との反応を含む。一部の実

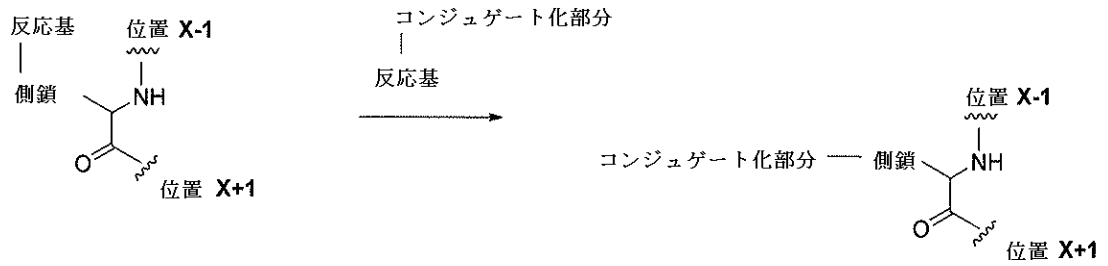
施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、末端アルキニル基とテトラゾールおよび光との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、Ｏ－アリルアミノ酸とテトラジンおよび光との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、Ｏ－アリルチロシンとテトラジンおよび光との反応を含む。

【０２０８】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アジドとシクロアルキン、例えばＤＢＣＯとの反応を含む。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、

【０２０９】

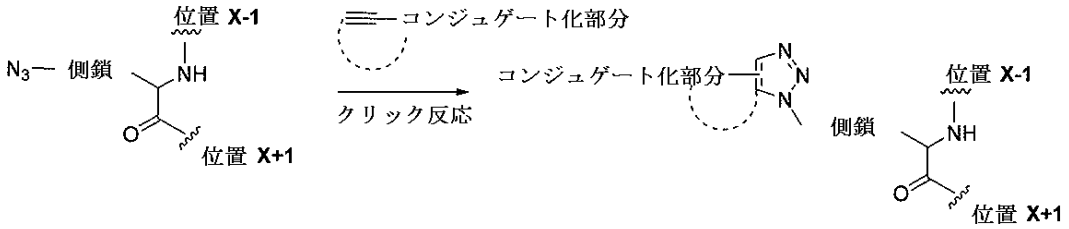
【化１７】



を含み、Ｘは、非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０コンジュゲート中の位置である。一部の実施形態では、コンジュゲート化部分は水溶性ポリマーを含む。一部の実施形態では、反応基は、アルキンまたはアジドを含む。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、

【０２１０】

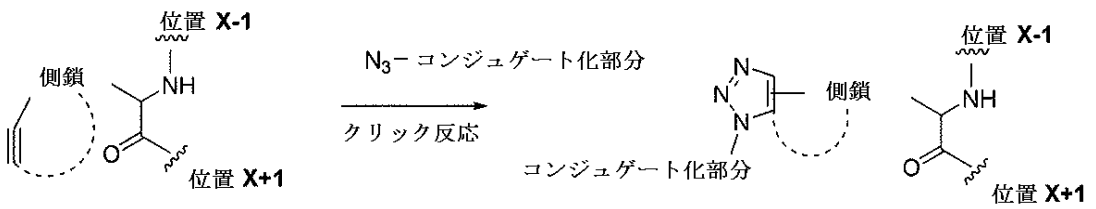
【化１８】



を含み、Ｘは、非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０コンジュゲート中の位置である。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、

【０２１１】

【化１９】



を含み、Ｘは、非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０コンジュゲート中の位置である。

【０２１２】

本明細書に記載されるクリック反応などのコンジュゲーション反応は、単一の位置異性体、または位置異性体の混合物を生成することができる。いくつかの例では、位置異性体の比は約１：１である。いくつかの例では、位置異性体の比は約２：１である。いくつか

の例では、位置異性体の比は約１．５：１である。いくつかの例では、位置異性体の比は約１．２：１である。いくつかの例では、位置異性体の比は約１．１：１である。いくつかの例では、位置異性体の比が１：１より大きい。

【０２１３】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、ジエンおよびジエノフィルを含む逆電子需要付加環化反応を含む。一部の実施形態では、ジエンはテトラジンを含む。一部の実施形態では、ジエノフィルはアルケンを含む。一部の実施形態では、ジエノフィルはアルキンを含む。一部の実施形態では、アルキンは、歪んだアルキンである。一部の実施形態では、アルケンは、歪んだジエンである。一部の実施形態では、アルキンはトランス－シクロオクチンである。一部の実施形態では、アルキンはシクロオクテンである。一部の実施形態では、アルケンはシクロプロペンである。一部の実施形態では、アルケンはフルオロシクロプロペンである。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、環中の２つの窒素原子を含む６員環複素環を介してリンカーまたはコンジュゲーション部分に結合したＩＬ－１０ポリペプチドの形成をもたらす。

【０２１４】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、オレフィンメタセシス反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アルケンおよびアルキンとルテニウム触媒との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、２つのアルケンとルテニウム触媒との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、２つのアルキンとルテニウム触媒との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アルケンまたはアルキンと、ルテニウム触媒およびアリル基を含むアミノ酸との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アルケンまたはアルキンと、ルテニウム触媒およびアリルスルフィドまたはセレン化物を含むアミノ酸との反応を含む。一部の実施形態では、ルテニウム触媒は、Ｈｏｖｅｄａ－Ｇｒｕｂｂｓ第２世代触媒である。一部の実施形態では、オレフィンメタセシス反応は、１つまたはそれ以上の歪んだアルケンまたはアルキンの反応を含む。

【０２１５】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、交差カップリング反応を含む。一部の実施形態では、交差カップリング反応は、遷移金属触媒、例えば、イリジウム、金、ルテニウム、ロジウム、パラジウム、ニッケル、白金、または他の遷移金属触媒、および１つまたはそれ以上の配位子を含む。一部の実施形態では、遷移金属触媒は、水溶性である。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、Ｓｕｚｕｋｉ－Ｍｉｙａｕｒａ交差カップリング反応を含む。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、ハロゲン化アリール（またはトリフラート、またはトシレート）、アリールまたはボロン酸アルケニル、およびパラジウム触媒の反応を含む。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、Ｓｏｎｏｇａｓｈｉｒａ交差カップリング反応を含む。本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、ハロゲン化アリール（またはトリフラート、またはトシレート）、アルキン、およびパラジウム触媒の反応を含む。一部の実施形態では、架橋結合反応は、炭素－炭素結合を介して、リンカーまたはコンジュゲート化部分のＩＬ－１０ポリペプチドへの結合をもたらす。

【０２１６】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、コンジュゲーション前の反応基の脱保護または「アンケージング」反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、光による反応基のアンケージング、続くコンジュゲーション反応を含む。一部の実施形態では、反応基は

、１つまたはそれ以上のニトロ基を含むアラルキル部分で保護される。一部の実施形態では、反応基のアンケージングは、遊離アミン、硫化物、または他の反応基をもたらす。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、遷移金属触媒による反応基のアンケージング、続くコンジュゲーション反応を含む。一部の実施形態では、遷移金属触媒は、パラジウムおよび１つまたはそれ以上の配位子を含む。一部の実施形態では、反応基は、アリル部分で保護される。一部の実施形態では、反応基は、アリルカルバメートで保護される。一部の実施形態では、反応基は、プロパルギル部分で保護される。一部の実施形態では、反応基は、プロパルギルカルバメートで保護される。一部の実施形態では、反応基は、ジエノフィルで保護され、ジエン（テトラジンなど）への曝露は、反応基の脱保護をもたらす。

【０２１７】

本明細書に記載される一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、リガンド指向性反応を含み、反応基に結合したリガンド（場合による）は、反応基とＩＬ－１０ポリペプチドとの間のコンジュゲーション部位を容易にする。一部の実施形態では、リガンドは、ＩＬ－１０ポリペプチドと反応基との反応中または反応後に切断される。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドのコンジュゲーション部位は、天然アミノ酸である。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドのコンジュゲーション部位は、リジン、システイン、またはセリンである。一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドのコンジュゲーション部位は、本明細書に記載される非天然アミノ酸である。一部の実施形態では、反応基は、電子不足アリール基またはヘテロアリール基などの脱離基を含む。一部の実施態様では、反応基は、ＩＬ－１０ポリペプチドによって置換される電子不足アルキル基などの脱離基を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、ラジカル捕捉剤とラジカル種との反応を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、酸化的ラジカル付加反応を含む。一部の実施形態では、ラジカル捕捉剤は、アリールアミンである。一部の実施形態では、ラジカル種は、チロシルラジカルである。一部の実施形態では、ラジカル種は、ルテニウム触媒（［Ｒｕ（ｂｐｙ）$_3$］など）および光によって生じる。

【０２１８】

酵素反応は、場合により、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応のために使用される。例示的な酵素的コンジュゲーションには、ＳｏｒｔＡ媒介コンジュゲーション、ＴＧｓ媒介コンジュゲーション、またはＦＧＥ媒介コンジュゲーションが含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるコンジュゲーション反応は、アミド結合を形成させるために、末端１－アミノ－２－チオ基とチオエステルとの天然タンパク質連結（ＮＰＬ）を含む。

【０２１９】

リンカーまたはコンジュゲート化部分をＩＬ－１０ポリペプチドと反応させるための種々のコンジュゲーション反応が本明細書中に記載され、ＩＬ－１０ポリペプチド中の天然（「カノニカル」）アミノ酸と反応が生じる。一部の実施形態では、天然アミノ酸は、野生型配列中に見出されるコンジュゲーション位置に見出されるか、または代わりに、その位置が突然変異されている。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、ＩＬ－１０残基でのジスルフィド結合の形成を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、システインまたはリジンの１，４マイケル付加反応を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、ＩＬ－１０のシアノベンゾチアゾール連結を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、１，３－ジクロロ－２－プロピオンなどのアセトン部分との架橋を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、システインとＯ－メシチレンスルホニルヒドロキシルアミンとの反応によって形成されるデヒドロアラニンへの１，４マイケル付加を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、チロシンとトリアゾリンジオン（ＴＡＤ）またはＴＡＤ誘導体との反応を含む。一部の実施形態では、コンジュゲーション反応は、トリプトファンとロジウムカルベノイドとの反応を含む。

【０２２０】
使用方法
増殖性疾患または状態
一部の実施形態では、それを必要とする対象における増殖性疾患または状態を治療する方法であって、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートの治療有効量を対象に投与することを含む方法が本明細書に記載される。一部の実施形態では、増殖性疾患または状態はがんである。場合によっては、がんは、固形腫瘍である。例示的な固形腫瘍としては、限定されないが、膀胱がん、骨がん、脳がん、乳がん、大腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんが挙げられる。場合によっては、固形腫瘍は転移性がんである。場合によっては、固形腫瘍は、以前の治療からの再発性または難治性がんである。
【０２２１】
いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、固形腫瘍を治療するために、それを必要とする対象に投与される。このような場合には、対象は、膀胱がん、骨がん、脳がん、乳がん、大腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん（または腎細胞がん）、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんを有する。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、乳がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、大腸がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、食道がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、頭頸部がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、腎臓がん（または腎細胞がんすなわちＲＣＣ）の治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、肺がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、黒色腫の治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、卵巣がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、膵臓がんの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、前立腺がんの治療のために対象に投与される。いくつかの例では、がんは転移性がんである。他の例では、がんは再発性がんである。追加の場合において、がんは難治性がんである。
【０２２２】
一部の実施形態では、がんは、治療未処置がんである。このような場合には、治療未処置がんは、治療を受けたことがないがんである。場合によっては、治療未処置がんは、膀胱がん、骨がん、脳がん、乳がん、大腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん（またはＲＣＣ）、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんなどの固形腫瘍である。一部の実施形態では、本明細書には、それを必要とする対象における治療未処置の固形腫瘍を治療する方法が記載され、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートを対象に投与することを含む。
【０２２３】
一部の実施形態では、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、血液学的悪性腫瘍を治療するために、それを必要とする対象に投与される。いくつかの例では、血液学的悪性腫瘍は白血病、リンパ腫または骨髄腫を含む。場合によっては、血液学的悪性腫瘍はＴ細胞悪性腫瘍である。他の場合には、血液学的悪性腫瘍はＢ細胞悪性腫瘍である。いくつかの例では、血液学的悪性腫瘍は転移性の血液学的悪性腫瘍である。他の例では、血液学的悪性腫瘍は再発性の血液学的悪性腫瘍である。追加の場合において、血液悪性腫瘍は難治性の血液悪性腫瘍である。場合によっては、対象はＴ細胞悪性腫瘍を有する。場合によっては、対象はＢ細胞悪性腫瘍を有する。場合によっては、対象は、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、多発性骨髄腫、節外辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、節外辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、バーキット

リンパ腫、非バーキット高悪性度Ｂ細胞リンパ腫、原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫（ＰＭＢＬ）、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Ｂリンパ芽球性リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、形質細胞骨髄腫、形質細胞腫、縦隔（胸腺）大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、血管内大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、またはリンパ腫様肉芽腫症を有する。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＣＬＬの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＳＬＬの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＦＬの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＤＬＢＣＬの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＭＣＬの治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症の治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、多発性骨髄腫の治療のために対象に投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、バーキットリンパ腫の治療のために対象に投与される。

【０２２４】

追加の治療剤

一部の実施形態では、追加の治療剤が、対象にさらに投与される。場合によっては、追加の治療剤は、ＩＬ－１０コンジュゲートと同時に投与され、および／または同時に製剤化される。他の場合には、追加の治療剤およびＩＬ－１０コンジュゲートは連続的に投与され、例えば、ＩＬ－１０コンジュゲートは、追加の治療剤に先立って投与されるか、またはＩＬ－１０コンジュゲートは、追加の治療剤の投与後に投与される。

【０２２５】

場合によっては、追加の治療剤は、化学療法剤、免疫療法剤、標的療法、放射線療法、またはそれらの組み合わせを含む。例示的な追加の治療剤としては、限定されないが、アルキル化剤、例えば、アルトレタミン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ロムスチン、メルファラン、オキサラプラチン、テモゾロミド、またはチオテパ；代謝拮抗薬、例えば、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、６－メルカプトプリン（６－ＭＰ）、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、またはペメトレキセド；アントラサイクリン、例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン；トポイソメラーゼＩ阻害剤、例えば、トポテカンまたはイリノテカン（ＣＰＴ－１１）；トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えば、エトポシド（ＶＰ－１６）、テニポシド、またはミトキサントロン；有糸分裂阻害剤、例えば、ドセタキセル、エストラムスチン、イクサベピロン、パクリタキセル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、またはビノレルビン；またはコルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、またはデキサメタゾンが挙げられる。

【０２２６】

場合によっては、追加の治療剤は、第一選択療法を含む。本明細書で使用される場合、「第一選択療法」は、がんを有する対象に対する第一選択療法を含む。いくつかの例では、がんが原発がんまたは局所がんである。他の例では、がんは転移性または再発性のがんである。場合によっては、第一選択治療として化学療法が行われる。他の場合には、第一選択治療は、免疫療法、標的療法、または放射線療法である。当業者は、異なる第一選択治療が異なるタイプのがんに適用可能であることを容易に理解する。

【０２２７】

場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、アルキル化剤、例えば、アルトレタミン、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ロムスチン、メルファラン、オキサラプラチン、テモゾロミド、またはチオテパ；代謝拮抗薬、例えば、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、６－メルカプトプリン（６－ＭＰ）、カペシタビン、シタラビン、フロクスウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、メトトレキサート、またはペメトレキセド

；アントラサイクリン、例えば、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン；トポイソメラーゼＩ阻害剤、例えば、トポテカンまたはイリノテカン（ＣＰＴ－１１）；トポイソメラーゼＩＩ阻害剤、例えば、エトポシド（ＶＰ－１６）、テニポシド、またはミトキサントロン；有糸分裂阻害剤、例えば、ドセタキセル、エストラムスチン、イクサベピロン、パクリタキセル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、またはビノレルビン；またはコルチコステロイド、例えば、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、またはデキサメタゾンから選択される追加の治療剤とともに投与される。

【０２２８】

いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、酵素ポリＡＤＰリボースポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）の阻害剤とともに投与される。例示的なＰＡＲＰ阻害剤としては、限定されないが、オラパリブ（ＡＺＤ－２２８１、Ｌｙｎｐａｒｚａ（登録商標）、Ａｓｔｒａ　Ｚｅｎｅｃａから）、ルカパリブ（ＰＦ－０１３６７３３８、Ｒｕｂｒａｃａ（登録商標）、Ｃｌｏｖｉｓ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙから）、ニラパリブ（ＭＫ－４８２７、Ｚｅｊｕｌａ（登録商標）、Ｔｅｓａｒｏから）、タラゾパリブ（ＢＭＮ－６７３、ＢｉｏＭａｒｉｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｉｎｃ．から）、ベリパリブ（ＡＢＴ－８８８、ＡｂｂＶｉｅから）、ＣＫ－１０２（以前のＣＥＰ　９７２２、Ｔｅｖａ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ　Ｌｔｄ．から）、Ｅ７０１６（Ｅｉｓａｉから）、イニパリブ（ＢＳＩ　２０１、Ｓａｎｏｆｉから）、およびパミパリブ（ＢＧＢ－２９０、ＢｅｉＧｅｎｅから）が挙げられる。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＰＡＲＰ阻害剤、例えば、オラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、タラゾパリブ、ベリパリブ、ＣＫ－１０２、Ｅ７０１６、イニパリブ、またはパミパリブと組み合わせて投与される。

【０２２９】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、チロシンキナーゼ阻害剤（ＴＫＩ）とともに投与される。例示的なＴＫＩには、限定されないが、アファチニブ、アレクチニブ、アキシチニブ、ボスチニブ、カボザンチニブ、セリチニブ、コビメチニブ、クリゾチニブ、ダブラフェニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イブルチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、レンバチニブ、ニロチニブ、ニンテダニブ、オシメルチニブ、パゾパニブ、ポナチニブ、レゴラフェニブ、ルキソリチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、トファシチニブ、およびバンデタニブが含まれる。

【０２３０】

いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、免疫チェックポイント阻害剤とともに投与される。例示的なチェックポイント阻害剤は、以下を含む。

【０２３１】

ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａのデュルバルマブ（Ｉｍｆｉｎｚｉ）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈのアテゾリズマブ（ＭＰＤＬ３２８０Ａ）、ＥＭＤ　Ｓｅｒｏｎｏ／Ｐｆｉｚｅｒのアベルマブ、ＣｙｔｏｍＸ　ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓのＣＸ－０７２、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＦＡＺ０５３、３Ｄ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ／ＡｌｐｈａｍａｂのＫＮ０３５、Ｅｌｉ　ＬｉｌｌｙのＬＹ３３０００５４、またはＥＭＤ　ＳｅｒｏｎｏのＭ７８２４（抗ＰＤ－Ｌ１／ＴＧＦベータトラップ）などのＰＤ－Ｌ１阻害剤；

【０２３２】

ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅのＡＭＰ－２２４（Ａｍｐｌｉｍｍｕｎｅ）およびｒＨＩｇＭ１２Ｂ７などのＰＤ－Ｌ２阻害剤；

【０２３３】

Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂのニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ）、Ｍｅｒｃｋのペンブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ）、ＡｇｅｎｕｓのＡＧＥＮ２０３４、ＢｅｉＧｅｎｅのＢＧＢ－Ａ３１７、Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｉｎｇｅｌｈｅｉｍ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＢｌ－７５４０９１、ＣＢＴ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＣＢＴ－５０１（ゲノリムズマブ）、ＩｎｃｙｔｅのＩＮＣＳＨＲ１２１０、Ｊａｎｓｓｅｎ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　＆　ＤｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔのＪＮＪ－６３７２３２８３、Ｍ

ｅｄＩｍｍｕｎｅのＭＥＤＩ０６８０、ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓのＭＧＡ０１２、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＰＤＲ００１、ＰｆｉｚｅｒのＰＦ－０６８０１５９１、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ／ＳａｎｏｆｉのＲＥＧＮ２８１０（ＳＡＲ４３９６８４）、またはＴＥＳＡＲＯからのＴＳＲ－０４２などのＰＤ－１阻害剤；

【０２３４】

Ｂｒｉｓｔｏｌ　Ｍｅｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂのイピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ（登録商標）、ＭＤＸ－０１０、ＢＭＳ－７３４０１６およびＭＤＸ－１０１としても公知である）、Ｐｆｉｚｅｒのトレメリムマブ（ＣＰ－６７５，２０６、チシリムマブ）、またはＡｇｅｎｕｓのＡＧＥＮ　１８８４などのＣＴＬＡ－４阻害剤；

【０２３５】

Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　ＳｑｕｉｂｂのＢＭＳ－９８６０１６、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＩＭＰ７０１、Ｎｏｖａｒｔｉｓ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＬＡＧ５２５、またはＲｅｇｅｎｅｒｏｎ　ＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓのＲＥＧＮ３７６７などのＬＡＧ３阻害剤；

【０２３６】

ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓのエノブリツズマブ（ＭＧＡ２７１）などのＢ７－Ｈ３阻害剤；

【０２３７】

Ｉｎｎａｔｅ　Ｐｈａｒｍａのリリルマブ（ＩＰＨ２１０１；ＢＭＳ－９８６０１５）などのＫＩＲ阻害剤；

【０２３８】

ＣＤ１３７阻害剤、例えば、ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）、ＰＦ－０５０８２５６６（抗４－１ＢＢ、ＰＦ－２５６６、Ｐｆｉｚｅｒ）、またはＸｍＡｂ－５５９２（Ｘｅｎｃｏｒ）。

【０２３９】

ＰＳ阻害剤、例えば、バビツキシマブ。

【０２４０】

ならびに阻害剤、例えば、抗体またはその断片（例えば、モノクローナル抗体、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体）、ＲＮＡｉ分子、またはＴＩＭ３、ＣＤ５２、ＣＤ３０、ＣＤ２０、ＣＤ３３、ＣＤ２７、ＯＸ４０、ＧＩＴＲ、ＩＣＯＳ、ＢＴＬＡ（ＣＤ２７２）、ＣＤ１６０、２Ｂ４、ＬＡＩＲ１、ＴＩＧＨＴ、ＬＩＧＨＴ、ＤＲ３、ＣＤ２２６、ＣＤ２、もしくはＳＬＡＭに対する小分子。

【０２４１】

いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートをペンブロリズマブ、ニボルマブ、トレメリムマブ、またはイピリムマブと組み合わせて投与する。

【０２４２】

いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、アレムツズマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブ・チウキセタン、ブレンツキシマブ・ベドチン、アドートラスツズマブ・エムタンシン、またはブリナツムマブなどの抗体とともに投与される。

【０２４３】

いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、追加のサイトカインから選択される追加の治療剤とともに投与される。いくつかの例では、追加のサイトカインは、Ｔエフェクター細胞の拡大および／または増殖を、増大するおよび／または相乗作用を与える。場合によっては、追加のサイトカインは、ＩＬ－１β、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１８、ＩＬ－２１、またはＴＮＦαを含む。場合によっては、追加のサイトカインはＩＬ－７である。場合によっては、追加のサイトカインはＩＬ－１５である。場合によっては、追加のサイトカインはＩＬ－２１である。場合によっては、追加のサイトカインはＴＮＦαである。

【０２４４】

いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、受容体アゴニストから選択される追加の治療剤とともに投与される。いくつかの例では、受容体アゴニストは、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）リガンドを含む。場合によっては、ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、またはＴＬＲ９を含む。場合によっては、ＴＬＲリガンドは、合成リガンド、例えば、Ｐａｍ３Ｃｙｓ、ＣＦＡ、ＭＡＬＰ２、Ｐａｍ２Ｃｙｓ、ＦＳＬ－１、Ｈｉｂ－ＯＭＰＣ、ポリＩ：Ｃ、ポリＡ：Ｕ、ＡＧＰ、ＭＰＬ　Ａ、ＲＣ－５２９、ＭＤＦ２β、ＣＦＡ、またはフラジェリンを含む。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、およびＴＬＲ９から選択される１つまたはそれ以上のＴＬＲアゴニストとともに投与される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、Ｐａｍ３Ｃｙｓ、ＣＦＡ、ＭＡＬＰ２、Ｐａｍ２Ｃｙｓ、ＦＳＬ－１、Ｈｉｂ－ＯＭＰＣ、ポリＩ：Ｃ、ポリＡ：Ｕ、ＡＧＰ、ＭＰＬ　Ａ、ＲＣ－５２９、ＭＤＦ２β、ＣＦＡ、およびフラジェリンカーら選択される１つまたはそれ以上のＴＬＲとともに投与される。

【０２４５】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、養子Ｔ細胞移植（ＡＣＴ）療法とともに使用される。一実施形態では、ＡＣＴは、例えば、抗腫瘍活性を有する、対象における自己Ｔリンパ球の同定、インビトロでの自己Ｔリンパ球の拡大、およびその後の対象への拡大されたＴリンパ球の再輸注を伴う。別の実施形態では、ＡＣＴは、例えば、抗腫瘍活性を有する同種Ｔリンパ球の使用、インビトロでのＴリンパ球の拡大、およびそれを必要とする対象への拡大された同種Ｔリンパ球のその後の輸注を含む。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、ＡＣＴ療法の一部として、自己Ｔリンパ球とともに使用される。他の例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０コンジュゲートは、ＡＣＴ療法の一部として、同種Ｔリンパ球とともに使用される。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＡＣＴ療法と同時に、それを必要とする対象に投与される。他の場合には、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ＡＣＴ療法を必要とする対象に、ＡＣＴ療法とともに連続的に投与される。

【０２４６】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、自己および／または同種Ｔ細胞移植のエクスビボ活性化および／または拡大のために使用される。このような場合、ＩＬ－１０コンジュゲートは、自己Ｔ細胞および／または同種Ｔ細胞を含む試料を活性化および／または拡大するために使用され、ＩＬ－１０コンジュゲートは、それを必要とする対象に試料を投与する前に、場合により試料から除去される。

【０２４７】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、ワクチンとともに投与される。いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、腫瘍崩壊性ウイルスと組み合わせて利用される。このような場合、ＩＬ－１０コンジュゲートは、免疫応答を調節するための刺激剤として作用する。いくつかの例では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、アジュバント療法の一部として腫瘍崩壊性ウイルスとともに使用される。例示的な腫瘍崩壊性ウイルスには、Ｔ－Ｖｅｃ（Ａｍｇｅｎ）、Ｇ４７Δ（Ｔｏｄｏら）、ＪＸ－５９４（Ｓｉｌｌａｊｅｎ）、ＣＧ００７０（Ｃｏｌｄ　Ｇｅｎｅｓｙｓ）、およびＲｅｏｌｙｓｉｎ（Ｏｎｃｏｌｙｔｉｃｓ　Ｂｉｏｔｅｃｈ）が含まれる。場合によっては、ＩＬ－１０コンジュゲートは、Ｔ－Ｖｅｃ、Ｇ４７Δ、ＪＸ－５９４、ＣＧ００７０、またはＲｅｏｌｙｓｉｎなどの腫瘍崩壊性ウイルスと組み合わせて使用される。

【０２４８】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０コンジュゲートは、放射線療法と組み合わせて投与される。

【０２４９】

ＩＬ－１０ポリペプチド産生

いくつかの例では、天然アミノ酸突然変異または非天然アミノ酸突然変異のいずれかを

含む、本明細書中に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、組換え的に生成されるか、または化学的に合成される。いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドは、組換え的に、例えば、宿主細胞系によって、または無細胞系において、生成される。

【０２５０】

いくつかの例では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、宿主細胞系を介して組換え的に生じる。場合によっては、宿主細胞は、真核細胞（例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞または植物細胞）、原核細胞（例えば、グラム陽性細菌またはグラム陰性細菌）、または古細菌細胞である。場合によっては、真核生物宿主細胞は、哺乳類宿主細胞である。場合によっては、哺乳動物宿主細胞は、安定な細胞株であるか、または、目的の遺伝物質を自身のゲノムに組み込んで、何世代にもわたる細胞分裂の後に遺伝物質の産物を発現する能力を有する細胞株である。他の場合には、哺乳動物宿主細胞は、一過性の細胞株であるか、または、目的の遺伝物質を自身のゲノムに組み込んでおらず、何世代にもわたる細胞分裂の後にも遺伝物質の産物を発現する能力を有しない細胞株である。

【０２５１】

例示的な哺乳動物宿主細胞としては、２９３Ｔ細胞株、２９３Ａ細胞株、２９３ＦＴ細胞株、２９３Ｆ細胞、２９３Ｈ細胞、Ａ５４９細胞、ＭＤＣＫ細胞、ＣＨＯＤＧ４４細胞、ＣＨＯ－Ｓ細胞、ＣＨＯ－Ｋ１細胞、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ（商標）細胞、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）Ｔ－ＲＥｘ（商標）２９３細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－２９３細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－３Ｔ３細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－ＢＨＫ細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－ＣＨＯ細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－ＣＶ－１細胞株、Ｆｌｐ－Ｉｎ（商標）－Ｊｕｒｋａｔ細胞株、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）２９３－Ｆ細胞、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ（商標）ＣＨＯ－Ｓ細胞、ＧｒｉｐＴｉｔｅ（商標）２９３ＭＳＲ細胞株、ＧＳ－ＣＨＯ細胞株、ＨｅｐａＲＧ（商標）細胞、Ｔ－ＲＥｘ（商標）Ｊｕｒｋａｔ細胞株、Ｐｅｒ．Ｃ６細胞、Ｔ－ＲＥｘ（商標）－２９３細胞株、Ｔ－ＲＥｘ（商標）－ＣＨＯ細胞株、およびＴ－ＲＥｘ（商標）－ＨｅＬａ細胞株が挙げられる。

【０２５２】

一部の実施形態では、真核生物宿主細胞は、昆虫宿主細胞である。例示的な昆虫宿主細胞としては、ショウジョウバエＳ２細胞、Ｓｆ９細胞、Ｓｆ２１細胞、Ｈｉｇｈ　Ｆｉｖｅ（商標）細胞、およびｅｘｐｒｅｓＳＦ＋（登録商標）細胞が挙げられる。

【０２５３】

一部の実施形態では、真核生物宿主細胞は、酵母宿主細胞である。例示的な酵母宿主細胞としては、ＧＳ１１５、ＫＭ７１Ｈ、ＳＭＤ１１６８、ＳＭＤ１１６８Ｈ、およびＸ－３３などのピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）酵母株、ならびにＩＮＶＳｃ１などのサッカロミケス・セレビシエ（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）酵母株が挙げられる。

【０２５４】

一部の実施形態では、真核生物宿主細胞は、植物宿主細胞である。いくつかの例では、植物細胞は、藻類由来の細胞を含む。例示的な植物細胞株としては、コナミドリムシ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ　ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）１３７ｃ、またはシネココッカス・エロンガタス（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ　ｅｌｏｎｇａｔｕｓ）ＰＰＣ　７９４２由来の株が挙げられる。

【０２５５】

一部の実施形態では、宿主細胞は、原核生物宿主細胞である。例示的な原核宿主細胞としては、ＢＬ２１、Ｍａｃｈ１（商標）、ＤＨ１０Ｂ（商標）、ＴＯＰ１０、ＤＨ５α、ＤＨ１０Ｂａｃ（商標）、ＯｍｎｉＭａｘ（商標）、ＭｅｇａＸ（商標）、ＤＨ１２Ｓ（商標）、ＩＮＶ１１０、ＴＯＰ１０Ｆ’、ＩＮＶαＦ、ＴＯＰ１０／Ｐ３、ｃｃｄＢ　Ｓｕｒｖｉｖａｌ、ＰＩＲ１、ＰＩＲ２、Ｓｔｂｌ２（商標）、Ｓｔｂｌ３（商標）、またはＳｔｂｌ４（商標）が挙げられる。

【０２５６】

いくつかの例では、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドを生成するための適切なポリ核酸分子またはベクターは、真核生物または原核生物起源のいずれかに由来する任意の適切なベクターを含む。例示的なポリ核酸分子またはベクターは、細菌（例えば、大腸菌）、昆虫、酵母（例えば、ピキア・パストリス）、藻類、または哺乳動物起源由来のベクターを含む。細菌ベクターとしては、例えば、ｐＡＣＹＣ１７７、ｐＡＳＫ７５、ｐＢＡＤベクターシリーズ、ｐＢＡＤＭベクターシリーズ、ｐＥＴベクターシリーズ、ｐＥＴＭベクターシリーズ、ｐＧＥＸベクターシリーズ、ｐＨＡＴ、ｐＨＡＴ２、ｐＭａｌ－ｃ２、ｐＭａｌ－ｐ２、ｐＱＥ ベクターシリーズ、ｐＲＳＥＴ Ａ、ｐＲＳＥＴ Ｂ、ｐＲＳＥＴ Ｃ、ｐＴｒｃＨｉｓ２シリーズ、ｐＺＡ３１－Ｌｕｃ、ｐＺＥ２１－ＭＣＳ－１、ｐＦＬＡＧ ＡＴＳ、ｐＦＬＡＧ ＣＴＳ、ｐＦＬＡＧ ＭＡＣ、ｐＦＬＡＧ Ｓｈｉｆｔ－１２ｃ、ｐＴＡＣ－ＭＡＴ－１、ｐＦＬＡＧ ＣＴＣ、またはｐＴＡＣ－ＭＡＴ－２が含まれる。

【０２５７】

昆虫ベクターとしては、例えば、ｐＦａｓｔＢａｃ１、ｐＦａｓｔＢａｃ ＤＵＡＬ、ｐＦａｓｔＢａｃ ＥＴ、ｐＦａｓｔＢａｃ ＨＴａ、ｐＦａｓｔＢａｃ ＨＴｂ、ｐＦａｓｔＢａｃ ＨＴｃ、ｐＦａｓｔＢａｃ Ｍ３０ａ、ｐＦａｓｔＢａｃｔ Ｍ３０ｂ、ｐＦａｓｔＢａｃ、Ｍ３０ｃ、ｐＶＬ１３９２、ｐＶＬ１３９３、ｐＶＬ１３９３ Ｍ１０、ｐＶＬ１３９３ Ｍ１１、ｐＶＬ１３９３ Ｍ１２、ＦＬＡＧベクター、例えば、ｐＰｏｌｈ－ＦＬＡＧ１もしくはｐＰｏｌｈ－ＭＡＴ ２、またはＭＡＴベクター、例えば、ｐＰｏｌｈ－ＭＡＴ１、もしくはｐＰｏｌｈ－ＭＡＴ２が挙げられる。

【０２５８】

酵母ベクターとしては、例えば、Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）ｐＤＥＳＴ（商標）１４ベクター、Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）ｐＤＥＳＴ（商標）１７ベクター、Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）ｐＤＥＳＴ（商標）２４ベクター、Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）ｐＹＥＳ－ＤＥＳＴ５２ベクター、ｐＢＡＤ－ＤＥＳＴ４９Ｇａｔｅｗａｙ（登録商標）デスティネーションベクター、ｐＡＯ８１５ピキアベクター、ｐＦＬＤ１ピキアパストリスベクター、ｐＧＡＰＺＡ、Ｂ、およびＣピキアパストリスベクター、ｐＰＩＣ３．５Ｋピキアベクター、ｐＰＩＣ６Ａ、Ｂ、およびＣピキアベクター、ｐＰＩＣ９Ｋピキアベクター、ｐＴＥＦ１／Ｚｅｏ、ｐＹＥＳ２／酵母ベクター、ｐＹＥＳ２／ＣＴ酵母ベクター、ｐＹＥＳ２／ＮＴＡ、Ｂ、およびＣ酵母ベクター、またはｐＹＥＳ３／ＣＴ酵母ベクターが挙げられる。

【０２５９】

藻類ベクターとしては、例えば、ｐＣｈｌａｍｙ－４ベクターまたはＭＣＳベクターが挙げられる。

【０２６０】

哺乳動物ベクターとしては、例えば、一過性発現ベクターまたは安定な発現ベクターが挙げられる。例示的な哺乳動物一過性発現ベクターとしては、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ ８、ｐＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ １９、ｐＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ ２３、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ２、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ６ａ、ｂ、ｃ、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ５．１、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ５ａ、ｂ、ｃ、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ ７．１、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ２０、ｐ３ｘＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ ２４、ｐＣＭＶ－ＦＬＡＧ－ＭＡＴ１、ｐＣＭＶ－ＦＬＡＧ－ＭＡＴ２、ｐＢＩＣＥＰ－ＣＭＶ ３、またはｐＢＩＣＥＰ－ＣＭＶ ４が挙げられる。例示的な哺乳動物安定発現ベクターとしては、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ３、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ ９、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ １３、ｐＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ ２１、ｐ３ｘＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ ２５、ｐＦＬＡＧ－ＣＭＶ ４、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ １０、ｐ３ｘＦＬＡＧ－ＣＭＶ １４、ｐＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ ２２、ｐ３ｘＦＬＡＧ－Ｍｙｃ－ＣＭＶ ２６、ｐＢＩＣＥＰ－ＣＭＶ １、またはｐＢＩＣＥＰ－ＣＭＶ ２が挙げられる。

【０２６１】

いくつかの例では、無細胞系は、本明細書に記載されるＩＬ－１０ポリペプチドを生成

するために使用される。場合によっては、無細胞系は、細胞由来の細胞質および／または核成分の混合物（例えば、完全に精製された組換え成分または部分的に精製された成分で構成される）を含み、インビトロ核酸合成に適している。いくつかの例では、無細胞系は、原核細胞成分を利用する。他の例では、無細胞系は、真核細胞成分を利用する。核酸合成は、例えば、ショウジョウバエ細胞、アフリカツメガエル卵、古細菌、またはＨｅＬａ細胞に基づく無細胞系において得られる。例示的な無細胞系としては、大腸菌Ｓ３０抽出系、大腸菌Ｔ７　Ｓ３０系、またはＰＵＲＥｘｐｒｅｓｓ（登録商標）、ＸｐｒｅｓｓＣＦ、およびＸｐｒｅｓｓＣＦ＋が挙げられる。

【０２６２】

無細胞翻訳系は、プラスミド、ｍＲＮＡ、ＤＮＡ、ｔＲＮＡ、シンテターゼ、放出因子、リボソーム、シャペロンタンパク質、翻訳開始および伸長因子、天然および／もしくは非天然アミノ酸、ならびに／またはタンパク質発現に使用される他の成分などの成分を様々に含む。このような成分は、場合により、収率を改善し、合成速度を増加させ、タンパク質生成物の忠実度を増加させ、または非天然アミノ酸を組み込むように修飾される。一部の実施形態では、本明細書に記載されるサイトカインは、米国特許第８，７７８，６３１号明細書；米国特許出願公開第２０１７／０２８３４６９号；米国特許出願公開第２０１８／００５１０６５号；米国特許出願公開第２０１４／０３１５２４５号；または米国特許第８，７７８，６３１号に記載される無細胞翻訳系を用いて合成される。一部の実施形態では、無細胞翻訳系は、修飾された放出因子、または１つもしくはそれ以上の放出因子を系から除去することさえも含む。一部の実施形態では、無細胞翻訳系は、減少したプロテアーゼ濃度を含む。一部の実施形態では、無細胞翻訳系は、非天然アミノ酸をコードするために使用される再割り当てされたコドンを有する修飾されたｔＲＮＡを含む。一部の実施形態では、非天然アミノ酸の組み込みのための本明細書に記載されるシンテターゼは、無細胞翻訳系において使用される。一部の実施形態では、ｔＲＮＡは、無細胞翻訳系に添加される前に、酵素的または化学的方法を用いて、非天然アミノ酸を予めロードされる。一部の実施形態では、無細胞翻訳系のための成分は、修飾された生物、例えば、修飾された細菌、酵母、または他の生物から得られる。

【０２６３】

一部の実施形態では、ＩＬ－１０ポリペプチドは、発現宿主系を介してまたは無細胞系を介して、環状順列形態として生じる。

【０２６４】

非天然アミノ酸を含むＩＬ－１０ポリペプチドの生成

本開示では、直交性または拡張された遺伝暗号を使用することができ、ＩＬ－１０ポリペプチドの核酸配列中に存在する１つまたはそれ以上の特異的コドンは、直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対を使用することによってＩＬ－１０に遺伝的に組み込まれ得るように、非天然アミノ酸をコードするように割り当てられる。直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対は、非天然アミノ酸をｔＲＮＡに付加することができ、コドンに応答してその非天然アミノ酸をポリペプチド鎖に組み込むことができる。

【０２６５】

いくつかの例では、コドンは、コドンアンバー、オーカー、オパールまたは四重項コドンである。場合によっては、コドンは、非天然アミノ酸を運ぶために使われる直交性ｔＲＮＡに対応する。場合によっては、コドンはアンバーである。他の場合には、コドンは、直交性コドンである。

【０２６６】

いくつかの例では、コドンは四重項コドンであり、直交性リボソームｒｉｂｏ－Ｑ１によってデコードされる。場合によっては、四重項コドンは、Ｎｅｕｍａｎｎら、「Ｅｎｃｏｄｉｎｇ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｕｎｎａｔｕｒａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ｖｉａ ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｑｕａｄｒｕｐｌｅｔ－ｄｅｃｏｄｉｎｇ ｒｉｂｏｓｏｍｅ」、Ｎａｔｕｒｅ、４６４巻（７２８７号）：４４１～４４４頁（２０１０年）に例示される通りである。

【０２６７】
いくつかの例では、本開示で使用されるコドンは、記録されたコドン、例えば、同義コドン、または代替コドンで置換される稀なコドンである。場合によっては、再コード化されたコドンは、Ｎａｐｏｌｉｔａｎｏら、「Ｅｍｅｒｇｅｎｔ ｒｕｌｅｓ ｆｏｒ ｃｏｄｏｎ ｃｈｏｉｃｅ ｅｌｕｃｉｄａｔｅｄ ｂｙ ｅｄｉｔｉｎｇ ｒａｒｅ ａｒｇｉｎｉｎｅ ｃｏｄｏｎｓ ｉｎ Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ」、ＰＮＡＳ、１１３巻（３８号）：Ｅ５５８８～５５９７頁（２０１６年）に記載される通りである。場合によっては、再コード化されたコドンは、Ｏｓｔｒｏｖら、「Ｄｅｓｉｇｎ，ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ａｎｄ ｔｅｓｔｉｎｇ ｔｏｗａｒｄ ａ ５７－ｃｏｄｏｎ ｇｅｎｏｍｅ」、Ｓｃｉｅｎｃｅ、３５３巻（６３０１号）：８１９～８２２頁（２０１６年）に記載される通りである。

【０２６８】
いくつかの例では、１つまたはそれ以上の非天然アミノ酸のＩＬ－１０への組み込みを導く非天然核酸が利用される。例示的な非天然核酸としては、限定されないが、ウラシル－５－イル、ヒポキサンチン－９－イル（Ｉ）、２－アミノアデニン－９－イル、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピルウラシルおよびシトシン、６－アゾウラシル、シトシンおよびチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチルおよび他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニンならびに３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニンが挙げられる。特定の非天然核酸、例えば、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジンおよびＮ－２置換プリン、Ｎ－６置換プリン、Ｏ－６置換プリン、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシル、５－プロピニルシトシン、５－メチルシトシン、二重鎖形成の安定性を増加させるもの、ユニバーサル核酸、疎水性核酸、無差別核酸、サイズ拡大核酸、フッ素化核酸、５－置換ピリミジン、６－アザピリミジンおよびＮ－２、Ｎ－６および０－６置換プリン、例えば、２－アミノプロピルアデニン、５－プロピニルウラシルおよび５－プロピニルシトシン、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、６－メチル、アデニンおよびグアニンの他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミンおよび２－チオシトシン、５－ハロウラシル、５－ハロシトシン、５－プロピニル（－Ｃ≡Ｃ－ＣＨ$_3$）ウラシル、５－プロピニルシトシン、ピリミジン核酸の他のアルキニル誘導体、６－アゾウラシル、６－アゾシトシン、６－アゾチミン、５－ウラシル（プソイドウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオール、８－チオアルキル、８－ヒドロキシルおよび他の８－置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ、特に５－ブロモ、５－トリフルオロメチル、他の５－置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニン、７－メチルアデニン、２－Ｆ－アデニン、２－アミノ－アデニン、８－アザグアニン、８－アザアデニン、７－デアザグアニン、７－デアザアデニン、３－デアザグアニン、３－デアザアデニン、三環式ピリミジン、フェノキサジンシチジン（［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、フェノチアジンシチジン（１Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾチアジン－２（３Ｈ）－オン）、Ｇ－クランプ、フェノキサジンシチジン（例えば、９－（２－アミノエトキシ）－Ｈ－ピリミド［５，４－ｂ］［１，４］ベンゾキサジン－２（３Ｈ）－オン）、カルバゾールシチジン（２Ｈ－ピリミド［４，５－ｂ］インドール－２－オン）、ピリドインドールシチジン（Ｈ－ピリド［３’，２’：４，５］ピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－２－オン）、プリンまたはピリ

ミジン塩基が他の複素環で置換されているもの、７－デアザアデニン、７－デアザグアノシン、２－アミノピリジン、２－ピリドン、アザシトシン、５－ブロモシトシン、ブロモウラシル、５－クロロシトシン、塩素化シトシン、シクロシトシン、シトシンアラビノシド、５－フルオロシトシン、フルオロピリミジン、フルオロウラシル、５，６－ジヒドロシトシン、５－ヨードシトシン、ヒドロキシ尿素、ヨードウラシル、５－ニトロシトシン、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－フルオロウラシル、および５－ヨードウラシル、２－アミノ－アデニン、６－チオ－グアニン、２－チオ－チミン、４－チオ－チミン、５－プロピニル－ウラシル、４－チオ－ウラシル、Ｎ４－エチルシトシン、７－デアザグアニン、７－デアザ－８－アザグアニン、５－ヒドロキシシトシン、２’－デオキシウリジン、２－アミノ－２’－デオキシアデノシン、ならびに米国特許第３，６８７，８０８号；同第４，８４５，２０５号；同第４，９１０，３００号；同第４，９４８，８８２号；同第５，０９３，２３２号；同第５，１３０，３０２号；同第５，１３４，０６６号；同第５，１７５，２７３号；同第５，３６７，０６６号；同第５，４３２，２７２号；同第５，４５７，１８７号；同第５，４５９，２５５号；同第５，４８４，９０８号；同第５，５０２，１７７号；同第５，５２５，７１１号；同第５，５５２，５４０号；同第５，５８７，４６９号；同第５，５９４，１２１号；同第５，５９６，０９１号；同第５，６１４，６１７号；同第５，６４５，９８５号；同第５，６８１，９４１号；同第５，７５０，６９２号；同第５，７６３，５８８号；同第５，８３０，６５３号；および同第６，００５，０９６号；国際公開第ＷＯ９９／６２９２３号；Ｋａｎｄｉｍａｌｌａら、（２００１年）Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、９巻：８０７～８１３頁；Ｔｈｅ Ｃｏｎｃｉｓｅ Ｅｎｃｙｃｌｏｐｅｄｉａ ｏｆ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、Ｋｒｏｓｃｈｗｉｔｚ，Ｊ．Ｉ．編集、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、１９９０年、８５８～８５９頁；Ｅｎｇｌｉｓｃｈら、Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ、１９９１年、３０巻、６１３頁；およびＳａｎｇｈｖｉ、Ｃｈａｐｔｅｒ １５、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｃｒｏｏｋｅａｎｄ Ｌｅｂｌｅｕ編集、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９９３年、２７３～２８８頁に記載されているもの。追加の塩基修飾は、例えば、米国特許第３，６８７，８０８号；Ｅｎｇｌｉｓｃｈら、Ａｎｇｅｗａｎｄｔｅ Ｃｈｅｍｉｅ、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｄｉｔｉｏｎ、１９９１年、３０巻、６１３頁；およびＳａｎｇｈｖｉ、Ｃｈａｐｔｅｒ １５、Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、２８９～３０２頁、Ｃｒｏｏｋｅ ａｎｄ Ｌｅｂｌｅｕ編集、ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ、１９９３年に見出すことができる。

【０２６９】

種々の複素環塩基および種々の糖部分（および糖類似体）を含む非天然核酸が当該技術分野において入手可能であり、場合によっては、核酸は、天然に存在する核酸の主な５塩基成分以外の１つまたは複数の複素環塩基を含む。例えば、複素環塩基は、場合によっては、ウラシル－５－イル、シトシン－５－イル、アデニン－７－イル、アデニン－８－イル、グアニン－７－イル、グアニン－８－イル、４－アミノピロロ［２．３－ｄ］ピリミジン－５－イル、２－アミノ－４－オキソピロロ［２，３－ｄ］ピリミジン－５－イル、２－アミノ－４－オキソピロロ［２．３－ｄ］ピリミジン－３－イル基を含み、プリンは、９位を介して核酸の糖部分に、１位を介してピリミジンに、７位を介してピロロピリミジンに、および１位を介してピラゾロピリミジンに結合する。

【０２７０】

一部の実施形態では、ヌクレオチド類似体はまた、リン酸部分で修飾される。修飾されたリン酸部分には、限定されないが、２つのヌクレオチド間の連結において修飾を有するものを含み、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび３’－アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートを含む他のアルキルホスホネート、ホスフィネート、ホスホルアミデート、例えば、３’－アミノホスホルアミデートおよびアミノ

アルキルホスホルアミデート、チオノホスホルアミデート、チオノアルキルホスホオネート、チオノアルキルホスホトリエステル、およびボラノホスフェートが含まれる、２つのヌクレオチド間のこれらのリン酸または修飾されたリン酸連結は、３’－５’連結または２’－５’連結を介しており、連結は、３’－５’から５’－３’、または２’－５’から５’－２’などの逆極性を含むことが理解される。種々の塩、混合塩および遊離酸形態も含まれる。多数の米国特許は、修飾されたリン酸塩を含有するヌクレオチドの製造および使用方法を教示し、限定されないが、米国特許第３，６８７，８０８号；同第４，４６９，８６３号；同第４，４７６，３０１号；同第５，０２３，２４３号；同第５，１７７，１９６号；同第５，１８８，８９７号；同第５，２６４，４２３号；同第５，２７６，０１９号；同第５，２７８，３０２号；同第５，２８６，７１７号；同第５，３２１，１３１号；同第５，３９９，６７６号；同第５，４０５，９３９号；同第５，４５３，４９６号；同第５，４５５，２３３号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７６，９２５号；同第５，５１９，１２６号；同第５，５３６，８２１号；同第５，５４１，３０６号；同第５，５５０，１１１号；同第５，５６３，２５３号；同第５，５７１，７９９号；同第５，５８７，３６１号；および同第５，６２５，０５０号が挙げられる。

【０２７１】

一部の実施形態では、非天然核酸は、２’，３’－ジデオキシ－２’，３’－ジデヒドロ－ヌクレオシド（ＰＣＴ／ＵＳ２００２／００６４６０）、５’－置換ＤＮＡおよびＲＮＡ誘導体（ＰＣＴ／ＵＳ２００２／０３３９６１；Ｓａｈａら、Ｊ．Ｏｒｇ　Ｃｈｅｍ．、１９９５年、６０巻、７８８～７８９頁；Ｗａｎｇら、Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ　＆　Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　Ｌｅｔｔｅｒｓ、１９９９年、９巻、８８５～８９０頁；およびＭｉｋｈａｉｌｏｖら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ　＆　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、１９９１年、１０巻（１～３号）、３３９～３４３頁；Ｌｅｏｎｉｄら、１９９５年、１４巻（３～５号）、９０１～９０５頁；およびＥｐｐａｃｈｅｒら、Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ　Ｃｈｉｍｉｃａ　Ａｃｔａ、２００４年、８７巻、３００４～３０２０頁；ＰＣＴ／ＪＰ２０００／００４７２０；ＰＣＴ／ＪＰ２００３／００２３４２；ＰＣＴ／ＪＰ２００４／０１３２１６；ＰＣＴ／ＪＰ２００５／０２０４３５；ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３１５４７９；ＰＣＴ／ＪＰ２００６／３２４４８４；ＰＣＴ／ＪＰ２００９／０５６７１８；ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０６７５６０）、または修飾塩基を有するリン酸塩として作製された５’－置換モノマーが含まれる。

【０２７２】

一部の実施形態では、非天然核酸には、５’－CH_2－置換２’－Ｏ－保護ヌクレオシド（Ｗｕら、Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ　Ｃｈｉｍｉｃａ　Ａｃｔａ、２０００年、８３巻、１１２７～１１４３頁、およびＷｕら、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．、１９９９年、１０巻、９２１～９２４頁）などの糖環（ＰＣＴ／ＵＳ９４／０２９９３）の５’位および２’位での修飾が含まれる。場合によっては、非天然核酸には、オリゴヌクレオチドへの組み込みのために製造されたアミド連結ヌクレオシド二量体が含まれ、二量体中の３’結連結ヌクレオシド（５’から３’）は、２’－OCH_3および５’－（Ｓ）－CH_3を含む（Ｍｅｓｍａｅｋｅｒら、Ｓｙｎｌｅｔｔ、１９９７年、１２８７～１２９０頁）。非天然核酸は、２’－置換５’－C_2H（またはＯ）修飾ヌクレオシド（ＰＣＴ／ＵＳ９２／０１０２０）を含むことができる。非天然核酸は、５’－メチレンホスホネートＤＮＡおよびＲＮＡモノマー、およびダイマーを含むことができる（Ｂｏｈｒｉｎｇｅｒら、Ｔｅｔ．Ｌｅｔｔ．、１９９３年、３４巻、２７２３～２７２６頁；Ｃｏｌｌｉｎｇｗｏｏｄら、Ｓｙｎｌｅｔｔ、１９９５年、７巻、７０３～７０５頁；およびＨｕｔｔｅｒら、Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ　Ｃｈｉｍｉｃａ　Ａｃｔａ、２００２年、８５巻、２７７７～２８０６頁）。非天然核酸は、２’－置換（米国特許出願公開第２００６／０００７４０３５号）および他の修飾５’－ホスホネートモノマー（国際公開第ＷＯ１９９７／３５８６９号）を有する５’－ホスホネートモノマーを含むことができる。非天然核酸は、５’－修飾メチレンホスホネートモノマー（ＥＰ６１４９０７およびＥＰ６２９６３３）を含むことができる。非天然核酸は、５’および／または６’位にヒドロキシル基を含む５’または６’－ホスホネートリボヌクレオ

シドの類似体を含むことができる（Ｃｈｅｎら、Ｐｈｏｓｐｈｏｒｕｓ，Ｓｕｌｆｕｒ ａｎｄ Ｓｉｌｉｃｏｎ、２００２年、７７７巻、１７８３～１７８６頁；Ｊｕｎｇら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、２０００年、８巻、２５０１～２５０９頁；Ｇａｌｌｉｅｒら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、２００７年、９２５～９３３頁；およびＨａｍｐｔｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９７６年、１９巻（８号）、１０２９～１０３３頁）。非天然核酸は、５’－ホスホネートデオキシリボヌクレオシドモノマーおよび５’－リン酸基を有するダイマーを含むことができる（Ｎａｗｒｏｔら、Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、２００６年、１６巻（１号）、６８～８２頁）。非天然核酸は、６’－ホスホネート基を有するヌクレオシドを含むことができ、５’または／および６’位は、置換されないか、またはチオ－ｔｅｒｔ－ブチル基（ＳＣ（ＣＨ$_3$）$_3$）（およびその類似体）；メチレンアミノ基（ＣＨ$_2$ＮＨ$_2$）（およびその類似体）もしくはシアノ基（ＣＮ）（およびその類似体）で置換されている（Ｆａｉｒｈｕｒｓｔら、Ｓｙｎｌｅｔｔ、２００１年、４巻、４６７～４７２頁；Ｋａｐｐｌｅｒら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８６年、２９巻、１０３０～１０３８頁；Ｋａｐｐｌｅｒら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８２年、２５巻、１１７９～１１８４頁；Ｖｒｕｄｈｕｌａら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９８７年、３０巻、８８８～８９４頁；Ｈａｍｐｔｏｎら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、１９７６年、１９巻、１３７１～１３７７頁；Ｇｅｚｅら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ、１９８３年、１０５巻（２６号）、７６３８～７６４０頁；およびＨａｍｐｔｏｎら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ、１９７３年、９５巻（１３号）、４４０４～４４１４頁）。

【０２７３】

一部の実施形態では、非天然核酸はまた、糖部分の修飾を含む。場合によっては、核酸は、糖基が修飾された１つまたはそれ以上のヌクレオシドを含む。このような糖修飾されたヌクレオシドは、増大したヌクレアーゼ安定性、増加した結合親和性、またはいくつかの他の有益な生物学的特性を付与し得る。特定の実施形態では、核酸は、化学的に修飾されたリボフラノース環部分を含む。化学的に修飾されたリボフラノース環の例としては、限定されないが、置換基（５’および／または２’置換基を含む）の付加；二環核酸（ＢＮＡ）を形成するための２つの環原子の架橋；リボシル環酸素原子のＳ、Ｎ（Ｒ）、またはＣ（Ｒ$_1$）（Ｒ$_2$）（Ｒ＝Ｈ、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルまたは保護基）での置換；およびそれらの組み合わせが挙げられる。化学的に修飾された糖の例は、国際公開第ＷＯ２００８／１０１１５７号、米国特許出願公開第２００５／０１３０９２３号、および国際公開第ＷＯ２００７／１３４１８１号に見出すことができる。

【０２７４】

いくつかの例では、修飾された核酸は、修飾された糖または糖類似体を含む。したがって、リボースおよびデオキシリボースに加えて、糖部分は、ペントース、デオキシペントース、ヘキソース、デオキシヘキソース、グルコース、アラビノース、キシロース、リキソース、または糖「類似体」シクロペンチル基であり得る。糖は、ピラノシルまたはフラノシル形であり得る。糖部分は、リボース、デオキシリボース、アラビノースまたは２’－Ｏ－アルキルリボースのフラノシドであり、糖は、［アルファ］または［ベータ］アノマ立体配置のいずれかで、それぞれの複素環塩基に結合される。糖修飾には、限定されないが、２’－アルコキシ－ＲＮＡ類似体、２’－アミノ－ＲＮＡ類似体、２’－フルオロ－ＤＮＡ、および２’－アルコキシ－またはアミノ－ＲＮＡ／ＤＮＡキメラが含まれる。例えば、糖修飾は、２’－Ｏ－メチル－ウリジンまたは２’－Ｏ－メチル－シチジンを含み得る。糖修飾には、２’－Ｏ－アルキル置換デオキシリボヌクレオシドおよび２’－Ｏ－エチレングリコール様リボヌクレオシドが含まれる。これらの糖または糖類似体、およびこのような糖または類似体が複素環塩基（核酸塩基）に結合しているそれぞれの「ヌクレオシド」の製造は公知である。また、糖修飾を行い、他の修飾と組み合わせることができる。

【０２７５】

糖部分への修飾には、リボースおよびデオキシリボースの天然修飾ならびに非天然修飾が含まれる。糖修飾には、限定されないが、２’位での以下の修飾が含まれる：ＯＨ；Ｆ；

Ｏ－、Ｓ－またはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－またはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－またはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキル（アルキル、アルケニルおよびアルキニルは、置換または非置換の$Ｃ_{１}$～$Ｃ_{１０}$アルキル、または$Ｃ_{２}$～$Ｃ_{１０}$アルケニルおよびアルキニルであり得る）。また、２’糖修飾には、限定されておらず、－Ｏ［（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$Ｏ］$_{ｍ}$$ＣＨ_{３}$、－Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$$ＯＣＨ_{３}$、－Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$$ＮＨ_{２}$、－Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$$ＣＨ_{３}$、－Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$$ＯＮＨ_{２}$、および－Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$$ＯＮ［（$ＣＨ_{２}$）$_{ｎ}$$ＣＨ_{３}$）］$_{２}$（ｎおよびｍは、１～約１０である）が含まれる。

【０２７６】

２’位における他の修飾には、限定されないが、$Ｃ_{１}$～$Ｃ_{１０}$低級アルキル、置換された低級アルキル、アルカリル、アラルキル、Ｏ－アルカリル、Ｏ－アラルキル、ＳＨ、$ＳＣＨ_{３}$、ＯＣＮ、Ｃｌ、Ｂｒ、ＣＮ、$ＣＦ_{３}$、$ＯＣＦ_{３}$、$ＳＯＣＨ_{３}$、$ＳＯ_{２}ＣＨ_{３}$、$ＯＮＯ_{２}$、$ＮＯ_{２}$、$Ｎ_{３}$、$ＮＨ_{２}$、ヘテロシクロアルキル、ヘテロシクロアルカリル、アミノアルキルアミノ、ポリアルキルアミノ、置換されたシリル、ＲＮＡ切断基、レポーター基、インターカレーター、オリゴヌクレオチドの薬物動態特性を改善するための基、またはオリゴヌクレオチドの薬力学的特性を改善するための基、および同様の特性を有する他の置換基が含まれる。同様の修飾はまた、糖上の他の位置、特に、３’末端ヌクレオチド上の糖の３’位置で、または２’－５’連結オリゴヌクレオチド中の糖の５’位置、および５’末端ヌクレオチドの５’位置において行うことができる。また、修飾された糖には、$ＣＨ_{２}$およびＳなどの架橋環酸素の修飾を含むものが含まれる。ヌクレオチド糖類似体はまた、ペントフラノシル糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣体を有することができる。このような修飾された糖構造の製造を教示し、一連の塩基修飾を詳細に記載する多数の米国特許が存在し、例えば、米国特許第４，９８１，９５７号；同第５，１１８，８００号；同第５，３１９，０８０号；同第５，３５９，０４４号；同第５，３９３，８７８号；同第５，４４６，１３７号；同第５，４６６，７８６号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５１９，１３４号；同第５，５６７，８１１号；同第５，５７６，４２７号；同第５，５９１，７２２号；同第５，５９７，９０９号；同第５，６１０，３００号；同第５，６２７，０５３号；同第５，６３９，８７３号；同第５，６４６，２６５号；同第５，６５８，８７３号；同第５，６７０，６３３号；同第４，８４５，２０５号；同第５，１３０，３０２号；同第５，１３４，０６６号；同第５，１７５，２７３号；同第５，３６７，０６６号；同第５，４３２，２７２号；同第５，４５７，１８７号；同第５，４５９，２５５号；同第５，４８４，９０８号；同第５，５０２，１７７号；同第５，５２５，７１１号；同第５，５５２，５４０号；同第５，５８７，４６９号；同第５，５９４，１２１，同第５，５９６，０９１号；同第５，６１４，６１７号；同第５，６８１，９４１号；および同第５，７００，９２０号が挙げられ、各々は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【０２７７】

修飾された糖部分を有する核酸の例としては、限定されないが、５’－ビニル、５’－メチル（ＲまたはＳ）、４’－Ｓ、２’－Ｆ、２’－$ＯＣＨ_{３}$および２’－Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{２}$$ＯＣＨ_{３}$置換基を含む核酸が挙げられる。２’位の置換基はまた、アリル、アミノ、アジド、チオ、Ｏ－アリル、Ｏ－（$Ｃ_{１}$－$Ｃ_{１０}$アルキル）、$ＯＣＦ_{３}$、Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{２}$$ＳＣＨ_{３}$、Ｏ（$ＣＨ_{２}$）$_{２}$－Ｏ－Ｎ（$Ｒ_{ｍ}$）（$Ｒ_{ｎ}$）、およびＯ－$ＣＨ_{２}$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（$Ｒ_{ｍ}$）（$Ｒ_{ｎ}$）から選択することができ、各$Ｒ_{ｍ}$および$Ｒ_{ｎ}$は、独立して、Ｈまたは置換もしくは非置換$Ｃ_{１}$－$Ｃ_{１０}$アルキルである。

【０２７８】

特定の実施形態では、本明細書に記載される核酸は、１つまたはそれ以上の二環状核酸を含む。特定のこのような実施形態では、二環式核酸は、４’および２’リボシル環原子間の架橋を含む。特定の実施形態では、本明細書で提供される核酸は、１つまたはそれ以上の二環状核酸を含み、架橋は、４’から２’の二環状核酸を含む。このような４’から２’の二環式核酸の例としては、限定されないが、４’－（$ＣＨ_{２}$）－Ｏ－２’（ＬＮＡ）；４’－（$ＣＨ_{２}$）－Ｓ－２’；４’－（$Ｃ_{２}Ｈ_{４}$）$_{２}$－Ｏ－２’（ＥＮＡ）；４’－$ＣＨ（Ｃ_{３}Ｈ_{６}）$－Ｏ－

２’および４’－ＣＨ（C_2H）－Ｏ－ＣＨ$_3$）－Ｏ－２’、ならびにそれらの類似体（例えば、米国特許第７，３９９，８４５号を参照されたい）；４’－Ｃ（ＣＨ$_3$）（ＣＨ$_3$）－Ｏ－２’およびその類似体（国際公開第ＷＯ２００９／００６４７８号、国際公開第ＷＯ２００８／１５０７２９号、米国特許出願公開第２００４／０１７１５７０号、米国特許第７，４２７，６７２号、Ｃｈａｔｔｏｐａｄｈｙａｙａら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、２００９年、７４巻、１１８～１３４号および国際公開第ＷＯ２００８／１５４４０１号を参照されたい）。また、例えば、Ｓｉｎｇｈら、Ｃｈｅｍ．Ｃｏｍｍｕｎ．、１９９８年、４巻、４５５～４５６頁；Ｋｏｓｈｋｉｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ、１９９８年、５４巻、３６０７～３６３０頁；Ｗａｈｌｅｓｔｅｄｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．、２０００年、９７巻、５６３３～５６３８頁；Ｋｕｍａｒら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔｔ．、１９９８年、８巻、２２１９～２２２２頁；Ｓｉｎｇｈら、Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．、１９９８年、６３巻、１００３５～１００３９頁；Ｓｒｉｖａｓｔａｖａら、Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．、２００７年、１２９巻（２６号）８３６２～８３７９頁；Ｅｌａｙａｄｉら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｉｎｖｅｎｓ．Ｄｒｕｇｓ、２００１年、２巻、５５８～５６１頁；Ｂｒａａｓｃｈら、Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ、２００１年、８巻、１～７頁；Ｏｒａｍら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ Ｍｏｌ．Ｔｈｅｒ．，２００１年、３巻、２３９～２４３頁；米国特許第４，８４９，５１３号；同第５，０１５，７３３号；同第５，１１８，８００号；同第５，１１８，８０２号；同第７，０５３，２０７号；同第６，２６８，４９０号；同第６，７７０，７４８号；同第６，７９４，４９９号；同第７，０３４，１３３号；同第６，５２５，１９１号；同第６，６７０，４６１号；および同第７，３９９，８４５号；国際公開第ＷＯ２００４／１０６３５６号、同ＷＯ１９９４／１４２２６号、同第ＷＯ２００５／０２１５７０号、同第ＷＯ２００７／０９００７１号、および同第ＷＯ２００７／１３４１８１号；米国特許出願公開第２００４／０１７１５７０号、同第２００７／０２８７８３１号、および同第２００８／００３９６１８号；米国仮特許出願第６０／９８９，５７４号、同第６１／０２６，９９５号、同第６１／０２６，９９８号、同第６１／０５６，５６４号、同第６１／０８６，２３１号、同第６１／０９７，７８７号、および同第６１／０９９，８４４号；ならびに国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０６４５９１号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０６６１５４号、同第ＰＣＴ／ＵＳ２００８／０６８９２２号、および同第ＰＣＴ／ＤＫ９８／００３９３号を参照されたい。

【０２７９】

特定の実施形態では、核酸は、連結した核酸を含む。核酸は、任意の核酸間連結を用いて一緒に連結することができる。核酸間連結基の２つの主要なクラスは、リン原子の有無によって定義される。核酸間連結を含む代表的なリンとしては、限定されないが、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、ホスホラミデート、およびホスホロチオエート（Ｐ＝Ｓ）が挙げられる。代表的な非リン含有核酸連結基としては、限定されないが、メチレンメチルイミノ（－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｏ－ＣＨ$_2$－）、チオジエステル（－Ｏ－Ｃ（Ｏ）－Ｓ－）、チオノカルバメート（－Ｏ－Ｃ（Ｏ）（ＮＨ）－Ｓ－）；シロキサン（－Ｏ－Ｓｉ（Ｈ）$_2$－Ｏ－）；およびＮ，Ｎ＊－ジメチルヒドラジン（－ＣＨ$_2$－Ｎ（ＣＨ$_3$）－Ｎ（ＣＨ$_3$））が挙げられる。特定の実施形態では、キラル原子を有する核酸間連結は、ラセミ混合物として、別個のエナンチオマー、例えば、アルキルホスホネートおよびホスホロチオエートとして製造することができる。非天然核酸は単一の修飾を含むことができる。非天然核酸は、１つの部分内または異なる部分間に複数の修飾を含有することができる。

【０２８０】

核酸に対する骨格リン酸修飾としては、限定されないが、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロアミデート（架橋または非架橋）、ホスホトリエステル、ホスホロジチオエート、ホスホジチオエート、およびボラノホスフェートが挙げられ、任意の組み合わせで使用することができる。他の非リン酸連結もまた使用することができる。

【０２８１】

特定の実施形態では、骨格修飾（例えば、メチルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロアミデートおよびホスホロジチオエートヌクレオチド間連結）は、修飾された核酸に対して免疫調節活性を付与することができ、および／またはインビボでのそれらの安定性を増大させることができる。

【０２８２】

いくつかの例では、リン誘導体（または修飾されたリン酸基）は、糖または糖類似体部分に結合され、一リン酸、二リン酸、三リン酸、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミデートなどであり得る。修飾されたリン酸連結または非リン酸連結を含む例示的なポリヌクレオチドは、Ｐｅｙｒｏｔｔｅｓら、１９９６年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２４巻：１８４１～１８４８頁；Ｃｈａｔｕｒｖｅｄｉら、１９９６年、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２４巻：２３１８～２３２３頁；およびＳｃｈｕｌｔｚら、（１９９６年）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２４巻：２９６６～２９７３頁；Ｍａｔｔｅｕｃｃｉ、１９９７年、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ａｎａｌｏｇｓ：ａｎ Ｏｖｅｒｖｉｅｗ」、Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｓ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｇｅｎｔｓ、（Ｃｈａｄｗｉｃｋ ａｎｄ Ｃａｒｄｅｗ編集）、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ；Ｚｏｎ、１９９３年、「Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅ Ｐｈｏｓｐｈｏｒｏｔｈｉｏａｔｅｓ」、Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｆｏｒ Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ａｎａｌｏｇｓ、Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ ａｎｄ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、１６５～１９０頁；Ｍｉｌｌｅｒら、１９７１年、ＪＡＣＳ、９３巻：６６５７～６６６５頁；Ｊａｇｅｒら、１９８８年、Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２７巻：７２４７～７２４６頁；Ｎｅｌｓｏｎら、１９９７年、ＪＯＣ、６２巻：７２７８～７２８７頁；米国特許第５，４５３，４９６号；およびＭｉｃｋｌｅｆｉｅｌｄ、２００１年、Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．、８巻：１１５７～１１７９頁に見出すことができる。

【０２８３】

場合によっては、骨格修飾は、ホスホジエステル連結を、アニオン性、中性またはカチオン性基などの別の部分で置換することを含む。このような修飾の例としては、アニオン性ヌクレオシド間連結；Ｎ３’からＰ５’ホスホラミデート修飾；ボラノホスフェートＤＮＡ；プロオリゴヌクレオチド；メチホスホネートなどの中性ヌクレオシド間連結；アミド連結されたＤＮＡ；メチレン（メチルイミノ）連結；ホルマセタールおよびチオフォームアセタール連結；スルホニル基を含む骨格；モルホリノオリゴ；ペプチド核酸（ＰＮＡ）；および正に荷電したデオキシリボ核酸グアニジン（ＤＮＧ）オリゴ（Ｍｉｃｋｌｅｆｉｅｌｄ、２００１年、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、８巻：１１５７～１１７９頁）が挙げられる。修飾核酸は、１つまたはそれ以上の修飾、例えば、ホスホジエステルおよびホスホロチオエート連結の組み合わせなどのリン酸連結の組み合わせを含む、キメラまたは混合骨格を含み得る。

【０２８４】

リン酸塩の置換基としては、例えば、短鎖アルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド間連結、または１つまたはそれ以上の短鎖ヘテロ原子もしくは複素環ヌクレオシド間連結が挙げられる。これらには、モルホリノ連結（ヌクレオシドの糖部分から部分的に形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシドおよびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；ならびに混合Ｎ、Ｏ、ＳおよびＣＨ$_2$構成部分を有する他のものが含まれる。多数の米国特許は、これらのタイプのリン酸塩置換を製造し、使用する方法を開示しており、限定されないが、米国特許第５，０３４，５０６号；同第５，１６６，３１５号；同第５，１８５，４４４号；同第５，２１４，１３４号；同第５，２１６，１４１号；同第５，２３５，０３３号；同第５，２６４，５６２号；同第５，２６４，５６４号；同第５，４０５，９３８号；同第５，４３４，２５７

号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７０，９６７号；同第５，４８９，６７７号；同第５，５４１，３０７号；同第５，５６１，２２５号；同第５，５９６，０８６号；同第５，６０２，２４０号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６０２，２４０号；同第５，６０８，０４６号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６１８，７０４号；同第５，６２３，０７０号；同第５，６６３，３１２号；同第５，６３３，３６０号；同第５，６７７，４３７号；および同第５，６７７，４３９号が挙げられる。また、ヌクレオチドの糖とリン酸部分の両方が、例えば、アミド型連結（アミノエチルグリジン）（ＰＮＡ）によって置換されることもヌクレオチド置換において理解される。米国特許第５，５３９，０８２号；同第５，７１４，３３１号；および同第５，７１９，２６２号は、ＰＮＡ分子の作製法および使用法を教示しており、これらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。Ｎｉｅｌｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９９１年、２５４巻、１４９７～１５００頁も参照されたい。他のタイプの分子（コンジュゲート）をヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に連結させて、例えば、細胞取り込みを増大させることも可能である。コンジュゲートは、ヌクレオチドまたはヌクレオチド類似体に化学的に連結することができる。このようなコンジュゲートには、限定されないが、脂質部分、例えば、コレステロール部分（Ｌｅｔｓｉｎｇｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８９年、８６巻、６５５３～６５５６頁）、コール酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．、１９９４年、４巻、１０５３～１０６０頁）、チオエーテル、例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ａｎｎ．ＫＹ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、１９９２年、６６０巻、３０６～３０９頁；Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．Ｌｅｔ．、１９９３年、３巻、２７６５～２７７０頁）、チオコレステロール（Ｏｂｅｒｈａｕｓｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９９２年、２０巻、５３３～５３８頁）、脂肪族鎖、例えば、ドデカンジオールもしくはウンデシル残基（Ｓａｉｓｏｎ－Ｂｅｈｍｏａｒａｓら、ＥＭＳＯ Ｊ、１９９１年、１０巻、１１１１～１１１８頁；Ｋａｂａｎｏｖら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．、１９９０年、２５９巻、３２７～３３０頁；Ｓｖｉｎａｒｃｈｕｋら、Ｂｉｏｃｈｉｍｉｅ、１９９３年、７５巻、４９～５４頁）、リン脂質、例えば、ジヘキサデシル－ｒａｃ－グリセリンもしくはトリエチルアンモニウム １－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－Ｓ－Ｈ－ホスホネート（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．、１９９５年、３６巻、３６５１～３６５４頁；Ｓｈｅａら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１９９０年、１８巻、３７７７～３７８３頁）、ポリアミンもしくはポリエチレングリコール鎖（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｎｕｃｌｅｏｓｉｄｅｓ ＆ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅｓ、１９９５年、１４巻、９６９～９７３頁）、またはアダマンタン酢酸（Ｍａｎｏｈａｒａｎら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．ら、１９９５年、３６巻、３６５１～３６５４頁）、パルミチル部分（Ｍｉｓｈｒａら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ、１９９５年、１２６４巻、２２９～２３７頁）、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分（Ｃｒｏｏｋｅら、Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．、１９９６年、２７７巻、９２３～９３７頁）が含まれる。多数の米国特許は、このようなコンジュゲートの製造を教示し、限定されないが、米国特許第４，８２８，９７９号；同第４，９４８，８８２号；同第５，２１８，１０５号；同第５，５２５，４６５号；同第５，５４１，３１３号；同第５，５４５，７３０号；同第５，５５２，５３８号；同第５，５７８，７１７号、同第５，５８０，７３１号；同第５，５９１，５８４号；同第５，１０９，１２４号；同第５，１１８，８０２号；同第５，１３８，０４５号；同第５，４１４，０７７号；同第５，４８６，６０３号；同第５，５１２，４３９号；同第５，５７８，７１８号；同第５，６０８，０４６号；同第４，５８７，０４４号；同第４，６０５，７３５号；同第４，６６７，０２５号；同第４，７６２，７７９号；同第４，７８９，７３７号；同第４，８２４，９４１号；同第４，８３５，２６３号；同第４，８７６，３３５号；同第４，９０４，５８２号；同第４，９５８，０１３号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，

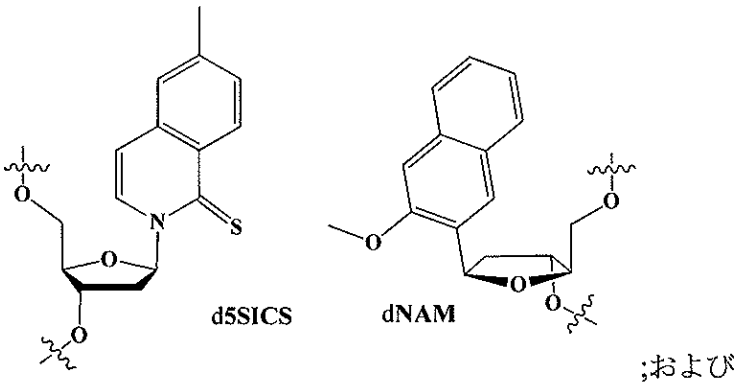
２４５，０２２号；同第５，２５４，４６９号；同第５，２５８，５０６号；同第５，２６２，５３６号；同第５，２７２，２５０号；同第５，２９２，８７３号；同第５，３１７，０９８号；同第５，３７１，２４１号、同第５，３９１，７２３号；同第５，４１６，２０３号、同第５，４５１，４６３号；同第５，５１０，４７５号；同第５，５１２，６６７号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５６５，５５２号；同第５，５６７，８１０号；同第５，５７４，１４２号；同第５，５８５，４８１号；同第５，５８７，３７１号；同第５，５９５，７２６号；同第５，５９７，６９６号；同第５，５９９，９２３号；同第５，５９９，９２８号および同第５，６８８，９４１号が含まれる。

【０２８５】

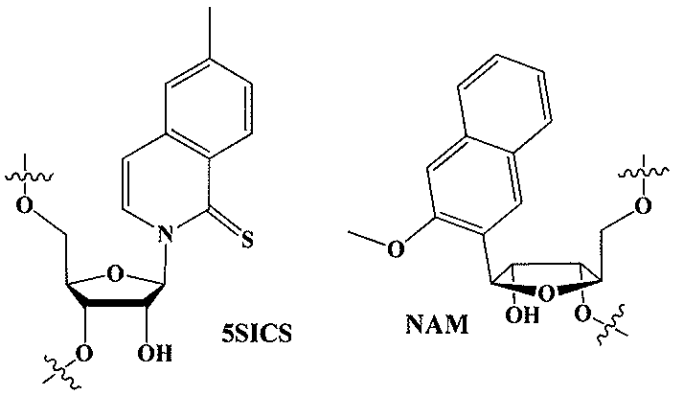
場合によっては、非天然核酸は、さらに、非天然塩基対を形成する。インビボでの条件下で非天然ＤＮＡまたはＲＮＡ塩基対（ＵＢＰ）を形成することができる例示的な非天然ヌクレオチドには、限定されないが、５ＳＩＣＳ、ｄ５ＳＩＣＳ、ＮＡＭ、ｄＮａＭ、およびそれらの組み合わせが含まれる。一部の実施形態では、非天然ヌクレオチドは、以下を含む：

【０２８６】

【化２０】



;および



【０２８７】

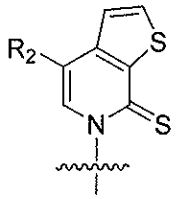
場合によっては、非天然核酸はさらに非天然塩基対を形成する。インビボでの条件下で非天然ＤＮＡまたはＲＮＡ塩基対（ＵＢＰ）を形成することができる例示的な非天然ヌクレオチドには、限定されないが、ＴＰＴ３、ｄＴＰＴ３、５ＳＩＣＳ、ｄ５ＳＩＣＳ、ＮａＭ、ｄＮａＭ、ＣＮＭＯ、ｄＣＮＭＯ、およびそれらの組み合わせを含む。本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートを製造するために使用される非天然ＵＢＰを形成することができる非天然ヌクレオチドの他の例は、Ｄｉｅｎら、Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．、２０１８年、１４０巻：１６１１５～１６１２３頁；Ｆｅｌｄｍａｎら、Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ、２０１７年、１３９巻：１１４２７～１１４３３頁；Ｌｅｄｂｅｔｔｅ

ｒら、Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．、２０１８年、１４０巻：７５８～７６５頁；Ｄｈａｍｉら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２０１４年、４２巻：１０２３５～１０２４４頁；Ｍａｌｙｓｈｅｖら、Ｎａｔｕｒｅ、２０１４年、５０９巻：３８５～３８８頁；Ｂｅｔｚら、Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．、２０１３年、１３５巻：１８６３７～１８６４３頁；Ｌａｖｅｒｇｎｅら、Ｊ Ａｍ Ｃｈｅｍ Ｓｏｃ．２０１３年、１３５巻：５４０８～５４１９頁；Ｍａｌｙｓｈｅｖら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ、２０１２年、１０９巻：１２００５～１２０１０頁に見出される。

【０２８８】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートを製造するために使用される非天然ヌクレオチドは、式：

【化２１】



〔式中、R_2は、水素、アルキル、アルケニル、アルキニル、メトキシ、メタンチオール、メタンセレノ、ハロゲン、シアノおよびアジドからなる群から選択され；ならびに

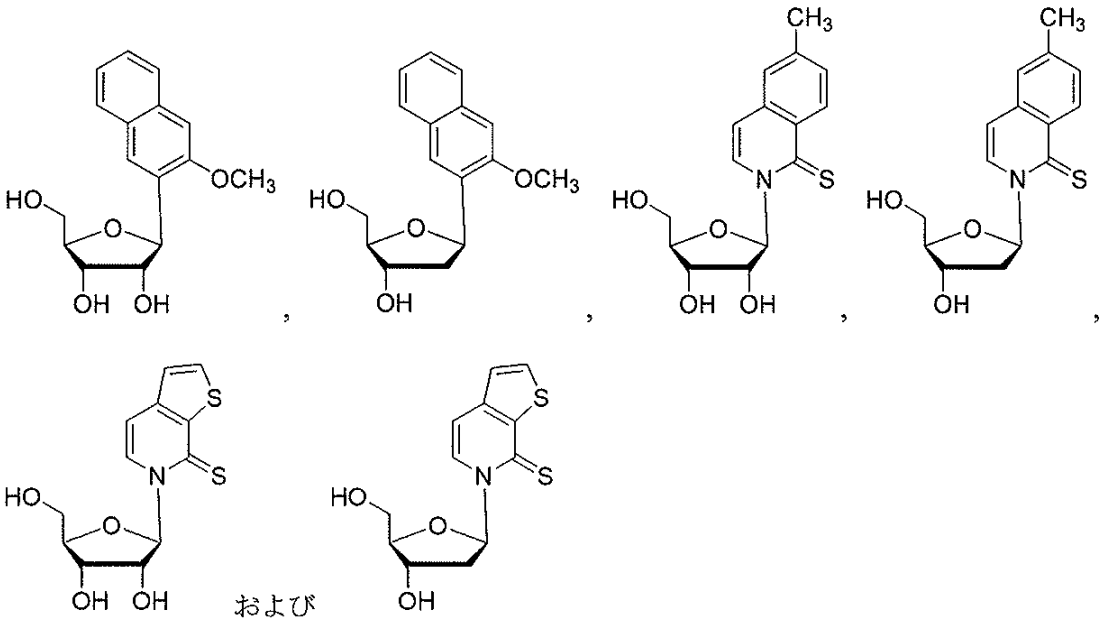
波線は、リボシルまたは２’－デオキシリボシルへの結合を示し、リボシルまたは２’－デオキシリボシル部分の５’－ヒドロキシ基は、遊離型であるか、または場合により、一リン酸基、二リン酸基もしくは三リン酸基に結合する〕

の化合物に由来し得る。

【０２８９】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートを製造するために使用される非天然ヌクレオチドは、

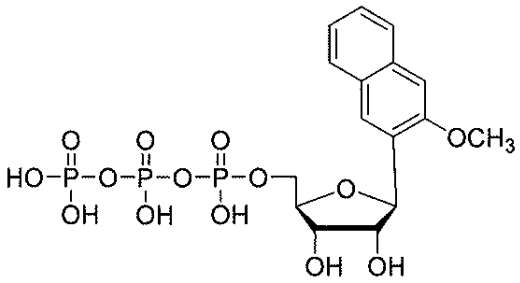
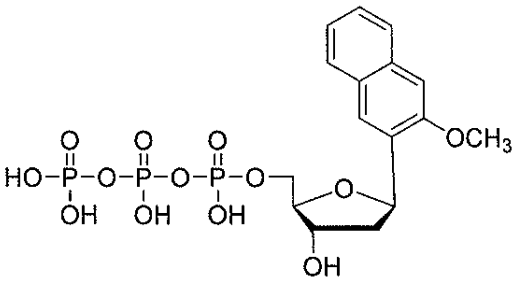
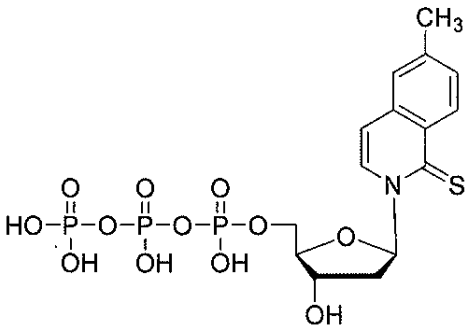
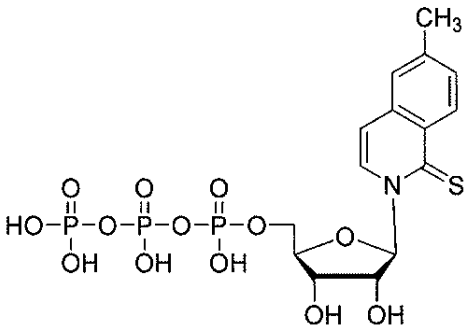
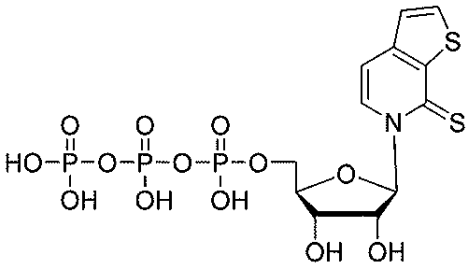
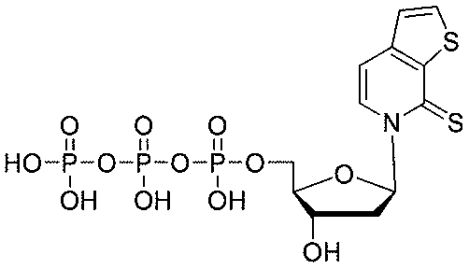
【化２２】



に由来し得る。一部の実施形態では、本明細書に開示されるＩＬ－１０コンジュゲートを製造するために使用される非天然ヌクレオチドは、

【０２９０】

【化２３】


,

,

,

,

および


またはその塩を含む。

【０２９１】

一部の実施形態では、非天然アミノ酸は、下記に列挙されるものを含む合成コドン／アンチコドン対によってＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。

【０２９２】

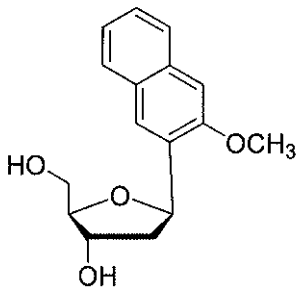
【表１】

コドン(mRNA)	アンチコドン(tRNA)
UUX	YAA または XAA
UGX	YCA または XCA
CGX	YCG または XCG
AGX	YCU または XCU
GAX	YUC または XUC
CAX	YUG または XUG
GXU	AYC
CXU	AYG
GXG	CYC
AXG	CYU
GXC	GYC
AXC	GYU
GXA	UYC
CXC	GYG
UXC	GYA
AUX	YAU または XAU
CUX	XAG または YAG
GUX	XAC または YAC
UAX	XUA または YUA
GGX	XCC または YCC

【０２９３】

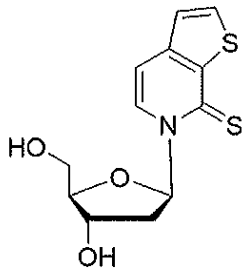
ここで、ＸおよびＹは、本明細書に開示される非天然塩基を含む。例えば、Ｘは、

【化２４】



に由来するヌクレオチドであり得、Ｙは、

【化２５】



に由来するヌクレオチドであり得る。

【０２９４】

一部の実施形態では、非天然塩基対は、Ｄｕｍａｓら、「Ｄｅｓｉｇｎｉｎｇ ｌｏｇｉｃａｌ ｃｏｄｏｎ ｒｅａｓｓｉｇｎｍｅｎｔ－Ｅｘｐａｎｄｉｎｇ ｔｈｅ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｉｎ ｂｉｏｌｏｇｙ」、Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ、６巻：５０～６９頁（２０１５年）に記載される非天然アミノ酸を生じる。

【０２９５】

本明細書に開示される構築物またはベクターが導入される宿主細胞は、目的のｔＲＮＡ、ｔＲＮＡシンテターゼおよびタンパク質が産生されるように、適切な培地中で培養または維持される。培地はまた、目的のタンパク質が非天然アミノ酸（単数または複数）を取り込むように非天然アミノ酸（単数または複数）を含む。

【０２９６】

直交性ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対は、非天然アミノ酸をｔＲＮＡに付加し、コドンに応答して非天然アミノ酸をポリペプチド鎖に組み込む。例示的なａａＲＳ－ｔＲＮＡ対としては、限定されないが、メタノカルドコックス・ヤンナスキイ（Ｍｅｔｈａｎｏｃｏｃｃｕｓ ｊａｎｎａｓｃｈｉｉ）（Ｍｊ－Ｔｙｒ）ａａＲＳ／ｔＲＮＡ対、大腸菌ＴｙｒＲＳ（Ｅｃ－Ｔｙｒ）／バチルス・ステアロサーモフィルス（Ｂ．ｓｔｅａｒｏｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ）ｔＲＮＡ$_{CUA}$対、大腸菌ＬｅｕＲＳ（Ｅｃ－Ｌｅｕ）／バチルス・ステアロサーモフィルスｔＲＮＡ$_{CUA}$対、およびピロリシル－ｔＲＮＡ対が挙げられる。

【０２９７】

非天然アミノ酸（単数または複数）を含むＩＬ－１０ポリペプチドは、ｔＲＮＡおよびｔＲＮＡシンテターゼを含み、１つまたはそれ以上のインフレーム直交性（終止）コドンを有する目的の核酸配列を含む、本明細書に記載される核酸構築物を宿主細胞に導入することによって製造される。宿主細胞は、非天然アミノ酸（単数または複数）を含む生理的溶液に曝露され、その後、宿主細胞は、目的のタンパク質のコード配列の発現を可能にする条件下で維持される。非天然アミノ酸（単数または複数）は、コドンに応答してポリペプチド鎖に組み込まれる。例えば、１つまたはそれ以上の非天然アミノ酸がＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。あるいは、２つ以上の非天然アミノ酸が、タンパク質中の２つ以上の部位でＩＬ－１０ポリペプチドに組み込まれる。

【０２９８】

複数の非天然アミノ酸をＩＬ－１０ポリペプチドに組み込む場合、複数のコドンを所望の位置のコード核酸配列に組み込む必要があり、その結果、ｔＲＮＡシンテターゼ／ｔＲＮＡ対がコドン（単数または複数）に応答して非天然アミノ酸の組み込みを指示することができる。核酸をコードする少なくとも１、２、３、４個、またはそれ以上のコドンは、目的とする核酸配列に組み込まれ得る。

【０２９９】

単一のタンパク質に１を超えるタイプの非天然アミノ酸を組み込むことが望ましい場合、第２のまたはさらなる直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼ対を使用して、第２のまたはさらなる非天然アミノ酸を組み込むことができ；適切には、上記第２のまたはさらなる直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼ対は、目的のタンパク質をコードする核酸中の異なるコドンを認識し、その結果、２つ以上の非天然アミノ酸を、単一の製造工程において、タンパク質中の異なる定義された部位に特異的に組み込むことができる。特定の実施形態では、したがって、２つ以上の直交性ｔＲＮＡ－ｔＲＮＡシンテターゼ対を使用することができる。

【０３００】

一旦、非天然アミノ酸（単数または複数）を組み込んだＩＬ－１０ポリペプチドが宿主細胞内に生成されると、それは、酵素的、化学的ならびに／または浸透圧的溶解および物理的破壊を含む、当該技術分野において公知である種々の技術によって、宿主細胞から抽出することができる。ＩＬ－１０ポリペプチドは、分取用クロマトグラフィー、アフィニ

ティ精製または任意の他の適切な技術などの当該技術分野において公知である標準技術によって精製することができる。

【０３０１】

適切な宿主細胞としては、細菌細胞（例えば、大腸菌）が含まれ得るが、最も適切な宿主細胞は、真核細胞、例えば、昆虫細胞（例えば、キイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）などのショウジョウバエ）、酵母細胞、線虫（例えば、シノラブディス・エレガンス（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ））、マウス（例えば、ハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ））、または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）もしくはＣＯＳ細胞、ヒト２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、およびマウス赤白血病（ＭＥＬ）細胞）、もしくはヒト細胞または他の真核細胞である。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。適切には、宿主細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒト細胞、または昆虫細胞である。

【０３０２】

適切な宿主細胞は、細菌細胞（例えば、大腸菌、ＢＬ２１（ＤＥ３））を含み得るが、最も適切には、宿主細胞は、真核細胞、例えば、昆虫細胞（例えば、キイロショウジョウバエ（Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ）などのショウジョウバエ）、酵母細胞、線虫（例えば、Ｃ．エレガンス（Ｃ．ｅｌｅｇａｎｓ）、マウス（例えば、ハツカネズミ（Ｍｕｓ　ｍｕｓｃｕｌｕｓ））、または哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）もしくはＣＯＳ細胞、ヒト２９３Ｔ細胞、ＨｅＬａ細胞、ＮＩＨ３Ｔ３細胞、およびマウス赤白血病（ＭＥＬ）細胞）、またはヒト細胞もしくは他の真核細胞である。他の適切な宿主細胞は、当業者に公知である。適切には、宿主細胞は、ヒト細胞または昆虫細胞などの哺乳動物細胞である。一部の実施形態では、適切な宿主細胞は大腸菌を含む。

【０３０３】

本発明の実施形態では一般的に使用される他の適切な宿主細胞は、実施例の節において言及されているものである。ベクターＤＮＡは、従来の形質転換またはトランスフェクション技術を介して宿主細胞に導入することができる。本明細書で使用される場合、用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む、宿主細胞に外来核酸分子（例えば、ＤＮＡ）を導入するための種々のよく知られた技術を指すことが意図される。宿主細胞を形質転換またはトランスフェクションするための適切な方法は、当該技術分野において周知である。

【０３０４】

細胞株を作製する場合、一般的に、安定した細胞系を製造することが好ましい。例えば、哺乳動物細胞の安定したトランスフェクションのためには、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技術に依存して、外来ＤＮＡがそのゲノムに組み込まれる細胞はごくわずかなことがあることが公知である。これらの組込み体を同定し、選択するために、選択マーカー（例えば、抗生物質に対する耐性）をコードする遺伝子を、一般的に、目的の遺伝子とともに宿主細胞に導入する。好ましい選択マーカーには、Ｇ４１８、ヒグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与するマーカーが含まれる。選択マーカーをコードする核酸分子は、同じベクター上の宿主細胞に導入することができ、または別のベクター上に導入することもできる。導入された核酸分子で安定にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって同定することができる（例えば、選択マーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存し、一方、他の細胞は死滅する）。

【０３０５】

一実施形態では、本明細書に記載される構築物は、宿主細胞のゲノムに組み込まれる。安定した組込みの利点は、個々の細胞またはクローン間の均一性が達成されることである。別の利点は、最良の産生細胞の選択が行われる場合があることである。したがって、安定した細胞株を作製することが望ましい。別の実施形態では、本明細書に記載される構築物は、宿主細胞にトランスフェクトされる。構築物を宿主細胞にトランスフェクトする利

点は、タンパク質収率が最大化されることである。一態様では、本明細書に記載される核酸構築物またはベクターを含む細胞が記載される。

【０３０６】

医薬組成物および製剤

一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物および製剤は、限定されないが、非経口、経口、または経皮投与経路を含む、複数の投与経路によって対象に投与される。場合によっては、非経口投与は、静脈内、皮下、筋肉内、脳内、鼻腔内、動脈内、関節内、皮内、硝子体内、骨内輸注、腹腔内、または髄腔内投与を含む。いくつかの例では、医薬組成物は、局所投与のために製剤化される。他の例では、医薬組成物は、全身投与のために製剤化される。

【０３０７】

一部の実施形態では、医薬製剤としては、限定されないが、水性液体分散液、自己乳化分散液、リポソーム分散液、エアロゾル、即放性製剤、制御放出製剤、遅延放出製剤、徐放性製剤、拍動性放出製剤、ならびに混合した即放性および制御放出製剤が挙げられる。

【０３０８】

一部の実施形態では、医薬製剤は、本明細書に開示される組成物との適合性に基づいて選択された担体または担体材料、および所望の投薬形態の放出プロファイル特性を含む。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ、Ｎｉｎｅｔｅｅｎｔｈ編集（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ、１９９５年）、Ｈｏｏｖｅｒ，Ｊｏｈｎ Ｅ．、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、Ｅａｓｔｏｎ、Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ、１９７５年、Ｌｉｂｅｒｍａｎ，Ｈ．Ａ．およびＬａｃｈｍａｎ，Ｌ．編集、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｃｋｅｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．、１９８０年、およびＰｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ、第７版（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓ １９９９年）を参照されたい。

【０３０９】

場合によっては、医薬組成物は、リポソームの脂質二重層に直接的または間接的に結合した複数のＩＬ－１０コンジュゲートを含む免疫リポソームとして製剤化される。例示的な脂質としては、限定されないが、脂肪酸；リン脂質；コレステロールなどのステロール；スフィンゴミエリンなどのスフィンゴ脂質；ガングリオシド、グロボシド、およびセレブロシドなどのスフィンゴ糖脂質；ステアリル、オレイル、およびリノレイルアミンなどの界面活性剤アミンが挙げられる。いくつかの例では、脂質はカチオン性脂質を含む。いくつかの例では、脂質はリン脂質を含む。例示的なリン脂質には、限定されないが、ホスファチジン酸（「ＰＡ」）、ホスファチジルコリン（「ＰＣ」）、ホスファチジルグリセリン（「ＰＧ」）、ホスファチジルエタノールアミン（「ＰＥ」）、ホスファチジルイノシトール（「ＰＩ」）、およびホスファチジルセリン（「ＰＳ」）、スフィンゴミエリン（脳スフィンゴミエリンを含む）、レシチン、リゾレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、セレブロシド、ジアラキドイルホスファチジルコリン（「ＤＡＰＣ」）、ジデカノイル－Ｌ－アルファ－ホスファチジルコリン（「ＤＤＰＣ」）、ジエリドイルホスファチジルコリン（「ＤＥＰＣ」）、ジラウロイルホスファチジルコリン（「ＤＬＰＣ」）、リノレオイルホスファチジルコリン、ジミリストイルホスファチジルコリン（「ＤＭＰＣ」）、ジオレオイルホスファチジルコリン（「ＤＯＰＣ」）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（「ＤＰＰＣ」）、ジステアロイルホスファチジルコリン（「ＤＳＰＣ」）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルコリン（「ＰＯＰＣ」）、ジアラキドイルホスファチジルコリン（「ＤＡＰＧ」）、ジデカノイル－Ｌ－アルファ－ホスファチジルグリセリン（「ＤＤＰＧ」）、ジエライドイルホスファチジルグリセリン（「ＤＥＰＧ」）、ジラウロイルホスファチジルグリセリン（「ＤＬＰＧ」）、ジリノレオイルホスファチジルグリセリン、ジミリストイルホスファチジルグリセリン（「ＤＭＰＧ」

）、ジオレオイルホスファチジルグリセリン（「ＤＯＰＧ」）、ジパルミトイルホスファチジルグリセリン（「ＤＰＰＧ」）、ジステアロイルホスファチジルグリセリン（「ＤＳＰＧ」）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルグリセリン（「ＰＯＰＧ」）、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＡＰＥ」）、ジデカノイル－Ｌ－アルファ－ホスファチジルエタノールアミン（「ＤＤＰＥ」）、ジエライドイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＥＰＥ」）、ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＬＰＥ」）、ジリノレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＭＰＥ」）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＯＰＥ」）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＰＰＥ」）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（「ＤＳＰＥ」）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルエタノールアミン（「ＰＯＰＥ」）、ジアラキドイルホスファチジルイノシトール（「ＤＡＰＩ」）、ジデカノイル－Ｌ－アルファ－ホスファチジルイノシトール（「ＤＤＰＩ」）、ジエラドイルホスファチジルイノシトール（「ＤＥＰＩ」）、ジラウロイルホスファチジルイノシトール（「ＤＬＰＩ」）、ジリノレオイルイチロイルホスファチジルイノシトール、ジミリストイルホスファチジルイノシトール（「ＤＭＰＩ」）、ジオレオイルホスファチジルイノシトール（「ＤＯＰＩ」）、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール（「ＤＰＰＩ」）、ジステアロイルホスファチジルイノシトール（「ＤＳＰＩ」）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチドイリノシトール（「ＰＯＰＩ」）、ジアラキドイルホスファチジルセリン（「ＤＡＰＳ」）、ジデカノイル－Ｌ－アルファ－ホスファチジルセリン（「ＤＤＰＳ」）、ジエラドイルホスファチジルセリン（「ＤＥＰＳ」）、ジラウロイルホスファチジルセリン（「ＤＬＰＳ」）、ジリノレオイルホスファチジルセリン、ジミリストイルホスファチジルセリン（「ＤＭＰＳ」）、ジオレオイルホスファチジルセリン（「ＤＯＰＳ」）、ジパルミトイルホスファチジルセリン（「ＤＰＰＳ」）、ジステアロイルホスファチジルセリン（「ＤＳＰＳ」）、１－パルミトイル－２－オレオイル－ホスファチジルセリン（「ＰＯＰＳ」）、ジアラキドイルスフィンゴミリン、ジデカノイルスフィンゴミエリン、ジエライドイルスフィンゴミエリン、ジラウロイルスフィンゴミエリン、ジリノレオイルスフィンゴミエリン、ジミリストイルスフィンゴミエリン、スフィンゴミエリン、ジオレオイルスフィンゴミエリン、ジパルミトイルスフィンゴミエリン、ジステアロイルスフィンゴミエリン、および１－パルミトイル－２－オレオイルスフィンゴミエリンが含まれる。

【０３１０】

いくつかの例では、医薬製剤は、さらに、酢酸、ホウ酸、クエン酸、乳酸、リン酸および塩酸などの酸、水酸化ナトリウム、リン酸ナトリウム、ホウ酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウムおよびトリス－ヒドロキシメチルアミノメタンなどの塩基、ならびにクエン酸／デキストロース、重炭酸ナトリウムおよび塩化アンモニウムなどの緩衝剤を含むｐＨ調整剤または緩衝剤を含む。このような酸、塩基および緩衝液は、組成物のｐＨを許容範囲に維持するのに必要な量に含まれる。

【０３１１】

いくつかの例では、医薬製剤は、組成物の浸透圧を許容範囲内にするのに必要な量の１つまたはそれ以上の塩を含む。このような塩には、ナトリウム、カリウムまたはアンモニウムカチオンおよび塩化物、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、ホウ酸塩、リン酸塩、重炭酸塩、硫酸塩、チオ硫酸塩または重亜硫酸アニオンを有するものが含まれ、適切な塩には塩化ナトリウム、塩化カリウム、チオ硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウムおよび硫酸アンモニムが含まれる。

【０３１２】

一部の実施形態では、医薬製剤は、限定されないが、ポリペプチドの溶解度およびインビボ安定性を増加させるために、トレハロース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、マルトース、グルコースのような糖、またはリン酸カリウム、クエン酸ナトリウム、硫酸アンモニウムのような塩、および／またはヘパリンのような他の薬剤を含む。

【０３１３】

いくつかの例では、医薬製剤は、より安定な環境を提供することができるため、化合物を安定化するために使用される希釈剤をさらに含む。緩衝溶液に溶解された塩（ｐＨ制御または維持を提供することもできる）は、限定されないが、リン酸緩衝生理食塩水溶液を含む、当該技術分野における希釈剤として利用される。

【０３１４】

安定剤には、任意の酸化防止剤、緩衝剤、酸、保存剤などの化合物が含まれる。安定剤の例としては、Ｌ－アルギニン塩酸塩、トロメタミン、アルブミン（ヒト）、クエン酸、ベンジルアルコール、フェノール、二リン酸二ナトリウム二水和物、プロピレングリコール、メタクレゾールまたはｍ－クレゾール、酢酸亜鉛、ポリソルベート－２０もしくはＴｗｅｅｎ（登録商標）２０、またはトロメタモールが挙げられる。

【０３１５】

界面活性剤には、ラウリル硫酸ナトリウム、ドキュセートナトリウム、Ｔｗｅｅｎ６０または８０、トリアセチン、ビタミンＥ　ＴＰＧＳ、ソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリソルビタンモノオレエート、ポリソルベート、ポラキソマー、胆汁塩、モノステアリン酸グリセリン、エチレンオキシドとプロピレンオキシドのコポリマー、例えば、Ｐｌｕｒｏｎｉｃ（登録商標）などの化合物が含まれる。追加の界面活性剤としては、ポリオキシエチレン脂肪酸グリセリドおよび植物油、例えば、ポリオキシエチレン（６０）水素化ヒマシ油、ならびにポリオキシエチレンアルキルエーテルおよびアルキルフェニルエーテル、例えば、オクトキシノール１０、オクトキシノール４０が挙げられる。時折、界面活性剤は、物理的安定性を高めるため、または他の目的のために含まれる。

【０３１６】

治療レジメン

一部の実施形態では、本明細書に記載される医薬組成物は、治療用途のために投与される。一部の実施形態では、医薬組成物は、毎日（ｄａｉｌｙ）、毎日（ｅｖｅｒｙ　ｄａｙ）、隔日、週５日、週１回、隔週、月２週間、月３週間、月１回、月２回、月３回、またはそれ以上投与される。医薬組成物は、少なくとも１ヵ月、２ヵ月、３ヵ月、４ヵ月、５ヵ月、６ヵ月、７ヵ月、８ヵ月、９ヵ月、１０ヵ月、１１ヵ月、１２ヵ月、１８ヵ月、２年、３年、またはそれ以上投与される。

【０３１７】

患者の状態が改善された場合、医師の裁量により、組成物の投与を連続的に行うか、あるいは、投与される組成物の用量を一時的に減少させるか、または一定の時間（すなわち、「休薬期間」）一時的に停止させる。いくつかの例では、休薬期間の長さは、２日～１年の間で変化し、例としては、２日、３日、４日、５日、６日、７日、１０日、１２日、１５日、２０日、２８日、３５日、５０日、７０日、１００日、１２０日、１５０日、１８０日、２００日、２５０日、２８０日、３００日、３２０日、３５０日、または３６５日が挙げられる。休薬期間中の用量の減少は、１０％～１００％であり、例としては、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または１００％が挙げられる。

【０３１８】

一旦、患者の状態の改善が見られると、必要に応じて維持用量が投与される。その後、症状の関数として、改善された疾患、障害または状態が保持されるレベルまで、投薬量または投薬頻度、またはその両方を減少させることができる。

【０３１９】

一部の実施形態では、このような量に対応する所与の薬剤の量は、特定の化合物、疾患の重症度、治療を必要とする対象または宿主の固有性（例えば、体重）などの要因に依存して変化するが、それにもかかわらず、例えば、投与される特定の薬剤、投与経路、および治療される対象または宿主を含む、ケースを取り巻く特定の状況に従って当該技術分野において公知である方法でルーチンに決定される。いくつかの例では、所望の用量は、単

回用量または同時に（または短期間にわたって）、または適切な間隔で、例えば、１日あたり２回、３回、４回またはそれ以上のサブ用量として投与される分割用量として都合よく示される。

【０３２０】

上記の範囲は、個々の治療レジメンに関する変数の数が多く、これらの推奨値からのかなりの逸脱が稀ではないことから、単に示唆的なものに過ぎない。このような投薬量は、多数の変数、限定されないが、使用される化合物の活性、治療される疾患または状態、投与の様式、個々の対象の要件、治療される疾患または状態の重症度、および医師の判断に応じて変更される。

【０３２１】

一部の実施形態では、このような治療レジメンの毒性および治療効力は、限定されないが、ＬＤ５０（集団の５０％に対する致死用量）およびＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な用量）の決定を含む、細胞培養または実験動物における標準的な製薬手順によって決定される。毒性と治療効能の間の用量比は治療指数であり、ＬＤ５０とＥＤ５０の間の比として表される。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータは、ヒトにおいて使用するための投薬量範囲の製剤化に使用される。このような化合物の投薬量は、好ましくは、最小毒性でＥＤ５０を含む循環濃度の範囲内にある。投薬量は、採用される投薬形態および利用される投与経路に依存して、この範囲内で変化する。

【０３２２】

キット／製造物

本明細書には、特定の実施形態において、本明細書に記載される１つまたはそれ以上の方法および組成物とともに使用するためのキットおよび製造物が開示される。このようなキットには、バイアル、チューブなどの１つまたはそれ以上の容器を受け入れるように区画化されたキャリア、パッケージ、または容器が含まれ、容器（単数または複数）の各々は、本明細書に記載される方法に使用される別個の要素のうちの１つを含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、および試験管が挙げられる。一実施形態では、容器は、ガラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成される。

【０３２３】

本明細書で提供される製造物は、パッケージング材料を含む。医薬パッケージ材料の例としては、限定されないが、ブリスタパック、ボトル、チューブ、バッグ、容器、および選択された製剤ならびに意図された投与および処置の様式に適した任意のパッケージング材料が挙げられる。

【０３２４】

例えば、容器（単数または複数）は、ＩＬ－１０ポリペプチドまたはコンジュゲートの送達を容易にするために、本明細書に開示される１つまたはそれ以上のＩＬ－１０ポリペプチドまたはコンジュゲート、および場合により、本明細書に記載される１つまたはそれ以上の医薬賦形剤を含む。このようなキットは、場合により、本明細書に記載される方法におけるその使用に関連する識別記述または標識または指示をさらに含む。

【０３２５】

キットは、典型的には、内容物および／または使用説明書を列挙した標識、および使用説明書を伴う添付文書を含む。典型的には、一組の説明書も含まれる。

【０３２６】

一実施形態では、標識は、容器上にあるかまたは容器に関連している。一実施形態では、標識を形成する文字（ｌｅｔｔｅｒ）、数字または他の文字（ｃｈａｒａｃｔｅｒ）が容器自体に取り付けられ、成形され、またはエッチングされる場合、標識は容器上にあり、標識は、例えば、パッケージ挿入物として、容器も保持するレセプタクルまたはキャリア内に存在する場合、容器に関連付けられる。一実施形態では、標識は、内容物が特定の治療用途に使用されるべきであることを示すために使用される。また、標識は、本明細書に記載される方法などの、内容物の使用のための指示を示す。

【０３２７】
特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提供される化合物を含有する１つまたはそれ以上の単位投与形態を含有するパックまたはディスペンサデバイス中に提供される。パックは、例えば、ブリスタパックなどの金属またはプラスチックホイルを含む。一実施形態では、パックまたはディスペンサデバイスは、投与のための指示書が付される。一実施形態では、パックまたはディスペンサにはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定される様式で容器に関連する通知も添付される。この通知は、ヒトまたは獣医学的投与のための医薬品の形態の当局による承認を反映するものである。このような通知は、例えば、米国食品医薬品局が承認した医薬品の標識または承認された製品の添付文書である。一実施形態では、相溶性の医薬担体中に製剤化された本明細書で提供される化合物を含む組成物もまた製造され、適切な容器に入れられ、指示された状態の処置のために標識される。
【０３２８】
特定の用語
別段の定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、請求された主題事項が属する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。詳細な説明は、例示的および説明的なものに過ぎず、請求された主題事項を限定するものではないことが理解されるべきである。本出願において、単数形の使用は、特に記述がない限り、複数形を含む。本明細書で使用されるように、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」、および「その（ｔｈｅ）」は、文脈による明確に別段の指定がない限り、複数の指示対象を含むことに留意されたい。本出願において、「または」の使用は、特に記述がない限り、「および／または」を意味する。さらに、用語「含んでいる」の使用、ならびに「含む（ｉｎｃｌｕｄｅ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｅｓ）」、および「含んで（ｉｎｃｌｕｄｅｄ）」などの他の形態の使用は、限定するものではない。
【０３２９】
本発明の種々の特徴は、単一の実施形態との関連で説明することができるが、特徴は、別個にまたは任意の適切な組み合わせで提供することもできる。逆に、本発明は、明確化のために、別個の実施形態との関連で本明細書に記載されるが、本発明はまた、単一の実施形態で実施される。
【０３３０】
本明細書において、「一部の実施形態」、「実施形態」、「１つの実施形態」または「他の実施形態」というときは、実施形態に関連して記載された特定の特徴（ｆｅａｔｕｒｅ）、構造または特徴（ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃ）が、少なくとも一部の実施形態に含まれるが、必ずしもすべての実施形態に含まれないことを意味する。
【０３３１】
本明細書で使用される場合、範囲および量は、特定の値または範囲として「約」として表すことができる。また、約には正確な量も含まれる。したがって、「約５μＬ」は、「約５μＬ」および「５μＬ」を意味する。一般的に、用語「約」は、例えば、１５％、１０％または５％以内などの実験誤差内にあると予想される量を含む。
【０３３２】
本明細書で使用される節の見出しは、組織上の目的のためのみであり、記載される主題を制限するものと解釈されるべきではない。
【０３３３】
本明細書で使用される場合、用語「個体（単数または複数）」、「対象（単数または複数）」および「患者（単数または複数）」は、任意の哺乳動物を意味する。一部の実施形態では、哺乳動物はヒトである。一部の実施形態では、哺乳動物はヒト以外である。いずれの用語も、医療従事者（例えば、医師、登録看護師、正看護師、医師の助手、用務員またはホスピス職員）の監督（例えば、常時または断続的）によって特徴付けられる状況を必要とせず、限定されない。
【０３３４】

本明細書で使用される場合、受容体結合に関して「顕著な」および「顕著に」という用語は、ＩＬ－１０ポリペプチドの標的受容体への結合に影響を与えるのに十分な変化を意味する。いくつかの例では、用語は、少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、またはそれ以上の変化を指す。いくつかの例では、用語は、少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、５０倍、１００倍、５００倍、１０００倍、またはそれ以上の変化を意味する。

【０３３５】

いくつかの例では、二量体化に関して「実質的に」という用語は、ＩＬ－１０二量体の形成を妨げるのに十分な変化を意味する。

【０３３６】

本明細書で使用される場合、用語「腫瘍浸潤性免疫細胞（単数または複数）」とは、腫瘍細胞を含む領域（例えば、腫瘍微小環境）に浸潤した免疫細胞を指す。いくつかの例では、腫瘍浸潤性免疫細胞は、腫瘍細胞破壊、腫瘍細胞増殖の低下、腫瘍組織量の減少、またはそれらの組み合わせと関連する。いくつかの例では、腫瘍浸潤性免疫細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を含む。いくつかの例では、腫瘍浸潤性免疫細胞は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、樹状細胞、肥満細胞、好酸球または好塩基球を含む。いくつかの例では、腫瘍浸潤性免疫細胞は、ＣＤ４＋またはＣＤ８＋Ｔ細胞を含む。

【実施例】

【０３３７】

これらの実施例は、単に例示的な目的のために提供され、本明細書に提供される特許請求の範囲を限定するものではない。

【実施例１】

【０３３８】

ＰＥＧ化ＩＬ－１０とヒトＩＬ－１０受容体サブユニットの生化学的相互作用

ＰＥＧ化ＩＬ－１０化合物とヒトＩＬ－１０受容体との相互作用の速度論的および平衡解離定数を、Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒ　Ｔｏｏｌｓ　ＬＬＣにおける表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を用いて測定する。これらの研究のために、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ融合されたＩＬ－１０Ｒ細胞外ドメインは、プロテインＡ被覆したＣＭ４バイオセンサーチップの表面上に捕捉される。Ｂｉａｃｏｒｅ　２０００または類似のＳＰＲ装置を用いて、２μＭの天然ＩＬ－１０またはＩＬ－１０突然変異タンパク質のいずれかで開始する２倍希釈シリーズで、表面を二重にプローブする。試験試料を６０秒間またはそれ以上注入し、プラトーに達するまで結合を測定し、続いて、緩衝液のみ（洗浄）３０秒間またはそれ以上注入し、解離を測定する。応答ユニット（ＲＵ、Ｙ軸）を時間（秒、Ｘ軸）に対してプロットする。

【０３３９】

初代ヒト白血球減少系（ＬＲＳ）由来のＰＢＭＣ試料におけるＩＬ－１０突然変異タンパク質のエクスビボ免疫応答プロファイリング

ＩＬ－１０突然変異タンパク質の差次的受容体特異性が初代免疫細胞亜集団の活性化にどのように影響を及ぼすかを決定するために、ヒトＬＲＳ由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）試料におけるリンパ球活性化の濃度－応答プロファイリングを、マルチカラーフローサイトメトリーを用いて行う。これらの試験は、ＰｒｉｍｉｔｙＢｉｏ　ＬＬＣ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ）で行われる。新鮮なＬＲＳ由来試料は、天然のＩＬ－１０またはＩＬ－１０突然変異タンパク質のいずれかで、最高濃度３０μｇ／ｍＬで開始する５倍希釈シリーズで処理される。４５分間のインキュベーションの後、試料を固定し、抗体で染色して、転写因子ＳＴＡＴ３のリン酸化形態（ｐＳＴＡＴ３）、ＩＬ－１０受容体シグナル伝達複合体の上流結合および活性化のマーカー、ならびに特異的Ｔ細胞およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞亜集団におけるｐＳＴＡＴ３形成を追跡する表面マーカーのパネル（表１）を検出する。

【０３４０】

【表２】

表 1: LRS 由来 PBMC 試料のフローサイトメトリー研究のための染色パネル

細胞型	マーカープロファイル
エフェクターT 細胞(Teff)	CD3+, CD4+, CD8+, CD127+
NK 細胞	CD3-, CD16+
調節性 T 細胞(Treg)	CD3+, CD4+, CD8-, IL-2Rα+, CD127-

【実施例２】
【０３４１】
【表３】

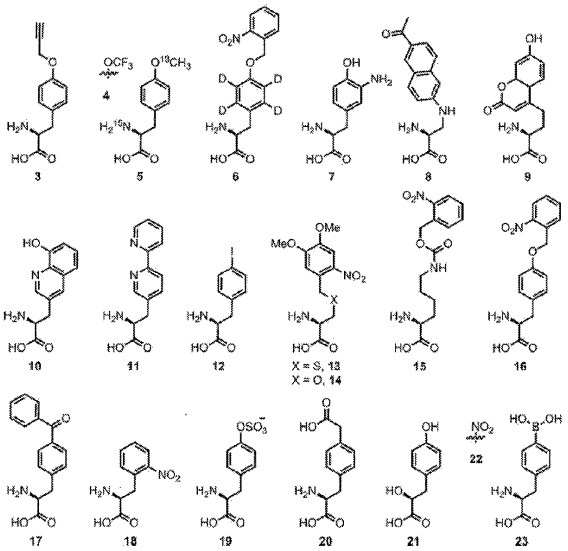
表 2:本明細書に記載される IL-10 配列

名称	配列	配列番号
IL-10 (ホモ・サピエンス) (成熟型)	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKT FFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQ FYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRL RRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKA MSEFDIFINYIEAYMTMKIRN	1
IL-10 (ホモ・サピエンス) (前駆体) NCBI 受付番号: NP_000563.1	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPG NLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLKES LLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPD IKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAV EQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTM KIRN	2

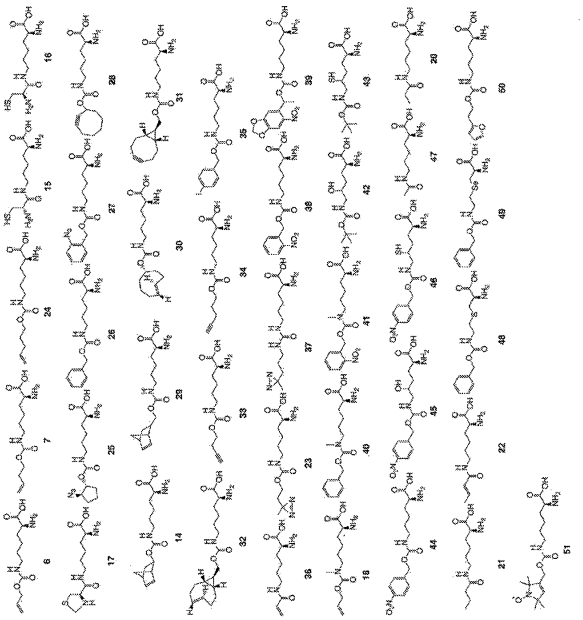
【０３４２】
本開示の好ましい実施形態を本明細書に示し、説明してきたが、このような実施形態が例示としてのみ提供されることは当業者には自明である。ここで、本開示から逸脱することなく、当業者は多数の変形、変化、および置換を想到するはずである。本明細書に記載される開示の実施形態に対する種々の代替物を、本開示を実施する際に使用することができることが理解されるべきである。以下の特許請求の範囲は、開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの均等物がそれによってカバーされることが意図される。

【図面】

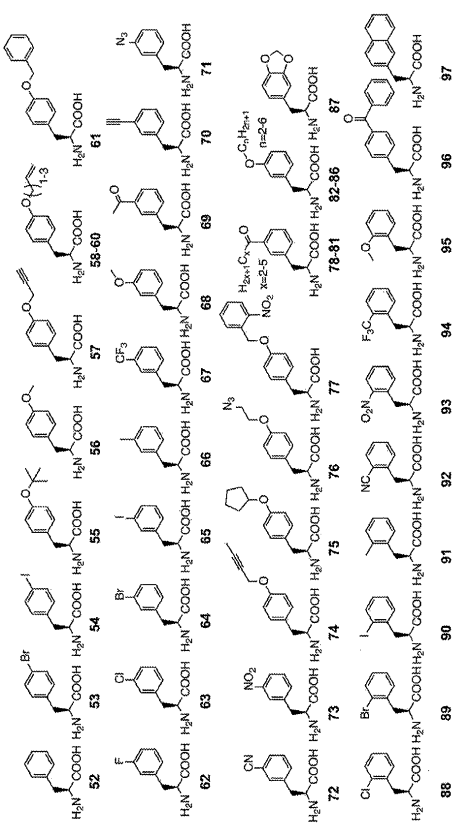
【図１】



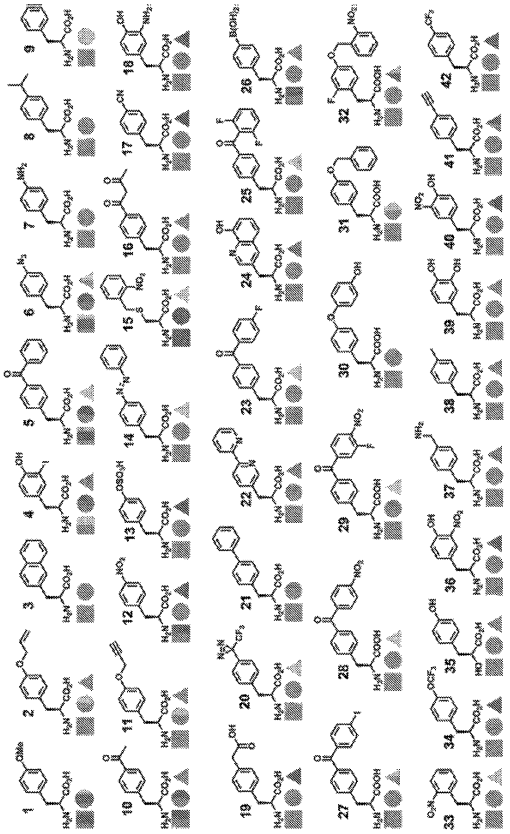
【図２Ａ】



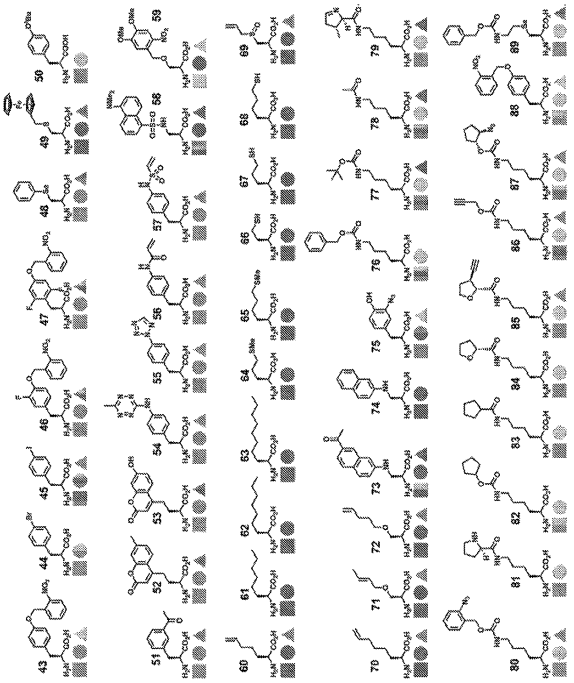
【図２Ｂ】



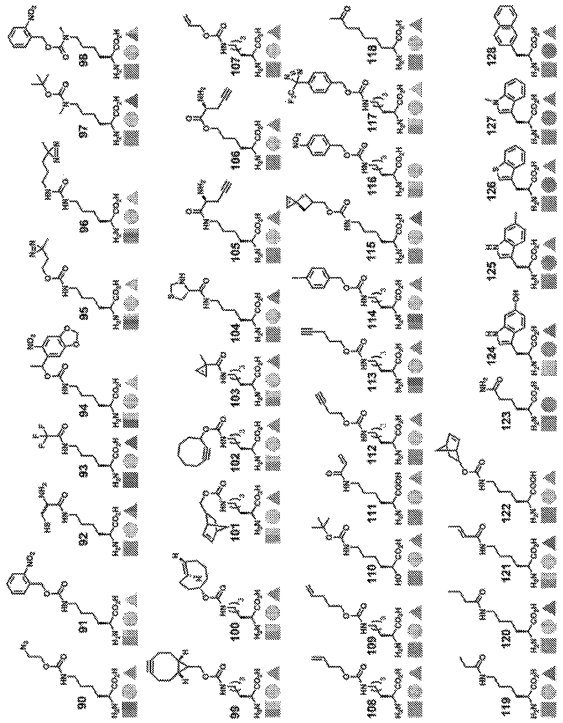
【図３Ａ】



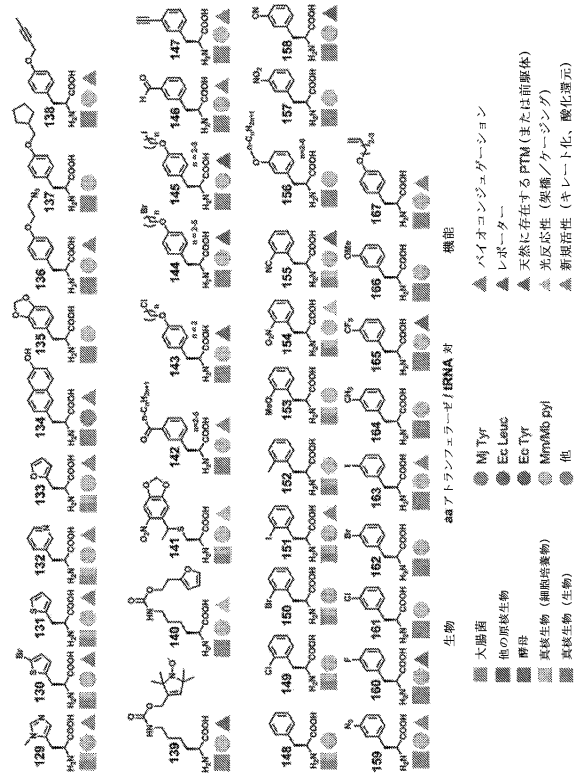
【図３Ｂ】



【図３Ｃ】



【図３Ｄ】



【配列表】

0007636323000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類　　FI
A61P 35/00 (2006.01)　　A61P 35/00
C12N 15/24 (2006.01)　　C12N 15/24

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(72)発明者　ジェロド・プタシン
アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７．ラ・ホーヤ．ノース・トーリー・パインズ・ロード１１０９９．スイート１９０
(72)発明者　マルコス・ミラ
アメリカ合衆国カリフォルニア州９２０３７．ラ・ホーヤ．ノース・トーリー・パインズ・ロード１１０９９．スイート１９０

審査官　福澤 洋光

(56)参考文献　国際公開第２０１３／１３０９１３（WO，Ａ１）
特表２０１６－５２８８７９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００４／０４４００６（WO，Ａ１）
VanBrunt MP. et al.，Genetically Encoded Azide Containing Amino Acid in Mammalian Cells Enables Site-Specific Antibody-Drug Conjugates Using Click Cycloaddition Chemistry，Bioconjugate chemistry，2015年，26(11)，2249-2260

(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
Ｕｎｉｐｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ