



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105848674 A

(43)申请公布日 2016.08.10

(21)申请号 201480068159.5

(22)申请日 2014.11.07

(30)优先权数据

61/902,702 2013.11.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.06.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/064620 2014.11.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/070060 EN 2015.05.14

(71)申请人 阿尔莫生物科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·B·穆姆 陈伊万昊

马丁·奥福特

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

代理人 肖鹏 孙涛

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书42页

(54)发明名称

将白细胞介素-10用于治疗疾病和病症的方法

(57)摘要

提供了通过组合一种或多种另外的试剂施用IL-10治疗患有包括癌症以及免疫和炎症相关病症的疾病、病症或病状的受试者的方法,及其相关联的方法和模型。

1. 一种治疗或预防受试者体内的疾病、病症或病状的方法,其包括向所述受试者施用:
 - a) 治疗有效量的至少一种免疫检查点的抑制剂,以及
 - b) 治疗有效量的IL-10试剂;以及其中所述疾病、病症或病状是癌症或癌症相关疾病、病症或病状。
2. 一种治疗或预防受试者体内的疾病、病症或病状的方法,其包括向所述受试者施用:
 - a) 治疗有效量的至少一种免疫检查点的抑制剂,以及
 - b) 治疗有效量的IL-10试剂,其中所述量足以在一个时间段内维持平均IL-10血清谷浓度;以及其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少1.0ng/mL,
其中在所述时间段的至少90%内维持所述平均IL-10血清谷浓度,以及
其中所述疾病、病症或病状是癌症或癌症相关疾病、病症或病状。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少1.5ng/mL。
4. 如权利要求3所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少2.0ng/mL。
5. 如权利要求2-4中任一项所述的方法,其中所述时间段是至少24小时。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述时间段是至少48小时。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述时间段是至少1周。
8. 如权利要求2-7中任一项所述的方法,其中在所述时间段的至少95%内维持所述平均IL-10血清谷浓度。
9. 如权利要求8所述的方法,其中在所述时间段的100%内维持所述平均IL-10血清谷浓度。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂是成熟人IL-10。
11. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂是成熟人IL-10的变体,并且其中所述变体展现出与成熟人IL-10的活性相当的活性。
12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述免疫检查点选自以下组成的组:CTLA4、PD1、PDL1、BTLA、TIM3、LAG3、A2aR以及杀伤细胞抑制性受体。
13. 如权利要求12所述的方法,其中所述免疫检查点选自以下组成的组:CTLA4、PD1、PDL1以及BTLA。
14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述疾病、病症或病状是癌症。
15. 如权利要求14所述的方法,其中所述癌症是实体瘤或血液病。
16. 如权利要求14所述的方法,其中所述癌症选自以下组成的组:黑素瘤、肺癌、肾癌以及乳腺癌。
17. 如权利要求1-16中任一项所述的方法,其中所述抑制剂是阿巴西普或伊匹木单抗。
18. 如权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述IL-10试剂包含用于形成修饰的IL-10试剂的至少一个修饰,其中所述修饰并不改变所述IL-10试剂的氨基酸序列。
19. 如权利要求18所述的方法,其中所述修饰的IL-10试剂是PEG-IL-10试剂。
20. 如权利要求19所述的方法,其中所述PEG-IL-10试剂包含共价地附接到IL-10的至少一个亚基的至少一个氨基酸残基的至少一个PEG分子。
21. 如权利要求19或20所述的方法,其中所述PEG-IL-10试剂包含单-聚乙二醇化的和二-聚乙二醇化的IL-10的混合物。

22. 如权利要求19-21中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10试剂的所述PEG组分具有约5kDa至约20kDa的分子量。

23. 如权利要求19-21中任一项所述的方法,其中所述PEG-IL-10试剂的所述PEG组分具有大于约20kDa的分子量。

24. 如权利要求19-23中任一项所述的方法,其中所述修饰包括接头。

25. 如权利要求18所述的方法,其中所述修饰的IL-10试剂是Fc融合分子。

26. 如权利要求18所述的方法,其中所述修饰的IL-10试剂包含血清白蛋白或白蛋白结合结构域(ABD)。

27. 如权利要求18所述的方法,其中所述修饰的IL-10试剂是糖基化的或羟乙基淀粉化的。

28. 如权利要求18-27中任一项所述的方法,其中所述修饰是位点特异性的。

29. 如权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述至少一种免疫检查点的抑制剂和所述IL-10试剂的所述施用借助于肠胃外注射。

30. 如权利要求29所述的方法,其中所述IL-10试剂的所述施用借助于皮下注射。

31. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,其中同时施用所述至少一种免疫检查点的抑制剂和所述IL-10试剂。

32. 如权利要求1-30中任一项所述的方法,其中相继施用所述至少一种免疫检查点的抑制剂和所述IL-10试剂。

33. 如权利要求1-32中任一项所述的方法,其还包括施用至少一种另外的预防剂或治疗剂。

34. 如权利要求33所述的方法,其中所述预防剂或治疗剂是化学治疗剂。

35. 如权利要求1-34中任一项所述的方法,其中所述受试者是人。

36. 一种药物组合物,其包含

a) 治疗有效量的如权利要求1-35中任一项所述的至少一种免疫检查点的抑制剂和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂;以及

b) 治疗有效量的如权利要求1-35中任一项所述的IL-10试剂和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

37. 如权利要求36所述的药物组合物,其中所述赋形剂是等渗注射溶液。

38. 如权利要求36或权利要求37所述的药物组合物,其中所述组合物适于人施用。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的药物组合物,其还包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

40. 如权利要求39中任一项所述的药物组合物,其中所述预防剂或治疗剂是化学治疗剂。

41. 一种无菌容器,其包含如权利要求36-40中任一项所述的药物组合物。

42. 如权利要求41所述的无菌容器,其中所述无菌容器是注射器。

43. 一种试剂盒,其包含如权利要求41或42所述的无菌容器。

44. 如权利要求43所述的试剂盒,其还包含第二无菌容器,所述第二无菌容器包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

将白细胞介素-10用于治疗疾病和病症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年11月11日提交的美国临时申请序列号61/902,702的优先权权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用IL-10组合其他试剂来治疗或预防包括癌症和免疫相关病症的一系列不同的疾病和病症的方法。

[0004] 引言

[0005] 细胞因子白细胞介素-10(IL-10)是通过对T细胞、B细胞、巨噬细胞以及抗原递呈细胞(APC)的作用来调控多个免疫应答的多效性细胞因子。IL-10可以通过抑制IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、GM-CSF以及G-CSF在活化的单核细胞和活化的巨噬细胞中的表达来阻抑免疫应答,并且它还通过NK细胞来阻抑IFN- γ 的产生。虽然IL-10主要在巨噬细胞中表达,但在活化的T细胞、B细胞、肥大细胞以及单核细胞中也检测到了表达。除了阻抑免疫应答之外,IL-10展现出免疫刺激特性,包括刺激IL-2和IL-4治疗的胸腺细胞的增殖、增强B细胞的活力以及刺激MHC II类的表达。

[0006] 人IL-10是在破坏两个单体亚基之间的非共价相互作用之后变得不具有生物活性的同二聚体。获自IL-10的公布晶体结构的数据表明功能性二聚体展现出类似于IFN- γ 的某些相似性(Zdanov等人,(1995)Structure(Lond)3:591-601)。

[0007] 归因于其多效性活性,IL-10已与广泛范围的疾病、病症和病状联系起来,所述疾病、病症和病状包括炎性病状、免疫相关病症、纤维变性病症、代谢病症以及癌症。针对许多这类疾病、病症和病状用IL-10进行的临床和预临床评估已经巩固了其治疗潜力。此外,聚乙二醇化的IL-10在某些治疗方案中已显示出比非聚乙二醇化的IL-10更有效。

[0008] 鉴于所述系列不同的疾病、病症和病状容易用IL-10及其修饰形式(例如,聚乙二醇化的IL-10)来治疗或预防,IL-10与在纤维变性病症和癌症的治疗中具有功效的其他试剂的组合提供了互补、加成或甚至协同的治疗方案的可能性。

[0009] 概述

[0010] 本公开涵盖使用IL-10、修饰的(例如,聚乙二醇化的)IL-10和本文描述的相关联的试剂以及其组合物与其他试剂组合来治疗和/或预防不同疾病、病症和病状、和/或其症状的方法。这类组合在本文描述的疾病、病症和病状的治疗和/或预防中提供产生加成或协同作用的机会。另外,这种联合治疗往往允许减少IL-10(例如,PEG-IL-10)及其组合的其他试剂的施用的量和/或频率,这可以使任何副作用最小化或得到消除。在具体实施方案中,一种或多种免疫检查点抑制剂与IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)组合施用。

[0011] 免疫检查点意指整合到免疫系统的一系列抑制性通路,所述抑制性通路对于维持自身耐受性和调节外周组织中的生理免疫应答的持续时间和幅度以便于使附带组织损伤最小化而言是至关重要的。肿瘤生长与免疫检查点的调节紧密关联。肿瘤将对某些免疫检查点通路的控制假定为免疫抵抗尤其是针对对于肿瘤抗原特异性的T细胞的主要机制。

[参见,例如,Stagg和Allard,(2013)Ther.Adv.Med.Oncol.5(3):169-81]。

[0012] 由于通过许多免疫检查点的信号转导由配体-受体相互作用引发,所述信号转导可以容易地由抗体来阻断或通过配体或受体的重组形式来调节。小分子拮抗剂也发现可以用作免疫检查点抑制剂。

[0013] 在具体实施方案中,本公开涵盖IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)组合用于治疗或预防癌症(即,如下所述的癌性疾病、病症和病状)的一种或多种免疫检查点抑制剂的施用。这类组合的有利之处可能在于IL-10试剂和免疫检查点抑制剂具有不同的作用机制,这提供了从多个不同的治疗角度攻击潜在疾病、病症或病状的机会。本文其他地方还描述了这种联合治疗的另外的优点。

[0014] 如下文详细论述,已鉴别许多免疫检查点。实例包括但不限于PD1(编程性细胞死亡蛋白1;又称为CD279);PDL1(PD1配体;又称为B7-H1);BTLA(B和T淋巴细胞衰减因子;又称为CD272);CTLA4(细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4;又称为CD152);TIM3(T-细胞膜蛋白3;又称为HAVcr2);以及LAG3(淋巴细胞活化基因3;又称为CD233)。这些免疫检查点中的一个或多个的抑制剂(例如,抗CTLA4抗体)可设想用于本文描述的组合和方法。多种另外的免疫检查点受体和配体(其中一些在各种类型的肿瘤细胞中被选择性地上调)是阻断的候选物,并且因此特别适合于试剂如IL-10(例如,PEG-IL-10)的联合治疗,所述试剂增强抗肿瘤反应的激活(Pardoll,(2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64)。

[0015] 本公开还涵盖鉴别免疫检查点抑制剂的方法,所述免疫检查点抑制剂特别适合于与IL-10(例如,PEG-IL-10)组合使用以用于治疗和/或预防本文描述的疾病、病症和病状(例如,癌症)。本公开的实施方案还涵盖用于优化本文描述的IL-10试剂和免疫检查点抑制剂的给药方案的方法和模型。在其他实施方案中,本公开涵盖用于鉴别可以最佳地适合于本文描述的联合治疗的特定患者群体的方法。在一些实施方案中,某些生物标志物的存在和/或程度可用于这类方法。

[0016] 如下文进一步论述,人IL-10是同二聚体,并且每个单体包含178个氨基酸,其中的前18个氨基酸包含信号肽。本公开的具体实施方案包括缺乏信号肽的成熟人IL-10多肽(参见,例如,美国专利号6,217,857)、或成熟人PEG-IL-10。在另外的具体实施方案中,IL-10试剂是成熟人IL-10的变体。所述变体可以展现出小于、相当于或大于成熟人IL-10的活性的活性;在某些实施方案中,活性相当于或大于成熟人IL-10的活性。

[0017] 本公开的某些实施方案涵盖IL-10的修饰以便于增强一种或多种特性(例如,药物代谢动力学参数、功效等)。这类IL-10修饰包括聚乙二醇化作用、糖基化、白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA))缀合和融合以及羟乙基淀粉化(hesylation)。在具体实施方案中,IL-10是聚乙二醇化的。在另外的实施方案中,IL-10的修饰不会对免疫原性产生治疗相关的不利影响,并且仍然在另外的实施方案中,修饰的IL-10具有比未修饰的IL-10更低的免疫原性。术语“IL-10”、“IL-10多肽”、“试剂”等等意图是广义解释的并且包括例如人和非人IL-10-相关多肽,包括同系物、变体(包括突变蛋白质)及其片段、连同具有例如前导序列(例如,信号肽)和前述部分的修饰形式的IL-10多肽。在另外的具体实施方案中,术语“IL-10”、“IL-10多肽”、“试剂”是激动剂。具体实施方案涉及聚乙二醇化的IL-10,其在本文中又称为“PEG-IL-10”。本公开还涵盖编码前述部分的核酸分子。

[0018] 本公开的具体实施方案涉及治疗或预防受试者(例如,人)的疾病、病症或病状(例

如,癌症)的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)和免疫检查点抑制剂,其中治疗有效量的IL-10试剂足以实现1pg/mL至10.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。在一些实施方案中,在至少95%的时间段内维持1.0pg/mL至10.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

[0019] 在本公开的一些实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是在1.0pg/mL至100pg/mL; 0.1ng/mL至1.0ng/mL; 1.0ng/mL至10ng/mL; 0.5ng/mL至5.0ng/mL; 0.75ng/mL至1.25ng/mL或0.9ng/mL至1.1ng/mL的范围内。在本公开的具体实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是至少1.25ng/mL、至少1.5ng/mL、至少1.6ng/mL、至少1.7ng/mL、至少1.8ng/mL、至少1.85ng/mL、至少1.9ng/mL、至少1.95ng/mL、至少1.97ng/mL和至少1.98ng/mL、至少1.99ng/mL、至少2.0ng/mL或大于2ng/mL。

[0020] 在另外的实施方案中,前述时间段是至少12小时、至少24小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少6周、至少2个月、至少3个月、至少6个月、至少9个月、或大于12个月。

[0021] 在本公开的具体实施方案中,在至少85%的时间段、至少90%、至少96%、至少98%、至少99%或100%的时间段内维持平均IL-10血清谷浓度。

[0022] 可以设想,足以维持所需稳态血清谷浓度(例如,1ng/mL)的给药方案可能导致高于所需稳态血清谷浓度的初始血清谷浓度。由于IL-10在哺乳动物受试者体内的药效学和药物代谢动力学特征,初始谷浓度(例如通过施用一个或多个负荷剂量,之后施用一系列维持剂量来实现)在一个时间段内逐渐但持续下降,甚至是在给药参数(量和频率)保持恒定的情况下。在所述时间段之后,逐渐但持续的下降结束,并且稳态血清谷浓度被维持。

[0023] 通过举例,向小鼠(例如,C57BL/6小鼠)肠胃外施用(例如,SC和IV)约0.1mg/kg/天的IL-10试剂(例如,mIL-10)要求维持2.0ng/mL的稳态血清谷浓度。然而,所述稳态血清谷浓度在以0.1mg/kg/天开始给药之后(以及还有在任何负荷剂量之后)约30天之前始终无法实现。相反,在已实现初始血清谷浓度(例如,2.5ng/mL)之后,所述浓度在例如约30天时段的过程中逐渐但持续地下降,在此时间之后,所需稳态血清谷浓度(2.0ng/mL)被维持。本领域技术人员将能够使用例如ADME和患者特定参数来确定维持所需稳态谷浓度所需的剂量。

[0024] 本公开的某些实施方案涉及免疫检查点抑制剂在它们与IL-10(例如,PEG-IL-10)组合施用时的给药参数、方案等等。一般而言,与免疫检查点抑制剂单一治疗相关联的给药参数和治疗方案在这类试剂与本文描述的IL-10试剂结合使用时也可适用。

[0025] 本公开涵盖以下方法,其中IL-10试剂包含用于形成修饰的IL-10试剂的至少一个修饰,其中所述修饰并不改变IL-10试剂的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-10试剂是PEG-IL-10试剂。PEG-IL-10试剂可以包含共价附接到IL-10的至少一个亚基的至少一个氨基酸残基的至少一个PEG分子,或在其他实施方案中包含单-聚乙二醇化和二-聚乙二醇化的IL-10的混合物。PEG-IL-10试剂的PEG组分可以具有大于约5kDa、大于约10kDa、大于约15kDa、大于约20kDa、大于约30kDa、大于约40kDa或大于约50kDa的分子量。在一些实施方案中,分子量是约5kDa至约10kDa、约5kDa至约15kDa、约5kDa至约20kDa、约10kDa至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约25kDa或约10kDa至约30kDa。

[0026] 在一些实施方案中,修饰的IL-10试剂包含至少一个Fc融合分子、至少一种血清白蛋白(例如,HSA或BSA)、HSA融合分子或白蛋白缀合物。在另外的实施方案中,修饰的IL-10

试剂是糖基化的、羟乙基淀粉化的,或包含至少一个白蛋白结合结构域。一些修饰的IL-10试剂可以包含多于一个类型的修饰。在具体实施方案中,修饰是位点特异性的。一些实施方案包括接头。修饰的IL-10试剂在下文进行详细论述。

[0027] 本公开的某些实施方案涵盖IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)组合一种免疫检查点抑制剂的施用,其他实施方案涵盖IL-10试剂组合两种免疫检查点抑制剂的施用,并且仍然另外的实施方案涵盖IL-10试剂组合三种或更多种免疫检查点抑制剂的施用。这类组合的有利之处可能在于IL-10试剂和免疫检查点抑制剂具有不同的作用机制,这提供了从多个不同的治疗角度攻击潜在疾病、病症或病状的机会。本文其他地方还描述了这种联合治疗的另外的优点。

[0028] 特异的IL-10和免疫检查点抑制剂(连同例如治疗目标)在它们组合使用时会影响给药方案、参数等。在一些实施方案中,本公开涵盖以下方法,其中可以每天至少两次、每天至少一次、每48小时至少一次、每72小时至少一次、每周至少一次、每2周至少一次、每月至少一次、每2个月至少一次或每3个月或更长时间至少一次向受试者施用PEG-IL-10。在某些实施方案中,PEG-IL-10可以组合免疫检查点抑制剂伊匹木单抗(YERVOY, Bristol-Myers Squibb)施用,伊匹木单抗是结合到细胞毒性T-淋巴细胞-相关抗原4(CTLA4)的重组人单克隆抗体。伊匹木单抗的推荐剂量是每3周静脉内施用3mg/kg,总共持续4个剂量。在一个示例性实施方案中,可以同时或几乎同时开始包含PEG-IL-10和伊匹木单抗的联合治疗。在包含具有PEG-IL-10和伊匹木单抗的联合治疗的另一个示例性实施方案中,可以首先开始伊匹木单抗治疗(每3周施用),并且之后一周可以开始每周PEG-IL-10治疗,在此之后两周施用第二剂量的伊匹木单抗。在一些实施方案中,治疗方案包括洗刷期(“休药期”),其中PEG-IL-10、伊匹木单抗或两者的血清水平下降至所需水平以允许受试者从与伊匹木单抗关联的任何不利影响(例如,免疫相关不良反应)中恢复。技术人员(例如,肿瘤学专家)将能够定制治疗方案,所述治疗方案考虑了IL-10和免疫检查点抑制剂试剂的特征(例如,它们的药物代谢动力学参数)、患者特定特征(例如,肾功能)以及治疗目标。

[0029] 本公开的具体实施方案涵盖一种或多种另外的试剂(例如,化学治疗剂)组合IL-10试剂和本文描述的一种或多种免疫检查点抑制剂的施用。另外的试剂的身份将在很大程度上取决于正在治疗的潜在病状的性质(例如,烷化剂诸如顺铂的添加在膀胱癌的治疗中可能是适当的)。下文进一步描述结合IL-10试剂和一种或多种免疫检查点抑制剂的组合施用一种或多种另外的治疗剂或预防剂(例如,化学治疗剂)的实施方案。

[0030] IL-10试剂可以通过任何有效途径来施用。在一些实施方案中,所述试剂通过肠胃外注射来施用,在某些实施方案中包括皮下注射。一种或多种免疫检查点抑制剂也可以通过就抑制剂的性质而言有效的任何途径来施用。在一些实施方案中,IL-10试剂和免疫检查点抑制剂可以通过相同途径(例如,SC)来施用,而在其他实施方案中,它们可以通过不同途径来施用(例如,IL-10试剂可以皮下施用,而免疫检查点抑制剂可以静脉内施用)。

[0031] 本公开的具体实施方案涉及药物组合物,所述药物组合物包含治疗上可接受的量的IL-10试剂组合治疗上可接受的量的免疫检查点抑制剂与一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂(例如,等渗注射溶液)。药物组合物通常是适合于人施用的一种药物组合物。另外,在一些实施方案中,所述药物组合物包含至少一种另外的预防剂或治疗剂。

[0032] 本公开的某些实施方案涵盖无菌容器,所述无菌容器含有一种上述药物组合物以及任选地一种或多种另外的组分。通过举例,但不限制,无菌容器可以是注射器。仍然在另外的实施方案中,无菌容器是试剂盒中的一个部件;所述试剂盒还可以含有例如第二无菌容器,所述第二无菌容器包含至少一种预防剂或治疗剂,所述预防剂或治疗剂的实例在本文中进行阐述。

[0033] 详述

[0034] 在进一步描述本公开之前,应理解本公开不限于本文阐述的具体实施方案,并且还理解本文所使用的术语仅是出于描述具体实施方案的目的,而不意图具有限制性。

[0035] 当提供数值范围时,应理解在该范围的上下限与在该规定范围的任何其他规定或中间值之间的各个中间值(除非上下文另外明确地规定,否则至下限的单位的十分之一)都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内,并且也涵盖在本发明内,受限于所述规定范围内任何明确排除在外的界限。当规定的范围包括一个或两个极限值时,排除那些包括的极限值中的任一个或两个极限值的范围也包括在本发明中。除非另外定义,否则本文中所使用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0036] 必须注意,如在本文中和在所附权利要求书中所使用,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代物,除非上下文另外清楚地指出。应进一步注意,所述权利要求书可以经拟订以排除任何任选的要素。因而,本声明意图用作与权利要求要素的叙述相关的诸如“只是”、“仅仅”等等这类排除性术语的使用或“否定”限制的使用的前提基础。

[0037] 提供本文中论述的出版物仅仅是针对它们在本申请的提交日期之前的公开内容。此外,所提供的出版日期可以不同于实际出版日期,其可能需要单独证实。

[0038] 综述

[0039] 绝大多数癌细胞具有大数目的提供众多肿瘤相关抗原的固有遗传和遗传后变化,宿主免疫系统可以识别所述肿瘤相关抗原,从而要求肿瘤产生特异性免疫抵抗机制以便于增殖。免疫检查点(又称为免疫抑制性通路)是正常介导免疫耐受性并减轻附带组织损伤的重要的免疫抵抗机制。

[0040] 在患有癌症的人当中,抗肿瘤免疫往往是无效的,这归因于与免疫稳态的维持相关联的严密调节。主要限制之一是“T细胞耗竭”过程,这起因于在抗原中的慢性暴露并且特征在于抑制性受体的上调。这些抑制性受体用作免疫检查点以防止不受控的免疫反应。用单克隆抗体(mAb)阻断这些免疫检查点中的一个或多个已显示能挽救否则会耗竭的抗肿瘤T细胞,并且与癌症患者的客观临床反应相关联(Stagg和Allard,(2013) Ther. Adv. Med. Oncol. 5(3):169-81)。因此,免疫检查点的抑制提供了用于治疗某些癌症的有希望的新途径。

[0041] 本公开涵盖本文描述的IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)及其组合物,组合一种或多种免疫检查点抑制剂用于治疗和/或预防各种疾病、病症和病状(例如,癌症)和/或其症状的用途。在本公开的某些方面中,这种治疗或预防通过利用特定给药参数来实现,所述特定给药参数用于使与施用其自身的单一治疗相关联的任何不利影响最小化。通过举例,将PEG-IL-10方案添加到包含伊匹木单抗(抗CTLA4mAb)的方案中可能允许减少实现治疗目标

所需的伊匹木单抗的量,从而减少(或甚至消除)伊匹木单抗的严重的且致命的免疫介导的不良反应,所述不良反应提示FDA要求存在“黑框警告”。

[0042] 应注意,结合本公开的多肽和核酸分子对“人”的任何提及并不意图对多肽或核酸获得的方式或来源作出限制,而是仅对序列作出参考,因为所述序列可以对应于天然存在的人多肽或核酸分子的序列。除了人多肽和对其编码的核酸分子之外,本公开涵盖来自其他物种的IL-10-相关多肽和对应的核酸分子。

[0043] 定义

[0044] 除非另外指明,否则以下术语意图具有下文阐述的含义。在整个说明书的其他地方定义了他术语。

[0045] 术语“患者”或“受试者”可互换使用来意指人或非人动物(例如,哺乳动物)。

[0046] 术语“施用(administration)”、“施用(administer)”等等在它们应用于例如受试者、细胞、组织、器官或生物流体时意指例如IL-10或PEG-IL-10)、核酸(例如,编码天然人IL-10的核酸);包含前述部分的药物组合物,或诊断剂与受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。在细胞的背景下,施用包括试剂与细胞接触(例如,体外或离体),以及试剂与流体接触,其中流体与细胞接触。

[0047] 术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”、“治疗(treatment)”等等意指以下作用过程(诸如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物),所述作用过程在诊断出、观察到和以类似方式发现疾病、病症或病状或其症状之后引发以便于暂时地或永久地消除、减缓、阻抑、减轻或改善折磨受试者的疾病、病症或病状的潜在病因中的至少一个,或与折磨受试者的疾病、病症、病状相关联的症状中的至少一个。因此,治疗包括抑制活动性疾病(例如,遏制疾病、病症或病状或与之相关联的临床症状的发展或进一步发展)。术语还可以用于其他情况,诸如IL-10或PEG-IL-10接触例如流体相或胶体相中的IL-10受体的情形。

[0048] 如本文所使用的术语“需要治疗”意指由医师或其他护理人员作出的受试者需要或将从治疗受益的判断。这个判断是基于医师或护理人员的专业技术领域内的各种因素作出的。

[0049] 术语“预防(prevent)”、“预防(preventing)”、“预防(prevention)”等等意指以下作用过程(诸如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物),所述作用过程以一种方式(例如,在疾病、病症、病状或其症状发作之前)引发以便于暂时地或永久性地防止、阻抑、抑制或减缓受试者发生疾病、病症、病状等等的风险(如通过例如临床症状的消失来确定),或者通常在受试者有患有特定疾病、病症或病状的倾向的情况下延迟它们的发作。在某些情况下,术语还意指减缓疾病、病症或病状的进展,或抑制其发展为有害的或另外不希望的状态。

[0050] 如本文所使用的术语“需要预防”意指由医师或其他护理人员作出的受试者需要或将从预防性护理受益的判断。这个判断是基于医师或护理人员的专业技术领域内的各种因素作出的。

[0051] 短语“治疗有效量”意指单独地或作为药物组合物的部分并以单次剂量或作为一系列剂量中的部分向受试者施用试剂,所述试剂的量在向受试者施用时能够对疾病、病症或病状的任何症状、方面或特征产生任何可检测的积极作用。治疗有效量可以通过测量相关生理效应来确定,并且所述治疗有效量可以结合给药方案和受试者病状的诊断分析等等来调整。通过举例,在施用之后产生的炎性细胞因子的量的测量结果可以指示是否已使用

治疗有效量。

[0052] 短语“足以实现改变的量”意指在施用特定治疗之前(例如,基线水平)和之后测量的指标的水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观参数(例如,IL-10的血清浓度)或主观参数(例如,受试者的良好状态的感觉)。

[0053] 术语“小分子”意指分子量小于约10kDa、小于约2kDa、或小于约1kDa的化学化合物。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、包含无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子以及合成分子。在治疗学上,小分子与大分子相比可能更易透过细胞、不太容易发生降解并且不太可能引发免疫应答。

[0054] 术语“配体”意指例如肽、多肽、膜缔合或膜结合分子、或其复合物,其可以充当受体的激动剂或拮抗剂。“配体”涵盖天然和合成配体,例如,细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白质以及来源于抗体的结合组合物。“配体”还涵盖小分子,例如,细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。所述术语也涵盖一种试剂,所述试剂并非激动剂或拮抗剂,但所述试剂可以结合到受体而不会显著影响其生物学特性,例如信号转导或粘附。另外,所述术语包括已例如通过化学或重组方法变为膜结合配体的可溶形式的膜结合配体。配体或受体可以整体是细胞内的,也就是说,所述配体或受体可以驻留在胞液、胞核、或一些其他细胞内区室中。配体和受体的复合物被称为“配体-受体复合物”。

[0055] 术语“抑制剂”和“拮抗剂”或“活化剂”和“激动剂”分别意指抑制性或活化分子,例如用于例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织或器官的活化。抑制剂是降低、阻断、防止、延迟活化、灭活、失敏或下调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。活化剂是增加、活化、促进、增强活化、致敏或上调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。抑制剂还可以被定义为减少、阻断或灭活组成型活性的分子。“激动剂”是与靶标相互作用以引起或促进靶标的活化的增加的分子。“拮抗剂”是与激动剂的作用相反分子。拮抗剂防止、减少、抑制或抵消激动剂的活性,并且拮抗剂即使在不存在鉴别的激动剂的情况下也可以防止、抑制或减少靶标例如靶受体的组成型活性。

[0056] 术语“调节(modulate)”、“调节(modulation)”等等意指分子(例如,活化剂或抑制剂)直接或间接增加或减少IL-10试剂(或对其编码的核酸分子)的功能或活性;或增强分子产生与IL-10试剂相当的作用的能力。术语“调节剂”意图广义地意指可以实现上述活动的分子。通过举例,例如基因、受体、配体或细胞的调节剂是改变基因、受体、配体或细胞的活性的分子,其中活性可以是活化、抑制或改变其调控特性。调节剂可以单独起作用,或所述调节剂可以使用辅因子例如蛋白质、金属离子或小分子。术语“调节剂”包括通过与IL-10相同的作用机制起作用(即,以与IL-10相似的方式调节与其相同的信号转导途径的试剂)并且能够引发与IL-10相当(比之更大)的生物响应的试剂。

[0057] 调节剂的实例包括小分子化合物和其他生物有机分子。小分子化合物的众多文库(例如,组合文库)是可商购的并且可以用作用于鉴别调节剂的起始点。技术人员能够开发一个或多个测定(例如,生化测定或基于细胞的测定),其中这类化合物文库可以被筛选以便于鉴别具有所需特性的一种或多种化合物;因此,熟练的药学药剂师能够通过例如合成和评价其类似物和衍生物来优化这一种或多种化合物。合成和/或制作分子模型研究也可以用于活化剂的鉴别中。

[0058] 分子的“活性”可以描述为或意指分子与配体或受体的结合;催化活性;刺激基因

表达或细胞信号转导、分化或成熟的能力；抗原活性；其他分子的活性的调节等等。所述术语还可以意指调节或维持细胞对细胞相互作用（例如，粘附）的活性，或维持细胞的结构（例如，细胞膜）的活性。“活性”还可以意指特异性活性，例如，[催化活性]/[mg蛋白质]、或[免疫活性]/[mg蛋白质]、生物区室中的浓度等等。术语“增殖活性”涵盖促进例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、肿瘤转移和血管生成，对它们而言必要的或确切地与它们相关联的活性。

[0059] 如本文所使用，“相当的”、“相当的活性”、“与…相当的活性”、“相当的作用”、“与…相当的作用”等等是可以定量地和/或定性地看待的相关术语。所述术语的含义常常取决于它们使用的背景。通过举例，均使受体活化的两种试剂从定性的角度来看可以视作具有相当的作用，但两种试剂在以下情况下从定量的角度来看可以视作缺乏相当的作用：一种试剂仅能够实现如在本领域公认的测定（例如，剂量响应测定）或在本领域公认的动物模型中所确定的另一种试剂的活性的20%。当将一个结果与另一个结果（例如，一个结果与参考标准）进行比较时，“相当的”往往意指一个结果与参考标准的偏差小于35%、小于30%、小于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于7%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。在具体实施方案中，如果一个结果与参考标准的偏差小于15%、小于10%或小于5%，所述结果与参考标准是相当的。通过举例，但不限制，活性或作用可以意指功效、稳定性、溶解度或免疫原性。

[0060] 术语例如细胞、组织、器官或生物体的“响应”涵盖生物化学或生理行为的变化，例如，生物区室内的浓度、密度、粘附、或迁移的变化，基因表达速率的变化，或分化状态的变化，其中变化与活化、刺激或治疗、或者诸如遗传编程的内部机制相关。在某些背景下，术语“活化”、“刺激”等等意指如通过内部机制以及通过外部或环境因子调控的细胞活化；而术语“抑制”、“下调”等等意指相反的作用。

[0061] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用来意指任何长度的氨基酸的聚合形式，其可以包括遗传编码和非遗传编码氨基酸、化学或生物化学修饰的或衍生的氨基酸以及具有修饰的多肽骨架的多肽。所述术语包括：融合蛋白，其包括但不限于具有异源氨基酸序列的融合蛋白、具有异源和同源前导序列的融合蛋白；具有或不具有N末端甲硫氨酸残基的融合蛋白；具有免疫标记蛋白的融合蛋白等等。

[0062] 将了解，贯穿本公开，根据单字母或三字母代码来参考氨基酸。为了读者方便，以下提供了单字母和三字母氨基酸代码：

G 甘氨酸 Gly P 脯氨酸 Pro

A 丙氨酸 Ala V 缬氨酸 Val

L 亮氨酸 Leu I 异亮氨酸 Ile

M 蛋氨酸 Met C 半胱氨酸 Cys

F 苯丙氨酸 Phe Y 酪氨酸 Tyr

[0063]

W 色氨酸 Trp H 组氨酸 His

K 赖氨酸 Lys R 精氨酸 Arg

Q 谷氨酰胺 Gln N 天冬酰胺 Asn

E 谷氨酸 Glu D 天冬氨酸 Asp

S 丝氨酸 Ser T 苏氨酸 Thr

[0064] 如本文所使用,术语“变体”涵盖天然存在的变体和非天然存在的变体。天然存在的变体包括同系物(一个物种与另一个物种的氨基酸或核苷酸序列分别不同的多肽和核酸)以及等位变体(一种物种内的一个个体与另一个个体的氨基酸或核苷酸序列分别不同的多肽和核酸)。非天然存在的变体包括分别包含氨基酸或核苷酸序列的变化的多肽和核酸,其中序列的变化是人工引入的(例如,突变蛋白质);例如,所述变化是在实验室中通过人为干涉(“经过人手”)产生的。因此,本文中的“突变蛋白质”广义意指通常携带单个或多个氨基酸取代的突变重组蛋白,并且往往来源于已经受定点或随机诱变的克隆基因,或来源于完全合成基因。

[0065] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等等在本文中可互换使用来意指任何长度的核苷酸的聚合形式,无论是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸的非限制性实例包括线性和环状核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等等。

[0066] 在多肽的结构背景下,如本文所使用的“N-末端”(或“氨基末端”)和“C-末端”(或“羧基末端”)分别意指多肽的氨基最末端和羧基最末端,而术语“N-端”和“C-端”分别意指多肽中朝向N-末端和C-末端的氨基酸序列中的相对位置,并且分别可以包括N-末端和C-末端处的残基。“紧邻N-端”或“紧邻C-端”意指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中第一氨基酸残基和第二氨基酸残基共价地结合以提供连续的氨基酸序列。

[0067] “衍生自”在氨基酸序列或多核苷酸序列(例如,“衍生自”IL-10多肽的氨基酸序列)的背景下意图指示多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸(例如,天然存在的IL-10多肽或IL-10-编码核酸)的序列的序列,并且不意图对产生蛋白质或核酸的来源或方法作出限制。通过举例,术语“衍生自”包括参考氨基酸或DNA序列的同系物或变体。

[0068] 在多肽的背景下,术语“分离的”意指处于与多肽可以天然存在的环境不同的环境中的相关多肽(如果天然存在的话)。“分离的”意图包括大体上富含相关多肽和/或其中相关多肽得以部分或大体上纯化的样品内的多肽。在多肽不是天然存在的情况下,“分离的”指示多肽已从在其中通过合成或重组手段制备所述多肽的环境中分离出来的多肽。

[0069] “富含”意指样品不是天然操纵的(例如,由科学家操纵),以使得相关多肽以a)比起始样品诸如生物样品(例如,多肽天然地存在其中或多肽在施用之后才存在其中的样品)中的多肽的浓度更大的浓度(例如,至少大3倍、至少大4倍、至少大8倍、至少大64倍、或更多倍)存在;或b)比在其中制备多肽的环境(例如,在细菌细胞中)更大的浓度存在。

[0070] “基本上是纯的”指示组分(例如,多肽)构成组合物总含量的大于约50%,以及典型地总多肽含量的大于约60%。更典型地,“基本上是纯的”意指总组合物的至少75%、至少85%、至少90%或更多是相关组分的组合物。在一些情况下,多肽将构成组合物的总含量的大于约90%、或大于约95%。

[0071] 术语“特异性地结合”或“选择性地结合”在提及配体/受体、抗体/抗原或其他结合对时指示对蛋白质和其他生物制剂的异质群体中的蛋白质的存在具有决定作用的结合反应。因此,在指定条件下,特定的配体与特定受体结合,而不与样品中存在的其他蛋白质大量结合。所涵盖的方法中的抗体、或衍生自抗体的抗原结合位点的结合组合物与它的抗原或其变体或突变蛋白质结合的亲和力是任何其他抗体或其所衍生的结合组合物的至少2倍大、至少10倍大、至少20倍大或至少100倍大。在一个具体实施方案中,抗体将具有如由例如斯卡查德分析(Scatchard analysis)所确定的大于约 10^9 升/摩尔的亲和力(Munsen等人, 1980 *Analyt. Biochem.* 107:220-239)。

[0072] IL-10和PEG-IL-10

[0073] 将又称为人细胞因子合成抑制因子(CSIF)的抗炎细胞因子IL-10分类为2型(类)细胞因子,即,一组包括IL-19、IL-20、IL-22、IL-24(Mda-7)和IL-26,干扰素(IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFN- δ 、IFN- ϵ 、IFN- κ 、IFN- Ω 和IFN- τ)以及干扰素样分子(限制素、IL-28A、IL-28B和IL-29)的细胞因子。

[0074] IL-10是对免疫调控和炎症具有多效作用的细胞因子。IL-10通过肥大细胞来产生,对抗这些细胞在过敏反应的部位处具有的炎性效应。虽然IL-10能够抑制促炎细胞因子诸如IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF α 以及GM-CSF的合成,但IL-10也对某些T细胞和肥大细胞具有刺激性,并且刺激B细胞成熟、增殖和抗体产生。IL-10可以阻断NF- κ B活性,并且参与JAK-STAT信号转导途径的调控。IL-10还诱导CD8+T细胞的细胞毒性活性和B细胞的抗体产生,并且IL-10阻抑巨噬细胞活性和肿瘤促进炎症。CD8+T细胞的调控是剂量依赖性的,其中较高剂量诱导较强的细胞毒性反应。

[0075] 人IL-10是分子量为37kDa的同二聚体,其中每个18.5kDa单体包含178个氨基酸,其中的前18个氨基酸包含信号肽,以及形成两个分子内二硫键的两个半胱氨酸残基。IL-10二聚体是在破坏两个单体亚基之间的非共价相互作用之后变得不具有生物活性。

[0076] 本公开涵盖展现出80%同源性的人IL-10(NP_000563)和鼠IL-10(NP_034678)以及其使用。此外,本公开的范围包括来自其他哺乳动物物种的IL-10直向同源物及其修饰形式,包括大鼠(登记NP_036986.2;GI 148747382);牛(登记NP_776513.1;GI 41386772);绵羊(登记NP_001009327.1;GI 57164347);狗(登记ABY86619.1;GI 166244598);以及兔(登

记AAC23839.1;GI 3242896)。

[0077] 如上所述,术语“IL-10”、“IL-10多肽”、“IL-10分子”、“IL-10试剂”等等意图是广义解释的并且包括例如人和非人IL-10-相关多肽,包括同系物、变体(包括突变蛋白质)及其片段、连同具有例如前导序列(例如,信号肽)和前述部分的修饰形式的IL-10多肽。在另外的具体实施方案中,IL-10、IL-10多肽和IL-10试剂是激动剂。

[0078] IL-10受体(II型细胞因子受体)由 α 和 β 亚基组成,所述 α 和 β 亚基分别又称为R1和R2。受体活化要求结合到 α 和 β 两者。IL-10多肽的一种同二聚体结合到 α ,并且同一IL-10多肽的另一种同二聚体结合到 β 。

[0079] 重组人IL-10的效用往往受到其相对较短的血清半衰期的限制,这可能归因于例如血流中的肾清除、蛋白降解和单聚体化。因此,已探索各种方法来在不破坏其二聚体结构以及因而不利地影响其活性的情况下改进IL-10的药物代谢动力学特征。IL-10的聚乙二醇化带来某些药物代谢动力学参数(例如,血清半衰期)的改进和/或活性的增强。如本文所使用,术语“聚乙二醇化的IL-10”和“PEG-IL-10”意指具有一个或多个聚乙二醇分子的IL-10分子,所述一个或多个聚乙二醇分子通常通过接头共价地附接到IL-10蛋白的至少一个氨基酸残基,以使得所述附接是稳定的。术语“单聚乙二醇化的IL-10”和“单-PEG-IL-10”指示一个聚乙二醇分子通常通过接头共价地附接到IL-10二聚体的一个亚基上的单个氨基酸残基。如本文所使用,术语“二聚乙二醇化的IL-10”和“二-PEG-IL-10”指示至少一个聚乙二醇分子通常通过接头附接到IL-10二聚体的每个亚基上的单个残基。

[0080] 在某些实施方案中,本公开中使用的PEG-IL-10是单-PEG-IL-10,其中1至9个PEG分子通过接头共价地附接到IL-10二聚体的一个亚基的N-末端处的氨基酸残基的 α 氨基。一个IL-10亚基的单聚乙二醇化通常因亚基混排而产生非聚乙二醇化、单聚乙二醇化和二聚乙二醇化的IL-10的非均匀混合物。此外,允许聚乙二醇化反应进行到完成通常将产生非特异性和多聚乙二醇化的IL-10,因而降低其生物活性。因此,本公开的具体实施方案包括通过本文描述的方法产生的单聚乙二醇化和二聚乙二醇化的IL-10的混合物的施用。

[0081] 在具体实施方案中,PEG部分的平均分子量是在约5kDa与约50kDa之间。虽然PEG与IL-10的附接的方法或位点不是至关重要的,但在某些实施方案中,聚乙二醇化并不改变或仅最小程度改变IL-10试剂的活性。在某些实施方案中,半衰期的增加大于生物活性的任何降低。PEG-IL-10的生物活性典型地通过评定受试者血清中的炎性细胞因子(例如,TNF- α 或IFN- γ)的水平来测量,所述受试者受细菌抗原(脂多糖(LPS))攻击并且用PEG-IL-10来治疗,如在美国专利号7,052,686中所描述。

[0082] IL-10变体可以根据所能想到的各种目的来制备,包括增加血清半衰期、减少对抗IL-10的免疫应答、促进纯化或制备、降低IL-10到其单体亚基的转化、改进治疗功效以及减轻治疗应用期间副作用的严重性或减少所述副作用的发生。氨基酸序列变体通常是自然界中不存在的预定变体,但一些可以是翻译后变体,例如,糖基化变体。IL-10的任何变体可以在其保留合适水平的IL-10活性的前提下使用。

[0083] 短语“保守性氨基酸取代”意指保留蛋白质的以下活性的取代:将蛋白质中的氨基酸置换为侧链具有与所述蛋白质的侧链相似的酸度、碱度、电荷、极性或大小的氨基酸。保守性氨基酸取代通常要求氨基酸残基在以下基团内的取代:1)L、I、M、V、F;2)R、K;3)F、Y、H、W、R;4)G、A、T、S;5)Q、N;以及6)D、E。取代、插入或缺失的指导原则可以是基于来自不同物种

的一种或多种不同变体蛋白的氨基酸序列的比对。因此,除了任何天然存在的IL-10多肽之外,本公开涵盖具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,通常不超过20、10或5个的氨基酸取代,其中所述取代通常是保守性氨基酸取代。

[0084] 本公开还涵盖含有衍生自成熟IL-10的连续氨基酸残基的成熟IL-10的活性片段(例如,子序列)。肽或多肽子序列的连续氨基酸残基的长度根据衍生所述子序列的特定的天然存在的氨基酸序列而变化。一般而言,肽和多肽可以来自约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸直至全长肽或多肽。

[0085] 此外,IL-10多肽在限定长度的连续氨基酸(例如,“比较窗口”)内与参考序列相比较可以具有限定的序列同一性。比对用于比较的序列的方法是本领域熟知的。用于比较的序列的最佳比对可以通过以下方式来实现:例如Smith&Waterman,Adv.Appl.Math.2:482(1981)的局部同源性算法;Needleman&Wunsch,J.Mol.Biol.48:443(1970)的同源性比对算法;Pearson&Lipman,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)的相似性方法的搜索;这些算法的计算机化实现方式(Wisconsin Genetics Software Package,Madison,Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA);或人工比对和视觉检查(参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编著,1995增刊))。

[0086] 作为一个实例,合适的IL-10多肽可以包含一种氨基酸序列,所述氨基酸序列与来自约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸直至全长肽或多肽的连续片段具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%的氨基酸序列同一性。

[0087] 如下文进一步论述,IL-10多肽可以从天然来源(例如,除其天然存在的环境之外的环境)分离并且也可以重组方式制得(例如,在遗传修饰的宿主细胞诸如细菌、酵母、毕赤酵母属、昆虫细胞等等中),其中遗传修饰的宿主细胞用包含编码多肽的核苷酸序列的核酸来修饰。IL-10多肽也可以是合成产生的(例如,通过不含细胞的化学合成)。

[0088] 本公开涵盖编码IL-10试剂的核酸分子,包括其天然存在的和非天然存在的亚型、等位变体和剪接变体。本公开还涵盖核酸序列,由于遗传密码的简并性,所述核酸序列与天然存在的DNA序列相比存在一个或多个碱基的变化,但仍翻译成对应于IL-10多肽的氨基酸序列。

[0089] 免疫检查点抑制剂

[0090] 特征在于所有癌症的巨大数目的遗传和遗传后变化提供一组不同的抗原,免疫系统可以使用所述组抗原来将肿瘤细胞从其正常相应物中区分开来。在T细胞的情况下,由T细胞受体(TCR)的抗原识别引发的响应的最终幅度(例如,细胞因子产生或增殖的水平)和品质(例如,所产生的免疫应答的类型,诸如细胞因子产生的模式)通过共刺激信号与抑制信号(免疫检查点)之间的平衡来调控。在正常的生理条件下,免疫检查点对于自身免疫的预防(即,自身耐受性的维持)以及还有在免疫系统对病原体感染作出响应时保护组织免受

损伤方面而言是至关重要的。免疫检查点蛋白的表达作为重要的免疫抵抗机制可能因肿瘤而调节异常。

[0091] T细胞已成为在治疗上操纵内源性抗肿瘤免疫的主要努力焦点,因为i)它们能够选择性识别所有细胞区室中衍生自蛋白质的肽;ii)它们能够直接识别和杀死抗原表达细胞(通过CD8+效应T细胞;又称为细胞毒性T淋巴细胞(CTL));以及iii)它们能够通过CD4+辅助T细胞来协调不同的免疫应答,从而整合自适应和天然效应机制。在临床环境中,免疫检查点的阻断-这会导致抗原特异性T细胞应答的扩增-已显示为人癌症治疗的有希望的方法。

[0092] T细胞介导的免疫包括多个连续步骤,其中每个步骤通过平衡刺激信号和抑制信号来调控以便于优化应答。虽然免疫应答中的几乎所有抑制信号最终都会调节细胞内信号传导途径,但许多是通过膜受体引发的,所述膜受体的配体是膜结合的或可溶的(细胞因子)。虽然调控T细胞活化的共刺激性和抑制性受体与配体在癌症中相对于正常组织往往不是过表达的,但调控组织中的T细胞效应子功能的抑制性配体和受体对于肿瘤细胞或对于同肿瘤微环境相关联的非转化细胞而言普遍是过表达的。可溶的且膜结合的受体-配体免疫检查点的功能可以使用激动剂抗体(针对共刺激性途径)或拮抗剂抗体(针对抑制性途径)来调节。因此,与当前批准用于癌症治疗的大多数抗体相对比,阻断免疫检查点的抗体并不直接靶向肿瘤细胞,而是靶向淋巴细胞受体或其配体以便于增强内源性抗肿瘤活性。[参见Pardoll,(2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64]。

[0093] 已显示IL-10能通过直接上调细胞毒酶粒酶A、粒酶B和穿孔素来直接活化人和鼠CD8+T细胞的细胞毒性。此外,在适当的条件下,将这些细胞暴露于IL-10将增强细胞内IFN γ 的累积,IFN γ 可以在T细胞受体与可溶的抗CD3或负载有肽抗原的同源MHC I连接之后分泌。IL-10(例如,PEG-IL-10)如上文所指示直接增强CD8+T细胞功能,而免疫检查点抑制剂通常以间接方式来达到此目的。IL-10和免疫检查点抑制剂对CD8+T细胞施加所述影响的不同机制为具有潜在有效的治疗效果的联合治疗提供了尚待发掘的机会。

[0094] 为用于阻断的候选物的免疫检查点(配体和受体)的实例包括PD1、PDL1、BTLA、CTLA4、TIM3、LAG3;A2aR;以及杀伤细胞抑制性受体,其中一些在各种类型的肿瘤细胞中被选择性地上调。下文论述这些免疫检查点中的每一个。本公开涵盖IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)组合这些受体和配体以及其他免疫检查点受体和配体的抑制剂的用途。在肿瘤环境下,这些IL-10-免疫检查点抑制剂组合的主要治疗目标是引导CD8+区室来摧毁肿瘤。

[0095] CTLA4(细胞毒性T-淋巴细胞相关抗原4;又称为CD152)。免疫检查点受体CTLA4属于受体的免疫球蛋白超家族,其还包括PD1;BTLA;淋巴细胞衰减因子;TIM3以及T细胞活化的V结构域免疫球蛋白阻抑剂。CD80(又称为B7.1)和CD86(又称为B7.2)已被鉴别为CTLA4受体配体。对待临床靶向的第一免疫检查点受体CTLA4排他地在T细胞上表达,其中CTLA4主要调控T细胞活化的早期阶段的幅度。已显示出CTLA4能对抗T细胞共刺激性受体CD28的活性。在抗原识别之后,CD28信号转导使T细胞受体信号转导大幅度扩增以活化T细胞。[参见,例如,Riley等人,(2002)Proc.Natl Acad.Sci.USA 99:11790-95]。

[0096] CTLA4在T细胞活化之后被转录性地诱导。虽然CTLA4通过活化的CD8+效应T细胞表达,但其主要生理学作用被认为通过对CD4+T细胞的两个主要子集的不同作用显现出来:i)下调辅助T细胞活性,以及ii)增强调控T细胞免疫抑制活性。确切地说,CTLA4阻断导致依赖

于辅助T细胞的免疫应答的增强,而调控T细胞的CTLA4接合增加其阻抑功能。[参见,例如,Fontenot等人,(2003)Nat.Immunol.Proc.4:330-36]。

[0097] 已描述了使用抗CTLA4拮抗性抗体靶向CTLA4信号转导途径的各种实验方法。已对这些方法作出评价以辨别这类抗体在癌症(例如,肿瘤)和传染病中的潜在效用。例如,IL-10先前已参与CTLA4介导的抗肿瘤免疫应答的阻抑(Jovasevic等人,(2004)J.Immunol.172:1449-54)。当它在2011年被批准用于治疗黑素瘤时,完全人源化的CTLA4单克隆抗体伊匹木单抗(YERVOY;Bristol-Myers Squibb)成为在美国得到监管批准的首例免疫检查点抑制剂。另一种试剂曲美木单抗(先前称为替西木单抗;MedImmune)当前处于用于例如肝细胞癌、黑素瘤和间皮瘤的临床试验中。

[0098] 在自身免疫和移植条件下,为了潜在效用,已使用拮抗性CTLA4-Ig靶向CD28信号转导途径(Wu等人,(2012)Int.J.Biol.Sci.8:1420-30)。包含CTLA4和抗体(CTLA4-Ig;阿巴西普(ORENCIA;Bristol-Myers Squibb))的融合蛋白已用于治疗类风湿关节炎,并且已显示其他融合蛋白对肾移植患者是有效的,所述肾移植患者对埃-巴二氏病毒敏感。

[0099] 虽然是有希望的,但CTLA4-相关治疗方法并不是没有缺点。通过举例,已报道用人源化的抗CTLA4拮抗性Ab治疗转移性黑素瘤会引起某些自身免疫毒性(例如,肠炎和皮炎),从而提示要求确定耐受的治疗窗口(Wu等人,(2012)Int.J.Biol.Sci.8:1420-30)。抗CTLA4试剂(例如,抗体诸如伊匹木单抗)与IL-10(例如,PEG-IL-10)的组合提供了在应答条件下使治疗功效最大化而不诱导不耐受的副作用的独特手段的可能性。因此,本公开的具体实施方案包括这类组合。

[0100] PD1(编程性细胞死亡蛋白1;又称为CD279),以及PDL1(PD1配体;又称为B7-H1)和PDL2。PD1是T细胞活化的负调控物,其与CD28家族的成员共享结构特性。PD1限制组织内的T细胞效应子功能。通过PD1的上调配体,肿瘤细胞阻断肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫应答。如同许多其他免疫检查点抑制剂一样,PD1阻断逆转T细胞耗竭,恢复细胞因子产生,并且加强抗原依赖性T细胞的扩增。PDL1和PDL2是已知用于活化PD1途径的两种配体。

[0101] 已显示PD1-PDL1/PDL2途径的阻断能延迟肿瘤生长并且延长荷瘤小鼠的生存期。此外,早期临床试验的结果表明PD1途径的阻断能在各种肿瘤类型中诱导持续的肿瘤消退。对于PD1和PDL1/PDL2,最重要的相互作用被认为发生在肿瘤部位处,而不是更广泛意义地发生在其与CTLA-4结合时穿过免疫系统。

[0102] 已经对使用基因转移和/或拮抗性抗体调节PD1-PDL1/PDL2途径的各种免疫治疗方法作出了评价。这类方法已显示在包括移植、感染、肿瘤和自身免疫疾病的许多疾病、病症和病状中都很有前景(Wu等人,(2012)Int.J.Biol.Sci.8:1420-30)。已显示PD1的细胞外免疫球蛋白(Ig)V结构域对于PD1与PDL1/PDL2之间的相互作用来说是重要的,从而表明hPD1-IgV可能是特定肿瘤免疫治疗的有希望的策略(Zhang等人,(2008)Cytotherapy 10(7):711-10)。PD1抗体正在开发当中(例如,纳武单抗(Bristol-Myers Squibb)、pidilizumab(CT-011;CureTech)和派姆单抗(lambrolizumab)(Merck))。纳武单抗已显示在患有黑素瘤、肺癌和肾癌的患者中有前景。也在肺癌中评价了包含纳武单抗和CTLA-4调节剂伊匹木单抗的联合治疗。还评价了抗PDL1抗体(例如,BMS-936559(Bristol-Myers Squibb)、MPDL3280A(Genentech/Roche)和MEDI4736(MedImmune)),也评价了抗PDL2抗体(例如,AMP-224(Amplimmune/GlaxoSmithKline))。

[0103] IL-10已参与PD1/PDL1连接的抑制作用(参见Said等人,(2010)Nat.Med.16:452-59;Wolfe等人,(2011)Eur.J.Immunol.41:413-24;Rodriguez-Garcia等人,(2011年4月)J.Leukoc.Biol.89(4):507-15;以及Getts等人,(2011)J.Immunol.187:2405-17)。与文献中的建议相对比,本公开涵盖包含IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)与PD1的抑制剂的组合、PD1L或PD1/PDL1之间的直接相互作用的有希望的治疗方法。

[0104] BTLA(B和T淋巴细胞衰减因子;又称为CD272)。BTLA是结构上和功能上与CTLA-4和PD-1相关的共抑制性分子。虽然BTLA在病毒特异性人CD8+T细胞上表达,但BTLA在其从原初表型分化为效应子表型之后逐渐下调(Paulos等人,(2010年1月)J.Clin.Invest.120(1):76-80)。在某些肿瘤细胞类型(例如,黑素瘤)和肿瘤相关内皮细胞上表达的疱疹病毒进入介质(HVEM;又称为TNFRSF14)已被鉴别为BTLA配体。由于BTLA与HVEM之间的相互作用是复杂的,BTLA的治疗抑制策略不如其他免疫检查点抑制性受体和配体的治疗抑制策略那么显而易见。[Pardoll,(2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64]。

[0105] 已经评价了使用抗BTLA抗体和拮抗性HVEM-Ig靶向BTLA/HVEM途径的多种实验方法,并且这类方法已表明在包括移植、感染、肿瘤和自身免疫疾病的许多疾病、病症和病状中有所希望的效用(Wu等人,(2012)Int.J.Biol.Sci.8:1420-30)。

[0106] 已显示BTLA与激动剂抗体的交联会限制T细胞增殖、IFN γ 和IL-10分泌(Otsuki等人,(2006)BBRC 344:1121-27)。此外,已显示IL-10暴露会一致地下调BTLA在CD8+T细胞中的信息表达。总的来说,这些数据表明了IL-10和BTLA的可能的逆调控,并且本公开的具体实施方案涵盖响应于这类联合治疗而向患有疾病、病症或病状的受试者施用IL-10(例如,PEG-IL-10)和抗BTLA试剂的组合。

[0107] TIM3(T-细胞膜蛋白3;又称为HAVcr2)。TIM3抑制T辅助1(TH1)细胞应答,并且已显示TIM3抗体会增强抗肿瘤免疫。TIM3的配体半乳凝素9在包括乳腺癌的各种类型的癌症中被上调。

[0108] 已报道TIM3与PD1在肿瘤特异性CD8+T细胞上共表达。当受到睾丸癌抗原NY-ESO-1刺激时,两种分子的双阻断显著增强了人T细胞的体外增殖和细胞因子产生。此外,在动物模型中,已报道PD1和TIM3的协作阻断在多种情况下会增强抗肿瘤免疫应答,在这类情况下,仅观察到来自每个单独分子的阻断的适度作用。[参见,例如,Pardoll,(2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64;Zhu等人,(2005)Nature Immunol.6:1245-52;Ngiew等人,(2011)Cancer Res.71:3540-51)]。

[0109] 已显示TIM-3阻断能上调IL-10(参见Zhang,(2012)J.Leukoc.Biol.91(2):189-96;Anderson,(2010)Eur.J.Immunol.40:859-66)。虽然文献中既未描述也未表明,但这一发现支持以下可能性:当抗TIM3试剂(例如,中和Ab)作为包含IL-10的治疗方案的部分施用时可能存在强有力的协同作用。

[0110] LAG3(淋巴细胞活化基因3;又称为CD233)。已显示LAG3会在增强调控T(T_{调控})细胞的功能中以及独立地在抑制CD8+效应T细胞功能中发挥作用。MHC II类分子(LAG3的配体)在一些上皮癌上被上调(常常响应于IFN γ),并且还在浸润肿瘤的巨噬细胞和树突细胞上表达。虽然并未明确阐述LAG3-MHC II类相互作用的作用,但所述相互作用可以是LAG3在增强T_{调控}细胞功能的作用中的关键组成部分。

[0111] LAG3是在T_{调控}细胞和无反应性T细胞两者上协作上调的若干免疫检查点受体之一。

在与一个受体单独的阻断相比较时,LAG3和PD1的同时阻断可以引起无反应性状态的增强的逆转。事实上,已显示LAG3和PD1的阻断在慢性感染的环境下会协同地逆转肿瘤特异性CD8⁺T细胞和病毒特异性CD8⁺T细胞当中的无反应性。在黑素瘤、乳腺癌和肾细胞癌中评价IMP321(ImmuFact)。[大体参见Woo等人,(2012)*Cancer Res* 72:917-27;Goldberg等人,(2011)*Curr.Top.Microbiol.Immunol.*344:269-78;Pardoll,(2012年4月)*Nature Rev.Cancer* 12:252-64;Grosso等人,(2007)*J.Clin.Invest.*117:3383-392]。

[0112] 还显示出LAG3是IL-10表达T_H17细胞的标志物(Camisaschi等人,(2010)*J.Immunol.*184)。已显示这些LAG3-阳性细胞在癌症患者体内会增加,并且相信IL-10会参与促进免疫抑制中。本公开的一个具体实施方案涵盖包含LAG3和IL-10的联合治疗。

[0113] A2aR(腺苷A2a受体A2aR;又称为Adora2a)。A2aR通过刺激CD4⁺T细胞朝向T_H17细胞发展来抑制T细胞应答。A2aR在肿瘤免疫中是特别重要的,因为在细胞更新中肿瘤中的细胞死亡的速率很高,并且死亡细胞会释放为A2aR的配体的腺苷。此外,A2aR的缺失已经与感染的增强的且有时病理性的炎症应答相关联。

[0114] A2aR的抑制可以通过阻断腺苷结合的抗体或通过腺苷类似物来实现。这类试剂可以用于诸如癌症和帕金森病的病症。[大体参见,Zarek等人,(2008)*Blood* 111:251-59;Waickman等人,(2011年11月25日)*Cancer Immunol.Immunother.*(doi:10.1007/s00262-011-1155-7)]。本公开具体涵盖具有这类试剂和IL-10的联合治疗。

[0115] 杀伤细胞抑制性受体。杀伤细胞抑制性受体基于其结构特征可以分为两类:i)杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR),以及ii)C型凝集素受体(II型跨膜受体家族的成员)。虽然这些受体的作用仍然处于研究当中,但已知的是,所述受体是NK细胞的杀伤活性的重要调控剂,并且NK细胞的活化可以提供强有力的抗肿瘤活性。还认为所述受体对T细胞和APC(例如,树突细胞)具有抑制作用。在肺癌中研究KIRIgG4(lirilumab;Bristol-Myers Squibb)。

[0116] 虽然大多数杀伤细胞抑制性受体对人白细胞抗原(例如,HLA)的子集有特异性并且具有等位基因特异性,但其他杀伤细胞抑制性受体能识别广泛表达的分子。NK细胞家族的成员的抑制可以呈现用于调节抗肿瘤免疫应答的独特方法,并且包含IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)的联合治疗是本公开的实施方案。[参见Raulet,(2006)*Semin.Immunol.*18:145-50;Plougastel等人,(2006)*Curr.Top.Microbiol.Immunol.*298:77-89]。

[0117] 另外的免疫检查点。文献中已描述了其他很少定义的免疫检查点。所述免疫检查点包括受体(例如,2B4(又称为CD244)受体)以及配体(例如,某些B7家族抑制性配体诸如B7-H3(又称为CD276)和B7-H4(又称为B7-S1、B7x和VCTN1))。[参见Pardoll,(2012年4月)*Nature Rev.Cancer* 12:252-64]。B7-H3和B7-H4是包括CTLA4和PD1的B7超家族的成员。在若干顽固性癌症中评价抑制T细胞活化的配体B7-H3(MGA271;MacroGenics)。

[0118] IDO(吲哚胺2,3-双加氧酶)是在肿瘤细胞和活化免疫细胞中正常表达的免疫调控酶。IDO下调通过色氨酸的氧化介导的免疫应答。这会导致T细胞活化的抑制和T细胞细胞凋亡的诱导,从而产生肿瘤特异性细胞毒性T淋巴细胞在其中变得不具有功能活性或不再能够攻击受试者的癌症细胞的环境。Indoximod(NewLink Genetics)是在转移性乳腺癌中被评价的IDO抑制剂。

[0119] 本公开涵盖这些和其他免疫检查点(已知但尚待完全阐明和/或鉴别)的抑制剂组合本文描述的IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)的用途。

[0120] 治疗考虑。许多肿瘤细胞表达多种抑制性配体,并且肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)表达多种抑制性受体。在考虑各种免疫检查点的抑制剂的作用机制时,所述抑制剂所调控的免疫功能的多样性开始起作用。例如,CTLA4和PD1在不同的水平下并通过不同的机制来调控免疫应答。因此,可以在多个水平上增强抗肿瘤免疫,并且可以鉴于各种机理考虑而产生组合策略。

[0121] 鉴于上文,在许多情况下,抗肿瘤免疫可以通过免疫检查点的双重或三重(或可能更多重)阻断来增强。本领域中已公开了多特异性抗体。例如,美国专利Publn.2013/0156774描述了用于靶向共表达PD1和TIM3的细胞的双特异性和多特异性试剂(例如,抗体),以及其使用方法。此外,已显示BTLA和PD1的双重阻断会增强抗肿瘤免疫(Pardoll, (2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64)。

[0122] 本公开涵盖IL-10(例如,PEG-IL-10)组合上文概括用于靶向多种免疫检查点抑制剂的策略的用途。

[0123] 免疫检查点抑制剂的治疗反应通常要比传统化疗和酪氨酸激酶抑制剂的反应迟很多来表现自身。事实上,在用免疫检查点抑制剂开始治疗之后,可能要花六个月或更多个月才能观察到治疗反应的客观指标。此外,在涉及抗CTLA4抗体治疗的一些情况下,转移性病变在后续消退之前通过计算机断层成像(CT)或磁共振成像(MRI)扫描发现尺寸实际上是增加的;这似乎归因于增加的免疫细胞浸润。[参见,例如,Pardoll, (2012年4月)Nature Rev.Cancer 12:252-64]。因此,关于是否用免疫检查点抑制剂组合本公开的IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)进行治疗的决定必须在往往比常规治疗更长的进展时间内作出。

[0124] 与免疫检查点抑制剂相关联的方法和模型。本公开涵盖用于鉴别患有疾病、病症或病状的候选受试者群体(或个体受试者)的各种方法和模型,所述候选受试者群体(或个体受试者)可以对本文描述的联合治疗(即,IL-10(例如,PEG-IL-10)组合免疫检查点抑制剂)作出响应。在一些实施方案中,所述方法和模型允许确定所述组合的施用是否导致加成或协同作用。在其他实施方案中,所述方法和模型允许确定所述组合的施用是否导致较少副作用。本公开的某些实施方案包括体外、离体和体内方法和/或模型的使用。在本公开的某些实施方案中受试者群体(或个体受试者)是非人动物(例如,啮齿类动物)或是人。

[0125] 通过举例,但不限制,本公开的一个方面涵盖一种用于确定患有本文描述的疾病、病症或病状(例如,癌症)的测试受试者是否为利用IL-10(例如,PEG-IL-10)和免疫检查点抑制剂的组合的治疗的候选者的方法,所述方法包括a)提供具有这种疾病、病症或病状的指征的测试受试者;b)向测试受试者共施用所述组合,其中所述组合足以在参考群体中实现所需反应;以及c)确定测试受试者是否展现出所需反应;其中所需反应的确定指示测试受试者是所述组合的治疗的候选者。

[0126] 所需反应可以是在多种情况下被认为有利的任何结果。在一些实施方案中,所需反应是疾病、病症或病状的进展的预防,而在其他实施方案中,所需反应是疾病、病症或病状的一个或多个特征的消退或稳定(例如,肿瘤尺寸的减小)。仍然在其他实施方案中,所需反应是与所述组合的一种或多种试剂相关联的一种或多种副作用的减少或消除。

[0127] 如上文所指出,本公开还涵盖各种模型。可以使用提供可靠的可复制的结果的任何模型。技术人员熟悉可以与本公开的主题结合使用的模型;在一个实施方案中,所述组合是在包括非人受试者(例如,小鼠)的模型中评价。本公开的具体实施方案涵盖一种用于确

定IL-10和一种或多种免疫检查点抑制剂的组合是否是由于治疗本文描述的疾病、病症或病状(例如,癌症)的候选物的模型。

[0128] 另外的实施方案包括一种用于确定组合中的试剂的最佳量的方法或模型。最佳量可以是例如在受试者或受试者群体内实现最佳效果的量,或实现治疗效果,同时最小化或消除与所述试剂中的一种或多种相关联的副作用的量。在一些实施方案中,已知或已确定IL-10和免疫检查点抑制剂的组合自身能有效治疗或预防受试者(例如,人)或受试者群体中的本文描述的疾病、病症或病状(例如,癌症),并且一种试剂的量是逐步增加的,而另一种试剂的量保持恒定。通过以此方式操纵试剂的量,临床医师能够确定对于例如治疗特定疾病、病症或病状,或者消除副作用或者减少副作用而言最有效的试剂的比率,以使得所述试剂在多种情况下是可接受的。

[0129] 与免疫检查点抑制剂相关联的生物标志物。本公开还涵盖生物标志物结合本文描述的方法和模型的使用。术语“生物标志物”意指一种特征,其作为正常生物过程、病理过程或对治疗介入的药理反应的指示物被客观地测量和评价。指示物可以是可以在体内或其产物内测量且影响或预测结果或疾病的发生率的任何物质、结构或过程。

[0130] 在本公开所涵盖的一些实施方案中,生物标志物用于预测IL-10-免疫检查点抑制剂联合治疗的临床反应。在一些情况下,预处理生物标志物可以用于这种治疗中,其中就生物标志物可以应用作为标准照护治疗决策的部分这一点对所述生物标志物进行验证。

[0131] 本公开涵盖任何生物标志物的使用,所述任何生物标志物可以提供可用于IL-10-免疫检查点抑制剂治疗的任何方面中的可复制信息,包括受试者对这种治疗的反应的存在和程度以及由这种治疗引起的不利作用的存在和程度。通过举例,但不限制,与PD1/PDL1相关联的生物标志物包括IFN γ 的增强以及粒酶A、粒酶B和穿孔素的上调;与BTLA相关联的生物标志物包括CD8+T细胞数目和功能的增加;与CTLA4相关联的生物标志物包括IFN γ 的增强,粒酶A、粒酶B和穿孔素的上调以及CD8+T细胞上ICOS表达的增强;与TIM3相关联的生物标志物包括粒酶A、粒酶B以及穿孔素的上调;并且与LAG3相关联的生物标志物包括IL-10表达T_H17细胞的增强。已知效应分子IP-10(可诱导蛋白10)和MIG(由IFN γ 诱导的单核因子)的表达在某些表达IL-10的肿瘤中通过LPS或IFN γ 增加;这些效应分子也可以用作通过本文描述的联合治疗可以增强的潜在的血清生物标志物。

[0132] 血清浓度

[0133] 本文描述的方法中的IL-10的血浆水平可以若干方式表征,包括:(1)高于某一指定水平或处于水平范围内的平均IL-10血清谷浓度;(2)在一定量时间内高于某一指定水平的平均IL-10血清谷浓度;(3)高于或低于某一指定水平或处于水平范围内的稳态IL-10血清浓度水平;或者(4)高于或低于某一指定水平或处于某一水平范围内的浓度特征的C_{最大值}。如本文所阐述,已发现平均IL-10血清谷浓度对于某些适应症的功效来说是特别重要的。

[0134] 在本公开的一些实施方案中,可以产生的血浆和/或血清水平浓度特征包括:大于约1.0pg/mL、大于约10.0pg/mL、大于约20.0pg/mL、大于约30pg/mL、大于约40pg/mL、大于约50.0pg/mL、大于约60.0pg/mL、大于约70.0pg/mL、大于约80.0pg/mL、大于约90pg/mL、大于约0.1ng/mL、大于约0.2ng/mL、大于约0.3ng/mL、大于约0.4ng/mL、大于约0.5ng/mL、大于约0.6ng/mL、大于约0.7ng/mL、大于约0.8ng/mL、大于约0.9ng/mL、大于约1.0ng/mL、大于约1.5ng/mL、大于约2.0ng/mL、大于约2.5ng/mL、大于约3.0ng/mL、大于约3.5ng/mL、大于约

4.0ng/mL、大于约4.5ng/mL、大于约5.0ng/mL、大于约5.5ng/mL、大于约6.0ng/mL、大于约6.5ng/mL、大于约7.0ng/mL、大于约7.5ng/mL、大于约8.0ng/mL、大于约8.5ng/mL、大于约9.0ng/mL、大于约9.5ng/mL或大于约10.0ng/mL的平均IL-10血浆和/或血清谷浓度。

[0135] 在本公开的具体实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是处于1.0pg/mL至10ng/mL的范围内。在一些实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是处于1.0pg/mL至100pg/mL的范围内。在其他实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是处于0.1ng/mL至1.0ng/mL的范围内。仍然在其他实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是处于1.0ng/mL至10ng/mL的范围内。应理解,本公开涵盖结合本文阐述的那些范围所涵盖的任何浓度的范围,甚至是在这类范围未被明确叙述的情况下。通过举例,一个实施方案中的平均血清IL-10浓度可以是处于0.5ng/mL至5ng/mL的范围内。通过另外的实例,本公开的具体实施方案包括约0.5ng/mL至约10.5ng/mL、约1.0ng/mL至约10.0ng/mL、约1.0ng/mL至约9.0ng/mL、约1.0ng/mL至约8.0ng/mL、约1.0ng/mL至约7.0ng/mL、约1.5ng/mL至约10.0ng/mL、约1.5ng/mL至约9.0ng/mL、约1.5ng/mL至约8.0ng/mL、约1.5ng/mL至约7.0ng/mL、约2.0ng/mL至约10.0ng/mL、约2.0ng/mL至约9.0ng/mL、约2.0ng/mL至约8.0ng/mL以及约2.0ng/mL至约7.0ng/mL的范围内的平均IL-10血清谷浓度。

[0136] 在具体实施方案中,在治疗的持续时间内维持了1-2ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。本公开还涵盖其中平均IL-10血清峰值浓度在治疗的持续时间内小于或等于约10.0ng/mL的实施方案。另外的实施方案涵盖大于或等于约1.0pg/mL的平均IL-10血清谷浓度。最佳平均血清浓度通常是在不引入不希望的副作用的情况下能实现所需治疗效果时所处的浓度。

[0137] 本公开的某些实施方案提供一种用于监测接收IL-10治疗的患者以预测以及因此潜在地避免副作用的方法,所述方法包括:(1)测量受试者的IL-10的峰值浓度;(2)测量受试者的IL-10的谷浓度;(3)计算峰-谷波动;以及(4)使用所计算的峰-谷波动来预测受试者体内的潜在副作用。在具体的受试者群体中,较小的峰-谷波动指示受试者将经历IL-10相关副作用的概率较低。此外,在一些实施方案中,特定峰-谷波动使用特定给药参数确定来用于治疗特定疾病、病症和病状,并且那些波动被用作参考标准。

[0138] 对于大多数药物,血浆药物浓度以多重指数方式下降。在静脉内施用之后不久,药物迅速地分布到整个初始空隙(最低限度地被限定为血浆容积)中,并且之后在血管外空隙(例如,某些组织)中出现缓慢的平衡分布。静脉内IL-10施用与这种双区室动力学模型相关联(参见Rachmawati, H.等人,(2004)Pharm. Res. 21(11):2072-78)。还研究了皮下重组hIL-10的药物代谢动力学(Radwanski, E.等人,(1998)Pharm. Res. 15(12):1895-1901)。因此,在评定适当的IL-10给药相关参数时,容积分布考虑是适宜的。此外,已经探索了将IL-10试剂靶向特定细胞类型的努力(参见,例如,Rachmawati, H. (2007年5月)Drug Met. Dist. 35(5): 814-21),并且可以证明IL-10的药物代谢动力学和给药原理的调节对于这类努力的成功是非常有价值的。

[0139] 本公开涵盖使得能够维持上文阐述的任何IL-10血清谷浓度的任何剂量和给药方案的施用。通过举例,但不限制,当受试者是人时,非聚乙二醇化的hIL-10可以以下剂量施用:大于0.5μg/kg/天、大于1.0μg/kg/天、大于2.5μg/kg/天、大于5μg/kg/天、大于7.5μg/kg、大于10.0μg/kg、大于12.5μg/kg、大于15μg/kg/天、大于17.5μg/kg/天、大于20μg/kg/

天、大于22.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于25 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于30 $\mu\text{g/kg/天}$ 或大于35 $\mu\text{g/kg/天}$ 。此外,通过举例,但不限制,当受试者是人时,包含相对较小PEG(例如,5kDa单-二-PEG-hIL-10)的聚乙二醇化的hIL-10可以以下剂量施用:大于0.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于0.75 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于1.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于1.25 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于1.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于1.75 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于2.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于2.25 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于2.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于2.75 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于3.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于3.25 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于3.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于3.75 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于4.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于4.25 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于4.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、大于4.75 $\mu\text{g/kg/天}$ 或大于5.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 。

[0140] 虽然有关IL-10血清浓度、剂量和对于实现特定IL-10血清浓度而言必要的治疗方案等的先前论述涉及利用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)的单一治疗,但在某些实施方案中,这类剂量、治疗方案等还与包含IL-10试剂组合一种或多种免疫检查点抑制剂的治疗方案有关。例如,PEG-IL-10给药方案在其单独施用时或在其组合PD1拮抗剂施用时可以相同的,因为PEG-IL-10和PD1拮抗剂具有不同的作用机制,所述作用机制允许所述试剂在其给药参数未修改的情况下组合。然而,这类组合可以允许PEG-IL-10和/或免疫检查点抑制剂的正常给药方案的修改。例如,可以减少一种或两种试剂的治疗剂量,可以降低一种或两种试剂的给药频率,和/或可以缩短一种或两种试剂的治疗持续时间,同时保留所需的治疗效果。

[0141] 技术人员(例如,药理学家)能够确定IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)组合免疫检查点抑制剂施用时的最佳给药方案。通过举例,在一些实施方案中,最佳PEG-IL-10给药方案可以要求减少每次给药施用的PEG-IL-10的量(例如,小于1.0 $\mu\text{g/kg/天}$ 、小于0.75 $\mu\text{g/kg/天}$ 、小于0.5 $\mu\text{g/kg/天}$ 、小于0.25 $\mu\text{g/kg/天}$ 或小于0.125 $\mu\text{g/kg/天}$)。在本公开的某些示例性实施方案中,平均IL-10血清谷浓度可以是在约0.1ng/mL至约9.5ng/mL、约0.25ng/mL至约8.0ng/mL、约0.5ng/mL至约7.0ng/mL、约0.75ng/mL至约6.0ng/mL或约1.0ng/mL至约5.0ng/mL的范围内。

[0142] 当IL-10试剂组合免疫检查点抑制剂施用,可以修改适用于单一治疗的IL-10试剂的给药参数中的一个或多个,而适用于单一治疗的免疫检查点抑制剂的给药参数可以保持不变;适用于单一治疗的IL-10试剂的给药参数中的一个或多个可以保持不变,而可以修改适用于单一治疗的免疫检查点抑制剂的给药参数中的一个或多个;可以修改适用于单一治疗的IL-10试剂和免疫检查点抑制剂的给药参数中的一个或多个;或者适用于单一治疗的IL-10试剂和免疫检查点抑制剂中每一个的给药参数可以保持不变。

[0143] 产生IL-10的方法

[0144] 本公开的多肽可以通过任何合适的方法来产生,包括非重组(例如,化学合成)和重组方法。

[0145] A. 化学合成

[0146] 在多肽是化学合成的情况下,合成可以通过液相或固相来进行。固相肽合成(SPPS)允许结合非天然氨基酸和/或肽/蛋白质主链修饰。各种形式的SPPS诸如9-芴甲氧羰基(Fmoc)和叔丁氧羰基(Boc)可用于合成本公开的多肽。化学合成的细节是本领域已知的(例如,Ganesan A.(2006)Mini Rev.Med.Chem.6:3-10;以及Camarero J.A.等人,(2005)Protein Pept Lett.12:723-8)。

[0147] 固相肽合成可以根据下文描述来进行。 α 功能(Na)和任何反应性侧链用酸不稳定

或碱不稳定基团保护。保护基团在用于连接酰胺键的条件下是稳定的,但可以在不损坏已形成的肽链的情况下容易地裂解。用于 α -氨基功能的合适的保护基团包括但不限于以下:Boc、苄氧基羰基(Z)、O-氯苄氧基羰基、二-苄基异丙基氧羰基、叔戊氧基羰基(Amoc)、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基-苄氧基羰基、o-硝基氧硫基、2-氰基-叔丁氧基-羰基、Fmoc、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己基-1-亚基)乙基(Dde)等等。

[0148] 合适的侧链保护基团包括但不限于:乙酰基、烯丙基(A11)、烯丙氧羰基(A11oc)、苄基(Bzl)、苄氧基羰基(Z)、叔丁氧羰基(Boc)、苄氧基甲基(Bom)、o-溴苄氧基羰基、叔丁基(tBu)、叔丁基二甲基甲硅烷基、2-氯苄基、2-氯苄氧基羰基、2,6-二氯苄基、环己基、环戊基、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环己基-1-亚基)乙基(Dde)、异丙基、4-甲氧基-2,3,6-三甲苄基磺酰基(Mtr)、2,3,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基(Pmc)、新戊酰、四氢吡喃-2-基、甲苯磺酰(Tos)、2,4,6-三甲氧基苄基、三甲基甲硅烷基以及三苯甲基(Trt)。

[0149] 在固相合成中,C端氨基酸偶联到合适的支持材料。合适的支持材料是对于合成过程的逐步缩合和裂解反应的试剂和反应条件而言是惰性的,并且不溶解在正使用的反应介质中的那些支持材料。可商购的支持材料的实例包括苯乙烯/二乙烯苯共聚物,其已用反应性基团和/或聚乙二醇修饰;氯甲基化苯乙烯/二乙烯苯共聚物;羟甲基化或氨甲基化的苯乙烯/二乙烯苯共聚物;等等。当需要制备肽核酸时,可以使用聚苯乙烯(1%)-二乙烯苯或用4-苄氧基苄基-醇(Wang-锚着点)或2-氯三苯甲基氯衍生的TentaGel®。在肽酰胺的情况下,可以使用聚苯乙烯(1%)-二乙烯苯或用5-(4'-氨基甲基)-3',5'-二甲氧基苯氧基)缬草酸(PAL-锚着点)或对-(2,4-二甲氧基苄基-氨基甲基)-苄氧基(Rink酰胺锚着点)衍生的TentaGel®。

[0150] 与聚合支持物的连接可以通过以下方式实现:通过在室温或高温(例如,在40℃与60℃之间)下,以及在例如2至72小时的反应时间下将活化试剂添加在乙醇、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮或类似溶剂中使C端Fmoc保护氨基酸与支持材料反应。

[0151] Na保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)与PAL、Wang或Rink锚着点的偶联可以例如在1-羟基苯并三唑或1-羟基-7-氮杂苯并三唑存在或不存在下,借助于偶联剂(诸如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或其他碳二亚胺、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸(TBTU)或其他脲盐、O-酰基脲、苯并三唑-1-基-三-吡咯烷-膦六氟磷酸盐(PyBOP)或其他磷盐、N-羟基琥珀酰亚胺、其他N-羟基酰亚胺或脲),例如借助于TBTU,伴随添加HOBt,添加或不添加碱例如像二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺或N-甲基吗啉,例如二异丙基乙胺来执行,其中反应时间是2至72小时(例如,在1.5至3倍过量氨基酸和偶联剂中(例如,在2倍过量中),以及在约10℃与50℃之间例如25℃的温度下在溶剂诸如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,例如二甲基甲酰胺中历时3个小时)。

[0152] 代替偶联剂,在上述条件下,还可能使用活性酯(例如,五氟苯基、对-硝基苯基等等),Na-Fmoc-氨基酸的对称酸酐,其酰基氯或酰基氟。

[0153] Na保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)可以在添加有DIEA的二氯甲烷中偶联到2-氯三苯甲基树脂,持续10至120分钟例如20分钟的反应时间,但是不限于这种溶剂和这种碱的使用。

[0154] 保护性氨基酸的成功偶联可以根据肽合成中的常规方法,典型地在自动化肽合成

仪中执行。通过利用例如哌啶(10%至50%)在二甲基甲酰胺中处理5至20分钟,例如利用50%哌啶在DMF中处理2x 2分钟并利用20%哌啶在DMF中处理1x 15分钟进行呈固相的偶联氨基酸的Na-Fmoc保护基团的裂解之后,3至10倍过量例如10倍过量的下一个保护性氨基酸在惰性的非水性极性溶剂诸如二氯甲烷、DMF或两者的混合物中以及在约10℃与50℃之间例如25℃的温度下偶联到先前的氨基酸。前述用于将第一Na-Fmoc氨基酸偶联到PAL、Wang或Rink锚着点的试剂适合用作偶联剂。保护性氨基酸的活性酯、或氯化物或氟化物或其对称酸酐也可以用作替代物。

[0155] 在固相合成结束时,肽从支持材料上裂解下来,与此同时裂解侧链保护基团。裂解可以在存在三氟醋酸或其他强酸性介质的情况下,通过添加5%-20%V/V清除剂诸如二甲基硫醚、乙基甲基硫醚、苯甲硫醚、甲苯硫酚、间甲苯酚、苯甲醚、乙二硫醇、苯酚或水,例如,15%v/v二甲基硫醚/乙二硫醇/间甲苯酚1:1:1来执行,持续0.5至3小时,例如2小时。具有完全保护侧链的肽通过利用冰醋酸/三氟乙醇/二氯甲烷2:2:6裂解2-氯三苯甲基锚着点来获得。保护的肽可以通过在硅胶上进行色谱法来纯化。如果肽通过Wang锚着点连接到固相并且如果意图获得具有C端烷基酰胺化的肽,那么裂解可以通过利用烷基胺或氟代烷基胺进行氨解来执行。氨解在约-10℃与50℃之间(例如,约25℃)的温度,以及约12与24小时之间(例如,约18小时)的反应时间下执行。此外,肽可以通过例如利用甲醇进行再次酯化来从支持物上裂解下来。

[0156] 获得的酸溶液可以与3至20倍量的冷乙醚或正己烷,例如10倍过量的二乙醚混合,以便于将肽沉淀下来并且因此分离残留在乙醚中的清除剂和裂解的保护基团。进一步纯化可以通过使肽从冰醋酸再沉淀若干次来执行。获得的沉淀物可以溶解在水或叔丁醇或两种溶剂的混合物(例如,1:1叔丁醇/水的混合物)中,并且进行冷冻干燥。

[0157] 所获得的肽可以通过各种色谱方法来纯化,包括采用乙酸盐形式的弱碱性树脂上进行的离子交换;在非衍生化的聚苯乙烯/二乙烯苯共聚物(例如,Amberlite®XAD)上进行的疏水性吸附色谱法;硅胶上进行的吸附色谱法;例如在羧甲基纤维素上进行的离子交换色谱法;例如在Sephadex®G-25上进行的分配色谱法;逆流分配色谱法;或高效液相色谱法(HPLC),例如在辛基或十八烷基硅烷键合硅胶(ODS)相上进行的反相HPLC。

[0158] B. 重组产生

[0159] 描述人和小鼠IL-10的制备的方法可见于例如美国专利号5,231,012,所述专利教导了用于产生具有IL-10活性的蛋白质的方法,包括重组技术和其他合成技术。IL-10可以是病毒来源的,并且Moore等人,(1990)Science 248:1230中公开了来自埃-巴二氏病毒(BCRF1蛋白)的病毒性IL-10的克隆和表达。IL-10可以使用本领域已知的标准技术诸如本文描述的那些以多种方式来获得。重组人IL-10还可商购自例如PeproTech, Inc., Rocky Hill, N.J.

[0160] 在多肽使用重组技术产生的情况下,多肽可以使用任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞分别产生作为细胞内蛋白或作为分泌性蛋白,所述构建体和宿主细胞可以是原核生物或真核生物细胞诸如细菌(例如,大肠杆菌)或酵母宿主细胞。可以用作宿主细胞的真核细胞的其他实例包括昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。在使用哺乳动物宿主细胞的情况下,它们可以包括人细胞(例如,HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(例如,NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类动物细胞(例如,Cos 1、Cos 7和CV1);以及仓鼠细胞(例

如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。

[0161] 适合于表达多肽的各种宿主-载体系统可以根据本领域已知的标准程序来采用。参见,例如,Sambrook等人,1989Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press,New York;以及Ausubel等人,1995Current Protocols in Molecular Biology,Wiley and Sons编著。用于将遗传物质引入到宿主细胞中的方法包括例如转化、电穿孔、缀合、磷酸钙法等等。可以选择转移方法以便于提供对引入的多肽编码核酸的稳定表达。多肽编码核酸可以提供为可遗传的游离元件(例如,质粒)或可以是基因组整合的。用于产生相关多肽的各种适当的载体是可商购的。

[0162] 载体可以在宿主细胞中提供染色体外维持或可以提供用于整合到宿主细胞基因组中。表达载体提供转录和翻译调控序列,并且可以提供用于诱导型或组成型表达,其中在转录起始区的转录控制下可操作地连接有编码区、以及转录和翻译终止区。一般而言,转录和翻译调控序列可以包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列以及增强子或活化因子序列。启动子可以是组成型的或诱导型的,并且可以是强组成型启动子(例如,T7)。

[0163] 表达构建体通常具有位于启动子序列附近的便利的限制性位点以提供用于插入编码相关蛋白质的核酸序列。在表达宿主中工作的可选择标志物可以存在来促进含有载体的细胞的选择。此外,表达构建体可以包括附加元件。例如,表达载体可以具有一个或两个复制系统,从而允许所述表达载体能够维持在多种生物体中,例如维持在哺乳动物或昆虫细胞中以用于表达并且维持在原核宿主中以用于克隆和扩增。此外,表达构建体可以含有可选择标志物基因以允许选择转化的宿主细胞。可选择基因是本领域熟知的,并且将随着所使用的宿主细胞而变化。

[0164] 蛋白质的分离和纯化是根据本领域已知的方法来完成。例如,蛋白质可以从细胞裂解物分离,所述细胞经遗传修饰来组成型地和/或在诱导之后表达蛋白质;或通过免疫亲和纯化从合成反应混合物分离,这通常涉及使样品与抗蛋白抗体接触,洗涤以去除非特异性结合的物质并且将特异性结合的蛋白质洗脱出来。分离的蛋白质可以进一步通过透析和蛋白质纯化中正常采用的其他方法来纯化。在一个实施方案中,蛋白质可以使用金属螯合色谱方法来分离。蛋白质可以含有多个修饰以促进分离。

[0165] 多肽可以基本上纯的或分离(例如,不含其他多肽)的形式制备。多肽可以存在于相对于可能存在的其他组分(例如,其他多肽或其他宿主细胞组分)而言富集所述多肽的组合物中。例如,纯化的多肽可以被提供,以使得所述多肽存在于基本上不含其他表达的蛋白质,例如,小于约90%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%或小于约1%的组合物中。

[0166] IL-10多肽可以使用重组技术以操纵本领域已知的不同IL-10相关核酸,以提供能够编码IL-10多肽的构建体来产生。将了解,在提供具体氨基酸序列时,普通技术人员鉴于其在例如分子生物学方面的背景和经验将认识到编码这种氨基酸序列的各种不同的核酸分子。

[0167] 酰胺键取代

[0168] 在一些情况下,IL-10除肽键之外还包括一个或多个键,例如,至少两个邻近氨基酸通过除酰胺键之外的键连接。例如,为了减少或消除不需要的蛋白水解或其他降解方式,

和/或为了提高血清稳定性,和/或为了限制或提高构象柔性,可以取代IL-10的主链内的一个或多个酰胺键。

[0169] 在另一个实例中,IL-10内的一个或多个酰胺键(-CO-NH-)可以由为酰胺键的电子等排体的键置换,所述键诸如-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH-(顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-或-CH₂SO-。IL-10内的一个或多个酰胺键还可以由例如还原型电子等排体假肽键置换。参见Couder等人,(1993)Int.J.Peptide Protein Res.41:181-184。这类置换和影响所述置换的方式是本领域的普通技术人员已知的。

[0170] 氨基酸取代

[0171] 在IL-10多肽中可以进行一次或多次氨基酸取代。以下是非限制性实例:

[0172] a)烷基取代的疏水性氨基酸的取代,所述烷基取代的疏水性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸、(S)-2-氨基丁酸、(S)-环己基丙氨酸或由来自C₁-C₁₀碳的脂族侧链取代的其他简单的 α -氨基酸,所述取代包括支链、环状和直链烷基、烯基或炔基取代;

[0173] b)芳族取代的疏水性氨基酸的取代,所述芳族取代的疏水性氨基酸包括苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、磺基酪氨酸、联苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-苯并噻吩基丙氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、组氨酸,包括上文所列的芳族氨基酸的氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤化(氟代、氯代、溴代或碘代)或者烷氧基(来自C₁-C₄)-取代形式,所述取代形式的说明性实例是:2-、3-或4-氨基苯丙氨酸;2-、3-或4-氯苯丙氨酸;2-、3-或4-甲基苯丙氨酸;2-、3-或4-甲氧苯丙氨酸;5-氨基-、5-氯-、5-甲基-或5-甲氧基色氨酸;2'-、3'-或4'-氨基-、2'-、3'-或4'-氯-、2,3或4-联苯丙氨酸;2'-、3'-或4'-甲基-、2-、3-或4-联苯丙氨酸以及2-或3-吡啶基丙氨酸;

[0174] c)含有碱性侧链的氨基酸的取代,所述含有碱性侧链的氨基酸包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、2,3-二氨基丙酸、高精氨酸,包括前述氨基酸的烷基、烯基、或芳基取代的(来自C₁-C₁₀支链、支链或环状)的衍生物,而不管取代基是在杂原子(诸如 α 氮,或者一个或多个末端氮)上还是在 α 碳上,例如位于前R位置。用作说明性实例的化合物包括:N- ϵ -异丙基-赖氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-甘氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-丙氨酸、N,N- γ , γ' -二乙基-高精氨酸。还包括化合物诸如 α -甲基-精氨酸、 α -甲基-2,3-二氨基丙酸、 α -甲基-组氨酸、 α -甲基-鸟氨酸,其中烷基位于 α 碳的前R位置。也包括由烷基、芳族、杂芳族(其中杂芳族基团单独地或组合地具有一个或多个氮、氧或硫原子)、羧酸或者许多熟知的活化衍生物诸如酰基氯、活性酯、活性氮杂内酯和相关衍生物中任一个形成的酰胺,以及赖氨酸、鸟氨酸或2,3-二氨基丙酸;

[0175] d)酸性氨基酸的取代,所述酸性氨基酸包括天冬氨酸,谷氨酸,高谷氨酸,酪氨酸,2,4-二氨基丙酸的烷基、芳基、芳烷基和杂芳基磺酰胺,鸟氨酸或赖氨酸以及四唑-取代的烷基氨基酸;

[0176] e)侧链酰胺残基的取代,所述侧链酰胺残基包括天冬酰胺、谷氨酰胺以及天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳族取代的衍生物;以及

[0177] f)含有羟基的氨基酸的取代,包括丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、2,3-二氨基丙酸以及丝氨酸或苏氨酸的烷基或芳族取代的衍生物。

[0178] 在一些情况下,IL-10包含一种或多种天然存在的非遗传编码的L-氨基酸、合成L-

氨基酸、或氨基酸的D-对映异构体。例如,IL-10可以仅包含D-氨基酸。例如,IL-10多肽可以包含以下残基中的一种或多种:羟脯氨酸、 β -丙氨酸、*o*-氨基苯甲酸、间胺苯甲酸、对-氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、2,3-二氨基丙酸、 α -氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸(肌氨酸)、鸟氨酸、瓜氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、茶基丙氨酸、吡啶基丙氨酸、3-苯并噻吩基丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉胺、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、 β -2-噻吩基丙氨酸、蛋氨酸亚砷、高精氨酸、N-乙酰基赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、*p*-氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、 ϵ -氨基己酸、 ω -氨基己酸、 ω -氨基庚酸、 ω -氨基辛酸、 ω -氨基癸酸、 ω -氨基十四烷酸、环己基丙氨酸、 α, γ -二氨基丁酸、 α, β -二氨基丙酸、 δ -氨基缬草酸以及2,3-二氨基丁酸。

[0179] 另外的修饰

[0180] 半胱氨酸残基或半胱氨酸类似物可以引入到IL-10多肽中可以通过二硫键提供到另一种肽的键联,或提供用于IL-10多肽的环化。引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物的方法是本领域已知的;参见,例如,美国专利号8,067,532。

[0181] IL-10多肽可以被环化。一种或多种半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以引入到IL-10多肽中,其中所引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以与第二引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物形成二硫键。环化的其他手段包括引入肟接头或羊毛硫胺酸接头;参见,例如,美国专利号8,044,175。可以使用和/或引入可以形成环化键的氨基酸(或非氨基酸部分)的任何组合。环化键可以利用氨基酸(或氨基酸和 $-(CH_2)_n-CO-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$)与允许引入桥的官能团的任何组合产生。一些实例是二硫化物、二硫化物模拟物,诸如 $-(CH_2)_n$ -碳桥、硫缩醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫胺酸)以及含酯和醚的桥。在这些实例中, n 可以是任何整数;但往往小于10。

[0182] 其他修饰包括例如N-烷基(或芳基)取代($\psi[CONR]$),或用于构建内酰胺和其他环状结构的主链交联。其他衍生物包括C端羟甲基衍生物、*o*修饰的衍生物(例如,C端羟甲基二苯醚)、N端修饰的衍生物,包括取代的酰胺,诸如烷基酰胺和酰肼。

[0183] 在一些情况下,IL-10多肽内的一个或多个L-氨基酸由一个或多个D-氨基酸置换。

[0184] 在一些情况下,IL-10多肽是逆向反转类似物(参见,例如,Sela and Zisman (1997)FASEB J.11:449)。逆向反转肽类似物是线性多肽的异构体,其中氨基酸序列的方向被逆转(retro),并且其中一个或多个氨基酸的手性D-或L-被反转(inverso),例如,使用D-氨基酸而不是L-氨基酸。[参见,例如,Jameson等人,(1994)Nature 368:744;以及Brady等人,(1994)Nature 368:692]。

[0185] IL-10多肽可以包括“蛋白质转导结构域”(PTD),其意指促进横穿脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜的多肽、多核苷酸、碳水化合物或者有机分子或无机分子。附接到另一个分子的PTD促进分子横穿膜,例如从细胞外空隙进入细胞内空隙或细胞溶质进入细胞器内。在一些实施方案中,PTD共价地连接到IL-10多肽的氨基端,而在其他实施方案中,PTD共价地连接到IL-10多肽的羧基端。示例性蛋白质转导结构域包括但不限于最小的十一肽蛋白质转导结构域(对应于包含YGRKKRRQRRR;SEQ ID NO:1的HIV-1TAT的第47-57位残基);包含足以进入到细胞中的多个精氨酸残基(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸)的聚精氨酸序列;VP22结构域(Zender等人,(2002)Cancer Gene Ther.9(6):489-96);

果蝇触角蛋白质转导结构域(Noguchi等人,(2003)Diabetes 52(7):1732-1737);截短型人降钙素肽(Trehin等人,(2004)Pharm.Research 21:1248-1256);聚赖氨酸(Wender等人,(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR(SEQ ID NO:2);运输蛋白GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:3);KALAEAKLAKALAKHLAKALAKLCEA(SEQ ID NO:4);以及RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:5)。示例性PTD包括但不限于YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)、RKKRRQRRR(SEQ ID NO:6);具有3个精氨酸残基至50个精氨酸残基的精氨酸均聚物;示例性PTD结构域氨基酸序列包括但不限于以下的任何序列:YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1);RKKRRQRR(SEQ ID NO:7);YARAAARQARA(SEQ ID NO:8);THRLPRRRRRR(SEQ ID NO:9);以及GGRRARRRRRR(SEQ ID NO:10)。

[0186] IL-10多肽的C末端处的氨基酸的羧基COR₃可以游离形式(R₃=OH)存在,或者以生理上可耐受的碱金属盐或碱土金属盐,例如像钠盐、钾盐或钙盐的形式存在。羧基还可以利用伯、仲或叔醇,例如像甲醇、支链或非支链的C₁-C₆烷基醇,例如乙醇或叔丁醇来酯化。羧基也可以利用伯或仲胺,诸如氨水、支链或非支链的C₁-C₆烷基胺或C₁-C₆二烷基胺,例如甲胺或二甲胺来酰胺化。

[0187] IL-10多肽的N端处的氨基酸NR₁R₂的氨基可以游离形式(R₁=H和R₂=H)存在,或者以生理上可耐受的盐例如像氯化物或乙酸盐的形式存在。氨基也可以用酸来乙酰化,以使得R₁=H并且R₂=乙酰基、三氟乙酰基或金刚烷基。氨基可以存在于受肽化学中常规使用的氨基保护基团保护的形式中,诸如上文提供的那些(例如,Fmoc、苯氧基羰基(Z)、Boc以及Alloc)。氨基可以是N-烷基化的,其中R₁和/或R₂=C₁-C₆烷基或C₂-C₈烯基或C₇-C₉芳烷基。烷基残基可以是直链的、支链的或环状的(例如,分别为乙基、异丙基和环己基)。

[0188] 用于增强和/或模拟IL-10功能的特定修饰

[0189] 往往有益且有时必要的是改进本文公开的治疗模态(例如,IL-10)的一个或多个物理特性和/或其施用方式。物理特性的改进包括例如调节免疫原性;增加水溶性、生物利用率、血清半衰期和/或治疗半衰期的方法;和/或调节生物活性。某些修饰还可以用于例如激发抗体以用于检测测定(例如,表位标签)中并且为蛋白质纯化提供便利。这类改进通常必须在不会不利地影响治疗模态的生物活性和/或提高其免疫原性的情况下赋予。

[0190] IL-10的聚乙二醇化是本公开涵盖的一种具体修饰,而其他修饰包括但不限于糖基化(N-和O-连接);多唾液酸化;包含血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白或牛血清白蛋白(BSA))的白蛋白融合分子;通过例如缀合脂肪酸链结合(酰化)的白蛋白;以及Fc-融合蛋白。

[0191] 聚乙二醇化:蛋白质治疗剂的临床效果经常受到短的血浆半衰期和对蛋白酶降解易感性的限制。各种治疗性蛋白质(例如,非格司亭)的研究已显示,这类难题可以通过各种修饰来克服,包括将多肽序列缀合或连接到各种非蛋白质聚合物,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚亚氧烷的任一种。这往往通过共价地结合到蛋白质和非蛋白质聚合物例如PEG两者上的连接部分来实现。已显示这类PEG缀合的生物分子具有临床有用的特性,包括更好的物理和热稳定性、对抗对酶降解的易感性的保护、增加的溶解度、更长的体内循环半衰期和降低的清除率、减少的免疫原性和抗原性以及减少的毒性。

[0192] 除了聚乙二醇化对药物代谢动力学参数的有益作用之外,聚乙二醇化自身可以增强活性。例如,已显示PEG-IL-10能比非聚乙二醇化的IL-10更有效地对抗某些癌症(参见,

例如,EP 206636A2)。

[0193] 适合于与多肽序列缀合的PEG在室温下通常可溶于水中,并且具有通式 $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$,其中R是氢或保护基团,诸如烷基或烷醇基,并且其中n是1至1000的整数。当R是保护基团时,它通常具有1至8个碳。缀合到多肽序列的PEG可以是直链的或支链的。本公开涵盖支链PEG衍生物,即“星状PEG”和多臂PEG。本公开中使用的PEG的分子量不限于任何具体范围,并且本文其他地方阐述了实例;通过举例,某些实施方案具有在5kDa与20kDa之间的分子量,而其他实施方案具有在4kDa与10kDa之间的分子量。

[0194] 本公开还涵盖缀合物的组合物,其中PEG具有不同的n值,并且因此各种不同的PEG以特定比率存在。例如,一些组合物包含缀合物的混合物,其中n=1、2、3和4。在一些组合物中,在n=1时,缀合物的百分比是18%-25%;在n=2时,缀合物的百分比是50%-66%;在n=3时,缀合物的百分比是12%-16%;并且在n=4时,缀合物的百分比至多是5%。一些组合物可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法来产生。在整个说明书中描述了示例性反应条件。阳离子交换色谱法可以用于分离缀合物,并且之后鉴别含有例如附接了所需数目的PEG的缀合物的部分,将所述部分纯化使其不含未修饰的蛋白质序列并且不含附接了其他数目的PEG的缀合物。

[0195] 聚乙二醇化最常发生于多肽的N端处的 α 氨基、赖氨酸残基的侧链上的 ϵ -氨基以及组氨酸残基的侧链上的咪唑基处。由于大多数重组多肽具有单个 α 以及多个 ϵ -氨基和咪唑基,众多位置异构体可以根据接头化学性质来产生。本文可以应用本领域已知的一般聚乙二醇化策略。

[0196] 两种广泛使用的第一代活化单甲氧基PEG(mPEG)是琥珀酰亚胺碳酸酯PEG(SC-PEG;参见,例如,Zalipsky等人(1992)Biotechnol. Appl. Biochem 15:100-114;以及Miron和Wilcheck(1993)Bio-conjug. Chem. 4:568-569);以及苯并三唑碳酸酯PEG(BTC-PEG;参见,例如,Dolence等人,美国专利号5,650,234),这两种PEG优先与赖氨酸残基反应以形成氨基甲酸酯键,但也已知与组氨酸和酪氨酸残基反应。已显示与某些分子上(例如,IFN α)的组氨酸残基的键联是水解不稳定的咪唑氨基甲酸酯键联(参见,例如, Lee和McNemar,美国专利号5,985,263)。第二代聚乙二醇化技术已被设计来避免这些不稳定的键联以及残基反应性的选择性的缺乏。PEG-醛接头的使用通过还原氨化靶向多肽的N端上的单位点。

[0197] PEG可以通过末端反应性基团(“间隔基”)结合到本公开的多肽,所述末端反应性基团在多肽序列中的一个或多个的游离氨基或羧基与聚乙二醇之间介导键合。具有间隔基的可以结合到游离氨基的PEG包括N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇,其可以通过利用N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。可以结合到游离氨基酸的另一种活化的聚乙二醇是2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-均三嗪,其可以通过使聚乙二醇单甲醚与氰尿酸氯反应来制备。结合到游离羧基的活化的聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0198] 本公开的多肽序列中的一个或多个与具有间隔基的PEG的缀合可以通过各种常规方法来执行。例如,缀合反应可以在pH为5至10的溶液中、在4℃至室温的温度下利用4:1至30:1的试剂与蛋白质的摩尔比来执行30分钟至20小时。反应条件可以被选择来将反应朝向主要产生所需取代程度引导。一般而言,低温、低pH(例如,pH=5)和短反应时间往往会减少附接的PEG的数目,而高温、中性到高pH(例如,pH $\geq$ 7)和较长反应时间往往会增加附接的PEG的数目。本领域已知的各种手段可以用于终止反应。在一些实施方案中,所述反应通过

将反应混合物酸化并在例如-20℃冷冻来终止。例如在美国专利号5,252,714、5,643,575、5,919,455、5,932,462以及5,985,263中论述了各种分子的聚乙二醇化。例如在美国专利号7,052,686中描述了PEG-IL-10。实验部分中阐述了涵盖用于本文的特定反应条件。

[0199] 本公开还涵盖PEG模拟物的使用。已经开发了保留PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予若干另外的有利特性的重组PEG模拟物。通过举例,可以重组地产生能够形成与PEG类似的延展构象,已融合到相关肽或蛋白质药物的简单的多肽链(包含例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser以及Thr)(例如,Amunix' XTEN技术;Mountain View,CA)。这避免了在生产过程中对另外的缀合步骤的需要。此外,确立的分子生物学技术使得能够控制多肽链的侧链组成,从而允许优化免疫原性和生产特性。

[0200] 糖基化:出于本公开的目的,“糖基化”意图广义意指将聚糖附接到蛋白质、脂质或其他有机分子的酶促过程。结合本公开使用的术语“糖基化”通常意思是指添加或删除一个或多个碳水化合物部分(通过去除潜在的糖基化位点或通过利用化学和/或酶手段消除糖基化),和/或添加在天然序列中可能存在或不存在的一个或多个糖基化位点。此外,所述短语包括天然蛋白质的糖基化中的性质变化,这涉及存在的各种碳水化合物部分在性质和比例上的变化。

[0201] 糖基化可以显著影响多肽诸如IL-10的物理特性(例如,溶解度)并且对于蛋白质稳定性、分泌和亚细胞定位来说可能也很重要。糖基化的多肽还可以展现出增强的稳定性或者可以改进一种或多种药物代谢动力学特性诸如半衰期。此外,溶解度改进可以例如使得能够产生与包含非聚乙二醇化的多肽的制剂相比更适合于药物施用的制剂。

[0202] 糖基化位点的添加可以通过改变氨基酸序列来完成。多肽的改变可以例如通过添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(针对O-连接糖基化位点)或天冬酰胺残基(针对N-连接糖基化位点)来进行。N-连接和O-连接低聚糖以及在各类型中存在的糖残基的结构可以是不同的。在两者中都常见的一种类型的糖是N-乙酰神经氨酸(下文称为唾液酸)。唾液酸通常是N-连接和O-连接低聚糖两者的末端残基,并且凭借其负电荷可以为糖蛋白带来酸性特性。本公开的一个具体实施方案包括N-糖基化变体的产生和使用。

[0203] 本公开的多肽序列可以任选地通过核酸水平的变化,特别是通过使编码多肽的核酸在预先选择的碱基处突变以使得产生将翻译成所需氨基酸的密码子来改变。

[0204] 多唾液酸化:本公开还涵盖多唾液酸化的使用,即多肽缀合到天然存在的、生物可降解的 α -(2→8)连接的唾液酸(“PSA”)以便于改进多肽的稳定性和体内药物代谢动力学。PSA是生无可降解的、无毒的天然聚合物,其是高度亲水的,这赋予其在血液中的增加其血清半衰期的高表观分子量。此外,一系列肽和蛋白质治疗剂的多唾液酸化已导致蛋白水解的显著减少、体内活性的保留以及免疫原性和抗原性的降低(参见,例如,G.Gregoriadis等人,Int.J.Pharmaceutics 300(1-2):125-30)。各种用于位点特异性多唾液酸化的技术是可用的(参见,例如,T.Lindhout等人,PNAS 108(18)7397-7402(2011))。

[0205] 白蛋白融合:另外用于缀合的合适的组分和分子包括白蛋白诸如人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。

[0206] 根据本公开,白蛋白可以在羧基端、氨基端、羧基端和氨基酸两者以及内部缀合到药物分子(例如,本文描述的多肽)(参见,例如,USP 5,876,969和USP 7,056,701)。

[0207] 在本公开所涵盖的HSA-药物分子缀合物中,可以使用各种形式的白蛋白,诸如白

蛋白分泌前序列及其变体、片段及其变体以及HSA变体。这类形式通常具有一种或多种所需的白蛋白活性。在另外的实施方案中,本公开涉及融合蛋白,所述融合蛋白包含直接或间接地融合到白蛋白、白蛋白片段和白蛋白变体等的多肽药物分子,其中融合蛋白具有比非融合的药物分子更高的血浆稳定性和/或融合蛋白保留非融合的药物分子的治疗活性。在一些实施方案中,间接融合通过接头诸如肽接头或其修饰形式来实现。

[0208] 如上所述,白蛋白与本公开的一个或多个多肽的融合可以例如通过进行遗传操纵以使得为HSA或其片段编码的核酸连接到为一个或多个多肽序列编码的核酸来实现。

[0209] 替代的白蛋白结合策略:已开发若干白蛋白-结合策略作为用于引导融合的替代物,并且可以与本文描述的IL-10试剂一起使用。通过举例,本公开涵盖通过缀合脂肪酰链(酰化)以及包含白蛋白结合结构域(ABD)多肽序列和本文描述的一个或多个多肽的序列的融合蛋白进行的白蛋白结合。

[0210] 与其他分子缀合:另外用于缀合的合适的组分和分子包括例如甲状球蛋白;破伤风类毒素;白喉类毒素;聚氨基酸诸如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸);轮状病毒的VP6多肽;流感病毒血细胞凝集素、流感病毒核蛋白;钥孔虫凝血蓝蛋白(KLH);以及乙型肝炎病毒核心蛋白和表面抗原;或前述各项的任何组合。

[0211] 因此,本公开涵盖一种或多种另外的组分或分子在多肽序列的N端和/或C端处的缀合,所述组分或分子诸如另一种多肽(例如,具有与本多肽异源的氨基酸序列的多肽)或载体分子。因此,示例性多肽序列可以提供为与另一种组分或分子缀合的缀合物。

[0212] IL-10多肽还可以缀合到大的代谢缓慢的大分子诸如蛋白质;多糖,诸如琼脂糖凝胶、琼脂糖、纤维素或纤维素珠粒;多聚氨基酸,诸如聚谷氨酸或聚赖氨酸;氨基酸共聚物;灭活病毒颗粒;灭活细菌毒素,诸如来自白喉、破伤风、霍乱或白细胞毒素分子的毒素;灭活细菌;以及树突细胞。这类缀合形式(如果需要)可以用于产生针对本公开的多肽的抗体。

[0213] 另外用于缀合的候选组分和分子包括适合于分离或纯化的那些组分和分子。具体的非限制性实例包括结合分子,诸如生物素(生物素-抗生物素蛋白特异性结合对)、抗体、受体、配体、凝集素或包含固体支持物的分子,所述固体支持物包括例如塑料或聚苯乙烯珠粒、板或珠粒、磁珠、试纸条以及膜。

[0214] Fc-融合分子:在某些实施方案中,本公开的多肽序列的氨基端或羧基端可以与免疫球蛋白Fc区(例如,人Fc)融合以形成融合缀合物(或融合分子)。已显示Fc融合缀合物会增加生物药剂的系统半衰期,并且因此生物药剂产品可能要求较低频率的施用。

[0215] Fc结合到覆盖在血管内的内皮细胞中的新生儿Fc受体(FcRn),并且在结合之后,Fc融合分子被保护免于降解和再释放到循环中,从而将分子更长久地保持在循环中。这种Fc结合被认为是内源性IgG保留其长血浆半衰期所用的机制。与传统的Fc-融合缀合物相比较,更为新近的Fc-融合技术将生物药剂的单一拷贝连接到抗体的Fc区以优化生物药剂的药物代谢动力学和药效学特性。

[0216] 其他修饰:本公开涵盖IL-10的用于改进一种或多种特性的当前已知的或将来开发的其他修饰的使用。实例包括羟乙基淀粉化,它的各个方面被描述于例如美国专利申请号2007/0134197和2006/0258607中;以及包含作为融合标签的SUMO的融合分子(LifeSensors, Inc.; Malvern, PA)。

[0217] 接头:上文已描述了接头及其使用。用于修饰本公开的多肽序列的前述组分和分

子中的任一个可以任选地通过接头来缀合。合适的接头包括“柔性接头”，所述柔性接头通常具有足够的强度以允许在修饰的多肽序列与连接的组分和分子之间的一些移动。接头分子通常是约6-50个原子长。接头分子还可以是例如芳基乙炔基、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物、二胺、二酸、氨基酸或其组合。可以容易地选择合适的接头，并且所述合适的接头可以具有任何合适的长度，诸如1个氨基酸（例如，Gly）、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50或多于50个氨基酸。

[0218] 柔性接头的实例包括甘氨酸聚合物(G_n)，甘氨酸-丝氨酸聚合物（例如， $(GS)_n$ 、 $GSGGS_n$ (SEQ ID NO:11)和 $GGGS_n$ (SEQ ID NO:12)，其中 n 是至少为1的整数)，甘氨酸-丙氨酸聚合物，丙氨酸-丝氨酸聚合物以及其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的，并且因此可以用作组分之间的中性连接(tether)。

[0219] 柔性接头的另外的实例包括甘氨酸聚合物(G_n)，甘氨酸-丙氨酸聚合物，丙氨酸-丝氨酸聚合物，甘氨酸-丝氨酸聚合物（例如， $(G_mS_o)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:13)、 $(G_mS_oG_m)_n$ (SEQ ID NO:14)、 $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ (SEQ ID NO:15)、 $(GSGGS_m)_n$ (SEQ ID NO:16)、 $(GSGS_mG)_n$ (SEQ ID NO:17)和 $(GGGS_m)_n$ (SEQ ID NO:18)以及其组合，其中 m 、 n 和 o 各自独立地选自至少1至20，例如1-18、2-16、3-14、4-12、5-10、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10的整数)以及其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的，并且因此可以用作组分之间的中性连接。柔性接头的实例包括但不限于 $GSGG$ (SEQ ID NO:19)、 $GGSGG$ (SEQ ID NO:20)、 $GSGSG$ (SEQ ID NO:21)、 $GSGGG$ (SEQ ID NO:22)、 $GGGSG$ (SEQ ID NO:23)以及 $GSSSG$ (SEQ ID NO:24)。

[0220] 另外的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G_n)或甘氨酸-丝氨酸聚合物（例如， $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:25)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:26)以及 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:27)，其中 $n=1$ 至50，例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50。示例性柔性接头包括但不限于 $GGGS$ (SEQ ID NO:28)、 $GGGGS$ (SEQ ID NO:29)、 $GSGG$ (SEQ ID NO:19)、 $GGSGG$ (SEQ ID NO:20)、 $GSGSG$ (SEQ ID NO:21)、 $GSGGG$ (SEQ ID NO:22)、 $GGGSG$ (SEQ ID NO:23)以及 $GSSSG$ (SEQ ID NO:24)。这些接头序列的多聚体（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30或30-50）可以连接在一起提供可以用于将异源氨基酸序列缀合到本文公开的多肽的柔性接头。如本文所述，异源氨基酸序列可以是信号序列和/或融合配偶体，诸如白蛋白、Fc序列等等。

[0221] 治疗性和预防性使用

[0222] 在具体实施方案中，本公开涵盖本文描述的IL-10试剂（例如，PEG-IL-10）和免疫检查点抑制剂的组合在治疗和/或预防与癌症相关联的疾病、病症或病状，肿瘤或癌前疾病、病症或病状中的用途。在不以任何方式限制本公开的情况下，涵盖以下实施方案：IL-10试剂（和本文描述的免疫检查点抑制剂中的一些）例如通过调节调控T细胞和/或CD8+T细胞的活性来降低对肿瘤细胞或癌症细胞抗原的耐受性（参见，例如，Ramirez-Montagut等人，(2003)Oncogene 22:3180-87；以及Sawaya等人，(2003)New Engl.J.Med.349:1501-09）。

[0223] 短语“癌症相关疾病、病症和病状”以及类似术语和短语意图广义意指与癌症直接或间接相关联的病状，并且包括例如血管生成和癌前病状诸如发育异常。虽然下文详细描述了具体使用，但应理解本公开并不限于此。

[0224] 根据本公开，IL-10试剂和免疫检查点抑制剂的组合可以用于治疗或预防增殖性病状或病症，包括癌症，例如子宫、子宫颈、乳腺、前列腺、睾丸、胃肠道（例如，食道、口咽、胃、小肠或大肠、结肠或直肠）、肾、肾细胞、膀胱、骨、骨髓、皮肤、头或颈、肝、胆囊、心脏、肺、

胰腺、唾液腺、肾上腺、甲状腺、脑(例如,神经胶质瘤)、神经节、中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)的癌症;以及造血系统和免疫系统(例如,脾或胸腺)的癌症。本公开还提供治疗或预防其他癌症相关疾病、病症或病状的方法,包括例如,免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠肿瘤、病毒诱导的癌症(例如,上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌和乳头瘤病毒)、腺癌、淋巴瘤、恶性肿瘤、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、畸胎瘤、化学诱导的癌症、转移以及血管生成。在具体实施方案中,肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、成神经胶质细胞瘤或白血病。

[0225] 本公开的另外的具体实施方案涉及造血细胞的肿瘤性(癌症相关)疾病、病症和病状。这类疾病、病症和病状可以归入以下两个宽泛类别之一中-骨髓瘤和淋巴瘤。每个类别含有不同类型的具有定义的形态学、病理学、治疗和/或预后特征的造血细胞癌。正确的分类连同可能影响预后或对化疗的反应的另外的因子的鉴别对于实现最佳治疗而言是必要的。

[0226] 骨髓瘤包括但不限于骨髓增殖瘤、嗜酸粒细胞增多的骨髓细胞和淋巴细胞病症、骨髓增殖/骨髓增殖异常瘤、骨髓增殖异常综合征、急性髓细胞性白血病和相关前体瘤以及谱系未定的急性白血病。淋巴瘤包括但不限于前体淋巴瘤、成熟B细胞瘤、成熟T细胞瘤、何杰金氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma)以及免疫缺陷相关联的淋巴组织增殖性病症。

[0227] 造血系统的其他癌症包括但不限于组织细胞和树突细胞瘤。

[0228] 在一些实施方案中,本公开提供用于用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)、免疫检查点抑制剂以及至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗癌症、肿瘤、癌前病状或增殖性病状的方法,本文其他地方阐述了所述至少一种另外的治疗剂或诊断剂的实例。

[0229] 药物组合物

[0230] 本公开的IL-10试剂和免疫检查点抑制剂可以是呈适合于向受试者施用的组合物的形式。一般而言,这类组合物是包含IL-10和/或免疫检查点抑制剂以及一种或多种药学上可接受的或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的“药物组合物”。在某些实施方案中,IL-10试剂和免疫检查点抑制剂各自以治疗上可接受的量存在。药物组合物可以用于本公开的方法中;因此,例如,药物组合物可以向受试者离体或体内施用以便于实践本文描述的治疗性和预防性方法以及用途。

[0231] 在药物组合物及其方面接下来的描述中,药物组合物通常在IL-10试剂的背景下描述。然而,应理解,无论是在包含IL-10试剂和免疫检查点抑制剂的组合的药物组合物中,还是在包含仅一种组分的药物组合物中(或者在免疫检查点抑制剂的情况下,药物组合物包含这类抑制剂中的两种或更多种),所述描述也适用于本公开的免疫检查点抑制剂。

[0232] 本公开的药物组合物可以被配制与目标施用方法或途径相容;本文阐述了示例性施用途径。另外,药物组合物可以与如本文所述的其他治疗活性剂或化合物组合使用,以便于治疗或预防如本公开所涵盖的疾病、病症和病状。

[0233] 药物组合物典型地包含治疗有效量的本公开所涵盖的IL-10多肽以及一种或多种药学上和生理上可接受的制剂。合适的药学上可接受的或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于抗氧化剂(例如,抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如,苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯)、乳化剂、助悬剂、分散剂、溶剂、填料、膨化剂、洗涤剂、缓冲液、媒介物、稀释剂和/或佐剂。例如,合适的媒介物可以是生理盐水溶液或柠檬

酸盐缓冲盐水,可能补充有在用于肠胃外施用的药物组合物中常用的其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是另外的示例性媒介物。本领域技术人员将容易识别可以用于本文涵盖的药物组合物和剂型中的各种缓冲液。典型的缓冲液包括但不限于药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。作为一个实例,缓冲液组分可以是水溶性材料,诸如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、醋酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸以及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)以及N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)。

[0234] 在配制好药物组合物之后,所述药物组合物可以作为溶液、混悬液、凝胶、乳液、固体或者脱水或冻干粉末保存在无菌小瓶中。这类制剂可以按照可立即使用的形式、在使用前要求重构的冻干形式、在使用前要求稀释的液体形式或其他可接受的形式来保存。在一些实施方案中,药物组合物提供在一次性容器(例如,一次性小瓶、安剂、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen®))中,而多次使用性容器(例如,多次使用性小瓶)提供在其他实施方案中。任何药物递送装置可以用于递送IL-10,所述药物递送装置包括植入物(例如,可植入泵)和导管系统、缓慢注射泵以及装置,所有这些对于技术人员而言都是熟知的。通常皮下或肌肉内施用的长效注射剂也可以用于在限定时间段内释放本文公开的多肽。长效注射剂通常是固体基的或油基的,并且通常包含本文阐述的制剂组分中的至少一种。本领域的普通技术人员熟悉长效注射剂的可能的制剂和用途。

[0235] 药物组合物可以是呈无菌可注射水性或油性混悬液形式。可以根据已知的技术使用本文提及的那些合适的分散剂或湿润剂以及助悬剂来配制这种混悬液。无菌可注射制剂也可能是溶于无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,例如,作为溶于1,3-丁二醇的溶液。可以采用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水,林格氏溶液,等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™(BASF, Parsippany, NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS),乙醇,多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)以及其合适的混合物。此外,无菌、不挥发性油通常用作溶剂或混悬介质。出于这个目的,可以采用任何温和和不挥发性油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。另外,脂肪酸诸如油酸发现可用于可注射制剂中。特定可注射制剂的延缓吸收可以通过包括延缓吸收的试剂(例如,单硬脂酸铝或明胶)来实现。

[0236] 含有活性成分的药物组合物可以是呈适合于口服使用的形式,例如呈片剂、胶囊、糖锭、锭剂、水性或油性混悬液、可分散粉剂或颗粒剂、乳剂、硬质或软质胶囊或糖浆、溶液、微珠粒或酞剂形式。在具体实施方案中,与本文描述的IL-10试剂共同施用的试剂的活性成分呈适合于口服施用的形式。意图用于口服使用的药物组合物可以根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法来制备,并且这类组合物可以含有一种或多种试剂,例如像增甜剂、调味剂、着色剂以及防腐剂,以便于提供药学上优良且可口的制剂。片剂、胶囊等等含有与药学上可接受的无毒赋形剂混合的活性成分,所述赋形剂适于片剂的制造。这些赋形剂可以是例如稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;成粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或海藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶或阿拉伯胶;以及润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0237] 适合于口服施用的片剂、胶囊等等可以是不包衣的,或通过已知技术包衣以延缓在胃肠道中的崩解和吸收并且由此提供持续作用。例如,可以采用延时材料,诸如单硬脂酸

甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们也可以通过本领域已知的技术来包衣以形成控制释放的渗透性治疗片剂。另外的试剂包括生物可降解或生物相容的颗粒或聚合物,诸如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚酸酐、聚乙醇酸、乙烯乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白、或丙交酯/乙交酯共聚物、聚交酯/乙交酯共聚物、或乙烯乙酸乙烯酯共聚物,以便于控制施用组合物的递送。例如,口服试剂可以包封于通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊中(通过分别使用羟甲基纤维素或明胶-微胶囊、或聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),或包封于胶体药物递送系统中。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球体、微珠粒以及基于脂质的系统,包括水包油乳剂、胶束、混合的胶束以及脂质体。用于制备上述制剂的方法对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0238] 用于口服使用的制剂也可以作为硬明胶胶囊存在,其中活性成分与惰性固体稀释剂(例如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素)混合;或作为软明胶胶囊存在,其中活性成分与水或油性介质(例如花生油、液体石蜡或橄榄油)混合。

[0239] 水性混悬液含有与适于制造水性混悬液的赋形剂混合的活性材料。这类赋形剂可以是助悬剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶以及阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂,例如天然存在的磷脂(例如,卵磷脂),或环氧乙烷与脂肪酸的缩合产物(例如,聚氧乙烯硬脂酸酯),或环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物(例如十七元环氧乙基十六醇),或环氧乙烷与源于脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯),或环氧乙烷与源于脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,聚乙烯山梨聚糖单油酸酯)。水性混悬液还可以含有一种或多种防腐剂。

[0240] 油性混悬液可以通过使活性成分混悬于植物油(例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油)或矿物油(诸如液体石蜡)中来配制。油性混悬液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或十六醇。可以添加增甜剂(诸如以上列出的那些)和调味剂以提供可口的口服制剂。

[0241] 适合于通过添加水来制备水性混悬液的可分散粉剂和颗粒剂提供了与分散剂或润湿剂、混悬剂以及一种或多种防腐剂混合的活性成分。本文中举例说明了合适的分散剂或润湿剂和助悬剂。

[0242] 本公开的药物组合物也可以是呈水包油乳剂的形式。油相可以是植物油(例如,橄榄油或花生油)或矿物油(例如,液体石蜡)或这些的混合物。合适的乳化剂可以是例如,天然存在的树胶,例如阿拉伯树胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂以及源于脂肪酸;己糖醇酐的酯或偏酯(例如,脱水山梨糖醇单油酸酯);以及偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如,聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0243] 制剂还可以包括用于保护组合物免于从身体中快速降解或消除的载体,诸如缓释剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药以及微囊化的递送系统。例如,可以单独使用延时材料诸如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯或将其同蜡组合使用。

[0244] 本公开涵盖呈栓剂形式的用于直肠施用的IL-10多肽的施用。栓剂可以通过将药物与合适的无刺激赋形剂混合来制备,所述无刺激赋形剂在常温下为固体但是在直肠温度下为液体,并且因此将在直肠中熔融以释放药物。这类材料包括但不限于可可脂和聚乙二醇。

[0245] 本公开所涵盖的IL-10多肽可以是呈当前已知的或将来开发的任何其他合适的药物组合物(例如,鼻用或吸入使用的喷雾)的形式。

[0246] 多肽或其片段在制剂中的浓度可以广泛地变化(例如,按重量计小于约0.1%(通常为或至少约2%)至多达20%至50%或更多),并且根据例如所选择的特定施用模式,通常将主要基于液体体积、粘度和基于受试者的因素而进行选择。

[0247] 施用途径

[0248] 本公开涵盖IL-10及其组合物按照任何适当的方式的施用。合适的施用途径包括肠胃外(例如,肌内、静脉内、皮下(例如,注射或植入)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(软组织内)和脑室内)、口服、鼻内、经阴道、舌下、眼内、直肠内、局部(例如,经皮肤)、舌下以及吸入。通常皮下或肌内施用的长效注射剂也可以用于在限定时间段内释放本文公开的IL-10多肽。

[0249] 本公开的具体实施方案涵盖肠胃外施用,并且在另外的具体实施方案中,肠胃外施用是皮下的。

[0250] 补充联合治疗

[0251] 本公开涵盖IL-10(例如,PEG-IL-10)和免疫检查点抑制剂的组合进一步组合一种或多种活性治疗剂或其他预防性或治疗性模态(例如,放射)的使用。出于本申请的目的,这类另外的组合可以被称为“补充组合”、“补充联合治疗”等等,并且添加到IL-10和免疫检查点抑制剂的组合的试剂可以被称为“补充剂”等等。在这类补充联合治疗中,各种补充活性剂往往具有与IL-10和/或免疫检查点抑制剂不同的作用机制。这种补充联合治疗通过使一种或多种试剂的剂量减少,从而减少或消除与一种或多种试剂相关联的副作用而可能是特别有利的;另外,这种补充联合治疗可以对潜在疾病、病症或病状具有协同治疗性或预防性作用。在本公开的一些实施方案中,补充剂是诊断剂。

[0252] 在具体实施方案中,本公开提供用于利用本文描述的IL-10多肽(例如,PEG-IL-10)和免疫检查点抑制剂以及至少一种另外的治疗剂或诊断剂(即,补充剂)治疗和/或预防与癌症相关联的疾病、病症或病状的方法。在本公开的实施方案中,疾病、病症和病状可以是癌症、肿瘤或癌前疾病、病症或病状。虽然这个部分的焦点集中于与癌症相关联的疾病、病症或病状的治疗和/或预防,但本公开涵盖本文描述的补充联合治疗与可用于治疗和/或预防任何非癌症相关疾病、病症或病状的试剂的进一步增强。

[0253] 在本公开的一些实施方案中,IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)、免疫检查点抑制剂和补充剂中的每一种可以呈单独的剂型。通过举例,PEG-IL-10可以呈适合于SC施用的制剂形式,免疫检查点抑制剂可以呈适合于IV施用的制剂形式,并且补充剂可以呈适合于口服施用的制剂形式;在此背景下,所述试剂中的每一种可以单独容纳或所述试剂中的两种或更多种可以容纳在一起(例如,作为试剂盒的不同组分)。在本公开的其他实施方案中,IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)、免疫检查点抑制剂和补充剂中的两种或更多种是呈相同剂型。例如,PEG-IL-10、免疫检查点抑制剂和补充剂可以被配制用于IV施用;在此背景下,所述试剂中的一种或多种可以是共同配制的(例如,作为注射器中的活性治疗剂)。

[0254] 在某些实施方案中,相继施用或施加IL-10试剂、免疫检查点抑制剂和补充剂(例如,化学治疗剂),例如,其中首先施用IL-10试剂,其次施用免疫检查点抑制剂,并且最后施用补充剂。在其他实施方案中,同时施用IL-10试剂、免疫检查点抑制剂和补充剂,例如,其中同时施用所述试剂中的两种,并且在此之前或之后施用第三种试剂。不管IL-10试剂、免疫检查点抑制剂和补充剂是相继、同时施用或以其某一变化形式施用,它们出于本公开的

目的都被认为是作为补充联合治疗施用。

[0255] 本公开涵盖在这些情况下可能是可接受的、适当的或最佳的补充联合治疗的任何可能的给药方案的使用。以下描述的方案是示例性的而非排他性的。在一个实施方案中,在一个时间段内维持利用IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)、免疫检查点抑制剂和补充剂进行的治疗。在另一个实施方案中,在一个时间段内(例如,在受试者稳定的时候)减少或继续利用IL-10试剂、免疫检查点抑制剂和补充剂进行的治疗。在另一个实施方案中,在恒定给药方案下,减少或停止(例如,在受试者稳定的时候)利用补充剂进行的治疗,同时维持利用IL-10试剂和免疫检查点抑制剂进行的治疗。在另外的实施方案中,在恒定给药方案下,减少或停止(例如,在受试者稳定的时候)利用补充剂进行的治疗,减少利用IL-10试剂进行的治疗(例如,更低剂量、更低频率给药或更短治疗方案),并且维持利用免疫检查点抑制剂进行的治疗。在另外的实施方案中,在恒定给药方案下,减少或停止(例如,在受试者稳定的时候)利用补充剂进行的治疗,减少利用IL-10试剂进行的治疗(例如,更低剂量、更低频率给药或更短治疗方案),并且维持利用免疫检查点抑制剂进行的治疗。

[0256] 在又一个实施方案中,在恒定给药方案下维持利用补充剂和IL-10试剂进行的治疗,同时减少或停止(例如,在受试者稳定的时候)利用免疫检查点抑制剂进行的治疗。在另外的实施方案中,在恒定给药方案下维持利用补充剂和免疫检查点抑制剂进行的治疗,同时减少或停止利用IL-10试剂进行的治疗(例如,更低剂量、更低频率给药或更短治疗方案)。其他给药方案的鉴别和使用对于技术人员而言将是显而易见的。

[0257] 虽然下文将阐述适合于与本文公开的IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)和免疫检查点抑制剂的组合一起使用的特定试剂,但应理解本公开并不限于此。本公开的实施方案涵盖补充剂(例如,化学治疗剂)用于治疗 and/或预防癌症、肿瘤或癌前或癌症相关疾病、病症或病状的用途。

[0258] 化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,诸如噻替哌及环磷酰胺;烷基磺酸酯,诸如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮杂环丙烷,诸如苯柔多巴(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、甲基多巴(meturedopa)及普力多巴(uredopa);乙烯亚胺及甲基三聚氰胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺及三羟甲基三聚氰胺;氮芥,诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酸胺、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸二氯甲基二乙胺氧化物、马法兰、新氮芥(novembichin)、苯芥胆固醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥末;亚硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲菌素(chlorozotocin)、福替目丁(fotemustine)、洛莫司汀、嘧啶亚硝脲(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素、蒽霉素(authramycin)、重氮乙酰丝氨酸、博来霉素(bleomycin)、放线菌素(cactinomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、卡拉比辛(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、更生霉素、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、紫菜霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素

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

[0259] 化学治疗剂还包括调控或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制剂4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛西芬(keoxifene)、奥那司酮(onapristone)及托瑞米芬(toremifene);以及抗雄激素,诸如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、醋酸亮丙瑞林及戈舍瑞林(goserelin);以及上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方案中,联合治疗包括激素或相关激素试剂的施用。

[0260] 可用于治疗或预防本文描述的癌前病状的任何其他试剂作为补充剂涵盖在内,所述补充剂包括但不限于细胞因子或细胞因子拮抗剂诸如IL-12、INF α 或抗表皮生长因子受体,放射治疗,针对另一种肿瘤抗原的单克隆抗体,单克隆抗体和毒素的复合物,T细胞佐剂,骨髓移植或抗原递呈细胞(例如,树突细胞治疗)。本文还提供了疫苗(例如,作为可溶性蛋白或者作为编码蛋白的核酸)。

[0261] 本公开涵盖上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0262] 给药

[0263] 虽然接下来的给药和给药相关话题的描述是在IL-10的背景下呈现,但所述描述在很大程度上也适用于本文公开的联合治疗中使用的免疫检查点抑制剂。与本文描述的免疫检查点抑制剂相关的特定给药参数可以容易地从其他来源确定,诸如出售成品随附的包装说明书。

[0264] 本公开的IL-10试剂(例如,PEG-IL-10)可以一定量向受试者施用,所述量取决于例如施用目标(例如,所需的消退(resolution)程度);施用制剂的受试者的年龄、体重、性别以及健康和身体状况;施用途径;以及疾病、病症、病状或其症状的性质。给药方案还可能考虑与正在施用的试剂相关联的任何副作用的存在、性质和程度。有效剂量的量和给药方案可以从例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)以及技术人员已知的其他方法容易地确定。

[0265] 如在其他地方详细论述,本公开涵盖施用IL-10以实现某一血清谷浓度和/或维持某一平均血清谷浓度。

[0266] 一般而言,给药参数指示剂量的量应小于可能对受试者产生不可挽回的毒性的量(即,最大耐受剂量,“MTD”)并且不小于对受试者产生可测量效果所要求的量。在考虑施用途径和其他因素的情况下,这类量通过例如与ADME相关联的药物代谢动力学和药效学参数来确定。

[0267] 有效剂量(ED)是试剂在服用所述试剂的受试者的某一部位中产生治疗反应或所需效果的剂量或量。试剂的“半数有效剂量”或ED₅₀是试剂在施用所述试剂的50%群体中产生治疗反应或所需效果的剂量或量。虽然ED₅₀通常用作试剂的效果的合理预期的量度,但它不一定是临床医师可能考虑了所有相关因素之后仍认为适当的剂量。因此,在一些情况下,有效量可以是大于计算的ED₅₀;在其他情况下,有效量可以是小于计算的ED₅₀;并且仍然在其他情况下,有效量可以与计算的ED₅₀相同。

[0268] 此外,本公开的IL-10试剂(PEG-IL-10)的有效剂量可以是在以一个或多个剂量向受试者施用时相对于健康受试者产生所需效果的量。例如,对于经历特定病症的受试者而言,有效剂量可以是所述病症的诊断参数、度量、标志物等等提高以下各项的有效剂量:至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或大于90%,其中100%被定义为由正常受试者展现出来的诊断参数、度量、标志物等等。

[0269] 治疗本文描述的疾病、病症或病状所需的PEG-IL-10的量是基于缀合蛋白的IL-10活性,所述IL-10活性可以通过本领域已知的IL-10活性测定来测定。通过举例,在肿瘤背景下,合适的IL-10活性包括例如浸润到肿瘤部位中的CD8⁺T细胞,来自这些浸润细胞的炎性细胞因子诸如IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10和RANK-L的表达以及生物样品中的TNF- α 或IFN- γ 的增加的水平。

[0270] PEG-IL-10的治疗有效量的范围可以是约0.01至约100 μ g蛋白质/kg体重/天、约0.1至20 μ g蛋白质/kg体重/天、约0.5至10 μ g蛋白质/kg体重/天,或约1至4 μ g蛋白质/kg体重/天。在一些实施方案中,PEG-IL-10通过连续输注来施用,以递送约50至800 μ g蛋白质/kg体重/天(例如,约1至16 μ g蛋白质/kg体重/天的PEG-IL-10)。输注速率可以基于例如副作用和血细胞计数的评价来变化。本文其他地方描述了IL-10试剂的其他特定给药参数。

[0271] 对于口服试剂的施用而言,组合物可以含有1.0至1000毫克活性成分,尤其1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0和1000.0毫克活性成分的片剂、胶囊等等形式来提供。

[0272] 在某些实施方案中,所公开的IL-10多肽的剂量包含在“单位剂型”中。短语“单位剂型”意指物理上离散的单位,各单位含有本公开的IL-10多肽单独地或组合一种或多种另外的试剂足以产生所需效果的预定量。将了解,单位剂型的参数将取决于特定试剂和待实现的效果。

[0273] 试剂盒

[0274] 本公开还涵盖包含IL-10及其药物组合物的试剂盒。试剂盒通常是呈如下所述容纳各种组分的物理结构的形式,并且可以例如用于实践上文描述的方法。

[0275] 试剂盒可以包括本文公开的(提供在例如无菌容器中的)一种或多种IL-10试剂(例如,PEG-IL-10),所述IL-10试剂可以是呈适合于向受试者施用的药物组合物的形式。IL-10试剂可以可立即使用的形式或在施用前要求例如重构或稀释的形式提供。在IL-10试剂是呈需要由使用者重构的形式时,试剂盒还可以包括与IL-10试剂一起或分开包装的缓冲液、药学上可接受的赋形剂等等。当联合治疗(例如,IL-10试剂和免疫检查点抑制剂)被涵盖在内时,试剂盒可以单独地含有若干试剂或者它们可以事先组合在试剂盒中。类似地,当补充治疗(例如,IL-10试剂、免疫检查点抑制剂和补充剂)被涵盖在内时,试剂盒可以单独地含有若干试剂或者它们当中的两种或更多种可以事先组合在试剂盒中。本公开的试剂盒可以针对适当地维持其中容纳的组分所需的条件(例如,冷藏或冷冻)而进行设计。

[0276] 试剂盒可以含有标签或包装说明书,包括其中所含组分的鉴别信息及其使用说明(例如,给药参数;活性成分的临床药理学,包括作用机制、药物代谢动力学和药效学;副作用;禁忌证等)。试剂盒中的每一种组分可以封闭在单个容器中,并且所有不同容器可以处于单一包装中。标签或说明书可以包括制造商信息,诸如批号和失效期。标签或包装说明书可以例如整合到容纳组分的物理结构中,单独包含在物理结构中或附于试剂盒的部件(例如,安瓿瓶、注射器或小瓶)。

[0277] 标签或说明书可以另外包括或整合到计算机可读介质,诸如盘(例如,硬盘、卡、存储盘),光盘诸如CD-或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带或电存储介质诸如RAM和ROM或者这些项的组合,诸如磁/光存储介质、FLASH介质或存储器型卡。在一些实施方案中,实际说明书不存在于试剂盒中,但提供用于自远程源头,例如通过因特网网站获得说明书的手段。

[0278] 实验

[0279] 提出以下实施例以便向本领域的普通技术人员提供如何制备和使用本发明的完全公开和说明,并且不意图限制本发明人看待其发明的范围,它们也不意图表示进行了以下实验且所述实验是能够进行的全部实验。应理解,以现在时书写的示例性说明不一定执行,而是可以执行所述说明来产生本文描述的数据等等。虽然已尽力确保就所用数字(例如量、温度等)来说的准确性,但仍应考量一些实验误差和偏差。

[0280] 除非另外指出,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是摄氏度(°C)并且压力是大气压或接近大气压。使用了标准缩写,包括以下各项:bp=碱基对;kb=千碱基;p1=皮升;s或sec=秒;min=分钟;h或hr=小时;aa=氨基酸;kb=千碱基;nt=核苷酸;pg=皮克;ng=纳克;μg=微克;mg=毫克;g=克;kg=千克;d1或dL=分升;μl或μL=微升;ml或

mL=毫升;l或L=升; μ M=微摩尔;mM=毫摩尔;M=摩尔;kDa=千道尔顿;i.m.=肌肉(地);i.p.=腹膜内(地);SC或SQ=皮下(地);QD=每天;BID=每天两次;QW=每周;QM=每月;HPLC=高效液相色谱法;BW=体重;U=单位;ns=无统计学意义;PBS=磷酸盐缓冲盐水;PCR=聚合酶链反应;NHS=N-羟基琥珀酰亚胺;HSA=人血清白蛋白;MSA=小鼠血清白蛋白;DMEM=杜氏改良培养基;GC=基因组拷贝;EDTA=乙二胺四乙酸。

[0281] 材料和方法

[0282] 以下一般材料和方法可以用于实践本公开和/或实施与本公开的各个方面相关联的实验工作。

[0283] 分子生物学中的标准方法被描述于科学文献(参见,例如,Sambrook和Russell(2001)*Molecular Cloning*,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;以及Ausubel等人,(2001)*Current Protocols in Molecular Biology*,第1-4卷,John Wiley and Sons,Inc.New York,N.Y.,其描述了细菌细胞的克隆和DNA诱变(第1卷)、哺乳动物细胞和酵母的克隆(第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达(第3卷)以及生物信息学(第4卷))。

[0284] 所述科学文献描述了用于蛋白质纯化的方法,包括免疫沉淀反应、色谱法、电泳、离心和结晶,以及化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生以及蛋白质的糖基化(参见,例如,Coligan等人,(2000)*Current Protocols in Protein Science*,第1-2卷,John Wiley and Sons,Inc.,NY)。

[0285] 描述了多克隆和单克隆抗体的产生、纯化和片段化(例如,Harlow和Lane(1999)*Using Antibodies*,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY);用于表征配体/受体相互作用的标准技术是可用的(参见,例如,Coligan等人,(2001)*Current Protocols in Immunology*,第4卷,John Wiley,Inc.,NY);包括荧光活化细胞分选法(FACS)的流式血细胞计数术的方法是可用的(参见,例如,Shapiro(2003)*Practical Flow Cytometry*,John Wiley and Sons,Hoboken,NJ);并且适合于修饰包括核酸引物和探针的核酸、多肽以及抗体的例如用作诊断试剂的荧光试剂是可用的(*Molecular Probes* (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich(2003) Catalogue, St. Louis, MO.)。

[0286] 用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能域、糖基化位点以及序列比对的软件包和数据库是可用的(参见,例如GCGWisconsin Package(Accelrys, Inc., San Diego, CA);以及DeCypher™(TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV))。

[0287] 描述了免疫系统组织学的标准方法(参见,例如Louis等人,(2002)*Basic Histology: Text and Atlas*, McGraw-Hill, New York, NY)。免疫细胞(CD4+和CD8+T细胞)的耗竭可以通过抗体介导的消除来实现。例如,可以每周注射250 μ g CD4-或CD8-特异性抗体,并且可以使用FACS和IHC分析来验证细胞消除。

[0288] 各种小鼠和其他动物品系可以与本发明的教导结合使用。例如,免疫活性Balb/C或B细胞-缺陷Balb/C小鼠可以获自The Jackson Lab., Bar Harbor, ME并且根据标准程序来使用(参见,例如,Martin等人,(2001)*Infect. Immun.*, 69(11):7067-73以及Compton等人,(2004)*Comp. Med.* 54(6):681-89)。适合于本公开涵盖的实验工作的其他小鼠品系是技术人员已知的,并且通常可获自The Jackson Lab。

[0289] 血清IL-10浓度水平和暴露水平可以通过本领域中使用的标准方法来确定。例如,血清暴露水平测定可以通过以下方式进行:将来自小鼠断尾的全血(约50 μ l/小鼠)收集到清洁的毛细管中,通过离心分离血清和血液细胞并且通过标准的ELISA试剂盒和技术来测定IL-10暴露水平。

[0290] 用于测定IL-10的修饰形式的生物活性的测定

[0291] 本公开涵盖本领域中已知用于测定本文描述的IL-10分子的生物活性的任何测定和方法的使用。以下描述的测定是代表性的而非排他性的。

[0292] TNF α 抑制测定。U937细胞(来自肺的可获自Sigma-Aldrich(#85011440); St.Louis,MO的淋巴母细胞人细胞系)的PMA刺激使细胞分泌TNF α ,并且随后利用人IL-10治疗这些TNF α 分泌细胞引起TNF α 分泌呈剂量依赖性方式的减少。示例性TNF α 抑制测定可以使用以下方案来进行。在含有10%FBS/FCS和抗生素的RMPI中培养U937细胞之后,将 1×10^5 , 90%的活U937细胞铺在96孔平底板上(可以使用经任何血浆处理的组织培养板(例如, Nunc; ThermoScientific, USA)),在每种条件下一式三份。铺放细胞以提供用于以下条件(全部至少一式三份;对于“单独介质”,将孔的数目加倍,因为一半将用于利用10nM PMA孵育之后的活力):5ng/ml LPS单独;5ng/mL LPS+0.1ng/mL rhIL-10;5ng/mL LPS+1ng/mL rhIL-10;5ng/mL LPS+10ng/mL rhIL-10;5ng/mL LPS+100ng/mL rhIL-10;5ng/mL LPS+1000ng/mL rhIL-10;5ng/mL LPS+0.1ng/mL PEG-rhIL-10;5ng/mL LPS+1ng/mL PEG-rhIL-10;5ng/mL LPS+10ng/mL PEG-rhIL-10;5ng/mL LPS+100ng/mL PEG-rhIL-10;以及5ng/mL LPS+1000ng/mL PEG-rhIL-10。将每个孔在200 μ L的10nMPMA中暴露24小时,在37 $^{\circ}$ C下,在5% CO₂孵育箱中培养,在此时间之后应该附着约90%的细胞。将三个额外的孔再次悬浮,并且计数细胞以评定活力(>90%应该是有活力的)。用3倍新鲜的不含PMA的介质温和但彻底地洗涤,确保细胞仍处于孔中。向每孔添加100 μ L含有rhIL-10或PEG-rhIL-10的适当缩合物的(在体积稀释100%时为2倍)介质,在37 $^{\circ}$ C下在5% CO₂孵育箱中孵育30分钟。向每孔添加100 μ L 10ng/mL LPS储备液以在每个孔中实现最终浓度5ng/mL LPS,并且在37 $^{\circ}$ C下在5% CO₂孵育箱中孵育18-24小时。去除上清液并且根据制造商的使用说明来进行TNF α ELISA。在ELISA中按一式二份对每种调节的上清液进行操作。

[0293] MC/9细胞增殖测定。MC/9细胞(鼠细胞系,特征在于可获自CellSignaling Technology; Danvers, MA的肥大细胞)的IL-10施用引起细胞增殖呈剂量依赖性方式的增加。Thompson-Snipes, L.等人((1991) J. Exp. Med. 173:507-10)描述了标准测定方案,其中MC/9细胞补充有IL3+IL10和IL3+IL4+IL10。供货商(例如, R&D Systems, USA; 以及Cell Signaling Technology, Danvers, MA)将所述测定用作rhIL10的分批释放测定。本领域的普通技术人员将能够修改Thompson-Snipes, L.等人中描述的标准测定方案,以使得细胞仅补充有IL-10。

[0294] CD8 T细胞IFN γ 分泌测定。活化的原代人CD8T细胞在先用PEG-IL-10治疗后用抗CD3抗体治疗时会分泌IFN γ 。以下方案提供了示例性CD8T细胞IFN γ 分泌测定。人原代外周血单核细胞(PBMC)可以根据任何标准方案来分离(参见,例如, Fuss等人, (2009) Current Protocols in Immunology, 第7.1单元, John Wiley, Inc., NY)。在经任何标准组织培养物处理的6孔板(BD; Franklin Lakes, NJ)中,每孔可以用含有以下各项的完全RPMI来培养2.5mL PBMC(细胞密度为1千万个细胞/mL):RPMI(Life Technologies; Carlsbad, CA)、10mM

HEPES(Life Technologies;Carlsbad,CA)、10%胎牛血清(Hyclone Thermo Fisher Scientific;Waltham,MA)以及青霉素/链霉素混合物(Life Technologies;Carlsbad,CA)。可以向孔添加人聚乙二醇化的IL-10至100ng/mL的最终浓度;还可以添加阻断抑制性/检查点受体的功能的最终浓度为10 μ g/mL的抗体,使其与聚乙二醇化的IL-10组合。可以在具有5%CO₂的潮湿的37℃孵育箱中将细胞孵育6-7天。在此孵育之后,可以使用Miltenyi Biotec's MACS细胞分离技术根据制造商的方案(Miltenyi Biotec;Auburn,CA)来分离CD8T细胞。之后可以在任何标准组织培养板中用含有1 μ g/mL抗CD3抗体(Affymetrix eBioscience;San Diego,CA)的完全RPMI将分离的CD8 T细胞培养4小时。在4小时孵育之后,可以收集介质并且使用市售的ELISA试剂盒并根据制造商的方案(Affymetrix eBioscience;San Diego,CA)来测定介质的IFN γ 。

[0295] 肿瘤模型和肿瘤分析。任何本领域公认的肿瘤模型、测定等等可以用于评价本文描述的IL-10分子对各种肿瘤的作用。下文描述的肿瘤模型和肿瘤分析代表可以被利用的那些。按10⁴、10⁵或10⁶个细胞/肿瘤接种皮下或皮内注射同源小鼠肿瘤细胞。可以使用Ep2乳腺癌、CT26结肠癌、PDV6皮肤鳞状细胞癌和4T1乳癌模型(参见,例如,Langowski等人(2006) Nature 442:461-465)。可以使用免疫活性Balb/C或B细胞缺陷Balb/C小鼠。可以向免疫活性小鼠施用PEG 10-mIL-10,同时可以在B细胞缺陷小鼠中进行PEG-hIL-10治疗。在治疗开始之前,允许肿瘤达到100-250mm³的尺寸。在远离肿瘤植入的部位处SC施用IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10或缓冲液对照。典型地每周两次使用电子测径器监测肿瘤生长。在各个端点收获肿瘤组织和淋巴器官以测量多个炎性标志物的mRNA表达并且针对若干炎性细胞标志物进行免疫组织化学。在液氮中急速冷冻组织并且在-80℃下保存所述组织。典型地每周两次使用电子测径器监测原发性肿瘤生长。可以使用公式(宽度²x长度/2)来计算肿瘤体积,其中长度是较长的尺寸。在治疗开始之前,允许肿瘤达到90-250mm³的尺寸。

[0296] 聚乙二醇化的IL-10的产生

[0297] 本公开涵盖通过技术人员已知的任何手段进行的聚乙二醇化的IL-10的合成。下文用于产生单-PEG-IL-10和单-/二-PEG-IL-10的混合物的若干替代合成方案的描述意图仅是说明性的。虽然单-PEG-IL-10和单-/二-PEG-IL-10的混合物两者具有许多相当的特性,但选择性聚乙二醇化的单-和二-PEG-IL-10的混合物能提高最终聚乙二醇化产物的产率(参见,例如,美国专利号7,052,686和美国专利公布号2011/0250163)。除了在适于本公开的实践的PEG(以及其他药物递送技术)的产生和使用中利用其自身的技能,技术人员还熟悉许多PEG相关技术(以及其他药物递送技术)的商业供应商。通过举例,NOF America Corp(Irvine,CA)供应单-官能线性PEG、双官能PEG、多臂PEG、支链PEG、杂官能PEG、分叉PEG以及可释放的PEG;并且Parchem(New Rochelle,NY)是PEG产品和其他特殊原材料的全球分销商。

[0298] 示例性PEG-IL-10合成方案No.1。用10mM磷酸钠pH 7.0、100mM NaCl对IL-10进行透析。使用透析缓冲液将透析的IL-10稀释3.2倍至约0.5至12mg/mL的浓度。在添加接头SC-PEG-12K(Delmar Scientific Laboratories,Maywood,Il.)之前,将1体积pH为9.1的100mM四硼酸钠添加到9体积的稀释IL-10中以将IL-10溶液的pH升高至8.6。将SC-PEG-12K接头溶解在透析缓冲液中,并且将适当体积的接头溶液(1.8至3.6摩尔接头/摩尔IL-10)添加到稀释的IL-10溶液中以起始聚乙二醇化反应。在5℃下进行反应以便于控制反应速率并

且温和地搅动反应溶液。当如通过尺寸排阻HPLC(SE-HPLC)确定的单-PEG-IL-10产率接近40%时,通过添加1M甘氨酸溶液至30mM的最终浓度来停止反应。使用HCl溶液将反应溶液的pH缓慢调节至7.0,并且以0.2微米过滤反应液并在-80℃下保存。

[0299] 示例性PEG-IL-10合成方案No.2。使用甲氧基-PEG-醛(PALD-PEG)作为接头(Inhale Therapeutic Systems Inc.,Huntsville,AL;也可获自NOF America Corp (Irvine,CA))来制备单-PEG-IL-10。PALD-PEG可以具有5KDa、12KDa或20KDa的分子量。如上所述透析和稀释IL-10,例外的是反应缓冲液的pH是在6.3与7.5之间。以1:1摩尔比将活化的PALD-PEG接头添加到反应缓冲液。将水性氰基氢硼酸盐添加到反应混合物中至0.5至0.75mM的最终浓度。在室温(18℃-25℃)下,在温和搅动下进行反应,持续15-20小时。将反应用1M甘氨酸淬灭。通过SE-HPLC分析产率。通过凝胶过滤色谱法将单-PEG-IL-10从未反应的IL-10、PEG接头和二-PEG-IL-10分离,并且通过RP-HPLC和生物测定(例如,刺激IL-10-响应细胞或细胞系)来对所述单-PEG-IL-10进行表征。

[0300] 示例性PEG-IL-10合成方案No.3。用pH范围为5-7.4的50mM磷酸钠、100mM氯化钠对IL-10(例如,啮齿类动物或灵长类动物)进行透析。在存在0.75-30mM氰基硼氢化钠下,在1-12mg/mL的浓度下以1:1-1:7摩尔比使5K PEG-丙醛与IL-10反应。可替代地,反应可以类似的方式用甲基吡啶甲硼烷来活化。将反应液在5℃-30℃下孵育3-24小时。将聚乙二醇化反应的pH调节至6.3,并且使7.5mg/mL的hIL-10与PEG反应,从而使IL-10与PEG接头之比为1:3.5。氰基氢硼酸盐的最终浓度为约25mM,并且在15℃下将反应进行12-15小时。单-和二-PEG IL-10是反应的最大产物,其中各浓度在终止时为约45%-50%。可以使用氨基酸诸如甘氨酸或赖氨酸,或者可替代地Tris缓冲液来淬灭反应。可以采用多种纯化方法诸如凝胶过滤、阴离子和阳离子交换色谱法以及尺寸排阻HPLC(SE-HPLC)以分离所需的聚乙二醇化的IL-10分子。

[0301] 本文中描述了本发明的具体实施方案,其包括为发明者所知用来执行本发明的最佳模式。在阅读前述说明之后,所公开的实施方案的变化对于本领域的技术人员而言可能变得显而易见,并且所预期的是,技术人员可以适当地采用这类变化。因此,意图以与本文具体描述不同的方式实践本发明,并且本发明包括适用法律允许的所附权利要求书中叙述的主题的所有修改和等效形式。此外,除非本文另外指示或明显地与上下文矛盾,否则本发明涵盖其所有可能变体中的上述元素的任何组合。

[0302] 在本说明书中引用的所有出版物、专利申请、检索号和其他参考文献都以引用的方式并入本文,如同特别地且单独地指出每一个单独的出版物或专利申请以引用的方式并入本文。