

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7121496号**  
**(P7121496)**

(45)発行日 令和4年8月18日(2022.8.18)

(24)登録日 令和4年8月9日(2022.8.9)

(51)国際特許分類

A 6 1 K	35/17 (2015.01)	F I	A 6 1 K	35/17	Z
A 6 1 K	38/20 (2006.01)		A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	47/60 (2017.01)		A 6 1 K	47/60	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)		C 1 2 N	5/10	

請求項の数 25 (全61頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-561747(P2017-561747)  
 (86)(22)出願日 平成28年5月26日(2016.5.26)  
 (65)公表番号 特表2018-516913(P2018-516913  
 A)  
 (43)公表日 平成30年6月28日(2018.6.28)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2016/034402  
 (87)国際公開番号 WO2016/191587  
 (87)国際公開日 平成28年12月1日(2016.12.1)  
 審査請求日 令和1年5月24日(2019.5.24)  
 審判番号 不服2021-8277(P2021-8277/J1)  
 審判請求日 令和3年6月23日(2021.6.23)  
 (31)優先権主張番号 62/167,699  
 (32)優先日 平成27年5月28日(2015.5.28)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)

(73)特許権者 515286243  
 アルモ・バイオサイエンシーズ・インコ  
 ーポレイテッド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・94  
 063、レッドウッド・シティ、チェサ  
 ピーク・ドライブ・575  
 (74)代理人 100092783  
 弁理士 小林 浩  
 (74)代理人 100095360  
 弁理士 片山 英二  
 (74)代理人 100120134  
 弁理士 大森 規雄  
 (74)代理人 100104282  
 弁理士 鈴木 康仁  
 (72)発明者 マム, ジョン・ブライアン  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌治療で使用するためのペグ化インターロイキン - 10

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**癌、血管新生、または前癌状態を治療するための医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を含み、

前記キメラ抗原受容体(CAR)は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域(ASTR)と、膜貫通ドメイン(TMD)と、少なくとも1つの共刺激ドメイン(CSD)を含む細胞内シグナリングドメイン(ISD)と、を含み、

前記細胞内シグナリングドメイン(ISD)が、CD3ゼータを含み、  
前記共刺激ドメイン(CSD)が、CD28、CD137(4-1BB)、またはそれらの組み合わせを含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができ、

前記標的細胞集団は、前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量のIL-10薬剤が投与されるものであり、

前記IL-10薬剤が、IL-10またはPEG-IL-10である、医薬組成物。

**【請求項2】**

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の投与より前である、請求項1に記載の医薬組成物。

**【請求項 3】**

前記 I L - 1 0 薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の投与と同時である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 4】**

前記 I L - 1 0 薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の前記投与の後である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

投与される前記 I L - 1 0 薬剤の量が細胞毒性機能を増強するのに十分である、請求項 1 ~ 4 いずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

投与される前記 I L - 1 0 薬剤の量が 1 0 ~ 1 0 0 n g / m L の血清濃度を達成するのに十分である、請求項 5 に記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

前記 I L - 1 0 薬剤が、 P E G - I L - 1 0 である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

前記 P E G - I L - 1 0 が、 I L - 1 0 の少なくとも 1 つの単量体の少なくとも 1 つのアミノ酸残基に共有結合した少なくとも 1 つの P E G 分子を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

前記 P E G - I L - 1 0 がモノペグ化 I L - 1 0 とジペグ化 I L - 1 0 の混合物を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 10】**

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が 5 k D a ~ 2 0 k D a の分子質量を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 11】**

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が少なくとも 2 0 k D a の分子質量を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 12】**

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が少なくとも 3 0 k D a の分子質量を有する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 13】**

癌、血管新生、または前癌状態を治療するための医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、

a ) キメラ抗原受容体 ( C A R ) であって、

前記キメラ抗原受容体 ( C A R ) は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも 1 つの抗原特異的標的化領域 ( A S T R ) と、膜貫通ドメイン ( T M D ) と、少なくとも 1 つの共刺激ドメイン ( C S D ) を含む細胞内シグナリングドメイン ( I S D ) と、を含み、

前記細胞内シグナリングドメイン ( I S D ) が、 C D 3 ゼータを含み、

前記共刺激ドメイン ( C S D ) が、 C D 2 8 、 C D 1 3 7 ( 4 - 1 B B ) 、またはそれらの組み合わせを含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができる、キメラ抗原受容体 ( C A R ) と、

b ) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量の I L - 1 0 とを発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を含む、医薬組成物。

**【請求項 14】**

前記キメラ抗原受容体及び前記 I L - 1 0 薬剤が同じベクターによって発現される、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

**【請求項 15】**

10

20

30

40

50

前記キメラ抗原受容体及び前記 I L - 1 0 薬剤が異なるベクターによって発現される、請求項 1 3 に記載の医薬組成物。

**【請求項 1 6】**

前記治療的に有効な複数の細胞に、細胞毒性機能を増強するのに十分な量で前記 I L - 1 0 薬剤を発現するベクターをトランスフェクトする、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 1 7】**

癌、血管新生、または前癌状態を治療するための医薬組成物であって、

前記医薬組成物は、

a ) キメラ抗原受容体 ( C A R ) を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な第 1 の複数の細胞であって、

前記キメラ抗原受容体 ( C A R ) は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも 1 つの抗原特異的標的化領域 ( A S T R ) と、膜貫通ドメイン ( T M D ) と、少なくとも 1 つの共刺激ドメイン ( C S D ) を含む細胞内シグナリングドメイン ( I S D ) と、を含み、

前記細胞内シグナリングドメイン ( I S D ) が、 C D 3 ゼータを含み、

前記共刺激ドメイン ( C S D ) が、 C D 2 8 、 C D 1 3 7 ( 4 - 1 B B ) 、またはそれらの組み合わせを含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合が、活性化誘導細胞死を惹起することができる、治療的に有効な第 1 の複数の細胞と、

b ) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量の I L - 1 0 を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な第 2 の複数の細胞とを含む、医薬組成物。

**【請求項 1 8】**

前記治療的に有効な第 2 の複数の細胞に、細胞毒性機能を増強するのに十分な量で前記 I L - 1 0 薬剤を発現するベクターをトランスフェクトする、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

**【請求項 1 9】**

前記治療的に有効な第 2 の複数の細胞が、前記 I L - 1 0 薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされた C D 8 + T 細胞を含む、請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 0】**

前記ベクターがプラスミドを含む、請求項 1 4 ~ 1 6 および 1 8 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 1】**

前記ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 1 4 ~ 1 6 および 1 8 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 2】**

前記 I L - 1 0 薬剤の発現が発現制御エレメントによってモジュレートされる、請求項 1 4 ~ 1 6 および 1 8 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 3】**

前記キメラ抗原受容体 ( C A R ) が、2種の共刺激ドメイン ( C S D ) を含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 4】**

前記 I L - 1 0 または P E G - I L - 1 0 が活性化メモリー C D 8 + T 細胞の機能を増強する、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 2 5】**

前記標的細胞集団が腫瘍抗原を含み、前記腫瘍抗原が、 C D 1 9 、 C D 2 0 、 C D 2 2 、 R O R 1 、メソテリン、 C D 3 3 / I L 3 R a 、 c - M e t 、 P S M A 、糖脂質 F 7 7 、 E G F R V I I I 、 G D - 2 、 N Y - E S O - 1 T C R 、 M A G E A 3 T C R またはこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項

10

20

30

40

50

に記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

関連出願の相互参照

本出願は、2015年5月28日に出願された米国特許仮出願第62/167,699号の優先権の利益を主張し、その出願は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

**【0002】**

本発明は、腫瘍学及び免疫に関連する疾患、障害及び状態の治療または予防における免疫応答をモジュレートするためのIL-10薬剤の使用方法に関する。 10

**【背景技術】**

**【0003】**

サイトカインのインターロイキン-10(IL-10)は、T細胞、B細胞、マクロファージ及び抗原提示細胞(APC)に対する作用を介して複数の免疫応答を調節する、多面的なサイトカインである。IL-10は、活性化単球及び活性化マクロファージにおいてIL-1、IL-1、IL-6、IL-8、TNF-、GM-CSF及びG-CSFの発現を阻害することによって免疫応答を抑制することができ、これは、NK細胞によるIFN-の産生も抑制する。IL-10はマクロファージで主に発現しているが、活性化T細胞、B細胞、肥満細胞及び単球でも発現が検出されている。免疫応答の抑制に加えて、IL-10は、IL-2処理及びIL-4処理した胸腺細胞の増殖を刺激すること、B細胞の生存率を増強すること及びMHCクラスIIの発現を刺激することを含めた、免疫刺激性を示す。 20

**【0004】**

ヒトIL-10は、2つの単量体サブユニット間の非共有結合性相互作用が破壊する際に生物学的に不活性になる、ホモ二量体である。機能的な二量体がIFN-に対してある種の類似性を呈することが、IL-10の公表された結晶構造から得られたデータによって示されている(Zdanov et al., (1995) Structure (London) 3: 591-601)。

**【0005】**

その多面的な活性の結果として、IL-10は、炎症状態、免疫関連障害、線維症障害、代謝障害及び癌を含めた、幅広い疾患、障害及び状態と関連づけられてきた。いくつかのそうした疾患、障害及び状態に関するIL-10を用いた臨床的及び前臨床的評価は、その治療的可能性を強固なものにした。さらに、ペグ化IL-10は、ある種の治療設定において非ペグ化IL-10よりも効果的であることが示された。 30

**【発明の概要】**

**【0006】**

本開示は、キメラ抗原受容体-T細胞療法(CAR-T細胞療法)の成分として、IL-10薬剤(例えば、ペグ化IL-10)の使用を企図する。CARは、癌(例えば、B及びT細胞リンパ腫の治療)及び他の悪性腫瘍に対する新たに出現した療法を示す。CAR-T細胞は、一般に、例えば目的の腫瘍に存在する既知の抗原に対して特異的な組換えT細胞受容体を発現するように改変された、患者由来のメモリーCD8+T細胞を含む。本開示は、一般に、癌治療のためのCAR-T細胞療法の使用に関する記載されているが、このような療法は、そのように限定されないことを理解されたい。 40

**【0007】**

CAR-T細胞療法は、患者自身の培養T細胞を利用する方法である養子細胞移入(ACT)の使用を含む。CAR-T細胞療法では、T細胞を患者から取り出し、既知の癌(例えば、腫瘍)に対して特異的な抗原に対するCARを発現するように遺伝的に変化させる。十分な数までエキソビオで增幅させた後、自己の細胞を患者に注入して戻し、癌を抗原特異的に破壊する。このように、CAR-T細胞療法は、患者から採血した血を1つの特定の成分を分離して除く方法(例えば白血球除去療法のプロセスにおける悪性

10

20

30

40

50

白血球細胞の除去)で処理し、次いで残部を患者の循環に返す、アフェレーシスと類似している。

#### 【0008】

以下でさらに述べるように、CAR-T細胞療法による治療は、標的抗原を発現する正常組織を標的化する抗原特異的毒性の誘導と命に関わるサイトカイン放出症候群をもたらすCAR-T細胞治療の極端な効力の両方によって、部分的に制限されてきた。特に、著しい抗原負荷量を伴う高親和性T細胞受容体相互作用が活性化誘導細胞死を導き得ることが観察された。歴史的に、活性化誘導細胞死の増強と関連してIL-10が科学文献によつて論じられた(Georgescu et al. (1997) J Clin Invest 100(10): 2622-33)。しかし、本明細書で提示されるデータは、IL-10薬剤をCAR-T細胞療法と併せて使用して、活性化誘導細胞死を予防または制限し、一方でCD8+T細胞の機能及び生存を増強できることを示唆する。10

#### 【0009】

以下でさらに述べるように、ヒトIL-10はホモ二量体であり、各単量体は、178個のアミノ酸を含み、その最初の18個がシグナルペプチドを含む。本開示の特定の実施形態は、シグナルペプチドを欠く成熟ヒトIL-10ポリペプチド(例えば、米国特許第6,217,857号を参照されたい)または成熟ヒトPEG-IL-10を含む。さらなる特定の実施形態では、IL-10薬剤は成熟ヒトIL-10の変異体である。変異体は、成熟ヒトIL-10の活性より小さい、その活性に匹敵する、またはその活性を超える活性を示すことができ、ある種の実施形態では、活性は成熟ヒトIL-10の活性に匹敵するか、その活性を超える。20

#### 【0010】

本開示のある種の実施形態は、1つまたは複数の特性(例えば、薬物動態パラメーター、有効性など)を増強するために、IL-10の修飾を企図する。そのようなIL-10の修飾としては、ペグ化、グリコシリ化、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン(HSA))コンジュゲーション及び融合ならびにHES化が挙げられる。特定の実施形態では、IL-10はペグ化される。さらなる実施形態では、IL-10の修飾は治療的に関連する、免疫原性への有害な影響をもたらさず、さらに別の実施形態では、修飾IL-10は未修飾IL-10よりも免疫原性が低い。用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド(複数可)」、「薬剤(複数可)」などは、広く解釈されることが意図され、例えば、ヒト及び非ヒトIL-10関連ポリペプチドを含み、それらの相同体、変異体(ムテインを含める)及び断片ならびに例えばリーダー配列(例えばシグナルペプチド)を有するIL-10ポリペプチド及び前述の修飾バージョンが含まれる。さらなる特定の実施形態では、用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド(複数可)」、「薬剤(複数可)」はアゴニストである。特定の実施形態は、本明細書で「PEG-IL-10」とも称する、ペグ化IL-10に関する。本開示は、前述のものをコードする核酸分子、核酸分子を含むベクターなど、ならびにIL-10薬剤を発現する細胞(例えば、形質転換細胞及び宿主細胞)も企図する。30

#### 【0011】

本開示は、対象の標的細胞集団に対するT細胞性免疫応答をモジュレートするためのCAR-T細胞療法の使用方法及びIL-10薬剤を企図する。特定の実施形態は、対象の標的細胞集団へのT細胞性免疫応答をモジュレートする方法であって、a)キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変された治療的に有効な複数の細胞を対象に導入すること(ここでは、キメラ抗原受容体は、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合は、活性化誘導細胞死を誘発することができる);及びb)活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量のIL-10薬剤を対象に投与すること含む方法を企図する。特定の実施形態では、CARは、標的細胞集団を特異的に認識する抗原結合ドメインを含む。40

#### 【0012】

10

20

30

40

50

本開示のある種の実施形態では、IL-10薬剤は活性化メモリーCD8+T細胞の機能を増強する。他の実施形態では、投与されるIL-10薬剤の量は、細胞毒性機能を増強するのに十分である。

#### 【0013】

IL-10薬剤の投与が治療的に有効な複数の細胞の投与より前、その投与と同時またはその投与の後である実施形態が企図される。本開示のある種の実施形態では、IL-10薬剤は皮下に投与される。

#### 【0014】

ある種の実施形態では、本開示は、10～100ng/mLの血清濃度を達成するのに十分な量のIL-10薬剤の投与を企図する。いくつかの実施形態では、IL-10薬剤は、1pg/mL～10.0ng/mLの平均IL-10血清中トラフ濃度を維持するのに十分な量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、1.0pg/mL～10.0ng/mLの平均IL-10血清中トラフ濃度が、定められた期間の少なくとも95%の間維持される。本開示のさらなる実施形態では、平均IL-10血清中トラフ濃度は、1.0pg/mL～100pg/mL；0.1ng/mL～1.0ng/mL；1.0ng/mL～10ng/mL；0.5ng/mL～5.0ng/mL；0.75ng/mL～1.25ng/mLまたは0.9ng/mL～1.1ng/mLの範囲である。本開示の特定の実施形態では、平均IL-10血清中トラフ濃度は、少なくとも1.25ng/mL、少なくとも1.5ng/mL、少なくとも1.6ng/mL、少なくとも1.7ng/mL、少なくとも1.8ng/mL、少なくとも1.85ng/mL、少なくとも1.9ng/mL、少なくとも1.95ng/mL、少なくとも1.97ng/mL、少なくとも1.98ng/mL、少なくとも1.99ng/mL、少なくとも2.0ng/mLであるか、2ng/mLを超える。

10

20

30

#### 【0015】

さらなる実施形態では、前述の期間は、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも1週間、少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1か月間、少なくとも6週間、少なくとも2か月間、少なくとも3か月間、少なくとも6か月間、少なくとも9か月間であるか、12か月間より長い。

#### 【0016】

本開示の特定の実施形態では、平均IL-10血清中トラフ濃度は、期間の少なくとも85%、期間の少なくとも90%、少なくとも96%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%の間維持される。

40

#### 【0017】

所望の定常状態血清中トラフ濃度（例えば、1ng/mL）を維持するのに十分な投薬レジメンが所望の定常状態血清中トラフ濃度より高い初期血清中トラフ濃度をもたらし得ることが想定される。哺乳類対象におけるIL-10の薬力学的及び薬物動態的特性が原因で、（1種または複数の負荷投与量、それに続く一連の維持量の投与を通して達成される）初期トラフ濃度は、投薬パラメーター（例えば、量及び頻度）が一定に保たれる場合でさえ、ある期間にわたって、徐々にではあるが絶えず低下する。その期間の後、徐々ではあるが絶え間ない低下が終わり、定常状態血清中トラフ濃度が維持される。

#### 【0018】

例として、マウス（例えば、C57BL/6マウス）への約0.1mg/kg/日のIL-10薬剤（例えば、mIL-10）の非経口投与（例えば、SC及びIV）が、2.0ng/mLの定常状態血清中トラフ濃度を維持するのに必要とされる。しかし、その定常状態血清中トラフ濃度は、0.1mg/kg/日の投薬開始後（また、任意の負荷投与量（複数可）の後）およそ30日後まで達成することができない。むしろ、初期血清中トラフ濃度（例えば、2.5ng/mL）が達成された後、その濃度は、例えばおよそ30日の期間にわたって、徐々にではあるが絶えず低下し、その期間の後、所望の定常状態血清中トラフ濃度（2.0ng/mL）が維持される。当業者は、例えば、ADE及び患者特異的パラメーターを使用して、所望の定常状態トラフ濃度を維持するのに必要とされ

50

る用量を決定することができる。

#### 【0019】

本開示は、修飾 IL - 10 薬剤を形成するための少なくとも 1 つの修飾を IL - 10 薬剤が含む方法であって、その修飾が IL - 10 薬剤のアミノ酸配列を変えない方法を企図する。いくつかの実施形態では、修飾 IL - 10 薬剤は PEG - IL - 10 薬剤である。PEG - IL - 10 薬剤は、IL - 10 の少なくとも 1 つのサブユニットの少なくとも 1 つのアミノ酸残基に共有結合した少なくとも 1 つの PEG 分子を含むことができ、または他の実施形態では、モノペグ化 IL - 10 とジペグ化 IL - 10 の混合物を含むことができる。PEG - IL - 10 薬剤の PEG 成分は、約 5 kDa を超える、約 10 kDa を超える、約 15 kDa を超える、約 20 kDa を超える、約 30 kDa を超える、約 40 kDa を超える、または約 50 kDa を超える分子質量を有し得る。いくつかの実施形態では、分子質量は、約 5 kDa ~ 約 10 kDa、約 5 kDa ~ 約 15 kDa、約 5 kDa ~ 約 20 kDa、約 10 kDa ~ 約 15 kDa、約 10 kDa ~ 約 20 kDa、約 10 kDa ~ 約 25 kDa または約 10 kDa ~ 約 30 kDa である。10

#### 【0020】

いくつかの実施形態では、修飾 IL - 10 薬剤は、少なくとも 1 つの Fc 融合分子、少なくとも 1 つの血清アルブミン（例えば、HSA もしくは BSA）、HSA 融合分子またはアルブミンコンジュゲートを含む。追加的な実施形態では、修飾 IL - 10 薬剤は、グリコシル化されている、HES 化されている、または少なくとも 1 つのアルブミン結合ドメインを含む。いくつかの修飾 IL - 10 薬剤は、1 種類より多い修飾を含むことができる。特定の実施形態では、修飾は部位特異的である。いくつかの実施形態はリンカーを含む。修飾 IL - 10 薬剤を以下で詳細に述べる。20

本開示は、IL - 10 薬剤を発現するように遺伝子改変された細胞の対象への導入と併せた、対象の疾患、障害または状態（例えば、癌関連障害）の治療または予防のための CAR - T 細胞療法の使用も企図する。その直接的及び局部的効果の結果、標的抗原を発現する正常組織を標的化する抗原特異的毒性の誘導と命に関わるサイトカイン放出症候群をもたらす CAR - T 細胞治療の極端な効力を弱めるのに必要な、そのような細胞から分泌される IL - 10 薬剤の量は、従来の方式で（例えば、皮下に）対象に投与される IL - 10 薬剤の量よりはるかに少ない。実際には、前述の効果を達成するのに必要な分泌される IL - 10 薬剤の量は、血清中で検出限界以下である。30

#### 【0021】

いくつかのそのような実施形態では、本開示は、対象の標的細胞集団への T 細胞性免疫応答をモジュレートする方法であって、a) キメラ抗原受容体（ここでは、キメラ抗原受容体は、標的細胞集団に結合することができる少なくとも 1 つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合は、活性化誘導細胞死を誘発することができる）；及び b) 活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量の IL - 10 薬剤を発現するように遺伝子改変された、治療的に有効な複数の細胞を対象に導入することを含む方法を企図する。

#### 【0022】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体及び IL - 10 薬剤は同じベクターによって発現されるが、他の実施形態では、キメラ抗原受容体及び IL - 10 薬剤は異なるベクターによって発現される。特定の実施形態では、治療的に有効な複数の細胞は、細胞毒性機能を増強するのに十分な量で IL - 10 薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされる。ベクターは、例えば、プラスミドでもよいしウイルスベクターでもよい。本開示は、IL - 10 薬剤を発現させる任意の他の手段の使用も企図する。特定の実施形態では、IL - 10 薬剤の発現は発現制御エレメントによってモジュレートされる。40

#### 【0023】

上記の実施形態では、複数の細胞を対象から得ることができ、エキソビオで遺伝子改変することができる。いくつかの実施形態では、複数の細胞は、アフェレーシス方法によって対象から得られる。本開示の他の実施形態では、複数の細胞はメモリー CD8 + T 細胞

10

20

30

40

50

であるが、さらに他の実施形態では、これは自己の腫瘍細胞である。

【0024】

本開示は、対象の標的細胞集団へのT細胞性免疫応答をモジュレートする方法であって、a)キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変された、治療的に有効な第1の複数の細胞（ここでは、キメラ抗原受容体は、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合が活性化誘導細胞死を誘発することができる）；及びb)活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL-10薬剤を発現するように遺伝子改変された、治療的に有効な第2の複数の細胞を対象に導入することを含む方法を企図する。

【0025】

特定の実施形態では、治療的に有効な複数の細胞は、細胞毒性機能を増強するのに十分な量でIL-10薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされる。さらに他の実施形態では、治療的に有効な第2の複数の細胞は、IL-10薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされたCD8+T細胞を含む。

【0026】

特定の実施形態では、第1の複数の細胞が対象から得られ、エキソビオで遺伝子改変されるが、他の実施形態では、第2の複数の細胞が対象から得られ、エキソビオで遺伝子改変される。本開示は、第1の複数の細胞及び第2の複数の細胞がアフェレーシス方法によって対象から得られる実施形態を企図する。いくつかの実施形態では、第1の複数の細胞はメモリーCD8+T細胞であり、第2の複数の細胞はナイーブCD8+T細胞である。さらに他の実施形態では、第1の複数の細胞及び第2の複数の細胞は自己の腫瘍細胞である。

【0027】

前述の実施形態のそれぞれでは、標的細胞集団は腫瘍抗原を含むことができる。Vigneron, N. et al. ((15 July 2013) Cancer Immunology 13:15)は、400種を超える腫瘍抗原ペプチドを含むT細胞規定(T cell - defined)ヒト腫瘍抗原のデータベースを記載している。腫瘍抗原の例としては、限定されないが、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRVIII、GD-2、NY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCR、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられる。

【0028】

本開示は、IL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）の投与またはIL-10薬剤を発現するベクターの導入と組み合せた、対象の疾患、障害または状態（例えば、癌関連障害）の治療または予防のためのCAR-T細胞療法の使用も企図する。

【0029】

特定の実施形態は、癌に関連した疾患、障害または状態（例えば、腫瘍）を有する対象を治療する方法であって、a)キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変された治療的に有効な複数の細胞を対象に導入すること（ここでは、キメラ抗原受容体は、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合は、活性化誘導細胞死を誘発することができる）；及びb)活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量のIL-10薬剤を対象に投与することを含む方法を含む。特定の実施形態では、治療を受ける対象は、免疫に関連した疾患、障害もしくは状態または本明細書に記載の別の疾患、障害もしくは状態を有する。

【0030】

本開示のある種の実施形態では、そのような方法は対象の癌に関連した疾患、障害または状態の予防のための治療プロトコールで使用されるが、他の実施形態では、そのような方法は免疫関連障害の予防のための治療プロトコールで使用される。IL-10薬剤に関する投薬パラメーター及びレジメンならびにそのような薬剤の例示的種類を含めた、上記

10

20

30

40

50

の方法のさらなる態様は、本明細書の他の個所で記載されている。

#### 【 0 0 3 1 】

本開示の追加的な実施形態は、癌に関連した疾患、障害または状態を有する対象を治療する方法であって、a ) キメラ抗原受容体（ここでは、キメラ抗原受容体は、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合は、活性化誘導細胞死を誘発することができる）；及びb ) 活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL - 10薬剤を発現するように遺伝子改変された、治療的に有効な複数の細胞を対象に導入することを含む方法を企図する。

#### 【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体及びIL - 10薬剤は同じベクターによって発現されるが、他の実施形態では、キメラ抗原受容体及びIL - 10薬剤は異なるベクターによって発現される。特定の実施形態では、治療的に有効な複数の細胞は、細胞毒性機能を増強するのに十分な量でIL - 10薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされる。ベクターは、例えば、プラスミドでもよいしウイルスベクターでもよい。本開示は、IL - 10薬剤を発現させる任意の他の手段の使用も企図する。特定の実施形態では、IL - 10薬剤の発現は発現制御エレメントによってモジュレートされる。

#### 【 0 0 3 3 】

上記の実施形態では、複数の細胞を対象から得ることができ、エキソビオで遺伝子改変することができる。本開示によれば、いくつかの実施形態では、複数の細胞はアフェレーシス方法によって対象から得られる。特定の実施形態では複数の細胞はメモリーCD8 + T細胞であり、他の実施形態では自己の腫瘍細胞である。

#### 【 0 0 3 4 】

本開示は、対象に導入した後少なくとも1週間、活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量でIL - 10薬剤が発現される方法を企図する。他の特定の実施形態では、対象に導入した後少なくとも2週間、少なくとも3週間、少なくとも1か月、少なくとも2か月、少なくとも3か月、少なくとも4か月、少なくとも5か月、少なくとも6か月、少なくとも7か月、少なくとも8か月、少なくとも9か月または少なくとも1年またはそれ以上、活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量でIL - 10薬剤が発現される。

#### 【 0 0 3 5 】

本開示のさらに別の実施形態は、癌に関連した疾患、障害または状態を有する対象を治療する方法であって、a ) キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変された、治療的に有効な第1の複数の細胞（ここでは、キメラ抗原受容体は、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合は、活性化誘導細胞死を誘発することができる）；及びb ) 活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL - 10薬剤を発現するように遺伝子改変された、治療的に有効な第2の複数の細胞を対象に導入することを含む方法を企図する。活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量でIL - 10薬剤が発現される時間の長さの例は、本明細書の他の個所で記載されている。

#### 【 0 0 3 6 】

ある種の実施形態では、上記の方法は、対象の癌に関連したまたは免疫に関連した疾患、障害または状態を含めた、疾患、障害または状態の予防のための治療プロトコールで使用される。

#### 【 0 0 3 7 】

本開示は、本明細書の他の個所で記載される期間にわたって、活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量でIL - 10薬剤が発現される方法を企図する。

#### 【 0 0 3 8 】

特定の実施形態では、治療的に有効な第1の複数の細胞は、細胞毒性機能を増強するのに十分な量でIL - 10薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされる。さらに他の

10

20

30

40

50

実施形態では、治療的に有効な第2の複数の細胞は、IL-10薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされたCD8+T細胞を含む。

#### 【0039】

特定の実施形態では、第1の複数の細胞が対象から得られ、エキソビオで遺伝子改変されるが、他の実施形態では、第2の複数の細胞が対象から得られ、エキソビオで遺伝子改変される。本開示は、第1の複数の細胞及び第2の複数の細胞がアフェレーシス方法によって対象から得られる実施形態を企図する。いくつかの実施形態では、第1の複数の細胞はメモリーCD8+T細胞であり、第2の複数の細胞はナイーブCD8+T細胞である。さらに他の実施形態では、第1の複数の細胞及び第2の複数の細胞は自己の腫瘍細胞である。

10

#### 【0040】

前述の実施形態のそれぞれでは、標的細胞集団は腫瘍抗原を含むことができ、その例は本明細書の他の個所で記載されている。

#### 【0041】

本開示は、本明細書に記載のIL-10薬剤をコードする核酸分子を企図する。ある種の実施形態では、核酸分子は、IL-10薬剤をコードする核酸分子の発現をもたらす発現制御エレメントに作動可能に連結される。いくつかの実施形態では、ベクター（例えば、プラスミドまたはウイルスベクター）は核酸分子を含む。IL-10薬剤を発現する形質転換細胞または宿主細胞も本明細書で企図される。

#### 【0042】

さらに別の実施形態では、本開示は、CAR-T T細胞の機能を増強する方法であって、a) CARを発現するようにT細胞を遺伝子操作し、それによって、CAR-T T細胞を生成すること；及びb) CAR-T T細胞によって分泌される少なくとも1つのサイトカインの量を低減させる薬剤（例えば、低分子干渉RNA（siRNA））でCAR-T T細胞をモジュレートすることを含む方法を提供する。サイトカインの例としては、限定されないが、腫瘍壊死因子ファミリーまたはトランスフォーミング増殖因子ベータスープラーファミリー（例えば、TGF-）のメンバーが挙げられる。TGF- の量を低減させることができ調節性T細胞の増殖を低減させる実施形態が企図される。

20

#### 【0043】

本開示の教示に基づいて、他の実施形態が当業者に明らかになるであろう。

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0044】

【図1】PEG-rHuIL-10による29日間の治療の後のPD-1及びLAG3+末梢T細胞の倍数増加を示す図である。

【図2】PEG-IL-10が、ナイーブCD8+T細胞と比較してメモリーCD8+T細胞（CD45RO+）におけるIFN-生成を優先的に増強することを示す図である。

【図3】PEG-IL-10がCD8+T細胞（CD45RO+）において活性化誘導細胞死を制限できることを示す図である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0045】

本開示をさらに説明する前に、本開示が本明細書に記載される特定の実施形態に限定されないことを理解されたい。本明細書で使用される術語は特定の実施形態のみを説明することを目的とし、制限を意図したものではないことも理解されたい。

40

#### 【0046】

値の範囲が提供される場合、その範囲の上限と下限の間にある、文脈において別段明記されない限り下限の単位の10分の1までの各介在値、及びその記載された範囲内の任意の他の記載された値または介在値が、本発明内に包含されることが理解されよう。これらのより小さな範囲の上限及び下限は、独立してそのより小さな範囲に含まれ得、示された範囲内の任意の具体的に除外された限界値を条件として、これも本発明内に包含される。示された範囲が限界値の一方または両方を含む場合、これらの含まれる限界値のいずれか

50

または両方を除いた範囲も本発明に含まれる。別段定義されない限りは、本明細書で使用するすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

#### 【0047】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「a」、「a n」及び「t h e」は、文脈において別段明記しない限り、複数の指示物を含むことに留意されたい。特許請求の範囲をいかなる随意の要素も除外するように起草できることにさらに留意されたい。したがって、この記述は、請求要素の記載に関連して「s o l e l y ( 単に ) 」、「o n l y ( のみ ) 」などのようなそうした排他的な術語の使用のため、または「否定的な」制限の使用のための先行詞として働くことが意図される。

10

#### 【0048】

本明細書で論じる刊行物は、単にその開示が本出願の出願日より前であるという理由で提供される。さらに、提供される公開日が実際の公開日と異なる可能性があり、これを個別に確認する必要があり得る。

#### 【0049】

##### 概要

C A R - T T 細胞療法は、例えば癌関連（例えば、B 及び T 細胞リンパ腫）及び免疫関連悪性腫瘍の治療に有望な治療方法である。C A R - T T 細胞は、一般に、例えば目的の腫瘍に存在する既知の抗原に対して特異的な組換え T 細胞受容体を発現するように改変された、患者由来のメモリー C D 8 + T 細胞を含む。本開示は癌治療のための C A R - T 細胞療法の使用に関連して一般に記載されるが、そのような療法が他の適応症の治療においても有用性を見出すことを理解されたい。

20

#### 【0050】

本明細書でさらに述べるように、C A R - T 細胞療法がある種の癌（例えば、非 B 細胞悪性腫瘍）の治療で使用された場合、活性化誘導細胞死を導き得る、著しい抗原負荷量を伴う高親和性 T 細胞受容体相互作用が観察された。I L - 1 0 は活性化誘導細胞死の増強と以前に関連づけられたが、本明細書で提示されるデータは、I L - 1 0 薬剤をC A R - T T 細胞療法と併せて使用して、活性化誘導細胞死を予防または制限し、一方で C D 8 + T 細胞の機能及び生存を増強できることを示唆する。

30

#### 【0051】

本開示のポリペプチド及び核酸分子に関する「ヒト」に対するいかなる言及も、ポリペプチドもしくは核酸が得られる方法または供給源に関して制限することを意図しておらず、むしろ、配列が天然に存在するヒトポリペプチドまたは核酸分子の配列に対応することができるよう配列に関してのみであることに留意されたい。ヒトポリペプチド及びそれをコードする核酸分子に加えて、本開示は、他の種由来の I L - 1 0 関連ポリペプチド及び対応する核酸分子を企図する。

#### 【0052】

##### 定義

別段指示がない限り、次の用語は、以下に記載される意味を有することが意図される。他の用語は明細書全体を通して他の個所で定義される。

40

#### 【0053】

用語「患者」または「対象」は互換的に使用されて、ヒトまたは非ヒト動物（例えば、哺乳動物）を指す。

#### 【0054】

用語「投与」、「投与する」などは、例えば、対象、細胞、組織、器官または生体液に適用される場合、例えば、I L - 1 0 または P E G - I L - 1 0 ）、核酸（例えば、天然ヒト I L - 1 0 をコードする核酸）；対象、細胞、組織、器官または生体液に対する、前述のものを含む医薬組成物または診断剤の接触を指す。細胞に関しては、投与は、（例えば、インビトロまたはエキソビオでの）細胞への試薬の接触、及び流体への試薬の接触（ここでは、流体は細胞と接触している）を含む。

50

**【 0 0 5 5 】**

用語「治療する」、「治療すること」、「治療」などは、対象を苦しめる疾患、障害もしくは状態の根本原因の少なくとも1つまたは対象を苦しめる疾患、障害、状態に付随する症状の少なくとも1つを、一次的または永続的に排除する、低減させる、抑制する、緩和するまたは回復させるために、疾患、障害もしくは状態またはそれらの症状が診断された、観察された後などに開始される、( I L - 1 0 または I L - 1 0 を含む医薬組成物を投与することなどの)一連の行為を指す。したがって、治療は、活動性疾患を阻害すること(例えば、疾患、障害もしくは状態またはそれらと関連する臨床症状の発生もしくはさらなる発生を抑止すること)を含む。この用語は、例えば流体相またはコロイド相において I L - 1 0 または P E G - I L - 1 0 が I L - 1 0 受容体と接触する状況などの他の文脈で使用することもできる。

10

**【 0 0 5 6 】**

本明細書で使用する場合、用語「治療を必要としている」は、医師または他の介護人によって行われる、対象が治療を必要とするまたは治療から恩恵を受けるであろうという判断を指す。この判断は、医師または介護人の専門的知識の領域にある様々な要因に基づいて行われる。

**【 0 0 5 7 】**

用語「予防する」、「予防すること」、「予防」などは、一般に、特定の疾患、障害または状態を有しやすい対象において、疾患、障害、状態などを発生する対象の危険性を一次的または永続的に予防する、抑制する、阻害するまたは低減させる(例えば、臨床症状がないことによって判定される)か、それらの発生を遅延させるための方法で、(例えば、疾患、障害、状態またはそれらの症状の発生より前に)開始される、( I L - 1 0 または I L - 1 0 を含む医薬組成物を投与することなどの)一連の行為を指す。特定の場合では、この用語は、疾患、障害または状態の進行を遅らせること、または有害なもしくは望まれない状況へのそれらの進行を阻害することも指す。

20

**【 0 0 5 8 】**

本明細書で使用する場合、用語「予防を必要としている」は、医師または他の介護人によって行われる、対象が予防的ケアを必要とするまたは予防的ケアから恩恵を受けるであろうという判断を指す。この判断は、医師または介護人の専門的知識の領域にある様々な要因に基づいて行われる。

30

**【 0 0 5 9 】**

フレーズ「治療有効量」は、対象に投与される場合に、単独でまたは医薬組成物の一部として、単回用量または一連の用量の一部として、疾患、障害または状態の任意の症状、態様または特性に対して任意の検出可能なプラスの効果を有することができる量で、薬剤を対象へ投与することを指す。治療有効量は、関連する生理作用を測定することによって確かめることができ、投薬レジメン及び対象の状態などの診断解析に関連して調整することができる。例として、投与後に生成される炎症性サイトカインの量の測定値は、治療有効量が使用されたかどうかの指標となり得る。

**【 0 0 6 0 】**

フレーズ「変化をもたらすのに十分な量の」は、特定の療法を施す前(例えば、ベースラインレベル)と後に測定された指標のレベルの間に検出可能な差が存在することを意味する。指標としては、任意の客観的なパラメーター(例えば、I L - 1 0 の血清濃度)または主観的パラメーター(例えば、対象の健康感)が挙げられる。

40

**【 0 0 6 1 】**

用語「小分子」は、約10kDa未満、約2kDa未満または約1kDa未満の分子量を有する化学化合物を指す。小分子としては、限定されないが、無機分子、有機分子、無機成分を含む有機分子、放射性原子を含む分子及び合成分子が挙げられる。治療的には、小分子は大分子よりも細胞透過性であり、分解を受けにくく、免疫応答を誘発する可能性が低いものであり得る。

**【 0 0 6 2 】**

50

用語「リガンド」は、受容体のアゴニストまたはアンタゴニストとして作用することができる、例えば、ペプチド、ポリペプチド、膜会合もしくは膜結合分子またはこれらの複合体を指す。「リガンド」は、天然及び合成のリガンド、例えば、サイトカイン、サイトカイン変異体、類似体、ムテイン及び抗体に由来する結合組成物を包含する。「リガンド」は、小分子、例えば、サイトカインのペプチド模倣物及び抗体のペプチド模倣物も包含する。この用語は、アゴニストでもアンタゴニストでもないが、その生物学的特性、例えば、シグナリングまたは接着に有意に影響を及ぼさずに受容体に結合することができる薬剤も包含する。さらに、この用語は、例えば化学的方法または組換え方法によって可溶性型の膜結合リガンドに変化させた、膜結合リガンドを含む。リガンドまたは受容体は完全に細胞内にあってもよく、すなわち、これらは、サイトゾル、核、またはいくつかの他の細胞内コンパートメントに存在することができる。リガンドと受容体の複合体は、「リガンド - 受容体複合体」と呼ばれる。

#### 【0063】

用語「インヒビター」及び「アンタゴニスト」または「アクチベーター」及び「アゴニスト」は、それぞれ、例えば、リガンド、受容体、補助因子、遺伝子、細胞、組織または器官などの活性化のための、阻害性分子または活性化分子を指す。インヒビターは、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体または細胞を減少させる、ブロックする、妨げる、活性化遅延させる、不活性化する、鈍感にするまたはダウンレギュレーションする分子である。アクチベーターは、例えば、遺伝子、タンパク質、リガンド、受容体または細胞を増加させる、活性化する、助長する、活性化を増強する、感受性にするまたはアップレギュレーションする分子である。インヒビターは、構成的活性を低減させる、ブロックするまたは不活性化する分子と定義することもできる。「アゴニスト」は、標的と相互作用して標的の活性化の増大を引き起こすまたは促進する分子である。「アンタゴニスト」は、アゴニストの作用（複数可）に対抗する分子である。アンタゴニストは、アゴニストの活性を妨げ、低減させ、阻害し、または中和し、アンタゴニストはまた、同定されたアゴニストが存在しない場合でも、標的、例えば標的受容体の構成的活性を妨げる、阻害するまたは低減させることができる。

#### 【0064】

用語「モジュレートする」、「モジュレーション」などは、分子（例えば、アクチベーターまたはインヒビター）が、IL-10薬剤（またはこれをコードする核酸分子）の機能もしくは活性を直接的または間接的に増大もしくは低下させる；または分子の能力を増強してIL-10薬剤のものに匹敵する効果を生じさせる、能力を指す。用語「モジュレーター」は、上記の活性をもたらすことができる分子を広く指すことを意図する。例として、例えば、遺伝子、受容体、リガンドまたは細胞のモジュレーターは、遺伝子、受容体、リガンドまたは細胞の活性を変化させる分子であり、この場合、活性は、その調節特性が活性化され得る、阻害され得るまたは変化させられ得る。モジュレーターは、単独で作用することができ、または補助因子、例えば、タンパク質、金属イオンまたは小分子を使用することができる。用語「モジュレーター」は、IL-10と同じ作用機構を介して作動し（すなわち、IL-10と類似した方法でIL-10と同じシグナル伝達経路をモジュレートする薬剤）、IL-10のものと匹敵する（またはIL-10のものを超える）生物学的応答を誘発することができる薬剤を含む。

#### 【0065】

モジュレーターの例としては、小分子化合物及び他の生物有機分子が挙げられる。小分子化合物の多数のライブラリー（例えば、コンビナトリアルライブラリー）が市販されており、モジュレーターの同定の出発点として働き得る。当業者は、所望の特性を有する1種または複数の化合物を同定するためにそのような化合物ライブラリーをスクリーニングすることができる1種または複数のアッセイ（例えば、生化学的アッセイまたは細胞ベースアッセイ）を開発することができ、その後、熟練の医薬化学者が、そのような1種または複数の化合物を、例えば、それらの類似体及び誘導体を合成及び評価することによって、最適化することができる。アクチベーターの同定において、合成及び／または分子モデ

10

20

30

40

50

リング研究を利用することもできる。

**【 0 0 6 6 】**

分子の「活性」は、リガンドまたは受容体への分子の結合；触媒活性；遺伝子発現または細胞のシグナリング、分化または成熟を刺激する能力；抗原活性；他の分子の活性のモジュレーションなどを説明するまたは指すことができる。この用語は、細胞間相互作用（例えば、接着）をモジュレートもしくは維持する活性、または細胞の構造（例えば、細胞膜）を維持する活性も指すことができる。「活性」は、比活性、例えば、[触媒活性] / [mg タンパク質] または [免疫活性] / [mg タンパク質]、生物学的コンパートメント中の濃度などを意味することもできる。用語「増殖活性」は、例えば、正常な細胞分裂ならびに癌、腫瘍、異形成、細胞形質転換、転移及び血管新生を促進する、これらに必要である、またはこれらと特に関連する活性を包含する。10

**【 0 0 6 7 】**

本明細書で使用する場合、「匹敵する」、「匹敵する活性」、「に匹敵する活性」、「匹敵する効果」、「に匹敵する効果」などは、定量的及び／または定性的に見なすことができる相対的な用語である。この用語の意味は、これらが使用される文脈に依存することが多い。例として、両方とも受容体を活性化する2つの薬剤は、定性的な観点からは、匹敵する効果を有すると見なすことができるが、当技術分野で認められたアッセイ（例えば、用量応答アッセイ）または当技術分野で認められた動物モデルにおいて決定したときに一方の薬剤が他の薬剤の活性の20%のみしか達成できない場合、2つの薬剤は、定量的な観点からは、匹敵する効果を欠くと見なすことができる。ある結果を別の結果と比較する（例えば、ある結果対参照標準）場合、「匹敵する」は、ある結果が、参照標準から、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満、7%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満または1%未満逸脱することを意味することが多い。特定の実施形態では、ある結果は、これが参照標準から15%未満、10%未満または5%未満逸脱する場合に、参照標準と匹敵する。例として、限定されないが、活性または効果は、有効性、安定性、溶解度または免疫原性を指すことができる。20

**【 0 0 6 8 】**

例えば、細胞、組織、器官または生物体の「応答」という用語は、生化学的または生理的な挙動、例えば、生物学的コンパートメント内の濃度、密度、接着もしくは移動、遺伝子発現率または分化の状態の変化を包含し、この場合、変化は活性化、刺激もしくは治療と、または遺伝的プログラミングなどの内部機構と相關する。ある文脈では、用語「活性化」、「刺激」などは、内部機構によって及び外部要因または環境要因によって調節されるような細胞活性化を指し、一方で、用語「阻害」、「ダウンレギュレーション」などは、反対の効果を指す。30

**【 0 0 6 9 】**

本明細書で互換的に使用される用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指し、これは、遺伝的にコードされた及び遺伝的にコードされていないアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸及び修飾されたポリペプチド骨格を有するポリペプチドを含むことができる。この用語は融合タンパク質を含み、限定されないが、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質；異種及び同種のリーダー配列を有する融合タンパク質；N末端のメチオニン残基を有するまたは有さない融合タンパク質；免疫学的にタグを付けられたタンパク質を有する融合タンパク質などが含まれる。40

**【 0 0 7 0 】**

本開示の全体を通して、1文字または3文字コードによってアミノ酸に言及することができます理解されよう。読者の便宜のために、1文字及び3文字のアミノ酸コードを以下に提供する。

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

10

20

30

40

### 【0071】

本明細書で使用する場合、用語「変異体」は、天然に存在する変異体及び天然に存在しない変異体を包含する。天然に存在する変異体は、相同体（種ごとにそれぞれアミノ酸またはヌクレオチド配列が異なるポリペプチド及び核酸）及びアレル変異体（それぞれ種内の個体ごとにアミノ酸またはヌクレオチド配列が異なるポリペプチド及び核酸）を含む。天然に存在しない変異体は、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化を含むポリペプチド及び核酸を含み、この場合、配列の変化は人工的に導入され（例えば、ムテイン）；例えば、この変化は、ヒトの介入（「人間の手」）によって研究室で生成される。したがって、本明細書では、「ムテイン」は、通常、単一または複数のアミノ酸置換を保有し、部位特異的変異誘発またはランダム変異誘発にかけられたクローン化遺伝子または完全合成遺伝子に由来することが多い、変異組換えタンパク質を広く指す。

### 【0072】

用語「DNA」、「核酸」、「核酸分子」、「ポリヌクレオチド」などは本明細書で互換的に使用されて、任意の長さのヌクレオチド（デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドのいずれか）のポリマー形態、またはそれらの類似体を指す。ポリヌクレオチドの非限定例としては、直鎖状及び環状の核酸、伝令RNA（mRNA）、相補DNA（cDNA）、組換えポリヌクレオチド、ベクター、プローブ、プライマーなどが挙げられる。

### 【0073】

ポリペプチドの構造に関連して本明細書で使用する場合、「N-terminal（N末端）」（または「amino terminus（アミノ末端）」）及び「C-terminal（C末端）」（または「carboxyl terminus（カルボキシル末端）」）は、それぞれポリペプチドのアミノ最末端及びカルボキシル最末端を指し、一方で、用語「N-terminal（N末端側）」及び「C-terminal（C末端側）」は、ポリペプチドのアミノ酸配列中の、それぞれN末端及びC末端に向かった相対位置を指し、それぞれN末端及びC末端の残基を含むことができる。「Immediat

50

ely N-terminal(直N末端)」または「immediately C-terminal(直C末端)」は、第1及び第2のアミノ酸残基が共有結合して連続的なアミノ酸配列をもたらす場合の、第2のアミノ酸残基に対する第1のアミノ酸残基の位置を指す。

#### 【0074】

アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列に関する「に由来する」(例えば、IL-10ポリペプチド「に由来する」アミノ酸配列)は、ポリペプチドまたは核酸が、参照のポリペプチドまたは核酸(例えば、天然に存在するIL-10ポリペプチドまたはIL-10をコードする核酸)の配列に基づく配列を有することを示すことを意図し、タンパク質または核酸が作製される供給源または方法に関して制限されることを意図しない。例として、用語「に由来する」は、参照のアミノ酸またはDNA配列の相同体または変異体を含む。

10

#### 【0075】

ポリペプチドに関する用語「単離された」は、天然に存在する場合、天然に存在することができる環境と異なる環境に存在する目的のポリペプチドを指す。「単離された」は、目的のポリペプチドが実質的に富化された、及び/または目的のポリペプチドが部分的または実質的に精製された試料中にあるポリペプチドを含むことを意図する。ポリペプチドが天然に存在しない場合、「単離された」は、ポリペプチドが、合成または組換えのいずれかの手段によって作製された環境から分離されたことを示す。

20

#### 【0076】

「富化された」は、a)出発試料、例えば、生物試料(例えば、ポリペプチドが天然に存在する、もしくは投与後にポリペプチドが存在する試料)中のポリペプチドの濃度より高い濃度(例えば、少なくとも3倍高い、少なくとも4倍高い、少なくとも8倍高い、少なくとも64倍高い、もしくはそれ以上)、またはb)(例えば、細菌細胞中のような)ポリペプチドが作製された環境より高い濃度で目的のポリペプチドが中に存在するよう、試料が(例えば、科学者によって)非自然的に操作されることを意味する。

30

#### 【0077】

「実質的に純粋」は、成分(例えば、ポリペプチド)が組成物の全含有量の約50%超、典型的には全ポリペプチド含有量の約60%超を構成することを示す。より典型的には、「実質的に純粋」は、全組成物の少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%またはそれ以上が目的の成分である組成物を指す。ある場合には、ポリペプチドは組成物の全含有量の約90%越または約95%越を構成する。

30

#### 【0078】

リガンド/受容体、抗体/抗原または他の結合ペアに言及する場合、用語「特異的に結合する」または「選択的に結合する」は、タンパク質及び他の生物学的物質(biology)の異種集団におけるタンパク質の存在の決定因である結合反応を示す。したがって、指定された条件下で、特定のリガンドが特定の受容体に結合し、且つ試料中に存在する他のタンパク質に有意な量で結合しない。企図される方法の抗体または抗体の抗原結合部位に由来する結合組成物は、任意の他の抗体またはそれに由来する結合組成物との親和性よりも少なくとも2倍大きい、少なくとも10倍大きい、少なくとも20倍大きい、または少なくとも100倍大きい親和性でその抗原またはその変異体もしくはムテインに結合する。特定の実施形態では、抗体は、例えばスキヤッチャード分析(Munson, et al. 1980 Analyt. Biochem. 107: 220-239)によって決定した場合、約10<sup>9</sup>リットル/molを超える親和性を有する。

40

#### 【0079】

IL-10及びPEG-IL-10

ヒトサイトカイン合成阻害因子(CSIF)としても知られる抗炎症性サイトカインIL-10は、IL-19、IL-20、IL-22、IL-24(Mda-7)及びIL-26、インターフェロン(IFN-γ、-β、-δ、-ε、-τ、-γ、-α及び-)ならびにインターフェロン様分子(リミチン、IL-28A、IL-28B及びIL-

50

29)を含む一連のサイトカインである、タイプ(クラス)-2サイトカインとして分類される。

#### 【0080】

IL-10は、免疫調節及び炎症において多面的効果を有するサイトカインである。これは、肥満細胞によって生成され、アレルギー反応部位でこの細胞が有する炎症作用を妨げる。これは、炎症誘発性サイトカイン、例えば、IFN-、IL-2、IL-3、TNF 及びGM-CSFの合成を阻害することができるが、IL-10は、ある種のT細胞及び肥満細胞に対して刺激性もあり、且つB細胞の成熟、増殖及び抗体産生を刺激する。IL-10はNF-B活性をブロックすることができ、JAK-STATAシグナル伝達経路の調節に関与する。これは、CD8+T細胞の細胞毒活性及びB細胞の抗体産生も誘導し、マクロファージ活性及び腫瘍促進性炎症を抑制する。CD8+T細胞の調節は用量依存的であり、高い用量ほど強い細胞毒性応答を誘導する。

#### 【0081】

ヒトIL-10は、分子量が37kDaのホモ二量体であり、各18.5kDaの単量体は178個のアミノ酸を含み、その最初の18個がシグナルペプチド及び2つの分子内ジスルフィド結合を形成する2つのシステイン残基を含む。IL-10二量体は、2つの単量体サブユニット間の非共有結合性相互作用が破壊される際に、生物学的に不活性になる。

#### 【0082】

本開示は、80%の相同性を示すヒトIL-10(NP\_000563)及びマウスIL-10(NP\_034678)、及びこれらの使用を企図する。さらに、本開示の範囲には、ラット(アクセションNP\_036986.2; GI 148747382)；ウシ(アクセションNP\_776513.1; GI 41386772)；ヒツジ(アクセションNP\_001009327.1; GI 57164347)；イヌ(アクセションABY 86619.1; GI 166244598)；及びウサギ(アクセションAAC23839.1; GI 3242896)を含めた、他の哺乳類由来のIL-10オルソログ及びその修飾型が含まれる。

#### 【0083】

先に言及したように、用語「IL-10」、「IL-10ポリペプチド(複数可)」、「IL-10分子(複数可)」、「IL-10薬剤(複数可)」などは、広く解釈されることが意図され、例えば、ヒト及び非ヒトIL-10関連ポリペプチドを含み、これには、それらの相同体、変異体(ムテインを含める)及び断片ならびに例えばリーダー配列(例えばシグナルペプチド)を有するIL-10ポリペプチド及び前述の修飾バージョンが含まれる。さらなる特定の実施形態では、IL-10、IL-10ポリペプチド(複数可)及びIL-10薬剤(複数可)はアゴニストである。

#### 【0084】

タイプIIサイトカイン受容体であるIL-10受容体は、それぞれR1及びR2とも称されるアルファ及びベータサブユニットから成る。受容体の活性化は、アルファ及びベータの両方への結合を必要とする。IL-10ポリペプチドの1つのホモ二量体がアルファに結合し、同じIL-10ポリペプチドの他のホモ二量体がベータに結合する。

#### 【0085】

組換えヒトIL-10の有用性は、その比較的短い血清半減期によって制限されることが多い、これは、例えば、腎クリアランス、タンパク質分解及び血流での单量体化が原因である可能性がある。その結果、その二量体構造を破壊し、それによりその活性に悪影響を及ぼすことなしに、IL-10の薬物動態プロファイルを向上させるために、様々なアプローチが探求されてきた。IL-10のペグ化は、ある種の薬物動態パラメーター(例えば、血清半減期)の向上及び/または活性の増強をもたらす。

#### 【0086】

本明細書で使用する場合、用語「ペグ化IL-10」及び「PEG-IL-10」は、IL-10タンパク質の少なくとも1つのアミノ酸残基に通常リンカーを介して共有結合

し、その結果結合が安定している1つまたは複数のポリエチレングリコール分子を有する、IL-10分子を指す。用語「モノペグ化IL-10」及び「モノ-PEG-IL-10」は、1つのポリエチレングリコール分子が、通常リンカーを介して、IL-10二量体の1つのサブユニットの單一アミノ酸残基に共有結合していることを示す。本明細書で使用する場合、用語「ジペグ化IL-10」及び「ジ-PEG-IL-10」は、少なくとも1つのポリエチレングリコール分子が、通常リンカーを介して、IL-10二量体の各サブユニットの單一残基に結合していることを示す。

#### 【0087】

ある種の実施形態では、本開示で使用されるPEG-IL-10は、1～9個のPEG分子が、IL-10二量体の1つのサブユニットのN末端で、アミノ酸残基のアルファアミノ基にリンカーを介して共有結合している、モノ-PEG-IL-10である。1つのIL-10サブユニットでのモノペグ化は、一般に、サブユニットシャフリングの結果、非ペグ化IL-10、モノペグ化IL-10及びジペグ化IL-10の不均一な混合物をもたらす。さらに、ペグ化反応を完了まで進めることは、一般に、非特異的且つ多重にペグ化IL-10をもたらすので、その生物活性を低減させる。したがって、本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の方法によって生成されたモノペグ化IL-10とジペグ化IL-10の混合物の投与を含む。10

#### 【0088】

特定の実施形態では、PEG部分の平均分子量は約5kDa～約50kDaの間である。IL-10へのPEG結合の方法または部位は重要ではないが、ある種の実施形態では、ペグ化はIL-10薬剤の活性を変化させないか、最低限にしか変化させない。ある種の実施形態では、半減期の増大は、生物学的活性のいかなる低下よりも大きい。PEG-IL-10の生物学的活性は、典型的には、米国特許第7,052,686号に記載されているように、細菌性抗原(リポ多糖(LPS))をチャレンジし、PEG-IL-10で治療した対象の血清中の炎症性サイトカイン(例えば、TNF-αまたはIFN-)レベルを評価することによって測定される。20

#### 【0089】

IL-10変異体は、血清半減期を増大させること、IL-10に対する免疫応答を低減させること、精製または調製を容易にすること、IL-10のその単量体サブユニットへの変換を低下させること、治療効果を向上させること、及び治療的使用間の重症度または副作用の発生を減らすことを含めた、様々な目的を持って調製することができる。アミノ酸配列変異体は、通常、天然に見られない所定の変異体であるが、翻訳後の変異体、例えば、グリコシリ化変異体もあり得る。IL-10変異体が適切なレベルのIL-10活性を保持することを条件として、任意のIL-10変異体を使用することができる。30

#### 【0090】

フレーズ「保存的アミノ酸置換」は、タンパク質中のアミノ酸(複数可)を同様の酸性度、塩基度、電荷、極性または側鎖サイズの側鎖を有するアミノ酸と交換することによってタンパク質の活性を保つ置換を指す。保存的アミノ酸置換は、一般に以下の群内のアミノ酸残基の置換を必要とする：1) L、I、M、V、F、2) R、K；3) F、Y、H、W、R；4) G、A、T、S；5) Q、N；及び6) D、E。置換、挿入または欠失に対するガイダンスは、異なる変異体タンパク質または異なる種由来のタンパク質のアミノ酸配列のアライメントに基づき得る。したがって、天然に存在する任意のIL-10ポリペプチドに加えて、本開示は、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個の、通常、20、10または5個以下のアミノ酸置換を有することを企図し、この場合、置換は通常、保存的アミノ酸置換である。40

#### 【0091】

本開示は、成熟IL-10に由来する連続的なアミノ酸残基を含む、成熟IL-10の活性断片(例えば、部分配列)も企図する。ペプチドまたはポリペプチド部分配列の連続的なアミノ酸残基の長さは、部分配列が由来する天然に存在する特定のアミノ酸配列に応じて変動する。一般に、ペプチド及びポリペプチドは、約20アミノ酸～約40アミノ酸

10

20

30

40

50

、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約60アミノ酸～約80アミノ酸、約80アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約120アミノ酸、約120アミノ酸～約140アミノ酸、約140アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約155アミノ酸、約155アミノ酸～全長ペプチドまたはポリペプチドまであり得る。

#### 【0092】

さらに、IL-10ポリペプチドは、連続的なアミノ酸の定められた長さ（例えば、「比較ウインドウ」）にわたって、参照配列と比較して定められた配列同一性を有し得る。比較のための配列アライメント方法は当技術分野で周知である。比較のための最適な配列アライメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981) の局地的相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970) の相同性アライメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 85: 2444 (1988) の類似性検索法、コンピュータによるこれらのアルゴリズムの実行 (Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis. のGAP、BESTFIT、FASTA及びTFAS TA)、または手動アライメント及び目視検査（例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement) を参照されたい）によって行うことができる。10

#### 【0093】

一例を挙げると、適切なIL-10ポリペプチドは、約20アミノ酸～約40アミノ酸、約40アミノ酸～約60アミノ酸、約60アミノ酸～約80アミノ酸、約80アミノ酸～約100アミノ酸、約100アミノ酸～約120アミノ酸、約120アミノ酸～約140アミノ酸、約140アミノ酸～約150アミノ酸、約150アミノ酸～約155アミノ酸、約155アミノ酸～全長ペプチドまたはポリペプチドまでの連続的な区間に對して、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%または少なくとも約99%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。20

#### 【0094】

以下でさらに述べるように、IL-10ポリペプチドは、天然源（例えば、その天然に存在する環境以外の環境）から単離することができ、（例えば、細菌、酵母、ピキア、昆虫細胞などの遺伝子改变宿主細胞において）組換えで作製することもでき、この場合、遺伝子改变宿主細胞は、該ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を用いて改変される。IL-10ポリペプチドは、（例えば、無細胞化学合成によって）合成的に生成することもできる。30

#### 【0095】

その天然に存在する及び天然に存在しないアイソフォーム、アレル変異体及びスプライスバリエントを含めた、IL-10薬剤をコードする核酸分子が本開示で企図される。本開示は、1つまたは複数の塩基が天然に存在するDNA配列と異なるが、それでも、遺伝暗号の縮重の結果、IL-10ポリペプチドに対応するアミノ酸配列に翻訳される核酸配列も包含する。40

#### 【0096】

##### キメラ抗原受容体T細胞

キメラ抗原受容体T細胞 (CAR；人工T細胞受容体、キメラT細胞受容体及びキメラの免疫受容体としても知られる) は、癌（例えば、B及びT細胞リンパ腫の治療）及び他の悪性腫瘍に対する、新たに出現した療法を示す。CAR-T T細胞は、一般に、例えば目的の腫瘍に存在する既知の抗原に対して特異的な組換えT細胞受容体を発現するように改変された、患者由来のメモリーCD8+T細胞を含む。本明細書で企図される他の種類のT細胞としては、ナイーブT細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリ-T細胞またはこれらの組み合わせが挙げられる。本開示は、一般に、癌治療のためのCAR-T細胞療法の使用に関連して記載されているが、このような療法はそのように限定

10

20

30

40

50

されないことを理解されたい。

【0097】

C A R - T 細胞療法は、養子細胞移入（A C T）の使用を含む。患者自身の培養T細胞を利用するA C Tは、患者特異的癌療法として将来性を示した（S n o o k a n d W a l d m a n ( 2 0 1 3 ) D i s c o v M e d 1 5 ( 8 1 ) : 1 2 0 - 2 5 ）。定められた特異性の抗原標的化受容体をT細胞に入れるための遺伝子工学的アプローチの使用は、A C Tの潜在的能力を大きく伸ばした。ほとんどの場合、これらの操作したキメラ抗原受容体は、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に移植するために使用される。

【0098】

C A R - T 細胞療法の開始は、患者からT細胞を取り出すことを含む。次いで、既知の癌（例えば、腫瘍）に対して特異的な抗原に対するC A Rを発現するようにT細胞を遺伝子操作する。十分な数までエキソビオで増幅させた後、自己の細胞を患者に注入して戻し、癌を抗原特異的に破壊する。

10

【0099】

C A Rは、一般に細胞外腫瘍結合部分と、最も一般的にはモノクローナル抗体の単鎖可変断片（s c F v）と融合した細胞内T細胞シグナリングドメインから成る抗原標的化受容体の1種である。C A Rは、M H C媒介性提示から独立して細胞表面抗原を直接認識し、これによって、すべての患者の任意の所与の抗原に対して特異的な单一受容体コンストラクトの使用が可能になる。

【0100】

20

キメラ抗原受容体は一般にいくつかの主成分を含み、そのうちのいくつかを以下に記載する。

【0101】

本明細書で使用する場合、フレーズ「抗原特異的標的化領域」（A S T R）は、C A Rを特異的抗原に導く領域を指す。C A Rの標的化領域は細胞外にある。本開示の特定の実施形態では、C A Rは、少なくとも2種の異なる抗原を標的にする、少なくとも2つの標的化領域を含む。さらなる特定の実施形態では、C A Rは、少なくとも3種以上の異なる抗原を標的にする、3つ以上の標的化領域を含む。いくつかの実施形態では、抗原特異的標的化領域は、抗体もしくはその機能的均等物またはそれらの断片もしくはそれらの誘導体を含み、各標的化領域は異なる抗原を標的にする。標的化領域は、全長重鎖、F a b 断片、单鎖F v（s c F v）断片、二価单鎖抗体またはダイアボディを含むことができ、これらのそれぞれは標的抗原に特異的である。本開示のある種の態様では、標的化領域は、免疫応答を促進するために、連結したサイトカイン、天然に存在する受容体由来のリガンド結合ドメイン、受容体に対する可溶性タンパク質-ペプチドリガンド、ペプチド、アフィビオディ及びワクチンを含むことができる。当業者は、抗原特異的標的化領域として使用することができる他の分子を知っている。

30

【0102】

本明細書で使用する場合、用語「細胞外スペーサードメイン」（E S D）は、抗原特異的標的化領域と膜貫通ドメインの間の親水性領域を指す。本開示は、C A RがE S Dを含む実施形態を企図し、その例としては、F c A b 断片もしくはその断片もしくは誘導体；抗体のヒンジ領域もしくはその断片もしくは誘導体；抗体のC H 2もしくはC H 3領域；G 1 y 3もしくはI g G（例えばヒトI g G 4）のC H 1及びC H 3ドメインを含めた人工スペーサー配列；または前述の組み合わせが挙げられる。当業者は他のE S Dを知つており、それらは本明細書で企図される。

40

【0103】

本明細書で使用する場合、用語「膜貫通ドメイン」（T M D）は、原形質膜を横切る、C A Rの領域を指す。いくつかの実施形態では、膜貫通領域は膜貫通タンパク質（例えば、タイプI膜貫通タンパク質）、人工疎水性配列またはこれらの組み合わせである。当業者は、本開示の教示と併せて使用することができる他の膜貫通ドメインを知っている。

【0104】

50

本明細書で使用する場合、用語「細胞内シグナリングドメイン」( I S D ) 及び「細胞質内ドメイン」は、エフェクター機能シグナルを伝達し、その特殊化した機能を実施するように細胞に指示する、C A R の一部分を指す。I S D の例としては、T - 細胞受容体複合体のゼータ鎖またはその相同体( 例えば、エータ鎖、F c R 1 及び鎖、M B 1 ( I g ) 鎖、B 2 9 ( I g ) 鎖など)のうちのいずれか、ヒトC D 3 ゼータ鎖、C D 3 ポリペプチド( 、及び )、s y k ファミリーチロシンキナーゼ( S y k 、Z A P 7 0 など)、s r c ファミリーチロシンキナーゼ( L c k 、F y n 、L y n など)ならびにT 細胞伝達に関与する他の分子、例えば、C D 2 、C D 5 及びC D 2 8 が挙げられる。当業者は、本開示の教示と併せて使用することができる他のI S D を知っている。

## 【 0 1 0 5 】

10

用語「共刺激性ドメイン」( C S D ) は、メモリー細胞の増殖、生存または発生を増強するC A R の一部分を指す。本明細書の他の個所で示すように、本開示のC A R は、1つまたは複数の共刺激性ドメインを含むことができる。本開示のいくつかの実施形態では、C S D は、T N F R スーパーファミリーの1つまたは複数メンバー、すなわち、C D 2 8 、C D 1 3 7 ( 4 - 1 B B ) 、C D 1 3 4 ( O X 4 0 ) 、D a p 1 0 、C D 2 7 、C D 2 、C D 5 、I C A M - 1 、L F A - 1 ( C D 1 1 a / C D 1 8 ) 、L c k 、T N F R - I 、T N F R - I I 、F a s 、C D 3 0 、C D 4 0 またはそれらの組み合わせを含む。当業者は、本開示の教示と併せて使用することができる他の共刺激性ドメインを知っている。

## 【 0 1 0 6 】

本明細書に記載のC A R - T T 細胞技術と併せて使用する場合、用語「リンカー」、「リンカードメイン」及び「リンカー領域」は、本開示のC A R のドメイン / 領域のうちのいずれかを一緒に連結する、約1 ~ 1 0 0 アミノ酸の長さのオリゴ領域またはポリペプチド領域を指す。リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに自由に移動できるように、グリシン及びセリンのようなフレキシブル残基から構成され得る。ある種の実施形態は、2つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないことを確実にすることが望ましい場合に、より長い長さのリンカーの使用を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは切断不可能であるが、他の場合、リンカーは切断可能である( 例えば、2 A リンカー( 例えばT 2 A ) 、2 A 様リンカーまたはこれらの機能的均等物及び前述の組み合わせ )。リンカーがピコルナウイルス2 A 様リンカー、ブタテッショウウイルス( P 2 A ) のC H Y S E L 配列、ゾセアシグナ( T h o s e a a s i g n a ) ウィルス( T 2 A ) またはこれらの組み合わせ、変異体及び機能的均等物を含む、本開示の実施形態が企図される。さらに別の実施形態では、リンカー配列は、2 A グリシンと2 B プロリンの間の切断をもたらすA s p - V a l / I l e - G l u - X - A s n - P r o - G l y ( 2 A ) - p r o ( 2 B ) モチーフを含む。他のリンカーは当業者に容易に明らかになり、本開示の教示を用いた使用が意図される。

20

## 【 0 1 0 7 】

30

C A R - T T 細胞療法の比較的急速な進展があった( 一般に、米国特許出願公開第2 0 1 5 0 0 3 8 6 8 4 号を参照されたい )。第1世代のC A R は、T - 細胞受容体( T C R ) 複合体のC D 3 活性化鎖への抗原認識ドメインの融合を対象とした。こうした第1世代のC A R はT 細胞のエフェクター機能をインビトロで誘導したが、インビトロでの有効性はその不十分な抗腫瘍効力によって大きく制限された。C A R 技術の発展によって第2世代のC A R がもたらされ、これは1つのC S D と並んでC D 3 活性化鎖を含み、この例としては、C D 2 8 または様々なT N F 受容体ファミリー分子、例えば4 - 1 B B ( C D 1 3 7 ) 及びO X 4 0 ( C D 1 3 4 ) 由来の細胞内ドメインが挙げられる。C D 3 活性化鎖に加えて2種の共刺激シグナルを含む第3世代のC A R が開発され、C S D は最も一般的にはC D 2 8 及び4 - 1 B B に由来する。第2及び第3世代のC A R は、抗腫瘍効力を劇的に向上させた。しかし、共刺激分子の特定の組み合わせが他のものよりも有利であるかどうかは完全には明らかでない。さらに、第2及び第3世代のC A R の効力の増大は、真に腫瘍特異的抗原標的がないことと相まって、重度の毒性の危険性も増大させた( 例えば、C a r p e n i t o e t a l . ( 2 0 0 9 ) P r o c N a t l A c a d )

40

50

Sci USA 106(9) : 3360 - 65 ; Grupp et al. (2013)  
N Engl J Med 368(16) : 1509 - 18 を参照されたい)。

#### 【0108】

##### 活性化誘導細胞死

特異的標的抗原に対する遺伝子操作したT細胞の注入は、長期の疾患管理、細胞毒性化学療法のものまたは標的療法と類似した作用の急速な開始及びT細胞レパートリーの免疫寛容とMHC拘束の両方の回避を含めた、いくつかの潜在的利益を有する。しかし、CAR-T細胞療法によるある種の癌（例えば、非B細胞悪性腫瘍）の治療は、標的抗原を発現する正常組織を標的化する抗原特異的毒性の誘導と命に関わるサイトカイン放出症候群をもたらすこともあるCAR-T細胞治療の極端な効力の両方によって、部分的に制限されてきた（Maggee (Nov. 2014) Discov Med 18(100) : 265 - 71）。特に、著しい抗原負荷量を伴う高親和性T細胞受容体相互作用が活性化誘導細胞死を導き得ることが観察された（Song et al. (2012) Blood 119(3) : 696 - 706；Hombach et al (2013) Mol Ther 21(12) : 2268 - 77）。

10

#### 【0109】

Fasリガンド（例えば、FasL、CD95リガンド）とのFas受容体（例えば、Fas、CD95）の相互作用に起因するプログラム細胞死である活性化誘導細胞死（AICD）は、末梢性免疫寛容を維持するのに役立つ。AICDエフェクター細胞はFasLを発現し、Fas受容体を発現する細胞でアポトーシスが誘導される。活性化誘導細胞死は、そのT細胞受容体の反復性刺激に起因する、活性化Tリンパ球の負の制御因子である。このプロセスを変えることは、自己免疫疾患につながり得る（Zhang J, et al. (2004) Cell Mol Immunol. 1(3) : 186 - 92）。

20

#### 【0110】

機構的に、Fas受容体へのFasリガンドの結合はFas受容体の三量体化を誘発し、次いで、その細胞質内ドメインは、アダプタータンパク質FADD（デスドメインを有するFas結合タンパク質（Fas-associated protein with death domain））のデスドメインと結合することができる。プロカスパーぜ8はFADDのデスエフェクタードメインに結合し、タンパク分解的にカスパーぜ8を自己活性化し、Fas、FADD及びプロカスパーぜ8は、デス誘導シグナリング複合体（death-inducing signaling complex）と一緒に形成する。活性化カスパーぜ8はサイトゾルに放出され、ここで、アポトーシスを惹起するカスパーぜカスケードを活性化する（Nagata S. (1997) Cell. 88(3) : 355 - 65s）。

30

#### 【0111】

活性化誘導増殖とエフェクター細胞死の間のバランスは、T細胞の恒常性増殖において重要な点である。休止T細胞はアポトーシスになりやすいが、サイトカイン（例えば、IL-2、IL-4、IL-7及びIL-12）の存在下でのTCR/CD3を介するT細胞の刺激は、クローン性増殖をもたらす。興味深いことに、T細胞の恒常性におけるこれらの分子の役割は、矛盾していることがある。例として、IL-2はCD4+T細胞の増殖及び生存に必要であるが、これは、活性化誘導細胞死の必要条件でもある。さらに、IL-18が活性化CD8+T細胞の増殖及び生存を促進することが示された。IL-18は、刺激への暴露後に特定の機能を有するCD8+T細胞集団のサイズを調節することによって、免疫/炎症反応に影響し得る。活性化T細胞の増殖と活性化誘導細胞死の調節は、免疫/炎症反応と密接に関連している（Li, W., et al. (July 2007) J Leukocyte Bio 82(1) : 142 - 51）。

40

#### 【0112】

##### CAR-T T細胞療法へのIL-10の効果

IL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）の特性は本明細書の他の個所で記載されている。抗炎症性及び免疫抑制分子として、IL-10は、抗原提示、CD4+T細胞

50

の機能、CD8+T細胞の病原体特異的機能 (Biswas et al. (2007) J Immunol 179 (7) : 4520 - 28)、ウイルスエピトープ特異的なCD8+T細胞のIFN応答 (Liu et al. (2003) J Immunol 171 (9) : 4765 - 72) 及び抗LCMV (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス) CD8+T細胞応答 (Brooks et al. (2008) PNAS USA 105 (51) : 20428 - 433) を阻害する。

#### 【0113】

IL-10は活性化誘導細胞死の増強に関連して議論されたが (Georgescu et al. (1997) J Clin Invest 100 (10) : 2622 - 33)、本明細書に提示するインビトロ及びインビボデータは、IL-10薬剤 (例えば、PEG-IL-10) をCAR-T T細胞療法と組み合わせて、活性化誘導細胞死を予防または制限し、一方でCD8+T細胞の機能及び生存を増強できることを示す。  
10

#### 【0114】

例として、実験セクションの実施例1に提示する発見は、PEG-IL-10の投与がCD8+T細胞の免疫活性化を媒介したことを示唆する。実施例1に記載されているように、腫瘍学の患者において、PEG-rHuIL-10による治療の前後に、PD-1-及びLAG3を発現するCD8+T細胞の数を比較した (実施例1を参照されたい)。PD-1及びLAG3の両方は、CD8+T細胞活性化及び細胞毒性機能のマーカーである。PD-1を発現する末梢CD8+T細胞の数は約2倍まで増加し、LAG3を発現する末梢CD8+T細胞の数は約4倍まで増加した。全体として見れば、これらのデータは、PEG-IL-10の投与がCD8+T細胞の免疫活性化を媒介したことを示す。  
20

#### 【0115】

PEG-IL-10の投与は、活性化メモリーCD8+T細胞の機能を増強することも観察された (実施例2を参照されたい)。メモリーT細胞 (抗原経験T細胞とも称される) は、前の感染、癌への暴露または以前のワクチン接種の間に、そのコグネイト抗原に以前に遭遇及び応答したTリンパ球のサブセット (例えば、ヘルパーT細胞 (CD4+) 及び細胞障害性T細胞 (CD8+)) である。これに対して、ナイーブT細胞は末梢内でそのコグネイト抗原に遭遇しておらず、これは、一般に、活性化マーカーのCD25、CD44またはCD69がないこと、及びメモリーCD45ROアイソフォームがないことを特徴とする。一般にCD45RO+であるメモリーT細胞は、ナイーブT細胞よりも速く強い免疫応答を再現及び開始することができる。  
30

#### 【0116】

CAR-T T細胞がメモリーCD8+T細胞に由来するので、メモリーCD8+T細胞に対するPEG-IL-10の効果を、インビトロで評価した。実施例2で提示するデータは、活性化メモリーCD8+T細胞の機能を増強するためのPEG-IL-10の効果と矛盾がない。

#### 【0117】

##### 方法及びモデル

本開示は、本明細書に記載の療法に応答性であり得る、CAR-T細胞療法の結果として活性化誘導細胞死を受けたまたは受けた疑いがある候補の対象集団 (または個々の対象) を特定するための様々な方法及びモデルを企図する。このような療法は、IL-10薬剤 (例えば、PEG-IL-10) による単独療法及びIL-10薬剤と活性化誘導細胞死の予防または制限において有益な活性を示すことが示されている1種または複数の別個の薬剤による併用療法を含む。いくつかの実施形態では、方法及びモデルは、IL-10薬剤の投与が所望のレベルの活性化誘導細胞死の低減を達成するかどうか、またはIL-10薬剤と別の薬剤の組み合わせがより有益であるかどうかの決定を可能にする。他の実施形態では、方法及びモデルは、組み合わせの投与によって、望ましくない効果がより少なくなるかどうかを決定することを可能にする。  
40

#### 【0118】

本開示のある種の実施形態は、インビトロ、エキソビオ及びインビボの方法及び / また

10

20

30

40

50

はモデルの使用を含む。本開示のある種の実施形態では、対象集団（または個々の対象）は非ヒト動物（例えば、げっ歯類）またはヒトである。

#### 【0119】

例として、限定されないが、本開示の一態様は、活性化誘導細胞死を受けたまたは受けた疑いがある試験対象が IL - 10 薬剤（例えば、PEG - IL - 10）による治療の候補であるかどうかを決定する方法を企図し、この方法は、a) 活性化誘導細胞死の兆候を有する試験対象を提供すること、b) 参照集団において所望の応答を達成するのに十分な量で IL - 10 薬剤を試験対象に投与すること、及び c) 試験対象が所望の応答を示すかどうかを決定することを含み、ここでは、所望の応答の決定が試験対象が治療の候補であることを示す。当業者は、併用療法を用いる使用のために、このような方法を改変することができる。所望の応答は、その状況下で好ましいと考えられるいかなる結果でもよい。

10

#### 【0120】

前述のように、本開示は様々なモデルも企図する。信頼でき、再現性のある結果を提供する任意のモデルを使用することができる。当業者は、本開示の主題と併せて使用することができるモデルに精通しており、一実施形態では、IL - 10 薬剤（例えば、PEG - IL - 10）は、非ヒト対象（例えば、マウス）を含むモデルで評価される。本開示の特定の実施形態は、別の薬剤と組み合わせたまたは別の薬剤なしの IL - 10 薬剤が、活性化誘導細胞死を予防するまたは低減させるための候補であるかどうかを決定するためのモデルを企図する。

20

#### 【0121】

さらなる本開示の実施形態は、別の薬剤と組み合わせたまたは別の薬剤なしの IL - 10 薬剤の最適量を決定するための方法またはモデルを含む。最適量は、例えば、対象または対象集団において最適な効果を達成する量でもよい。薬剤（複数可）の量を操作することによって、臨床医は、活性化誘導細胞死を予防するまたは低減させるための最適な投薬レジメンを決定することができる。

#### 【0122】

##### バイオマーカー

本開示は、本明細書に記載の方法及びモデルと併せて、バイオマーカーの使用も企図する。用語「バイオマーカー（複数可）」は、正常な生物学的プロセス、発病プロセスまたは治療介入に対する薬理反応の指標として客観的に測定及び評価した特性を指す。指標は、身体またはその生成物中で測定することができる任意の物質、構造もしくはプロセスでもよく、アウトカムまたは疾患の発生率に影響し、またはそうした発生率を予測する。

30

#### 【0123】

本開示のいくつかの実施形態では、バイオマーカー（複数可）を使用して、IL - 10 薬剤（例えば、PEG - IL - 10）による療法に対する臨床応答（複数可）を予測する。ある場合には、治療前のバイオマーカーをそのような療法で使用することができ、ここでは、バイオマーカーは、標準ケアの治療意思決定の一部として適用することができる点まで検証されている。

#### 【0124】

##### 血清濃度

40

以下を含めたいいくつかの方法で、本明細書に記載の方法における IL - 10 の血漿レベルを特徴づけることができる：(1) ある規定レベルを上回るかレベルの範囲内の平均 IL - 10 血清トラフ濃度；(2) ある期間、ある規定レベルを上回る平均 IL - 10 血清トラフ濃度；(3) ある規定レベルを上回るかある規定レベルより低い、もしくはレベルの範囲内の定常状態 IL - 10 血清濃度レベル；または(4) ある規定レベルを上回るかある規定レベルより低い、またはある範囲のレベル内の濃度プロファイルの C<sub>max</sub>。本明細書に記載されるように、平均血清トラフ IL - 10 濃度は、ある種の適応症における有効性に特に重要であることが分かった。

#### 【0125】

本開示のいくつかの実施形態では、もたらされ得る血漿及び / または血清レベル濃度ブ

50

ロファイルは、以下を含む：約 1 . 0 p g / m L を超える、約 1 0 . 0 p g / m L を超える、約 2 0 . 0 p g / m L を超える、約 3 0 p g / m L を超える、約 4 0 p g / m L を超える、約 5 0 . 0 p g / m L を超える、約 6 0 . 0 p g / m L を超える、約 7 0 . 0 p g / m L を超える、約 8 0 . 0 p g / m L を超える、約 9 0 p g / m L を超える、約 0 . 1 n g / m L を超える、約 0 . 2 n g / m L を超える、約 0 . 3 n g / m L を超える、約 0 . 4 n g / m L を超える、約 0 . 5 n g / m L を超える、約 0 . 6 n g / m L を超える、約 0 . 7 n g / m L を超える、約 0 . 8 n g / m L を超える、約 0 . 9 n g / m L を超える、約 1 . 0 n g / m L を超える、約 1 . 5 n g / m L を超える、約 2 . 0 n g / m L を超える、約 2 . 5 n g / m L を超える、約 3 . 0 n g / m L を超える、約 3 . 5 n g / m L を超える、約 4 . 0 n g / m L を超える、約 4 . 5 n g / m L を超える、約 5 . 0 n g / m L を超える、約 5 . 5 n g / m L を超える、約 6 . 0 n g / m L を超える、約 6 . 5 n g / m L を超える、約 7 . 0 n g / m L を超える、約 7 . 5 n g / m L を超える、約 8 . 0 n g / m L を超える、約 8 . 5 n g / m L を超える、約 9 . 0 n g / m L を超える、約 9 . 5 n g / m L を超える、または約 1 0 . 0 n g / m L を超える平均 I L - 1 0 血漿及び／または血清トラフ濃度。

#### 【 0 1 2 6 】

本開示の特定の実施形態では、平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度は 1 . 0 p g / m L ~ 1 0 n g / m L の範囲である。いくつかの実施形態では、平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度は 1 . 0 p g / m L ~ 1 0 0 p g / m L の範囲である。他の実施形態では、平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度は 0 . 1 n g / m L ~ 1 . 0 n g / m L の範囲である。さらに他の実施形態では、平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度は 1 . 0 n g / m L ~ 1 0 n g / m L の範囲である。本開示は、そのような範囲が明確に記載されていなくても、本明細書に記載されるものによって包含される任意の濃度を組み入れる範囲を企図することを理解されたい。例として、一実施形態の平均血清 I L - 1 0 濃度は 0 . 5 n g / m L ~ 5 n g / m L の範囲でもよい。さらなる例として、本開示の特定の実施形態は、約 0 . 5 n g / m L ~ 約 1 0 . 5 n g / m L 、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 1 0 . 0 n g / m L 、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 9 . 0 n g / m L 、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 8 . 0 n g / m L 、約 1 . 0 n g / m L ~ 約 7 . 0 n g / m L 、約 1 . 5 n g / m L ~ 約 1 0 . 0 n g / m L 、約 1 . 5 n g / m L ~ 約 9 . 0 n g / m L 、約 1 . 5 n g / m L ~ 約 8 . 0 n g / m L 、約 1 . 5 n g / m L ~ 約 7 . 0 n g / m L 、約 2 . 0 n g / m L ~ 約 1 0 . 0 n g / m L 、約 2 . 0 n g / m L ~ 約 9 . 0 n g / m L 、約 2 . 0 n g / m L ~ 約 8 . 0 n g / m L 及び約 2 . 0 n g / m L ~ 約 7 . 0 n g / m L の範囲の平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度を含む。

#### 【 0 1 2 7 】

特定の実施形態では、1 ~ 2 n g / m L の平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度が治療期間にわたって維持される。本開示は、平均 I L - 1 0 血清ピーク濃度が治療期間にわたって約 1 0 . 0 n g / m L 以下である実施形態も企図する。さらなる実施形態は、約 1 . 0 p g / m L 以上の平均 I L - 1 0 血清トラフ濃度を企図する。最適な平均血清濃度は、一般に、望まれない有害作用をもたらすことなしに所望の治療効果が達成されるものである。

#### 【 0 1 2 8 】

本開示のある種の実施形態は、有害作用を予測し、それにより有害作用を潜在的に回避するために、I L - 1 0 療法を受ける対象をモニターする方法を提供し、この方法は、以下を含む：( 1 ) 対象の I L - 1 0 のピーク濃度を測定すること；( 2 ) 対象の I L - 1 0 のトラフ濃度を測定すること；( 3 ) ピークトラフ変動を計算すること、及び( 4 ) 計算したピークトラフ変動を使用して、対象における潜在的有害作用を予測すること。特定の対象集団では、ピークトラフ変動が小さいほど対象が I L - 1 0 関連有害作用を経験するであろう確率が低いことを示す。さらに、いくつかの実施形態では、特定の投薬パラメータを使用して、特定のピークトラフ変動が特定の疾患、障害及び状態の治療ために決定され、それらの変動が参照標準として使用される。

#### 【 0 1 2 9 】

大多数の薬物について、血漿薬物濃度は多次指数関数的に低減する。静脈内投与の直後

10

20

30

40

50

に、薬物は初期空間（最低限、血漿容積と定義される）全体にわたって急速に分布し、次いで、血管外空間（例えば、ある種の組織）へのよりゆっくりとした平衡型分布が起こる。静脈内 IL-10 投与は、このような 2 つのコンパートメントキネティックモデルと関係がある (Rachmawati, H. et al. (2004) Pharm. Res. 21 (11) : 2072 - 78 を参照されたい）。皮下の組換え hIL-10 の薬物動態も研究された (Radwanski, E. et al. (1998) Pharm. Res. 15 (12) : 1895 - 1901)。したがって、適切な IL-10 投薬関連パラメーターを評価する場合に、分布容積の考慮が関係する。さらに、IL-10 薬剤を特定の細胞型に標的化するための試みが探求されており（例えば、Rachmawati, H. (May 2007) Drug Met. Dist. 35 (5) : 814 - 21 を参照されたい）、IL-10 の薬物動態及び投薬原理の活用は、そのような試みの成功にとって非常に貴重であると判明し得る。

#### 【0130】

本開示は、上記の IL-10 血清トラフ濃度のいずれかの維持をもたらす任意の用量及び投薬レジメンの投与を企図する。例として、限定されないが、対象がヒトである場合、非ペグ化 hIL-10 を、0.5 μg / kg / 日を超える、1.0 μg / kg / 日を超える、2.5 μg / kg / 日を超える、5 μg / kg / 日を超える、7.5 μg / kg を超える、10.0 μg / kg を超える、12.5 μg / kg を超える、15 μg / kg / 日を超える、17.5 μg / kg / 日を超える、20 μg / kg / 日を超える、22.5 μg / kg / 日を超える、25 μg / kg / 日を超える、30 μg / kg / 日を超える、または 35 μg / kg / 日を超える用量で投与することができる。さらに、例として、限定されないが、対象がヒトである場合、比較的小さな PEG を含むペグ化された hIL-10 (例えば、5 kDa のモノ - 、ジ - PEG - hIL-10) を、0.5 μg / kg / 日を超える、0.75 μg / kg / 日を超える、1.0 μg / kg / 日を超える、1.25 μg / kg / 日を超える、1.5 μg / kg / 日を超える、1.75 μg / kg / 日を超える、2.0 μg / kg / 日を超える、2.25 μg / kg / 日を超える、2.5 μg / kg / 日を超える、2.75 μg / kg / 日を超える、3.0 μg / kg / 日を超える、3.25 μg / kg / 日を超える、3.5 μg / kg / 日を超える、3.75 μg / kg / 日を超える、4.0 μg / kg / 日を超える、4.25 μg / kg / 日を超える、4.5 μg / kg / 日を超える、4.75 μg / kg / 日を超える、または 5.0 μg / kg / 日を超える用量で投与することができる。

#### 【0131】

特定の IL-10 血清濃度などを達成するのに必要な IL-10 の血清濃度、用量及び治療プロトコールに関する先行する議論は、IL-10 薬剤（例えば、PEG - IL-10）による単独療法に関するが、1つまたは複数のさらなる療法と組み合わせて IL-10 薬剤（例えば、PEG - IL-10）が投与されるが投与される場合、当業者（例えば、薬理学者）は、最適な投薬レジメン（複数可）を決定することができる。

#### 【0132】

##### IL-10 の生成方法

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

#### 【0133】

##### A. 化学合成

ポリペプチドを化学的に合成する場合は、合成は液相または固相を介して進行することができる。固相ペプチド合成 (SPPS) によって、非天然アミノ酸（異常アミノ酸）及び／またはペプチド / タンパク質骨格修飾の組み込みが可能になる。様々な形態の SPPS、例えば、9 - フルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 及び t - プチルオキシカルボニル (Boc) が本開示のポリペプチドの合成に利用可能である。化学合成の詳細は当技術分野で既知である（例えば、Ganesan A. (2006) Mini Rev. Med. Chem. 6 : 3 - 10；及び Camarero J. A. et al. , (2010) 50

05) Protein Pept Lett. 12: 723 - 8)。

【0134】

固相ペプチド合成は、以下に記載のように実施することができる。アルファ官能基(N)及び任意の反応性側鎖を酸不安定性基または塩基不安定性基で保護する。保護基はアミド結合を連結する条件下で安定であるが、形成されたペプチド鎖を損なうことなしに容易に切断することができる。-アミノ官能基に対する適切な保護基としては、限定されないが、以下が挙げられる：Boc、ベンジルオキシカルボニル(Z)、O-クロロベンジルオキシカルボニル、ビ-フェニルイソプロピルオキシカルボニル、tert-アミルオキシカルボニル(Amoc)、-ジメチル-3,5-ジメトキシ-ベンジルオキシカルボニル、o-ニトロスルフェニル、2-シアノ-t-ブトキシカルボニル、Fmoc、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル(Dde)など。

【0135】

適切な側鎖保護基としては、限定されないが、以下が挙げられる：アセチル、アリル(A11)、アリルオキシカルボニル(A11oc)、ベンジル(Bz1)、ベンジルオキシカルボニル(Z)、t-ブチルオキシカルボニル(Boc)、ベンジルオキシメチル(Bom)、o-ブロモベンジルオキシカルボニル、t-ブチル(tBu)、t-ブチルジメチルシリル、2-クロロベンジル、2-クロロベンジルオキシカルボニル、2,6-ジクロロベンジル、シクロヘキシル、シクロペンチル、1-(4,4-ジメチル-2,6-ジオキソシクロヘキサ-1-イリデン)エチル(Dde)、イソプロピル、4-メトキシ-2,3-6-トリメチルベンジルスルホニル(Mtr)、2,3,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル(Pmc)、ピバリル、テトラヒドロピラン-2-イル、トシリル(Tos)、2,4,6-トリメトキシベンジル、トリメチルシリル及びトリチル(Trt)。

【0136】

固相合成では、C末端側アミノ酸を適切な支持材料にカップリングさせる。適切な支持材料は、合成プロセスの段階的縮合及び切断反応に関する試薬及び反応条件に対して不活性であるもの、及び使用される反応媒体に溶解しないものである。市販の支持材料の例としては、反応基及び/またはポリエチレングリコールで修飾されたスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー；クロロメチル化されたスチレン/ジビニルベンゼンコポリマー；ヒドロキシメチル化またはアミノメチル化されたスチレン/ジビニルベンゼンコポリマーなどが挙げられる。ペプチド酸の調製が所望される場合は、4-ベンジルオキシベンジル-アルコール(Wang-アンカー)または2-クロロトリチルクロリドで誘導体化されたポリスチレン(1%)ジビニルベンゼンまたはTentaGel(登録商標)を使用することができる。ペプチドアミドの場合には、5-(4'-アミノメチル)-3',5'-ジメトキシフェノキシ)吉草酸(PAL-アンカー)またはp-(2,4-ジメトキシフェニル-アミノメチル)-フェノキシ基(Rinkアミドアンカー)で誘導体化されたポリスチレン(1%)ジビニルベンゼンまたはTentaGel(登録商標)を使用することができる。

【0137】

ポリマー支持体への結合は、室温または高温(例えば、40~60の間)で、例えば2~72時間の反応時間で、エタノール、アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、ジクロロメタン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドンまたは同様の溶媒中に活性化試薬を添加することにより、C末端側のFmoc保護されたアミノ酸を支持材料と反応させることによって達成することができる。

【0138】

PAL、WangまたはRinkアンカーへのN保護されたアミノ酸(例えば、Fmocアミノ酸)のカップリングは、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールまたは1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾールの存在下または非存在下で、例えば、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド

10

20

30

40

50

(D I C) または他のカルボジイミド、2 - (1 H - ベンゾトリアゾル - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレート (T B T U) または他のウロニウム塩、O - アシル - 尿素、ベンゾトリアゾル - 1 - イル - トリス - ピロリジノ - ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (P y B O P) または他のホスホニウム塩、N - ヒドロキシスクシンイミド、他のN - ヒドロキシイミドまたはオキシムなどのカップリング試薬を用いて、例えば、H O B t を添加したT B T Uを用いて、例えば、ジイソプロピルエチルアミン (D I E A) 、トリエチルアミンまたはN - メチルモルホリンなどの塩基、例えば、ジイソプロピルエチルアミンを添加して、または添加しないで、2 ~ 7 2 時間の反応時間で (例えば、1 . 5 ~ 3 倍過剰のアミノ酸及びカップリング試薬 (例えば、2 倍過剰) で 3 時間、約 1 0 ~ 5 0 の間の温度、例えば 2 5 で、ジメチルホルムアミド、N - メチルピロリドンまたはジクロロメタンなどの溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド中で ) 行うことができる。

#### 【0139】

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

#### 【0140】

ジクロロメタン中で、D I E Aを加えて、1 0 ~ 1 2 0 分、例えば 2 0 分の反応時間で、N - 保護されたアミノ酸 (例えば、F m o c アミノ酸) を 2 - クロロトリチル樹脂にカップリングさせることができるが、この溶媒及びこの塩基の使用に限定されない。

#### 【0141】

保護されたアミノ酸の連続的カップリングを、ペプチド合成の従来の方法に従って、典型的には自動ペプチド合成機で行うことができる。例えば、ピペリジン (1 0 % ~ 5 0 %) のジメチルホルムアミド溶液で 5 ~ 2 0 分間、例えば、5 0 % ピペリジンのD M F 溶液で 2 × 2 分間及び 2 0 % ピペリジンのD M F 溶液で 1 × 1 5 分間処理することによって、固相上にカップリングしたアミノ酸のN - F m o c 保護基を切断した後、ジクロロメタン、D M F またはこれら 2 つの混合物などの不活性な非水性極性溶媒中で、約 1 0 ~ 5 0 の間の温度で、例えば 2 5 で、3 ~ 1 0 倍過剰量、例えば、1 0 倍過剰量の次の保護されたアミノ酸を先のアミノ酸にカップリングする。P A L 、W a n g またはR i n k アンカーへ第 1 の N - F m o c アミノ酸をカップリングするための先に述べた試薬は、カップリング試薬として適切である。保護されたアミノ酸の活性エステルまたはそれらの塩化物もしくはフッ化物もしくは対称無水物を代替物として使用することもできる。

#### 【0142】

固相合成の終わりに、ペプチドが支持材料から切断され、同時に側鎖保護基を切断する。切断は、ジメチルスルフィド、エチルメチルスルフィド、チオアニソール、チオクレゾール、m - クレゾール、アニソールエタンジチオール、フェノールまたは水などの 5 % ~ 2 0 % V / V のスカベンジャー、例えば、1 5 % v / v のジメチルスルフィド / エタンジチオール / m - クレゾール 1 : 1 : 1 を添加したトリフルオロ酢酸または他の強酸性媒体を用いて、0 . 5 ~ 3 時間以内、例えば、2 時間以内で行うことができる。完全に保護された側鎖を有するペプチドは、氷酢酸 / トリフルオロエタノール / ジクロロメタン 2 : 2 : 6 で 2 - クロロトリチルアンカーを切断することによって得られる。シリカゲルによるクロマトグラフィーによって、保護されたペプチドを精製することができる。W a n g アンカーを介してペプチドが固相に連結している場合、及びC末端側のアルキルアミド化を有するペプチドを得ることが意図される場合、アルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンを用いたアミノリシスによって、切断を行うことができる。アミノリシスは、約 - 1 0 ~ 5 0 の間の温度 (例えば、約 2 5 ) で、約 1 2 ~ 2 4 時間の間の反応時間 (例えば、約 1 8 時間) で行われる。加えて、例えばメタノールを用いる再エステル化によって、ペプチドを支持体から切断することができる。

#### 【0143】

ペプチドを沈殿させるため、したがって、エーテル中に残存するスカベンジャーと切断

10

20

30

40

50

保護基を分離するために、得られる酸性溶液を3～20倍量の冷エーテルまたはn-ヘキサン、例えば、10倍過剰のジエチルエーテルと混合することができる。冰酢酸からペプチドを数回再沈殿させることによって、さらに精製することができる。得られる沈殿物を水またはtert-ブタノールまたはこれら2つの溶媒の混合物に、例えばtert-ブタノール／水の1：1混合物に溶解し、凍結乾燥することができる。

#### 【0144】

アセテート形態の弱塩基性樹脂上のイオン交換；非誘導体化ポリスチレン／ジビニルベンゼンコポリマー（例えば、Ambreline（登録商標）XAD）による疎水性吸着クロマトグラフィー；シリカゲルによる吸着クロマトグラフィー；例えばカルボキシメチルセルロースによるイオン交換クロマトグラフィー；例えばSephadex（登録商標）G-25による分配クロマトグラフィー；向流分配クロマトグラフィー；または高压液体クロマトグラフィー（HPLC）、例えば、オクチルまたはオクタデシルシリカ（ODS）相による逆相HPLCを含めた様々なクロマトグラフィー方法によって、得られたペプチドを精製することができる。10

#### 【0145】

##### B. 組換え生成

ヒト及びマウスのIL-10の調製を記載している方法は、例えば、米国特許第5,231,012号に見出すことができ、これは、組換え及び他の合成技法を含めた、IL-10活性を有するタンパク質の生成方法を教示する。IL-10はウイルス起源でもよく、エピスタインバーウィルス由来のウイルス性IL-10（BCRF1タンパク質）のクローニング及び発現が、Moore et al., (1990) Science 248:1230に開示されている。IL-10は、当技術分野で既知の標準的な技法、例えば本明細書に記載のものを使用する、いくつかの方法で得ることができる。組換えヒトIL-10はまた、例えば、Peprotech, Inc., Rocky Hill, N.J.から市販されている。20

#### 【0146】

組換え技法を使用してポリペプチドを生成する場合は、任意の適切なコンストラクト及び任意の適切な宿主細胞（原核細胞または真核細胞、例えば、それぞれ細菌（例えば、E. coli）または酵母宿主細胞でもよい）を使用して、細胞内タンパク質として、または分泌タンパク質として、ポリペプチドを生成することができる。宿主細胞として使用することができる真核細胞の他の例としては、昆虫細胞、哺乳動物細胞及び／または植物細胞が挙げられる。哺乳類宿主細胞を使用する場合、哺乳類宿主細胞としては、ヒト細胞（例えば、HeLa、293、H9及びジャーカット細胞）；マウス細胞（例えば、NIH3T3、L細胞及びC127細胞）；靈長類細胞（例えば、Cos1、Cos7及びCV1）；ならびにハムスター細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）を挙げることができる。30

#### 【0147】

当技術分野で既知の標準的手順に従って、ポリペプチドの発現に適した様々な宿主-ベクター系を用いることができる。例えば、Sambrook et al., 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York；及びAusubel et al. 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sonsを参照されたい。遺伝物質を宿主細胞に導入する方法としては、例えば、形質転換、エレクトロポレーション、コンジュゲーション、リン酸カルシウム方法などが挙げられる。移入方法は、導入ポリペプチドをコードする核酸の安定的発現をもたらすように選択することができる。ポリペプチドをコードする核酸は、遺伝性のエピソーム要素（例えば、プラスミド）として提供することができ、またはゲノムに組み込むことができる。目的のポリペプチドの生成で使用するための様々な適切なベクターが市販されている。40

#### 【0148】

10

20

30

40

50

ベクターは、宿主細胞において染色体外の維持をもたらすことができ、または宿主細胞ゲノムへの組み込みをもたらすことができる。発現ベクターは、転写及び翻訳調節配列を提供することができ、及び誘導性または構成的発現を提供することができ、ここでは、コード領域は、転写開始領域ならびに転写及び翻訳終結領域の転写制御下で作動可能に連結している。一般に、転写及び翻訳調節配列としては、限定されないが、プロモーター配列、リボゾーム結合部位、転写開始及び終止配列、翻訳開始及び終止配列及びエンハンサーまたはアクチベーター配列を挙げることができる。プロモーターは構成的または誘導性のいずれかでもよく、強い構成的プロモーター（例えば、T7）でもよい。

#### 【0149】

発現コンストラクトは、目的のタンパク質をコードする核酸配列を挿入するための、プロモーター配列の近傍に位置する便利な制限部位を一般に有する。ベクターを含む細胞の選択を容易にするために、発現宿主で作用する選択マーカーが存在してもよい。さらに、発現コンストラクトはさらなる要素を含むことができる。例えば、発現ベクターは、1つまたは2つの複製系を有することができるので、これによって、ベクターが生物体、例えば、発現用の哺乳類細胞または昆虫細胞で、及びクローニング及び增幅用の及び原核宿主で維持されることが可能になる。さらに、発現コンストラクトは、形質転換宿主細胞の選択を可能にするための選択マーカー遺伝子を含むことができる。選択可能な遺伝子は当技術分野で周知であり、使用する宿主細胞によって異なる。

10

#### 【0150】

タンパク質の単離及び精製は、当技術分野で既知の方法に従って達成することができる。例えば、タンパク質を構成的に及び／または誘導時に発現するように遺伝子改変した細胞の可溶化液から、または合成反応混合物から、免疫親和性精製によってタンパク質を単離することができ、これは、一般に、抗タンパク質抗体に試料を接触させること、洗浄して、非特異的結合物質を除去すること、及び特異的結合タンパク質を溶出することを含む。透析及びタンパク質精製で通常用いられる他の方法によって、単離したタンパク質をさらに精製することができる。一実施形態では、金属キレートクロマトグラフィー方法を使用して、タンパク質を単離することができる。タンパク質は、単離を容易にするために修飾を含むことができる。

20

#### 【0151】

実質的に純粋なまたは単離された形態（例えば、他のポリペプチドを含まない）でポリペプチドを調製することができる。ポリペプチドは、存在し得る他の成分（例えば、他のポリペプチドまたは他の宿主細胞成分）と比べてポリペプチドが富化された組成物中に存在し得る。例えば、精製ポリペプチドは、ポリペプチドが他の発現タンパク質を実質的に含まない（例えば、約90%未満、約60%未満、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満または約1%未満）組成物中に存在するように提供することができる。

30

#### 【0152】

IL-10ポリペプチドをコードすることができるコンストラクト提供するために、当技術分野で既知の異なるIL-10関連核酸を操作するための組換え技法を使用して、IL-10ポリペプチド生成することができる。特定のアミノ酸配列が提供される場合は、例えば分子生物学における当業者の背景及び経験の点から見て、そのようなアミノ酸配列をコードする様々な異なる核酸分子を当業者は認識するであろうことが理解されよう。

40

#### 【0153】

##### アミド結合置換

ある場合には、IL-10はペプチド結合以外の1つまたは複数の結合を含み、例えば、少なくとも2つの隣接するアミノ酸がアミド結合以外の結合を介して結合する。例えば、望まれないタンパク質分解または他の分解手段を低減させるまたは排除するために、及び／または血清安定性を増大させるために、及び／または構造的柔軟性の増大を制限するために、IL-10の骨格内の1つまたは複数のアミド結合を置換することができる。

#### 【0154】

50

別の例では、IL-10内の1つまたは複数のアミド結合(-CO-NH-)を、-CH<sub>2</sub>NH-、-CH<sub>2</sub>S-、-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-、-CH=CH-(シス及びトランス)、-COCH<sub>2</sub>-、-CH(OH)CH<sub>2</sub>-または-CH<sub>2</sub>SO-などのアミド結合のアイソスターである結合で交換することができる。IL-10内の1つまたは複数のアミド結合を、例えば、還元アイソスター偽ペプチド結合に交換することもできる。Coudert et al. (1993) Int. J. Peptide Protein Res. 41: 181-184を参照されたい。そのような交換及びその成し遂げ方は当業者に既知である。

#### 【0155】

##### アミノ酸置換

IL-10ポリペプチドにおいて1つまたは複数のアミノ酸置換を行うことができる。以下は非限定例である。

#### 【0156】

a) アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、ノルロイシン、(S)-2-アミノ酪酸、(S)-シクロヘキシリラニンまたは分枝、環状及び直鎖アルキル、アルケニルまたはアルキニル置換を含むC1~C10炭素の脂肪族側鎖によって置換されている他の単純なアルファアミノ酸を含む、アルキル置換疎水性アミノ酸の置換。

#### 【0157】

b) フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン、スルホチロシン、ビフェニルアラニン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、2-ベンゾチエニルアラニン、3-ベンゾチエニルアラニン、ヒスチジン(上に列挙した芳香族アミノ酸のアミノ、アルキルアミノ、ジアルキルアミノ、アザ、ハロゲン化(フルオロ、クロロ、ブロモもしくはヨード)またはアルコキシ(C1~C4)置換形態を含める)を含む、芳香族置換疎水性アミノ酸の置換。その実例は、2-、3-または4-アミノフェニルアラニン、2-、3-または4-クロロフェニルアラニン、2-、3-または4-メチルフェニルアラニン、2-、3-または4-メトキシフェニルアラニン、5-アミノ-、5-クロロ-、5-メチル-または5-メトキシトリプトファン、2'-、3'-または4'-アミノ-、2'-、3'-または4'-クロロ-、2、3または4-ビフェニルアラニン、2'-、3'-または4'-メチル-、2-、3-または4-ビフェニルアラニン及び2-または3-ピリジルアラニンである。

#### 【0158】

c) 置換基がヘテロ原子(例えば、アルファ窒素または末端窒素(複数可)上にあるか、例えばプロ-R位のアルファ炭素上にあるかを問わず、アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン、2,3-ジアミノプロピオン酸、ホモアルギニン(先のアミノ酸のアルキル、アルケニルまたはアリール置換(C1~C10分枝、直鎖または環状)誘導体を含む)を含む、塩基性側鎖含有アミノ酸の置換。実例となる化合物としては、以下が挙げられる:N-イブシロン-イソプロピル-リジン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-グリシン、3-(4-テトラヒドロピリジル)-アラニン、N,N-ガンマ,ガンマ'-ジエチル-ホモアルギニン。アルファ-メチル-アルギニン、アルファ-メチル-2,3-ジアミノプロピオン酸、アルファ-メチル-ヒスチジン、アルファ-メチル-オルニチン(ここでは、アルキル基はアルファ-炭素のプロ-R位を占める)などの化合物も挙げられる。アルキル、芳香族、複素芳香族(ここでは、複素芳香族基は1つまたは複数の窒素、酸素または硫黄原子を单一でまたは組み合わせて有する)、カルボン酸または多くの周知の活性化誘導体、例えば酸塩化物、活性エステル、活性アゾリド及び関連誘導体のいずれか、ならびにリジン、オルニチンまたは2,3-ジアミノプロピオン酸から形成されるアミドも挙げられる。

#### 【0159】

d) アスパラギン酸、グルタミン酸、ホモグルタミン酸、チロシン、2,4-ジアミノプロピオン酸、オルニチンまたはリジンのアルキル、アリール、アリールアルキル及びヘテロアリールスルホンアミド、ならびにテトラゾール置換アルキルアミノ酸を含む、酸性

10

20

30

40

50

アミノ酸の置換。

【0160】

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

【0161】

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

【0162】

ある場合には、IL-10は、1つまたは複数の天然に存在する遺伝的にコードされていないL-アミノ酸、合成L-アミノ酸またはアミノ酸のD-鏡像異性体を含む。例えば、IL-10はD-アミノ酸のみを含むことができる。例えば、IL-10ポリペプチドは、以下の残基の1つまたは複数を含むことができる：ヒドロキシプロリン、-アラニン、o-アミノ安息香酸、m-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸、m-アミノメチル安息香酸、2, 3 - ジアミノプロピオン酸、-アミノイソ酪酸、N-メチルグリシン（サルコシン）、オルニチン、シトルリン、t-ブチルアラニン、t-ブチルグリシン、N-メチルイソロイシン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、ノルロイシン、ナフチルアラニン、ピリジルアラニン3-ベンゾチエニルアラニン、4-クロロフェニルアラニン、2-フルオロフェニルアラニン、3-フルオロフェニルアラニン、4-フルオロフェニルアラニン、ペニシラミン、1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、-2-チエニルアラニン、メチオニンスルホキシド、ホモアルギニン、N-アセチルリジン、2, 4 - ジアミノ酪酸、ロー-アミノフェニルアラニン、N-メチルバリン、ホモシステイン、ホモセリン、-アミノヘキサン酸、-アミノヘキサン酸、-アミノヘプタン酸、-アミノオクタン酸、-アミノデカン酸、-アミノテトラデカン酸、シクロヘキシルアラニン、-ジアミノ酪酸、-ジアミノプロピオン酸、-アミノ吉草酸及び2, 3 - ジアミノ酪酸。

10

20

30

【0163】

さらなる修飾

ジスルフィド結合を介して別のペプチドへ結合させるために、またはIL-10ポリペプチドを環化するために、システイン残基またはシステイン類似体をIL-10ポリペプチドに導入することができる。システインまたはシステイン類似体を導入する方法は当技術分野で既知であり、例えば、米国特許第8,067,532号を参照されたい。

40

【0164】

IL-10ポリペプチドを環化することができる。1つまたは複数のシステインまたはシステイン類似体をIL-10ポリペプチドに導入することができ、導入したシステインまたはシステイン類似体が第2の導入したシステインまたはシステイン類似体とジスルフィド結合を形成することができる。他の環化手段としては、オキシムリンカーまたはランチオニンリンカーの導入が挙げられ、例えば、米国特許第8,044,175号を参照されたい。環化結合を形成することができるアミノ酸（または非アミノ酸部分）の任意の組み合わせを使用及び/または導入することができる。環化結合は、アミノ酸と（またはアミノ酸及び-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO-または-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CO-と）架橋の導入を可能にする官能基との任意の組み合わせを用いて生成することができる。いくつかの例は、ジスルフィド、ジスルフィド模倣物、例えば-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-カルバ架橋、チオアセタール、チオエーテル架橋（シスタチオニンまたはランチオニン）ならびにエステル及びエーテルを含む架橋である。これらの例では、nは任意の整数でもよいが、10未満であることが多い。

【0165】

他の修飾としては、例えば、N-アルキル（もしくはアリール）置換（[CONR]）またはラクタム及び他の環状構造を構築するための骨格架橋が挙げられる。他の誘導体としては、C末端側ヒドロキシメチル誘導体、o-修飾誘導体（例えば、C末端側ヒドロ

50

キシメチルベンジルエーテル)、アルキルアミド及びヒドラジドなどの置換アミドを含むN末端修飾誘導体が挙げられる。

#### 【0166】

ある場合には、IL-10ポリペプチド中の1つまたは複数のL-アミノ酸が1つまたは複数のD-アミノ酸と交換される。

#### 【0167】

ある場合には、IL-10ポリペプチドはレトロインベルソ類似体である(例えば、Selaa and Zisman (1997) FASEB J. 11: 449を参照されたい)。レトロインベルソペプチド類似体は、アミノ酸配列の方向が逆転しており(レトロ)、例えばL-アミノ酸ではなくD-アミノ酸を使用して、その中の1つまたは複数のアミノ酸のキラリティー、すなわちD-またはL-が反転している(インベルソ)、直鎖状ポリペプチドの異性体である。[例えば、Jameson et al. (1994) Nature 368: 744; 及びBrady et al. (1994) Nature 368: 692を参照されたい。]。

10

#### 【0168】

IL-10ポリペプチドは、「タンパク質形質導入ドメイン」(PTD)を含むことができ、これは、脂質二重層、ミセル、細胞膜、オルガネラ膜または小胞膜の横断を容易にする、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、炭水化物または有機もしくは無機分子を指す。別の分子に結合しているPTDは、分子が膜を横断するのを、例えば、細胞外空間から細胞内空間へ、またはサイトゾルからオルガネラ内へ移動するのを容易にする。いくつかの実施形態では、PTDはIL-10ポリペプチドのアミノ末端に共有結合しているが、他の実施形態では、PTDはIL-10ポリペプチドのカルボキシル末端に共有結合している。例示的タンパク質形質導入ドメインとしては、限定されないが、最小ウンデカペプチドタンパク質形質導入ドメイン(YGRKKRRQRRR; 配列番号1を含むHIV-1TATの残基47~57に対応する); 細胞中へ直接侵入するのに十分ないいくつかのアルギニン残基(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10または10~50アルギニン)を含むポリアルギニン配列; VP22ドメイン(Zender et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9(6): 489-96); Drosophilaのアンテナペディアタンパク質形質導入ドメイン(Noguchi et al. (2003) Diabetes 52(7): 1732-1737); トランケートされたヒトカルシトニンペプチド(Trehin et al. (2004) Pharm. Research 21: 1248-1256); ポリリジン(Wender et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13003-13008); RRQRRTSKLMKR(配列番号2); トランスポータンGWTLN SAGYLLGKINLKALAA LAKKIL(配列番号3); KALAWEA KLA KALAKALA KHLAKA LAKALKCEA(配列番号4); 及びRQIKIWFQNRRMVKWK(配列番号5)が挙げられる。例示的PTDとしては、限定されないが、YGRKKR RQRRR(配列番号1)、RK KRR QRRR(配列番号6); 3アルギニン残基から50アルギニン残基のアルギニンホモポリマーが挙げられ、例示的なPTDドメインアミノ酸配列としては、限定されないが、以下のいずれかが挙げられる: YGRKKR RQR(配列番号1); RK KRR QRR(配列番号7); YARAAARQARA(配列番号8); THRLP RRRRR(配列番号9); 及びGGRRA RRRRR(配列番号10)。

20

#### 【0169】

IL-10ポリペプチドのC末端部にあるアミノ酸のカルボキシル基COR<sub>3</sub>は、遊離形態(R<sub>3</sub>=OH)で、または生理学的に許容されるアルカリまたはアルカリ土類塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩の形態で存在することができる。カルボキシル基は、例えば、メタノール、分枝または非分枝のC1~C6-アルキルアルコール、例えば、エチルアルコールまたはtert-ブタノールなどの一級、二級または三級アルコールでエステル化することもできる。カルボキシル基は、アンモニア、分枝また

30

40

50

は非分枝の C 1 ~ C 6 - アルキルアミンまたは C 1 ~ C 6 ジ - アルキルアミン、例えば、メチルアミンまたはジメチルアミンなどの一級または二級アミンでアミド化することもできる。

#### 【 0 1 7 0 】

I L - 1 0 ポリペプチドの N 末端にあるアミノ酸 N R 1 R 2 のアミノ基は、遊離形態 (R 1 = H 及び R 2 = H) 、または生理学的に許容される塩、例えば、塩化物または酢酸塩の形態で存在することができる。アミノ基は、R 1 = H 及び R 2 = アセチル、トリフルオロアセチルまたはアダマンチルであるように、酸でアセチル化することもできる。アミノ基は、ペプチド化学で従来から使用されているアミノ保護基、例えば上記で提供されたもの（例えば、F m o c 、ベンジルオキシ - カルボニル ( Z ) 、B o c 及び A l l o c ）によって保護された形態で存在することができる。アミノ基は N - アルキル化することができる、ここでは、R 1 及び / または R 2 = C 1 ~ C 6 アルキルまたは C 2 ~ C 8 アルケニルまたは C 7 ~ C 9 アラルキルである。アルキル残基は直鎖でも、分枝でも環状でもよい（例えば、それぞれ、エチル、イソプロピル及びシクロヘキシリル）。

10

#### 【 0 1 7 1 】

I L - 1 0 の機能を増強及び / または模倣するための特定の修飾

本明細書に開示される治療モダリティ（例えば、I L - 1 0 ）のより多くの物理的特性のうちの 1 つ及び / またはこれが投与される方法を向上させることは、有益であることが多く、不可避であることもある。物理的特性の向上としては、例えば、免疫原性をモジュレートすること；水溶性、バイオアベイラビリティ、血清半減期及び / もしくは治療半減期を増大させる方法；及び / または生物学的活性をモジュレートすることが挙げられる。ある種の修飾はまた、例えば、検出アッセイで使用するための抗体を産生させるのに（例えば、エピトープタグ）及びタンパク質精製を容易にするのに有用であり得る。そのような向上は、一般に、治療モダリティの生物活性及び / またはその免疫原性の増大に悪影響を及ぼすことなく与えられなければならない。

20

#### 【 0 1 7 2 】

I L - 1 0 のペグ化は本開示が企図する 1 つの特定の修飾であるが、他の修飾としては、限定されないが、グリコシル化 ( N - 及び O 結合型) ; ポリシリアル化；血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン ( H S A ) 、イヌ ( c y n o ) 血清アルブミンまたはウシ血清アルブミン ( B S A ) ）含有アルブミン融合分子；例えばコンジュゲートした脂肪酸鎖を介して結合しているアルブミン結合（アシル化）；及び F c - 融合タンパク質が挙げられる。

30

#### 【 0 1 7 3 】

ペグ化：タンパク質治療剤の臨床効果は、短い血漿半減期及びプロテアーゼ分解に対する感受性によって制限されることが多い。様々な治療用タンパク質（例えば、フィルグラスチム）の研究によって、そのような難題は、ポリペプチド配列を様々な非タンパク質性ポリマーのうちのいずれか、例えば、ポリエチレングリコール ( P E G ) 、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンとコンジュゲートまたは連結することを含めた様々な修飾によって克服することができる事が示された。これは、タンパク質と非タンパク質性ポリマー、例えば P E G の両方に共有結合している連結部分によって成し遂げられることが多い。そのような P E G コンジュゲート生体分子は、より良い物理的安定性及び熱安定性、酵素的分解に対する感受性からの保護、溶解度の増大、より長いインビボ循環半減期及びクリアランスの低下、免疫原性及び抗原性の低減ならびに毒性の低減を含めた、臨床的に有用な特性を有することが示されている。

40

#### 【 0 1 7 4 】

薬物動態パラメーターに対するペグ化の有益効果に加えて、ペグ化それ自体が活性を増強することができる。。例えば、P E G - I L - 1 0 は、ある種の癌に対して、非ペグ化 I L - 1 0 よりも効果的であることが示されている（例えば、E P 2 0 6 6 3 6 A 2 を参照されたい）。

#### 【 0 1 7 5 】

50

ポリペプチド配列へのコンジュゲーションに適した P E G は一般に室温で水溶性であり、一般式 R ( O - C H <sub>2</sub> - C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> O - R を有し、式中 R は水素または保護基、例えばアルキル基またはアルカノール基であり、n は 1 ~ 1 0 0 0 の整数である。R が保護基である場合、これは一般に 1 ~ 8 個の炭素を有する。ポリペプチド配列にコンジュゲートされる P E G は直鎖状でもよいし、分枝状でもよい。分枝 P E G 誘導体、「星型 P E G」及びマルチアーム P E G が本開示で企図される。本開示で使用される P E G の分子量は任意の特定の範囲に制限されず、例が本明細書の他の個所に記載される。例として、ある種の実施形態は 5 k D a ~ 2 0 k D a の分子量を有するが、他の実施形態は 4 k D a ~ 1 0 k D a の分子量を有する。

## 【 0 1 7 6 】

本開示は、P E G が異なる n 値を有し、それにより様々な異なる P E G が特定の比率で存在するコンジュゲートの組成物も企図する。例えば、いくつかの組成物は、n = 1、2、3 及び 4 であるコンジュゲートの混合物を含む。いくつかの組成物では、n = 1 の場合のコンジュゲートのパーセンテージは 1 8 ~ 2 5 % であり、n = 2 の場合のコンジュゲートのパーセンテージは 5 0 ~ 6 6 % であり、n = 3 の場合のコンジュゲートのパーセンテージは 1 2 ~ 1 6 % であり、n = 4 の場合のコンジュゲートのパーセンテージは最大で 5 % までである。そのような組成物は、当技術分野で既知の反応条件及び精製方法によって生成することができる。例示的反応条件は本明細書全体を通して記載されている。陽イオン交換クロマトグラフィーを使用して、コンジュゲートを分離することができ、次いで、例えば所望の数の結合した P E G を有するコンジュゲートを含む画分を特定し、未修飾タンパク質配列及び他の数の結合した P E G を有するコンジュゲートを含まずに精製する。

## 【 0 1 7 7 】

ペグ化は、ポリペプチドの N 末端のアルファアミノ基、リジン残基の側鎖のイプシロンアミノ基及びヒスチジン残基の側鎖のイミダゾール基で最も頻繁に生じる。ほとんどの組換えポリペプチドは単一のアルファ及びいくつかのイプシロンアミノ及びイミダゾール基を有するので、リンカーの化学的性質に応じて多数の位置異性体を生成することができる。当技術分野で既知の一般的なペグ化ストラテジーを本明細書に適用することができる。

## 【 0 1 7 8 】

広く使用されている 2 つの第 1 世代活性化モノメトキシ P E G ( m P E G ) は、サクシニミジルカルボネート P E G ( S C - P E G ; 例えは、Z a l i p s k y , e t a l . ( 1 9 9 2 ) B i o t e h n o l . A p p l . B i o c h e m 1 5 : 1 0 0 - 1 1 4 ; 及び M i r o n a n d W i l c h e c k ( 1 9 9 3 ) B i o - c o n j u g . C h e m . 4 : 5 6 8 - 5 6 9 を参照されたい ) 及びベンゾトリアゾールカルボネート P E G ( B T C - P E G ; 例えは、D o l e n c e , e t a l . 米国特許第 5 , 6 5 0 , 2 3 4 号を参照されたい ) であり、これらは、リジン残基と優先的に反応してカルバメート結合を形成するが、ヒスチジン残基及びチロシン残基と反応することも知られている。ある種の分子 ( 例えは、I F N ) のヒスチジン残基への結合は、加水分解的に不安定なイミダゾールカルバメート結合であることが示されている ( 例えは、L e e a n d M c N e m a r , 米国特許第 5 , 9 8 5 , 2 6 3 号を参照されたい ) 。第 2 世代のペグ化技術は、こうした不安定な結合及び残基反応性における選択性の欠如を回避するように設計された。P E G - アルデヒドリンカーの使用は、還元的アミノ化を介してポリペプチドの N 末端の单一部位を標的にする。

## 【 0 1 7 9 】

P E G は、ポリペプチド配列の 1 つまたは複数の遊離アミノ基またはカルボキシル基とポリエチレングリコールの間の結合を媒介する末端側反応基 ( 「スペーサー」 ) を介して、本開示のポリペプチドに結合することができる。遊離アミノ基に結合することができるスペーサーを有する P E G は N - ヒドロキシスクシニルイミドポリエチレングリコールを含み、これは、ポリエチレングリコールのコハク酸エステルを N - ヒドロキシスクシニルイミドで活性化することによって調製することができる。遊離アミノ基に結合することができる別の活性化ポリエチレングリコールは 2 , 4 - ビス ( O - メトキシポリエチレング

10

20

30

40

50

リコール) - 6 - クロロ - s - トリアジンであり、これは、ポリエチレングリコールモノメチルエーテルを塩化シアヌルと反応させることによって調製することができる。遊離カルボキシル基に結合している活性化ポリエチレングリコールはポリオキシエチレンジアミンを含む。

#### 【0180】

スペーサーを有する PEGへの本開示のポリペプチド配列の 1つまたは複数のコンジュゲーションは、様々な従来の方法によって行うことができる。例えば、コンジュゲーション反応は、4 : 1 ~ 30 : 1 の試薬のタンパク質に対するモル比を用いて、pH 5 ~ 10 の溶液中で、4 ~ 室温の温度で、30 分間 ~ 20 時間行うことができる。反応条件は、主に所望の程度の置換をもたらすように反応を導くように選択することができる。一般に、低温、低 pH ( 例えば、pH = 5 ) 及び短い反応時間は結合する PEG の数を減少させる傾向があり、一方で、高温、中性から高 pH ( 例えば、pH 7 ) 及び長い反応時間は結合する PEG の数を増加させる傾向がある。当技術分野で既知の様々な手段を使用して、反応を終了することができる。いくつかの実施形態では、反応混合物を酸性化し、例えば - 20 °C で凍結させることによって反応を終止する。様々な分子のペグ化が、例えば、米国特許第 5,252,714 号；第 5,643,575 号；第 5,919,455 号；第 5,932,462 号；及び第 5,985,263 号で論じられている。PEG - IL - 10 は、例えば米国特許第 7,052,686 号に記載されている。本明細書で使用が企図される特定の反応条件は、実験セクションに記載される。

10

#### 【0181】

本開示は PEG 模倣物の使用も企図する。PEG の特質 ( 例えば、血清半減期の増強 ) を保持しながら、いくつかのさらなる有利な特性を与える、組換え PEG 模倣物が開発された。例として、PEG と類似した延長したコンフォメーションを形成することができる単純なポリペプチド鎖 ( 例えば、Ala, Glu, Gly, Pro, Ser 及び Thr を含む ) は、目的のペプチドまたはタンパク質薬物に既に融合されて、組換えで生成することができる ( 例えば、Amunix の X TEN 技術 ; Mountain View, CA )。これによって、製造プロセス中のさらなるコンジュゲーションステップが不要になる。さらに、確立された分子生物学的技法によって、ポリペプチド鎖の側鎖組成物の制御ができるようになり、これによって、免疫原性及び製造特性の最適化が可能になる。

20

#### 【0182】

グリコシリ化 : 本開示において、「グリコシリ化」は、グリカンをタンパク質、脂質または他の有機分子に結合させる酵素的プロセスを広く指すことを意図する。本開示と関連して、用語「グリコシリ化」の使用は、1つもしくは複数の炭水化物部分を付加または削除する ( 潜在的なグリコシリ化部位を除去することによる、もしくは化学的及び / もしくは酵素的手段でグリコシリ化を削除することによる ) 、及び / または天然配列に存在してもよいし、存在しなくてもよい 1 つもしくは複数のグリコシリ化部位を付加することを意味することが一般に意図される。さらに、このフレーズは、存在する様々な炭水化物成分の性質及び割合の変化を伴う、天然タンパク質のグリコシリ化の質的な変化を含む。

30

#### 【0183】

グリコシリ化は IL - 10 などのポリペプチドの物理的特性 ( 例えば、溶解度 ) に劇的に影響を及ぼすことができ、また、タンパク質の安定性、分泌及び細胞内局在に重要であり得る。グリコシリ化されたポリペプチドはまた、増強された安定性を示すことができ、または半減期などの 1 種もしくは複数の薬物動態特性を向上させることができる。さらに、溶解度の向上は、例えば、非グリコシリ化ポリペプチドを含む製剤よりも医薬投与に適した製剤の生成を可能にし得る。

40

#### 【0184】

グリコシリ化部位の付加は、アミノ酸配列を変更することによって達成することができる。ポリペプチドに対する変更は、例えば、( O 結合型グリコシリ化部位に関しては ) 1 つもしくは複数のセリン残基もしくはスレオニン残基、または ( N 結合型グリコシリ化部位に関しては ) アスパラギン残基の付加またはこれらの残基による置換によって行うこと

50

ができる。各タイプに見られるN結合型及びO結合型オリゴ糖ならびに糖残基の構造は異なっていてもよい。両方に一般に見られる糖の1つのタイプは、N-アセチルノイラミン酸（以降はシアル酸と称する）である。シアル酸は、通常、N結合型とO結合型のオリゴ糖の両方の末端側残基であり、その負電荷によって、糖タンパク質に酸性特性を与えることができる。本開示の特定の実施形態は、N-グリコシリ化変異体の生成及び使用を含む。

#### 【0185】

本開示のポリペプチド配列は、核酸レベルでの変化を介して、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるように、ポリペプチドをコードする核酸を予め選択された塩基において変異させることによって、場合により変更することができる。

#### 【0186】

ポリシアリル化：本開示は、ポリペプチドの安定性及びインビボでの薬物動態を向上させるために、天然に存在する生分解性の - (2-8) 連結ポリシアリル酸（「PSA」）へのポリペプチドのコンジュゲーションである、ポリシアリル化の使用も企図する。PSAは、非常に親水性の、生分解性及び無毒性の天然ポリマーであり、血中で見かけ上の高い分子量を与え、これによってその血清半減期が増大する。さらに、様々なペプチド及びタンパク質治療剤のポリシアリル化は、タンパク質分解の顕著な低減、インビボ活性の活性保持ならびに免疫原性及び抗原性の低減を導いた（例えば、G. Gregoriadis et al., Int. J. Pharmaceutics 300 (1-2) : 125-30 を参照されたい）。部位特異的ポリシアリル化のための様々な技法が利用可能である（例えば、T. Lindhout et al., PNAS 108 (18) 7397-7402 (2011) を参照されたい）。

10

#### 【0187】

アルブミン融合：コンジュゲーションのためのさらなる適切な成分及び分子としては、アルブミン、例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、イヌ血清アルブミン及びウシ血清アルブミン（BSA）が挙げられる。

#### 【0188】

本開示によれば、アルブミンを、薬物分子（例えば、本明細書に記載のポリペプチド）に、カルボキシル末端、アミノ末端、カルボキシル末端とアミノ末端の両方及び内部でコンジュゲートすることができる（を参照されたい。例えば、USP5, 876, 969 及び USP7, 056, 701）。

20

#### 【0189】

本開示で企図されるHSA-薬物分子コンジュゲートでは、アルブミン分泌プレ配列及びその変異体、その断片及び変異体ならびにHSA変異体などの様々な形態のアルブミンを使用することができる。そのような形態は、一般に、1種または複数の所望のアルブミン活性を有する。追加的な実施形態では、本開示は、アルブミン、アルブミン断片及びアルブミン変異体などに直接的または間接的に融合したポリペプチド薬物分子を含む融合タンパク質を含み、融合タンパク質は非融合薬物分子よりも高い血漿安定性を有し、及び/または融合タンパク質は非融合薬物分子の治療活性を保持する。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーまたはその修飾バージョンなどのリンカーによって、間接的な融合が成し遂げられる。

30

#### 【0190】

先に言及したように、1種または複数の本開示のポリペプチドへのアルブミンの融合は、例えば、HSAをコードする核酸またはその断片を1種または複数のポリペプチド配列をコードする核酸に結合させるような遺伝子操作によって達成することができる。

#### 【0191】

代替のアルブミン結合ストラテジー：いくつかのアルブミン結合ストラテジーが直接の融合に代わるものとして開発されており、本明細書に記載のIL-10薬剤とともに使用することができる。例として、本開示は、コンジュゲートした脂肪酸鎖を介したアルブミン結合（アシル化）ならびにアルブミン結合ドメイン（ABD）ポリペプチド配列及び本明細書に記載のポリペプチドの1種または複数の配列を含む融合タンパク質を企図する。

40

50

**【 0 1 9 2 】**

他の分子とのコンジュゲーション：コンジュゲーションのためのさらなる適切な成分及び分子としては、例えば、サイログロブリン；破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリアミノ酸、例えばポリ（D-リジン：D-グルタミン酸）；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルスのヘマグルチニン、インフルエンザウイルスの核タンパク質；キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）；ならびにB型肝炎ウイルスのコアタンパク質及び表面抗原；または前述の任意の組み合わせが挙げられる。

**【 0 1 9 3 】**

したがって、本開示は、ポリペプチド配列のN末端及び/またはC末端での1つまたは複数のさらなる成分または分子、例えば、別のポリペプチド（例えば、対象ポリペプチドに対して異種のアミノ酸配列を有するポリペプチド）または担体分子のコンジュゲーションを企図する。したがって、例示的ポリペプチド配列は、別の成分または分子とのコンジュゲートとして提供され得る。

10

**【 0 1 9 4 】**

IL-10ポリペプチドを、大型の緩徐に代謝される巨大分子、例えば、タンパク質；多糖、例えばセファロース、アガロース、セルロースまたはセルロースビーズ；ポリマー性アミノ酸、例えばポリグルタミン酸またはポリリジン；アミノ酸コポリマー；不活性化ウイルス粒子；不活性化細菌毒素、例えば、ジフテリア、破傷風、コレラまたはロイコトキシン分子からのトキソイド；不活性化細菌；及び樹状細胞にコンジュゲートすることができる。そのようなコンジュゲート形態を必要に応じて使用して、本開示のポリペプチドに対する抗体を生成することができる。

20

**【 0 1 9 5 】**

コンジュゲーションのためのさらなる候補成分及び分子としては、単離または精製に適したもののが挙げられる。特定の非限定例としては、結合分子、例えば、ビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合ペア）、抗体、受容体、リガンド、レクチン、または、例えば、プラスチックもしくはポリスチレンビーズ、プレートもしくはビーズ、磁気ビーズ、試験ストリップ及び膜を含めた固体支持体を含む分子が挙げられる。

**【 0 1 9 6 】**

Fc-融合分子：ある種の実施形態では、本開示のポリペプチド配列のアミノ末端またはカルボキシル末端を免疫グロブリンFc領域（例えば、ヒトFc）と融合して、融合コンジュゲート（または融合分子）を形成することができる。Fc融合コンジュゲートは生物製剤の全身半減期を増大させることができ、それにより、生物製剤製品はより低頻度の投与しか必要としない可能性がある。

30

**【 0 1 9 7 】**

Fcは、血管内を覆う内皮細胞において新生児型Fc受容体（FcRn）に結合し、結合の際に、Fc融合分子は分解から保護され、循環中に再放出され、これによって、分子が循環中により長く維持される。このFc結合は、内在性のIgGがその長い血漿半減期を保持する機構であると考えられる。より最近のFc-融合技術は、單一コピーの生物製剤を抗体のFc領域に連結して、従来のFc-融合コンジュゲートと比べて生物製剤の薬物動態的及び薬力学的特性を最適化する。

40

**【 0 1 9 8 】**

他の修飾：本開示は、1種または複数の特性を向上させるために、IL-10の、現在既知であるか将来的に開発される他の修飾の使用を企図する。例としては、HES化、例えば米国特許出願第2007/0134197号及び第2006/0258607号に記載されている様々な態様ならびに融合タグとしてSUMOを含む融合分子（Life Sciences, Inc. ; Malvern, PA）が挙げられる。

**【 0 1 9 9 】**

リンカー：リンカー及びその使用は上述した。本開示のポリペプチド配列を修飾するのに使用される前述の成分及び分子のうちのいずれかを、場合により、リンカーを介してコンジュゲートすることができる。適切なリンカーとしては、一般に、修飾ポリペプチド配

50

列と連結された成分及び分子との間である種の動きを可能にするのに十分な長さである、「フレキシブルリンカー」が挙げられる。リンカー分子は、一般に約6～50原子の長さである。リンカー分子は、例えば、アリールアセチレン、2～10の単量体単位を含むエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、2価酸、アミノ酸またはこれらの組み合わせでもよい。適切なリンカーは、容易に選択することができ、1個のアミノ酸（例えば、Gly）、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、10～20個、20～30個、30～50個または50個を超えるアミノ酸などの任意の適切な長さでもよい。

#### 【0200】

フレキシブルリンカーの例としては、グリシンポリマー( $G_n$ )、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、グリシン-セリンポリマー（例えば、( $G_m S_o$ ) $n$ 、( $G S G G S$ ) $n$ （配列番号11）、( $G_m S_o G_m$ ) $n$ 、( $G_m S_o G_m S_o G_m$ ) $n$ （配列番号12）、( $G S G G S_m$ ) $n$ （配列番号11）、( $G S G S_m G$ ) $n$ （配列番号12）及び( $G G G S_m$ ) $n$ （配列番号13）及びこれらの組み合わせ（ここでは、m、n及びoは、少なくとも1～20の、例えば、1～18、2～16、3～14、4～12、5～10、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10）の整数からそれぞれ独立に選択される）ならびに他のフレキシブルリンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは比較的構造不定であり、したがって、成分間の中性のテザーとして働くことができる。フレキシブルリンカーの例としては、限定されないが、GGSG（配列番号14）、GGSGG（配列番号15）、GS GSG（配列番号12）、GS GG G（配列番号16）、GGGSG（配列番号17）及びGSSSG（配列番号18）が挙げられる。

#### 【0201】

フレキシブルリンカーのさらなる例としては、グリシンポリマー( $G_n$ またはグリシン-セリンポリマー（例えば、( $G S$ ) $n$ 、( $G S G G S$ ) $n$ （配列番号11）、( $G G G S$ ) $n$ （配列番号13）及び( $G G G G S$ ) $n$ （配列番号19）（ここでは、n=1～50、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30、30～50である））が挙げられる。例示的フレキシブルリンカーとしては、限定されないが、GGGS（配列番号13）、GGGGS（配列番号19）、GGS G（配列番号14）、GGSGG（配列番号15）、GS GSG（配列番号12）、GS GGGG（配列番号16）、GGGSG（配列番号17）及びGSSSG（配列番号18）が挙げられる。これらのリンカー配列の多量体（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10～20、20～30または30～50）を互いに連結して、異種アミノ酸配列を本明細書に開示されるIL-10薬剤にコンジュゲートするのに使用することができるフレキシブルリンカーを提供することができる。本明細書に記載のように、異種アミノ酸配列はシグナル配列でもよく、及び/または融合パートナー、例えば、アルブミン、Fc配列などでもよい。

#### 【0202】

##### 治療的及び予防的使用

本開示は、CAR-T細胞療法を受ける患者において活性化誘導細胞死を予防するまたはその重症度を低減するために、本明細書に記載のIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）の使用を企図する。より具体的には、IL-10薬剤は、対象の標的細胞集団に対するT細胞性免疫応答のモジュレーションに関する方法であって、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を対象に導入することを含み、キメラ抗原受容体が、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合が活性化誘導細胞死を惹起することができる方法で使用される。

#### 【0203】

特定の実施形態では、活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量のIL-10薬剤が、非経口的に（例えば、皮下に）対象に投与される。他の実施形態では、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞及び活

10

20

30

40

50

活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL-10薬剤が対象に導入される。さらに別の実施形態では、IL-10薬剤を発現するように遺伝子改変した細胞によって、活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量のIL-10薬剤が対象に導入され、ここでは、発現コンストラクトはCARを発現するものとは異なる細胞中に存在する。

#### 【0204】

IL-10薬剤をコードする遺伝物質を、当業者に既知の任意の手段によって細胞に導入することができる。方法の主要な2クラスは、組換えウイルス（ウイルスベクターとも称される）を使用するもの及びネイキッドDNAまたはDNA複合体を使用するもの（非ウイルス方法）である。使用することができるウイルスの例としては、限定されないが、レトロウイルス、アデノウイルス及び単純ヘルペスウイルスが挙げられる。非ウイルス方法の例としては、限定されないが、ネイキッドDNAの注射、送達を増強するための物理的方法（例えば、エレクトロポレーション）及び送達を増強するための化学的方法（例えば、リポプレックス）が挙げられる。

10

#### 【0205】

本開示のある種の実施形態では、ベクター（例えば、ウイルスベクター）は遺伝子を送達するように遺伝子操作される。ベクターは静脈内に与えることができ、または身体の特定の組織に直接的に注射することができ、ここで、ベクターは個々の細胞に取り込まれる。代わりに、対象の細胞の一部を取り出し、エキソビオ状況でベクターに曝露し、続いて、ベクターを含む細胞を患者に戻すことができる。特定の実施形態では、IL-10薬剤の発現は発現制御エレメントによってモジュレートされる。

20

#### 【0206】

本明細書に記載のIL-10薬剤と併せて使用されるCAR-T細胞療法は、癌、例えば、子宮、頸部、乳房、前立腺、精巣、消化管（例えば、食道、中咽頭、胃、小腸または大腸、結腸または直腸）、腎臓、腎細胞、膀胱、骨、骨髄、皮膚、頭または首、肝臓、胆嚢、心臓、肺、脾臓、唾液腺、副腎、甲状腺、脳（例えば、神経膠腫）、神経節、中枢神経系（CNS）及び末梢神経系（PNS）の癌ならびに造血系及び免疫系（例えば、脾臓または胸腺）の癌を含めた増殖性の疾患、障害または状態を治療または予防するのに使用することができる。本開示は、例えば、免疫原性腫瘍、非免疫原性腫瘍、休止状態の腫瘍、ウイルス誘導性癌（例えば、上皮細胞癌、内皮細胞癌、扁平上皮癌腫及びパピローマウイルス）、腺癌、リンパ腫、癌腫、黒色腫、白血病、骨髄腫、肉腫、奇形癌腫、化学誘導性癌、転移及び血管新生を含めた、他の癌に関連した疾患、障害または状態を治療または予防する方法も提供する。本開示は、例えば、調節性T細胞及び/またはCD8+T細胞の活性をモジュレートすることによって、腫瘍細胞または癌細胞抗原に対する耐性を低減させることも企図する（例えば、Ramirez-Montagut, et al. (2003) Oncogene 22: 3180-87; and Sawaya, et al. (2003) New Engl. J. Med. 349: 1501-09を参照されたい）。特定の実施形態では、腫瘍または癌は、結腸癌、卵巣癌、乳癌、黒色腫、肺癌、膠芽腫または白血病である。用語（複数可）癌に関連した疾患、障害及び状態という用語（複数可）の使用は、癌に直接的または間接的に関連する状態を広く指すことを意図し、例えば、血管新生及び前癌状態、例えば異形成を含む。

30

#### 【0207】

他の実施形態では、本明細書に記載のIL-10薬剤と併せて使用されるCAR-T細胞療法は、免疫/炎症関連障害を治療または予防するのに使用することができる。本明細書で使用する場合、例えば「免疫疾患」、「免疫状態」、「免疫障害」、「炎症疾患」、「炎症状態」、「炎症障害」などの用語は、任意の免疫または炎症関連状態（例えば、病的炎症及び自己免疫疾患）を広く包含することが意図される。そのような状態は、他の疾患、障害及び状態と密接に絡み合っていることが多い。例として、「免疫状態」は癌、腫瘍及び血管新生などの増殖性状態を指すことができ、これには、免疫系による根絶に抵抗する感染（急性及び慢性）、腫瘍ならびに癌が含まれる。

40

50

**【 0 2 0 8 】**

免疫及び炎症に関連した疾患、障害及び状態の非限定なリストとしては、関節炎（例えば、関節リウマチ）、腎不全、狼瘡、喘息、乾癬、大腸炎、膀胱炎、アレルギー、線維症、手術合併症（例えば、炎症性サイトカインが治癒を妨げる場合）、貧血及び線維筋痛症が挙げられる。慢性炎症と関連する他の疾患及び障害としては、アルツハイマー病、うつ血性心不全、卒中、大動脈弁狭窄症、動脈硬化症、骨粗鬆症、パーキンソン病、感染症、炎症性腸疾患（例えば、クローン病及び潰瘍性大腸炎）、アレルギー性接触皮膚炎及び他の湿疹、全身性硬化症、移植ならびに多発性硬化症が挙げられる。

**【 0 2 0 9 】****医薬組成物**

10

I L - 1 0 薬剤が対象に投与される場合、本開示は、対投への与象に適した任意の形態の組成物の使用を企図する。一般に、そのような組成物はI L - 1 0 及び1種または複数の医薬的に許容可能なまたは生理学的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤を含む「医薬組成物」である。医薬組成物を本開示の方法で使用することができ、したがって、例えば、本明細書に記載の治療的及び予防的な方法及び使用を実施するために、医薬組成物をエキソビオまたはインビオで対象に投与することができる。

**【 0 2 1 0 】**

意図された方法または投与経路に適合するように、本開示の医薬組成物を製剤化することができ、例示的投与経路は本明細書に記載される。さらに、本開示によって企図される疾患、障害及び状態を治療または予防するために、医薬組成物を本明細書に記載される他の治療的に活性な薬剤または化合物と組み合わせて使用することができる。

20

**【 0 2 1 1 】**

医薬組成物は、典型的には、治療有効量の本開示で企図されるI L - 1 0 薬剤及び1種または複数の医薬的に及び生理学的に許容可能な製剤用薬剤を含む。適切な医薬的に許容可能なまたは生理学的に許容可能な希釈剤、担体または賦形剤としては、限定されないが、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸及び硫酸水素ナトリウム）、防腐剤（例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、エチルもしくはn - プロピル、p - ヒドロキシ安息香酸）、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、溶媒、フィラー、充填剤、界面活性剤、緩衝液、ビヒクル、希釈剤、及び／または補助剤が挙げられる。例えば、適切なビヒクルは、おそらく非経口投与のための医薬組成物によく見られる他の材料で補充される、生理的食塩水でもよいし、クエン酸緩衝食塩水でもよい。中性の緩衝食塩水または血清アルブミンと混合した食塩水はさらなる例示的ビヒクルである。本明細書で企図される医薬組成物及び剤形で使用することができる様々な緩衝液を当業者は容易に認識するであろう。典型的な緩衝液としては、限定されないが、医薬的に許容可能な弱酸、弱塩基またはこれらの混合物が挙げられる。一例を挙げると、緩衝液成分は、水溶性物質、例えば、リン酸、酒石酸、乳酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、アスコルビン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸及びこれらの塩でもよい。許容される緩衝剤としては、例えば、トリス緩衝液、N - (2 - ヒドロキシエチル)ピペラジン - N' - (2 - エタンスルホン酸) (H E P E S )、2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸 (M E S )、2 - (N - モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩 (M E S )、3 - (N - モルホリノ)プロパンスルホン酸 (M O P S )及びN - トリス [ヒドロキシメチル] メチル - 3 - アミノプロパンスルホン酸 (T A P S )が挙げられる。

30

**【 0 2 1 2 】**

医薬組成物を製剤化した後は、これを、溶液剤、懸濁剤、ゲル剤、エマルジョン剤、固体または脱水もしくは凍結乾燥した粉末剤として滅菌バイアル中に保存することができる。そのような製剤は、すぐに使える形態、使用前に再構成を必要とする凍結乾燥形態、使用前に希釈を必要とする液体形態または他の許容される形態のいずれかで保存することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は使い捨て容器（例えば、使い捨てのバイアル、アンプル、シリンジまたは自動注入装置（例えば、E p i P e n (登録商標) に類似）中で提供されるが、他の実施形態では多回使用容器（例えば、多回使用バイアル）が

40

50

提供される。I L - 10 を送達するために任意の薬物送達装置を使用することができ、これには、埋植体（例えば、埋め込み式ポンプ）及びカテーテルシステム、低速注入ポンプ及びデバイスが含まれ、これらすべては当業者に周知である。一般に皮下または筋肉内に投与されるデポー注射を、定められた期間にわたって本明細書に開示されるポリペプチドを放出するために利用することもできる。デポー注射は、通常固系ベースまたは油系のいずれかであり、一般に、本明細書に記載される製剤成分の少なくとも 1 つを含む。当業者はデポー注射の可能な製剤及び使用に精通している。

#### 【 0 2 1 3 】

医薬組成物は、滅菌した注射用の水性または油性懸濁剤の形態でもよい。この懸濁剤は、本明細書で言及するそれらの適切な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤を使用して、既知の技術に従って製剤化することができる。滅菌した注射用調製物は、例えば、1,3-ブタジオール中の溶液のような、無毒の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中の滅菌した注射用溶液剤または懸濁剤でもよい。用いることができる許容される希釈剤、溶媒及び分散媒としては、水、リンゲル溶液、等張塩化ナトリウム溶液、Cremophor EL（商標）（BASF、Parisippany、NJ）またはリン酸緩衝食塩水（PBS）、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコール）ならびにこれらの適切な混合物が挙げられる。さらに、滅菌した不揮発性油は従来から溶媒または懸濁媒として用いられている。この目的のために、合成のモノまたはジグリセリドを含めた、任意の無菌の不揮発性油を用いることができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸は、注射剤の調製に使用される。特定の注射用製剤の持続性吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムまたはゼラチン）を含むことによって達成することができる。

#### 【 0 2 1 4 】

活性成分を含む医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル剤、トローチ剤、ロゼンジ剤、水性もしくは油性の懸濁剤、分散性の粉末剤もしくは顆粒剤、エマルジョン剤、硬質もしくは軟質カプセル剤、またはシロップ剤、溶液剤、ミクロビーズ剤またはエリキシル剤などの経口的使用に適した形態でもよい。特定の実施形態では、本明細書に記載の I L - 10 薬剤と同時投与される薬剤の活性成分は経口的使用に適した形態である。経口的使用を目的とする医薬組成物は、医薬組成物の製造分野で既知の任意の方法に従って調製することができ、そのような組成物は、医薬的に洗練された美味な調製物を提供するために、1種または複数の薬剤、例えば、甘味剤、着香剤、着色剤及び保存剤を含むことができる。錠剤、カプセル剤などは、錠剤の製造に適した無毒の医薬的に許容可能な賦形剤との混合物中に活性成分を含む。これらの賦形剤は、例えば、希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウムまたはリン酸ナトリウム；造粒剤及び崩解剤、例えば、コーンスタークまたはアルギン酸；結合剤、例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシアゴム（acacia）及び潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクでもよい。

#### 【 0 2 1 5 】

経口投与に適した錠剤、カプセル剤などは、消化管において崩壊及び吸収を遅らせ、それによって、持続的作用をもたらすための既知の技法によって、コーティングされていなくてもよいし、コーティングされていてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの時間遅延物質を用いることができる。これらは、制御放出用の浸透性治療錠剤を形成するための当技術分野で既知の技法によってコーティングすることもできる。さらなる薬剤としては、投与組成物の送達を制御するための、生分解性または生体適合性の粒子またはポリマー物質、例えば、ポリエステル、ポリアミン酸、ハイドロゲル、ポリビニルピロリドン、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、エチレン-ビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミンまたはラクチド／グリコリドコポリマー、ポリラクチド／グリコリドコポリマー、またはエチレンビニルアセテートコポリマーが挙げられる。例えば、経口薬剤を、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルまたはポリ（メタクリル酸メチ

10

20

30

40

50

ル)マイクロカプセルを使用することによるコアセルベーション技法または界面重合により調製されるマイクロカプセルに、またはコロイド薬物送達システムに封入することができる。コロイド分散系としては、巨大分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフェア、マイクロビーズ及び脂質ベースの系（水中油形エマルジョン、ミセル、混合ミセル及びリポソームが含まれる）が挙げられる。上記の製剤の調製方法は当業者には明らかである。

#### 【0216】

経口的使用のための製剤は、活性成分が不活性な固体希釈剤、例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、カオリンもしくは微結晶セルロースと混合された硬質ゼラチンカプセル剤として、または活性成分が水もしくは油媒体、例えば、ピーナッツ油、流動パラフィンもしくはオリーブ油と混合された軟質ゼラチンカプセル剤として、提供することもできる。10

#### 【0217】

水性懸濁剤は、その製造に適した賦形剤との混合物中に活性材料を含む。そのような賦形剤は、懸濁化剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシ-プロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル-ピロリドン、トラガカントゴム及びアカシアゴム；分散剤または湿潤剤、例えば、天然に存在するホスファチド（例えば、レシチン）、またはアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシ-エチレンステアレート）、またはエチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール用）、またはエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、またはエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール無水物に由来する部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリエチレンソルビタンモノオレエート）でもよい。水性懸濁剤は1種または複数の防腐剤を含むこともできる。20

#### 【0218】

油性懸濁剤は、植物油、例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油またはココナッツ油中に、または鉱物油、例えば流動パラフィン中に活性成分を懸濁させることによって、製剤化することができる。油性懸濁剤は、増粘剤、例えば、蜜ろう、固体パラフィンまたはセチルアルコールを含むことができる。美味な経口調製物を提供するために、上記のものなどの甘味剤及び着香剤を加えることができる。30

#### 【0219】

水を加えることによって水性懸濁剤を調製するのに適した分散性粉末剤及び顆粒剤は、分散剤または湿潤剤、懸濁化剤及び1種または複数の防腐剤との混合物中に活性成分を提供する。適切な分散剤または湿潤剤及び懸濁化剤は、本明細書で例示される。

#### 【0220】

本開示の医薬組成物は水中油形乳剤の形態でもよい。油相は植物油、例えばオリーブ油もしくはラッカセイ油でもよく、または鉱物油、例えば、流動パラフィンでもよく、またはこれらの混合物でもよい。適切な乳化剤は、天然に存在するゴム、例えば、アカシアゴムまたはトラガカントゴム；天然に存在するホスファチド、例えば、ダイズ、レシチン、及び脂肪酸に由来するエステルまたは部分エステル；ヘキシトール無水物、例えば、ソルビタンモノオレエート；ならびに部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートであり得る。40

#### 【0221】

製剤は、急速な分解または身体からの排除に対して組成物を保護するために、担体を含むことができ、例えば、埋植体、リポソーム、ハイドロゲル、プロドラッグ及びマイクロカプセル化送達系を含めた制御放出製剤である。例えば、モノステアリン酸グリセリルまたはステアリン酸グリセリルなどの時間遅延物質を単独でまたはワックスと組み合わせて用いることができる。

#### 【0222】

本開示は、直腸内投与のために、坐剤の形態のIL-10ポリペプチドの投与を企図す

10

20

30

40

50

る。坐剤は、常温では固体であるが直腸温では液体である適切な非刺激性賦形剤と薬物を混合することによって調製することができ、したがって、直腸で融解して薬物を放出することになる。そのような材料としては、限定されないが、ココアバター及びポリエチレングリコールが挙げられる。

#### 【0223】

本開示によって企図されるIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）及び他の薬剤は、現在既知であるか将来的に開発される任意の他の適切な医薬組成物の形態（例えば、経鼻または吸入使用のためのスプレー剤）でもよい。

#### 【0224】

10 製剤中のポリペプチド（例えば、IL-10）またはその断片の濃度は広く変動する可能性があり（例えば、重量基準で約0.1%未満、通常約2%または少なくとも約2%～20%～50%程度またはそれ以上）、及び、通常、例えば選択される特定の投与様式に従って、液量、粘度及び対象に基づく要因に主としてに基づいて選択される。

#### 【0225】

##### 投与経路

本開示は、任意の適切な方法での、IL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）及びその組成物の投与を企図する。適切な投与経路としては、非経口（例えば、筋肉内、静脈内、皮下（例えば、注射または埋植体）、腹腔内、囊内、関節内、腹腔内、脳内（実質内）及び脳室内）、経口、経鼻、腔、舌下、眼内、直腸、局所（例えば、経皮）、舌下ならびに吸入が挙げられる。定められた期間にわたって本明細書に開示されるIL-10薬剤放出するために、一般に皮下または筋肉内に投与されるデボー注射を利用することもできる。

#### 【0226】

本開示のいくつかの特定の実施形態では、IL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）は非経口的に投与され、さらなる特定の実施形態では、非経口投与は皮下である。

#### 【0227】

CAR-T細胞療法に関して、キメラ抗原受容体を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を対象に導入するための代替手段であって、キメラ抗原受容体が、標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、標的細胞集団へのキメラ抗原受容体の標的化領域の結合が、活性化誘導細胞死を惹起することができる代替手段が本明細書に記載される。

#### 【0228】

##### 併用療法

本明細書に記載のCAR-T細胞療法と併せて、本開示は、1種または複数の活性薬剤（例えば、化学療法剤）または他の予防的もしくは治療的な非薬理学的モダリティ（例えば、局所的放射線療法または全身放射線療法）と組み合わせたIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）の使用を企図する。例として、本開示は、放射線照射フェーズに、1つもしくは複数のさらなる療法（例えば、CAR-T細胞療法及びIL-10薬剤の投与）または本明細書に記載の薬剤による治療が先行するかまたは後続する、治療レジメンを企図する。いくつかの実施形態では、本開示は、骨髄移植、末梢血幹細胞移植または他の種類の移植療法と組み合わせた、CAR-T細胞療法及びIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）の使用をさらに企図する。

#### 【0229】

本明細書で使用する場合、「併用療法」は、別々に投与または導入することができる、例えば、（例えば、キット中に提供することができるような）別々の投与のために別々に製剤化することができる療法、及び一緒に投与または導入することができる療法を含むこと意図する。ある種の実施形態では、例えば、1つまたは複数の他の薬剤より前に1つの薬剤が投与される場合、IL-10薬剤及び他の薬剤（複数可）は連続して投与されるか与えられる。他の実施形態では、例えば、同時にまたはほとんど同時に2つ以上の薬剤が投与される場合、IL-10薬剤及び他の薬剤（複数可）は同時に投与され、2つ以上の

10

20

30

40

50

薬剤は2つ以上の別々の製剤に存在していても、または単一の製剤中に組み合わされてもよい（すなわち、共製剤）。薬剤が連續して投与されるか同時に投与されるを問わず、本開示の目的のために薬剤は組み合わせて投与されると見なされる。

#### 【0230】

本開示のIL-10薬剤は、その状況下で適切な任意の方法で、少なくとも1つの他の活性薬剤と組み合わせて使用することができる。一実施形態では、IL-10薬剤及び他の薬剤（複数可）による治療は、ある期間にわたって維持される。別の実施形態では、（例えば、対象が安定している場合）少なくとも1つの他の薬剤（複数可）による治療は低減されるかまたは中断されるが、本開示のIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）による治療は一定の投薬レジメンで維持される。さらなる実施形態では、（例えば、対象が安定している場合）他の薬剤（複数可）による治療は低減されるか中断されるが、本開示のIL-10薬剤による治療は低減される（例えば、より低用量、より低頻度の投薬またはより短い治療レジメン）。さらに別の実施形態では、（例えば、対象が安定している場合）他の薬剤（複数化）による治療は低減されるか中断され、本開示のIL-10薬剤による治療は増大される（例えば、より高用量、より高頻度の投薬またはより長い治療レジメン）。さらに別の実施形態では、他の薬剤（複数可）による治療は維持され、本開示のIL-10薬剤による治療は低減されるか中断される（例えば、より低用量、より低頻度の投薬またはより短い治療レジメン）。さらに別の実施形態では、他の薬剤（複数可）による治療及び本開示のIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）による治療は低減されるか中断される（例えば、より低用量、より低頻度の投薬またはより短い治療レジメン）。

10

#### 【0231】

本明細書に記載のCAR-T細胞療法と併せて、本開示は、所望の活性を示すIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）及び少なくとも1つのさらなる治療的または予防的薬剤（複数可）または診断剤によって、増殖性状態、癌、腫瘍または前癌性の疾患、障害もしくは状態を治療及び/または予防する方法を提供する。本開示のいくつかの実施形態は、従来の化学療法剤（例えば、アルキル化剤、ナイトロジエンマスター、ニトロソ尿素、抗生物質、代謝拮抗薬、葉酸類似体、プリン類似体、ピリミジン類似体、抗ホルモン剤及びタキソイド）の使用を企図する。他の本開示の実施形態は、相加的または相乗的な腫瘍増殖抑制を達成するために、シグナル伝達インヒビター（例えば、GLEEVECまたはHERCEPTIN）または免疫調節剤と組み合わせて本明細書に記載のIL-10薬剤を投与することを含む、腫瘍抑制または腫瘍増殖のための方法を企図する。

20

#### 【0232】

本明細書に記載のCAR-T細胞療法と併せて、本開示は、所望の活性を示すIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）及び少なくとも1つのさらなる薬剤（複数可）または診断剤によって、免疫及び/または炎症関連の疾患、障害及び状態ならびにそれに関連する障害を治療及び/または予防する方法も提供する。併用療法に有用な治療剤の例としては、限定されないが、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、シクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）インヒビター、ステロイド、TNFアンタゴニスト（例えば、REMICADE及びENBREL）、インターフェロン-1a（AVONEX）、インターフェロン-1b（BETASERON）及び免疫チェックポイントインヒビター（例えば、YERVOY）が挙げられる。

30

#### 【0233】

##### 投薬

本開示のIL-10薬剤（例えば、PEG-IL-10）は、例えば、投与の目標（例えば、所望の回復度）；製剤が投与される対象の年齢、体重、性別及び健康及び身体状態；ならびに投与経路によって決まる量で対象に投与することができる。有効投薬量及び投薬レジメンは、例えば、安全性及び用量漸増試験、インビボ研究（例えば、動物モデル）ならびに当業者に既知の他の方法から容易に決定することができる。

#### 【0234】

40

50

他の個所で詳述されるように、本開示は、I L - 1 0 の投与がある種の血清トラフ濃度を達成する、及び／またはある種の平均血清トラフ濃度を維持する実施形態を企図する。

#### 【 0 2 3 5 】

一般に、投薬パラメーターは、対象に対して不可逆的に毒性を持つ可能性がある量（すなわち、最大耐量「M T D」）より低く、且つ対象に対して測定可能な効果をもたらすのに必要とされる量より低くない投薬量を規定する。そのような量は、投与経路及び他の要因を考慮に入れて、例えば、A D M E と関連する薬物動態的及び薬力学的パラメーターによって決定される。

#### 【 0 2 3 6 】

有効量（E D）は、薬剤を摂取する対象のある割合において、治療応答または所望の効果をもたらす薬剤の用量または量である。薬剤の「半有効量」またはE D 5 0 は、薬剤が投与される集団の5 0 %で治療応答または所望の効果をもたらす薬剤の用量または量である。E D 5 0 は、一般に、薬剤の効果の妥当な予測値の尺度として使用されるが、これは、必ずしも臨床医がすべての関連する要因を考慮に入れて適切と考える可能性がある用量とは限らない。したがって、場合によっては、有効量は計算されたE D 5 0 を超えてよく、他の状況では、有効量は計算されたE D 5 0 より低くてもよく、さらに他の状況では有効量は計算されたE D 5 0 と同じでもよい。

10

#### 【 0 2 3 7 】

P E G - I L - 1 0 の治療有効量は、約0 . 0 1 ~ 約1 0 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日、約0 . 1 ~ 2 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日、約0 . 5 ~ 1 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日または約1 ~ 4 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日の範囲にわたり得る。いくつかの実施形態では、P E G - I L - 1 0 は、約5 0 ~ 8 0 0 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日（例えば、約1 ~ 1 6 μ g タンパク質 / k g 体重 / 日のP E G - I L - 1 0 ）を送達するように持続注入によって投与される。注入速度は、例えば、有害作用及び血球数の評価に基づいて変動し得る。I L - 1 0 薬剤についての他の特定の投薬パラメーターは、本明細書の他の個所で記載される。

20

#### 【 0 2 3 8 】

ある種の実施形態では、開示されるI L - 1 0 薬剤の投薬量は「単位剤形」に含まれる。フレーズ「単位剤形」は物理的に分離した単位を指し、各単位は、単独でまたは1種または複数のさらなる薬剤と組み合わせて、所望の効果をもたらすのに十分である、所定量の本開示のI L - 1 0 薬剤を含む。単位剤形のパラメーターは特定の薬剤及び達成されるべき効果に依存することが理解されよう。

30

#### 【 0 2 3 9 】

##### キット

本開示は、I L - 1 0 薬剤（例えば、P E G - I L - 1 0 ）及びその医薬組成物を含むキットも企図する。キットは、一般に、以下に記載されるような様々な成分を収容する物理的構造の形態であり、例えば、上記の方法を実施する際に利用可能である。

#### 【 0 2 4 0 】

キットは、（例えば、滅菌容器中に提供される）本明細書に開示されるI L - 1 0 薬剤（例えば、P E G - I L - 1 0 ）を含むことができ、これは、対象への投与に適した医薬組成物の形態でもよい。I L - 1 0 薬剤は、すぐに使える形態で、または例えば、投与前に再構成または希釈を必要とする形態で提供することができる。I L - 1 0 薬剤が、使用者が再構成する必要がある形態である場合は、キットは、I L - 1 0 薬剤とともにパッケージ化された、またはI L - 1 0 薬剤とは別に、緩衝液、医薬的に許容可能な賦形剤などを含むこともできる。キットはまた、I L - 1 0 薬剤及び／または使用される特定のC A R - T T 細胞療法の成分の両方を含むことができ；キットは、いくつかの薬剤を別々に含むことができ、またはこれらは、キット内で既に組み合わされていてもよい。本開示のキットは、その中に収容された成分を適切に維持するのに必要な条件（例えば、冷蔵または冷凍）用に設計することができる。

40

#### 【 0 2 4 1 】

50

キットは、その中の成分についての識別情報及びそれらの使用についての説明書（例えば、投薬パラメーター、活性成分（複数可）の臨床薬理（作用機構（複数可）、薬物動態及び薬力学、有害作用、禁忌などが含まれる））を含むラベルまたは添付文書を含むことができる。キットの各成分は個々の容器内に封入されていてもよく、様々な容器のすべてが単一包装内にあってもよい。ラベルまたは添付文書は、ロット番号及び有効期限などの製造情報を含むことができる。ラベルまたは添付文書は、成分を収容する物理的構造内に統合されてもよく、物理的構造内に別々に含まれてもよく、またはキットの成分（例えば、アンプル、シリンジもしくはバイアル）に固定されてもよい。

#### 【0242】

ラベルまたは添付文書は、さらに、コンピュータ可読媒体、例えば、ディスク（例えば、ハードディスク、カード、メモリーディスク）、光学ディスク、例えば、C D - もしくはD V D - R O M / R A M 、D V D 、M P 3 、磁気テープ、または電気記憶媒体、例えば、R A M 及びR O M 、またはこれらの複合型、例えば、磁気／光記録媒体、F L A S H メディアもしくはメモリータイプカードを含んでもよく、またはこれらの中に組み込まれてもよい。いくつかの実施形態では、実際の説明書はキット中に存在しないが、例えばインターネットサイトを介して遠隔供給源から説明書を得るための手段が提供される。

10

#### 【実施例】

#### 【0243】

以下の実施例は、本発明を製造及び使用する方法の完全な開示及び説明を当業者に提供するために提示され、本発明者らが自身の発明と考えるものとの範囲を限定することを意図するものではなく、また、以下の実験が実施され、実施され得る実験のすべてであることを表すことを意図するものでもない。現在時制で書かれた例示的説明は必ずしも実施されたとは限らず、むしろその中に記載されたデータなどを生成するために説明を実施できることを理解されたい。使用される数（例えば、量、温度など）について正確性を保証するように努力したが、いくつかの実験的誤差及び偏差が考慮されるべきである。

20

#### 【0244】

別段指示がない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏度（°）であり、圧力は大気圧またはその付近である。標準的な省略形が使用され、これには以下が含まれる：s またはs e c = 秒（複数可）；m i n = 分（複数可）；h またはh r = 時間（複数可）；a a = アミノ酸（複数可）；b p = 塩基対（複数可）；k b = キロベース（複数可）；n t = ヌクレオチド（複数可）；n g = ナノグラム；μ g = マイクログラム；m g = ミリグラム；g = グラム；k g = キログラム；d l またはd L = デシリットル；μ l またはμ L = マイクロリットル；m l またはm L = ミリリットル；l またはL = リットル；n M = ナノモル濃度；μ M = マイクロモル濃度；m M = ミリモル濃度；M = モル濃度；k D a = キロダルトン；i . m . = 筋肉内（に）；i . p . = 腹腔内（に）；S C またはS Q = 皮下（に）；H P L C = 高速液体クロマトグラフィー；B W = 体重；U = 単位；n s = 統計学的に有意でない；P M A = ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート；P B S = リン酸緩衝食塩水；D M E M = ダルベッコ改変イーグル培地；P B M C = 一次末梢血单核球；F B S = ウシ胎児血清；F C S = ウシ胎仔血清；H E P E S = 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ビペラジンエタンスルホン酸；L P S = リポ多糖；R P M I = ロズウェルパーク記念研究所培地；A P C = 抗原提示細胞；F A C S = 蛍光活性化セルソーティング。

30

#### 【0245】

#### 材料及び方法

下記の一般的な材料及び方法は、指示された場合に使用され、または以下の実施例で使用され得る。

#### 【0246】

分子生物学的手順。分子生物学の標準的な方法は科学文献に記載されている（例えば、S a m b r o o k and R u s s e l l (2 0 0 1) M o l e c u l a r C l o n i n g , 3 r d e d . , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y

40

50

Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 及びAusubel, et al. (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1 - 4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y(これらは、細菌細胞でのクローニング及びDNA変異誘発(Vol. 1)、哺乳動物細胞及び酵母でのクローニング(Vol. 2)、複合糖質及びタンパク質発現(Vol. 3)ならびにバイオインフォマティクス(Vol. 4)を記載する)を参照されたい)。

#### 【0247】

抗体関連方法。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の產生、精製及び断片化が記載されている(例えば、Harlow and Lane(1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。リガンド/受容体相互作用を特徴づける標準的な技法が利用可能である(例えば、Coligan et al. (2001) Current Protocols in Immunology, Vol. 4, John Wiley, Inc., NYを参照されたい)。蛍光活性化セルソーティング(FACS)を含めたフローサイトメトリーのための方法が利用可能である(例えば、Shapiro(2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJを参照されたい)。例えば診断試薬として使用するために、核酸、例えば、核酸プライマー及びプローブ、ポリペプチド及び抗体を修飾するのに適した蛍光試薬が利用可能である(Molecular Probes(2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; Sigma-Aldrich(2003) Catalogue, St. Louis, MO.)。抗体のさらなる議論は、本明細書の他の個所に登場する。

#### 【0248】

ソフトウェア。例えば、抗原断片、リーダー配列、タンパク質フォールディング、機能ドメイン、グリコシル化部位及び配列アラインメントを決定するためのソフトウェアパッケージ及びデータベースが利用可能である(例えば、GCG Wisconsin Package(Accelrys, Inc., San Diego, CA); 及びDecypher(商標)(TimeLogic Corp., Crystal Bay, NVを参照されたい))。

#### 【0249】

ペグ化。本明細書に記載のペグ化IL-10は、当業者に既知の任意の手段によって合成することができる。モノ-PEG-IL-10及びモノ-/ジ-PEG-IL-10の混合物を生成するための例示的合成スキームが記載されている(例えば、米国特許第7,052,686号; 米国特許公開第2011/0250163号; WO2010/077853を参照されたい)。本開示の特定の実施形態は、選択的にペグ化されたモノ-及びジ-PEG-IL-10の混合物を含む。本開示の実施に適したPEG(及び他の薬物送達技術)の生成及び使用における自身の技能を活用することに加えて、当業者はPEG関連技術の多くの商業的供給業者に精通している(例えば、NOF America Corp.(Irvine, CA)及びParchem(New Rochelle, NY))。

#### 【0250】

動物。当業者に既知の様々なマウス及び他の動物系統を本開示の教示と併せてを使用することができる。例えば、免疫適格性Balb/CマウスまたはB細胞欠損Balb/CマウスをJackson研究所、Bar Harbor、MEから得ることができ、標準的手順に従って使用することができる(例えば、Martin et al.(2001) Infect. Immun., 69(11):7067-73及びCompton et al.(2004) Comp. Med. 54(6):681-89を参照されたい)。

#### 【0251】

IL-10濃度。血清IL-10の濃度レベル及び曝露レベルは、当技術分野で使用される標準的な方法によって決定することができる。例えば、実験対象がマウスである場合

10

20

30

30

40

50

、切断したマウスの尾から全血（約 $50\mu\text{L}$  / マウス）を単純な毛細管に採取し、遠心分離によって血清及び血球を分離し、標準的なELISAキット及び技法によってIL-10の曝露レベルを決定することによって、血清曝露レベルアッセイを実施することができる。

#### 【0252】

FACS分析。FACS分析に関する多数のプロトコール、材料及び試薬が市販されており、本明細書の教示と併せて使用することができる（例えば、Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ; Cell Signaling Technologies, Danford, MA; Abcam, Cambridge, MA; Affymetrix, Santa Clara, CA）。ダイレクトフローサイトメトリー（すなわち、コンジュゲート化一次抗体の使用）及びインダイレクトフローサイトメトリー（すなわち、一次抗体及びコンジュゲート化二次抗体の使用）の両方を使用することができる。例示的なダイレクトフローのプロトコールは以下の通りである：収集した細胞を洗浄し、氷冷したPBS、10% FCS、1% アジ化ナトリウム中で細胞懸濁液を $1 \sim 5 \times 10^6$  細胞 / mL の濃度に調整する。ポリスチレンの丸底の $12 \times 75\text{mm}^2$  ファルコンチューブ中で細胞を染色することができる。細胞の喪失がほとんどない状態で、しかし細胞を再懸濁するのが難しくない程度で、細胞を十分に遠心分離することができ、それで上清液を除去することができる。一次標識抗体を加えることができ（0.1 ~ 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ）、必要に応じて、3% BSA / PBS 中で希釈物を作製することができる。  
4 で少なくとも30分間インキュベーションした後、400gで5分間の遠心分離によって3回細胞を洗浄することができ、次いで、0.5 ~ 1 mL の氷冷のPBS、10% FCS、1% アジ化ナトリウム中に再懸濁することができる。分析するまで（好都合には同日中）、暗所の氷上で細胞を維持することができる。細胞を数日間保つために標準的な方法を使用して細胞を固定することもでき、異なる抗原に対する固定は、抗原特異的な最適化を必要とする場合がある。

#### 【0253】

以下に記載するアッセイは代表的なものであり、排他的なものではない。

#### 【0254】

PBMC及びCD8+T細胞遺伝子発現アッセイ。以下のプロトコールは遺伝子発現を調べるための例示的アッセイを提供する。

#### 【0255】

ヒトPBMCは、任意の標準的プロトコールに従って単離することができる（例えば、Fuss et al. (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NYを参照されたい）。RPMI (Life Technologies; Carlsbad, CA)、10 mM HEPES (Life Technologies; Carlsbad, CA)、10% FCS (Hyclone Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA) 及びペニシリン / ストレプトマイシンカクテル (Life Technologies; Carlsbad, CA) を含む完全RPMIを用いて、任意の標準的な組織培養処理6ウェルプレート (BD; Franklin Lakes, NJ) 中で、ウェルあたり $2.5\text{mL}$  のPBMC ( $800$ 万細胞 / mL の細胞密度) を培養することができる。ヒトペグ化-IL-10を $100\text{ng} / \text{mL}$  の終濃度でウェルに加え、続いて、7日間インキュベーションすることができる。Miltenyi BiotecのMACS細胞分離技術を使用して、製造業者のプロトコール (Miltenyi Biotech; Auburn, CA) に従って、CD8+T細胞をPBMCから単離することができる。それぞれ、QiagenのRNeasyキット及びRT2 First Strandキットを使用して、製造者の説明書 (Qiagen N.V.; Netherlands) に従って、単離したCD8+T細胞及びCD8+T細胞を枯渇させたPBMCからRNAを抽出することができ、cDNAを合成することができる。QiagenのRT2 SYBR Green qPCR Mastermix及びプライマー (ID01, GUSB

10

20

30

40

50

及びGAPDH)を使用して、製造業者のプロトコールに従って、cDNAテンプレートに対して定量的PCR実施することができる。IDO1のCt値をハウスキーピング遺伝子、すなわちGUSB及びGAPDHの平均Ct値に対して標準化することができる。

#### 【0256】

PBMC及びCD8+T細胞サイトカイン分泌アッセイ。活性化一次ヒトCD8+T細胞は、PEG-IL-10、次いで抗CD3抗体で処理した場合に、IFN- $\gamma$ を分泌する。以下のプロトコールは、サイトカイン分泌を調べるための例示的アッセイを提供する。

#### 【0257】

ヒトPBMCは、任意の標準的プロトコールに従って単離することができる(例えば、Fuss et al. (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NYを参照されたい)。RPMI(Life Technologies; Carlsbad, CA)、10 mM HEPES(Life Technologies; Carlsbad, CA)、10% FCS(Hyclone Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA)及びペニシリン/ストレプトマイシンカクテル(Life Technologies; Carlsbad, CA)を含む完全RPMIを用いて、任意の標準的な組織培養処理6ウェルプレート(BD; Franklin Lakes, NJ)中で、ウェルあたり2.5mLのPBMC(800万細胞/mLの細胞密度)を培養することができる。ヒトペグ化-IL-10を100ng/mLの終濃度でウェルに加え、続けて3日間インキュベーションすることができる。Miltenyi BiotecのMACS細胞分離技術を使用して、製造業者のプロトコール(Miltenyi Biotec; Auburn, CA)に従って、CD8+T細胞をPBMCから単離することができる。次いで、1 $\mu$ g/mLの抗CD3抗体(Affymetrix eBioscience)を含む完全RPMIを用いて、任意の標準的な組織培養プレート中で4時間、単離したCD8+T細胞を培養することができる。4時間インキュベーションしてから、培地を採取し、市販のELISAキットを使用して、製造業者のプロトコール(Affymetrix eBioscience)に従って、IFN- $\gamma$ に関してアッセイすることができる。

#### 【0258】

TNF阻害アッセイ。U937細胞(Sigma-Aldrich (#85011440); St. Louis, MO)から入手可能な肺由来のリンパ芽球ヒト細胞系)のPMA刺激は、細胞にTNF $\alpha$ を分泌させ、その後の、このTNF $\alpha$ 分泌細胞のヒトIL-10での処理は、用量依存的にTNF $\alpha$ 分泌の低下を引き起こす。例示的TNF $\alpha$ 阻害アッセイは、以下のプロトコールを使用して実施することができる。

#### 【0259】

10% FBS/FCS及び抗生物質を含むRMP1でU937細胞を培養した後に、条件あたり3連で、1×10<sup>5</sup>個の90%生存可能なU937細胞を96ウェル平底プレート(任意の血漿処理組織培養プレート(例えば、Nunc; Thermo Scientific, USA)を使用することができる)にプレーティングする。次の条件をもたらすように細胞をプレートする(すべて少なくとも3連;「培地単独」についてはウェル数を2倍にし、これは、10nM PMAとのインキュベーション後の生存率に半分を使用するからである):5ng/mL LPS単独; 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; 及び5ng/mL LPS+100ng/mL PEG-rhIL-10。各ウェルを200 $\mu$ Lの10nM PMAに24時間曝露し、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で37℃で培養

10

20

20

30

40

50

し、その時間の後は、約 90 % の細胞が接着しているべきである。3 つの追加ウェルを再懸濁させることができ、細胞を計数して、生存率を評価する (> 90 % が生存可能であるべきである)。PMA を含まない新鮮な培地で、穏やかに、しかし十分に 3 回洗浄し、細胞がウェル中にまだ存在することを確認する。ウェルあたり 100 μL の、適切な濃度 (容積が 100 % に希釈される場合 2 倍) の rhIL-10 または PEG-rhIL-10 を含む培地を加え、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 37 °C で 30 分間インキュベートする。ウェルあたり 100 μL の 10 ng / mL LPS を加えて、各ウェルで 5 ng / mL LPS の終濃度にし、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 37 °C で 18 ~ 24 時間インキュベートする。上清を取り出し、製造者の説明書に従って TNF E L I S A を行う。E L I S A において各条件上清 (conditioned supernatant) を 2 連で行う。

#### 【0260】

MC/9 細胞増殖アッセイ。MC/9 細胞 (Cell Signaling Technology; Danvers, MA から入手可能な、肥満細胞の特性を有するマウス細胞系) への IL-10 投与は、用量依存的に細胞増殖の増大を引き起す。Thompson-Snipes, L. et al. (1991) J. Exp. Med. 173: 507 - 10 は、MC/9 細胞が IL3 + IL-10 及び IL-3 + IL-4 + IL-10 で補充される標準的なアッセイプロトコールを記載している。供給業者 (例えば、R&D Systems, USA; 及び Cell Signaling Technology, Danvers, MA) は、rhIL-10 についてのロットリリースアッセイとしてこのアッセイを使用する。当業者は、細胞が IL-10 のみで補充されるように Thompson-Snipes, L. et al. に記載されている標準的なアッセイプロトコールを変更することができるであろう。

#### 【0261】

活性化誘導細胞死アッセイ。以下のプロトコールは、例示的活性化誘導細胞死アッセイを提供する。

#### 【0262】

ヒト PBMC は、任意の標準的プロトコールに従って単離することができる (例えば、Fuss et al. (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NY を参照されたい)。CD8+T 細胞 (CD45RO+) は、Miltenyi Biotech の抗 CD45RO MACS ビーズ及び MACS 細胞分離技術を使用して、製造業者のプロトコール (Miltenyi Biotech Inc; Auburn, CA) に従って、単離することができる。細胞を活性化するために、抗 CD3 及び抗 CD28 抗体 (Affymetrix eBioscience, San Diego, CA) でプレコーティングされた標準的な 24 ウェルプレート (BD; Franklin Lakes, NJ) 中で、AIM V 培地 (Life Technologies; Carlsbad, CA) で、1 mL の単離細胞 (3 × 10<sup>6</sup> 細胞 / mL の密度) を 3 日間培養することができる。プレコーティングプロセスは、10 μg / mL の抗 CD3 抗体及び 2 μg / mL の抗 CD28 抗体を含む 300 μL の炭酸緩衝液 (0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)、0.5 M NaCl (Sigma-Aldrich)、pH 8.3) を各ウェルに加え、37 °C で 2 時間インキュベートし、AIM V 培地で各ウェルを洗浄することによって行うことができる。3 日間の活性化期間に統一して、細胞を採取し、計数し、標準的な 24 ウェルプレート中の 1 mL の AIM V 培地 (2 × 10<sup>6</sup> 細胞 / mL の密度) に再プレーティングし、100 ng / mL PEG-hIL-10 で 3 日間処理することができる。PEG-hIL-10 による活性化及び処理のプロセスを反復することができ、その後、製造業者のプロトコール (Life Technologies) に従って、トリパンブルー排除によって生細胞を計数することができる。

#### 【0263】

腫瘍モデル及び腫瘍分析。当技術分野で認められた任意の腫瘍モデル、アッセイなどを

10

20

30

40

50

、様々な腫瘍に対する本明細書に記載のIL-10薬剤の効果を評価するのに使用することができる。以下に記載される腫瘍モデル及び腫瘍分析は、利用可能なものの代表である。同系のマウス腫瘍細胞を、腫瘍接種あたり $10^4$ 、 $10^5$ または $10^6$ 細胞で皮下または皮内に注射する。Ep2乳癌腫、CT26結腸癌腫、皮膚のPDV6扁平上皮癌腫及び4T1乳癌腫モデルを使用することができる（例えば、Langowski et al. (2006) Nature 442: 461 - 465を参照されたい）。免疫適格性Balb/CマウスまたはB細胞欠損Balb/Cマウスを使用することができる。PEG10-mIL-10を免疫適格性マウスに投与してもよく、一方で、PEG-hIL-1処理がB細胞欠損マウスで行われてもよい。処理を開始する前に、腫瘍を $100 \sim 250\text{ mm}^3$ のサイズに到達させる。IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10または緩衝液対照を腫瘍移植から離れた部位でSC投与する。腫瘍増殖は、典型的には、電子キャリパーを使用して週2回モニターする。腫瘍組織及びリンパ器管を様々なエンドポイントで収集して、いくつかの炎症マーカーについてmRNAの発現を測定し、いくつかの炎症細胞マーカーについて免疫組織化学的検査を行う。組織を液体窒素中で急速凍結し、-80°Cで保存する。原発腫瘍増殖は、典型的には、電子キャリパーを使用して週2回モニターする。腫瘍体積は、式（幅 $2 \times$ 長さ $/2$ ）（長さは長いほうの寸法である）を使用して計算することができる。処理を開始する前に、腫瘍を $90 \sim 250\text{ mm}^3$ のサイズに到達させる。

【 0 2 6 4 】

## 実施例 1

PEG-IL-10はCD8+T細胞の免疫活性化を媒介する

PEG-rHuIL-10による29日間の治療の前及び後の癌患者において、PD-1-及びLAG3を発現するCD8+T細胞の数の変化を測定した。持続性の部分応答を伴って療法に応答した2人の患者は、血中のPD1+CD8T細胞が増加した。第1の患者（腎細胞癌腫）は、毎日20μg/kgのPEG-rHuIL-10のSCを受け、22週後に総腫瘍量の71%の低減を経験した。第2の患者（黒色腫）は毎日40μg/kgのPEG-rHuIL-10のSCを受け、22週後に総腫瘍量の57%低減を経験した。

【 0 2 6 5 】

治療前及び治療期間中に、末梢血単核球細胞（PBM C）を各患者の末梢から単離し、FACS分析にかけた。図1に示すように、PD-1を発現する末梢CD8+T細胞の数は29日以内に約2倍まで増加し、治療期間中増加し続け、LAG3を発現する末梢CD8+T細胞の数は29日以内に約4倍まで増加した。PD-1及びLAG3の両方はCD8+T細胞活性化及び細胞毒性機能のマーカーである。これらの発見は、PEG-rHuIL-10投与がCD8+T細胞の免疫活性化を媒介したことを示唆する。

【 0 2 6 6 】

## 実施例 2

PEG-IL-10は活性化メモリ-CD8+T細胞の機能を増強する

メモリーT細胞（抗原経験T細胞とも称される）は、前の感染、癌への暴露または以前のワクチン接種の間に、そのコグネイト抗原に以前に遭遇及び応答したTリンパ球のサブセット（例えば、ヘルパーT細胞（CD4+）及び細胞障害性T細胞（CD8+））である。これに対して、ナイーブT細胞は末梢内でそのコグネイト抗原に遭遇しておらず、これは、一般に、活性化マーカーのCD25、CD44またはCD69がないこと、及びメモリーCD45ROアイソフォームがないことを特徴とする。一般にCD45RO+であるメモリーT細胞は、ナイーブT細胞よりも速く強い免疫応答を再現及び開始することができる。

【 0 2 6 7 】

リーキー CD 8 + T 細胞 (CD45RO+) における INF γ 生成を優先的に増強するが、ナイーブ CD 8 + T 細胞はそうではない。これらのデータは、活性化メモリー CD 8 + T 細胞の機能を増強するための PEG - IL - 10 の効果と矛盾がない。

#### 【0268】

実施例 3

PEG - IL - 10 处理は、より多くの活性化メモリー CD 8 + T 細胞をもたらす

本明細書に記載のように、CAR - T 細胞療法はメモリー CD 8 + T 細胞に由来する。効果的であるためには、注入するされたメモリー CD 8 + T 細胞は、細胞毒性を示さなければならぬだけでなく、持続しなければならない (Curran KJ, Brentjens RJ. (20 Apr 2015) J Clin Oncol pii: JCO.2014.60.3449; Berger et al., (Jan 2008) J Clin Invest 118 (1): 294 - 305)。しかし、T 細胞の反復活性化は活性化誘導細胞死を導き、これは細胞数を減少させ、したがって、全体的な治療効果を低下させる。

10

#### 【0269】

本明細書に記載の手順を使用して、PEG - IL - 10 による処理あり及びなしで、2人のドナーからのヒト CD45RO+ メモリー CD 8 + T 細胞の活性化誘導細胞死を測定した。図 3 に示すように、2 ラウンドの TCR 及び同時刺激誘導性活性化後の PEG - IL - 10 によるヒト CD45RO+ メモリー CD 8 + T 細胞の処理は、より多くの数の生細胞をもたらした。これらのデータは、PEG - IL - 10 が活性化誘導細胞死を制限することができ、したがって、より多くの数の活性化メモリー T 細胞をもたらして持続することを示す。これらの知見は、CAR - T 細胞療法と組み合わせた PEG - IL - 10 の使用がさらなる臨床的有用性を提供することを示唆する。

20

#### 【0270】

本発明を実施するために本発明者らが知っている最良の形態を含めた本発明の特定の実施形態が、本明細書に記載される。前述の説明を読めば、開示される実施形態の変形が当業者に明らかになり得、当業者は、必要に応じてそのような変形を用いることができるところが期待される。したがって、本発明が、本明細書に具体的に記載された以外の方法で実施されること、及び本発明が、適用可能な法律に許容されるように、本明細書に添付の特許請求の範囲に記載される主題のすべての修正及び均等物を含むことが意図される。さらに、本明細書で別段指示がない限り、または文脈に明らかに矛盾していない限り、それらのすべての可能な変形における上記の要素の任意の組み合わせが本発明に包含される。

30

#### 【0271】

本明細書で引用されるすべての刊行物、特許出願、受託番号及び他の参考文献は、個々の刊行物または特許出願のそれぞれが参照により組み込まれると具体的及び個々に示されるかのように、参照により本明細書に組み込まれる。

本発明は以下の態様も含む。

##### [1]

対象の標的細胞集団に対する T 細胞性免疫応答のモジュレート方法であって、

a) キメラ抗原受容体 (CAR) を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を前記対象に導入することであり、

40

ここで、前記キメラ抗原受容体は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも 1 つの抗原特異的標的化領域を含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができるものであること、及び

b) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量の IL - 10 薬剤を前記対象に投与すること  
を含み、

それによって、前記 T - 細胞性免疫応答をモジュレートする、前記モジュレート方法。

##### [2]

50

対象の標的細胞集団に対するT細胞性免疫応答のモジュレート方法であって、

a) キメラ抗原受容体（CAR）であり、

ここで、前記キメラ抗原受容体は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができるもの、及び

b) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL-10薬剤を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を前記対象に導入することを含み、

それによって、前記T-細胞性免疫応答をモジュレートする、前記モジュレート方法。

[3]

対象の標的細胞集団に対するT細胞性免疫応答のモジュレート方法であって、

a) キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な第1の複数の細胞であり、

ここで、前記キメラ抗原受容体は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができるもの；及び

b) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL-10薬剤を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な第2の複数の細胞を前記対象に導入することを含み、

それによって、前記T-細胞性免疫応答をモジュレートする、前記モジュレート方法。

[4]

前記CARが、前記標的細胞集団を特異的に認識する抗原結合ドメインを含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[5]

前記CARが膜貫通ドメイン及びシグナリングドメインをさらに含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[6]

前記シグナリングドメインがCD3ゼータシグナリングドメインを含む、請求項5に記載の方法。

[7]

前記シグナリングドメインが少なくとも1つの共刺激性ドメインを含む、請求項5に記載の方法。

[8]

前記IL-10薬剤が活性化メモリーCD8+T細胞の機能を増強する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[9]

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の投与より前である、請求項1に記載の方法。

[10]

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の投与と同時である、請求項1に記載の方法。

[11]

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の前記投与の後である、請求項1に記載の方法。

[12]

前記キメラ抗原受容体及び前記IL-10薬剤が同じベクターによって発現される、請求項2に記載の方法。

[13]

10

20

30

40

50

前記キメラ抗原受容体及び前記 I L - 1 0 薬剤が異なるベクターによって発現される、請求項 2 に記載の方法。

[ 1 4 ]

前記治療的に有効な複数の細胞に細胞毒性機能を増強するのに十分な量で前記 I L - 1 0 薬剤を発現するベクターをトランスフェクトする、請求項 2 に記載の方法。

[ 1 5 ]

前記治療的に有効な第 2 の複数の細胞に細胞毒性機能を増強するのに十分な量で前記 I L - 1 0 薬剤を発現するベクターをトランスフェクトする、請求項 3 に記載の方法。

[ 1 6 ]

前記治療的に有効な第 2 の複数の細胞が前記 I L - 1 0 薬剤を発現するベクターでトランセフェクトされた C D 8 + T 細胞を含む、請求項 3 に記載の方法。

10

[ 1 7 ]

前記ベクターがプラスミドを含む、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 1 8 ]

前記ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 1 9 ]

前記 I L - 1 0 薬剤の発現が発現制御エレメントによってモジュレートされる、請求項 1 2 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 2 0 ]

20

投与される前記 I L - 1 0 薬剤の量が細胞毒性機能を増強するのに十分である、請求項 1 に記載の方法。

[ 2 1 ]

投与される前記 I L - 1 0 薬剤の量が 1 0 ~ 1 0 0 n g / m L の血清濃度を達成するのに十分である、請求項 2 0 に記載の方法。

[ 2 2 ]

前記 I L - 1 0 薬剤が P E G - I L - 1 0 である、請求項 1 に記載の方法。

[ 2 3 ]

前記 P E G - I L - 1 0 が、 I L - 1 0 の少なくとも 1 つの単量体の少なくとも 1 つのアミノ酸残基に共有結合した少なくとも 1 つの P E G 分子を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

30

[ 2 4 ]

前記 P E G - I L - 1 0 がモノペグ化 I L - 1 0 とジペグ化 I L - 1 0 の混合物を含む、請求項 2 2 に記載の方法。

[ 2 5 ]

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が 5 k D a ~ 2 0 k D a の分子質量を有する、請求項 2 2 に記載の方法。

[ 2 6 ]

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が少なくとも 2 0 k D a の分子質量を有する、請求項 2 2 に記載の方法。

40

[ 2 7 ]

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が少なくとも 3 0 k D 的分子質量を有する、請求項 2 2 に記載の方法。

[ 2 8 ]

前記 I L - 1 0 薬剤が皮下に投与される、請求項 1 に記載の方法。

[ 2 9 ]

前記複数の細胞が前記対象から得られ、エキソビオで遺伝子改変される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

[ 3 0 ]

前記複数の細胞がアフェレーシスによって前記対象から得られる、請求項 2 9 に記載の

50

方法。

[ 3 1 ]

前記第1の複数の細胞が前記対象から得られ、エキソビボで遺伝子改変される、請求項3に記載の方法。

[ 3 2 ]

前記第2の複数の細胞が前記対象から得られ、エキソビボで遺伝子改変される、請求項3 1に記載の方法。

[ 3 3 ]

前記第1の複数の細胞及び前記第2の複数の細胞がアフェレーシスによって前記対象から得られる、請求項3 1または3 2に記載の方法。

10

[ 3 4 ]

前記複数の細胞がメモリーCD8+T細胞である、請求項3 0に記載の方法。

[ 3 5 ]

前記第1の複数の細胞がメモリーCD8+T細胞である、請求項3 3に記載の方法。

[ 3 6 ]

前記第2の複数の細胞がナイーブCD8+T細胞である、請求項3 3に記載の方法。

[ 3 7 ]

前記複数の細胞が自己の腫瘍細胞である、請求項1または2に記載の方法。

[ 3 8 ]

前記第1の複数の細胞及び前記第2の複数の細胞が自己の腫瘍細胞である、請求項3に記載の方法。

20

[ 3 9 ]

前記標的細胞集団が腫瘍抗原を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[ 4 0 ]

前記腫瘍抗原が、CD19、CD20、CD22、ROR1、メソテリン、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRVIII、GD-2、NEY-ESO-1 TCR、MAGE A3 TCRまたはこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、請求項4 3に記載の方法。

[ 4 1 ]

癌に関連した疾患、障害または状態を有する対象の治療方法であって、

30

a ) キメラ抗原受容体(CAR)を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を前記対象に導入することであり、

ここで、前記キメラ抗原受容体は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができること、及び

b ) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な治療有効量のIL-10薬剤を前記対象に投与することを含む、前記治療方法。

[ 4 2 ]

癌に関連した疾患、障害または状態を有する対象の治療方法であって、

40

a ) キメラ抗原受容体(CAR)であり、

ここで、前記キメラ抗原受容体は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合は、活性化誘導細胞死を惹起することができるもの、及び

b ) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のL-10薬剤を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な複数の細胞を前記対象に導入することを含む、前記治療方法。

[ 4 3 ]

50

癌に関連した疾患、障害または状態を有する対象の治療方法であって、

a) キメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な第1の複数の細胞であり、

ここで、前記キメラ抗原受容体は、前記標的細胞集団に結合することができる少なくとも1つの抗原特異的標的化領域を含み、

前記標的細胞集団への前記キメラ抗原受容体の標的化領域の前記結合が、活性化誘導細胞死を惹起することができるもの、及び

b) 前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量のIL-10薬剤を発現するように遺伝子改変した、治療的に有効な第2の複数の細胞を前記対象に導入することを含む、前記治療方法。

10

[44]

前記CARが前記標的細胞集団を特異的に認識する抗原結合ドメインを含む、請求項41～43のいずれか1項に記載の方法。

[45]

前記CARが膜貫通ドメイン及びシグナリングドメインをさらに含む、請求項41～43のいずれか1項に記載の方法。

[46]

前記シグナリングドメインがCD3ゼータシグナリングドメインを含む、請求項45に記載の方法。

[47]

前記シグナリングドメインが少なくとも1つの共刺激性ドメインを含む、請求項45に記載の方法。

[48]

前記IL-10薬剤が活性化メモリーCD8+T細胞の機能を増強する、請求項41～43のいずれか1項に記載の方法。

[49]

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の投与より前である、請求項41に記載の方法。

[50]

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の投与と同時である、請求項41に記載の方法。

20

[51]

前記IL-10薬剤の投与が前記治療的に有効な複数の細胞の前記投与の後である、請求項41に記載の方法。

[52]

前記キメラ抗原受容体及び前記IL-10薬剤が同じベクターによって発現される、請求項42に記載の方法。

[53]

前記キメラ抗原受容体及び前記IL-10薬剤が異なるベクターによって発現される、請求項42に記載の方法。

30

[54]

前記治療的に有効な複数の細胞に、細胞毒性機能を増強するのに十分な量で前記IL-10薬剤を発現するベクターをトランスフェクトする、請求項42に記載の方法。

[55]

前記治療的に有効な第2の複数の細胞に、細胞毒性機能を増強するのに十分な量で前記IL-10薬剤を発現するベクターをトランスフェクトする、請求項43に記載の方法。

[56]

前記治療的に有効な第2の複数の細胞が、前記IL-10薬剤を発現するベクターでトランスフェクトされたCD8+T細胞を含む、請求項43に記載の方法。

[57]

40

50

前記ベクターがプラスミドを含む、請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 5 8 ]

前記ベクターがウイルスベクターを含む、請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 5 9 ]

前記 I L - 1 0 薬剤の発現が発現制御エレメントによってモジュレートされる、請求項 5 2 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

[ 6 0 ]

投与される前記 I L - 1 0 薬剤の量が細胞毒性機能を増強するのに十分である、請求項 4 1 に記載の方法。

10

[ 6 1 ]

投与される前記 I L - 1 0 薬剤の量が 1 0 ~ 1 0 0 n g / m L の血清濃度を達成するのに十分である、請求項 6 0 に記載の方法。

[ 6 2 ]

前記 I L - 1 0 薬剤が P E G - I L - 1 0 である、請求項 4 1 に記載の方法。

[ 6 3 ]

前記 P E G - I L - 1 0 が、 I L - 1 0 の少なくとも 1 つの単量体の少なくとも 1 つのアミノ酸残基に共有結合した少なくとも 1 つの P E G 分子を含む、請求項 6 2 に記載の方法。

[ 6 4 ]

前記 P E G - I L - 1 0 がモノペグ化 I L - 1 0 とジペグ化 I L - 1 0 の混合物を含む請求項 6 2 に記載の方法。

20

[ 6 5 ]

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が 5 k D a ~ 2 0 k D a の分子質量を有する請求項 6 2 に記載の方法。

[ 6 6 ]

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が少なくとも 2 0 k D a の分子質量を有する請求項 6 2 に記載の方法。

[ 6 7 ]

前記 P E G - I L - 1 0 の前記 P E G 成分が少なくとも 3 0 k D a の分子質量を有する、請求項 6 2 に記載の方法。

30

[ 6 8 ]

前記 I L - 1 0 薬剤が皮下に投与される、請求項 4 1 に記載の方法。

[ 6 9 ]

前記複数の細胞が前記対象から得られ、エキソビボで遺伝子改変される、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

[ 7 0 ]

前記複数の細胞がアフェレーシスによって前記対象から得られる、請求項 6 9 に記載の方法。

[ 7 1 ]

前記第 1 の複数の細胞が前記対象から得られ、エキソビボで遺伝子改変される、請求項 4 3 に記載の方法。

40

[ 7 2 ]

前記第 2 の複数の細胞が前記対象から得られ、エキソビボで遺伝子改変される、請求項 7 1 に記載の方法。

[ 7 3 ]

前記第 1 の複数の細胞及び前記第 2 の複数の細胞がアフェレーシスによって前記対象から得られる、請求項 7 1 または 7 2 に記載の方法。

[ 7 4 ]

前記複数の細胞がメモリー C D 8 + T 細胞である、請求項 7 0 に記載の方法。

50

[ 7 5 ]

前記第1の複数の細胞がメモリーC D 8 + T細胞である、請求項7 3に記載の方法。

[ 7 6 ]

前記第2の複数の細胞がナイーブC D 8 + T細胞である、請求項7 3に記載の方法。

[ 7 7 ]

前記複数の細胞が自己の腫瘍細胞である、請求項4 1または4 2に記載の方法。

[ 7 8 ]

前記第1の複数の細胞及び前記第2の複数の細胞が自己の腫瘍細胞である、請求項4 3に記載の方法。

[ 7 9 ]

前記標的細胞集団が腫瘍抗原を含む、請求項4 1～4 3のいずれか1項に記載の方法。

[ 8 0 ]

前記腫瘍抗原が、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、R O R 1、メソテリン、C D 3 3 / I L 3 R a、c - M e t、P S M A、糖脂質F 7 7、E G F R v I I I、G D - 2、N Y - E S O - 1 T C R、M A G E A 3 T C Rまたはこれらの任意の組み合わせから成る群から選択される、請求項4 3に記載の方法。

[ 8 1 ]

前記対象に導入してから少なくとも2週、前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量で前記I L - 1 0薬剤が発現される、請求項4 2または4 3に記載の方法。

[ 8 2 ]

前記対象に導入してから少なくとも1か月、前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量で前記I L - 1 0薬剤が発現される、請求項4 2または4 3に記載の方法

—

[ 8 3 ]

前記対象に導入してから少なくとも3か月、前記活性化誘導細胞死を予防または制限するのに十分な量で前記I L - 1 0薬剤が発現される、請求項4 2または4 3に記載の方法

—

[ 8 4 ]

請求項4 2または4 3に記載のI L - 1 0薬剤をコードする核酸分子。

[ 8 5 ]

前記I L - 1 0薬剤をコードする前記核酸分子の発現を与える発現制御エレメントに作動可能に連結した、請求項8 4に記載の核酸分子。

[ 8 6 ]

請求項8 4または8 5に記載の核酸分子を含むベクター。

[ 8 7 ]

前記ベクターがウイルスベクターを含む、請求項8 6に記載のベクター。

[ 8 8 ]

前記ベクターがプラスミドを含む、請求項8 7に記載のベクター。

[ 8 9 ]

請求項5 2または4 3に記載のI L - 1 0薬剤を発現する、形質転換細胞または宿主細胞。

[ 9 0 ]

a) C A Rを発現するようにT細胞を遺伝子操作し、それによって、C A R - T T細胞を生成すること、及びb) 前記C A R - T T細胞によって分泌される少なくとも1つのサイトカインの量を低減する薬剤で前記C A R - T T細胞をモジュレートすることを含み、それによって前記C A R - T T細胞の機能を増強する、C A R - T T細胞の機能の増強方法。

[ 9 1 ]

前記薬剤が低分子干渉R N A ( s i R N A )である、請求項9 0に記載の方法。

10

20

30

40

50

## [ 9 2 ]

前記サイトカインが腫瘍壊死因子ファミリーまたはトランスフォーミング増殖因子ベータスープラーファミリーのメンバーである、請求項 9 1 に記載の方法。

## [ 9 3 ]

前記腫瘍壊死因子ファミリーの前記メンバーが TNF - である、請求項 9 2 に記載の方法。

## [ 9 4 ]

前記トランスフォーミング増殖因子ベータスープラーファミリーの前記メンバーが TG F - である、請求項 9 2 に記載の方法。

## [ 9 5 ]

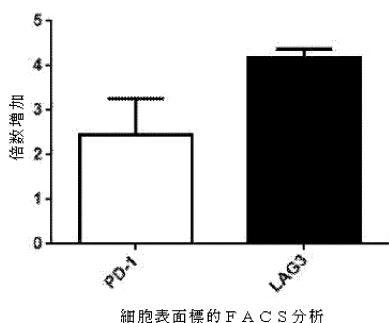
T G F - の量を低減させることが調節性 T 細胞の増殖を低減させる、請求項 9 4 に記載の方法。

10

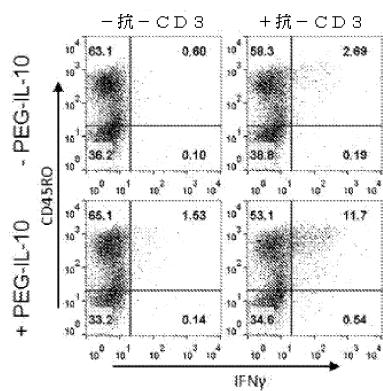
【図面】

【図 1】

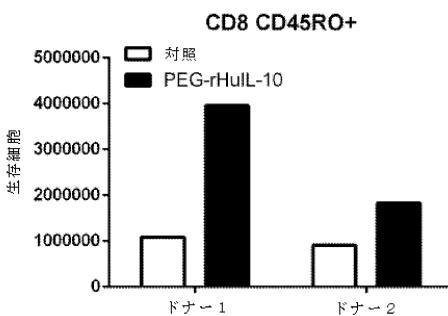
20~40 μg / kg の P E G - I L - 1 0 による 2 9 日間の治療後の  
P D - 1 及び L A G 3 + 抹消 T 細胞の倍数増加



【図 2】



【図 3】



20

30

【配列表】

0007121496000001.app

40

50

---

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 12 N 15/24 (2006.01)

F I

C 12 N 15/24

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

(72)発明者 チャン, アイヴァン・ホー

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

合議体

審判長 森井 隆信

審判官 富永 みどり

審判官 斎藤 恵

(56)参考文献 国際公開第2014/172392 (WO, A1)

Teng MW et al., Stable IL-10: a new therapeutic that promotes tumor immunity, *Cancer Cell*, 2011年12月13日, Vol. 20, No. 6, p. 691-693, doi: 10.1016/j.ccr.2011.11.020

中川 岳志 ほか, キメラ抗原受容体(CAR)発現細胞傷害性T細胞(CTL)を用いた次世代養子免疫療法の開発, *Drug Delivery System*, 2013年, 第28巻, 第1号, p. 35-44, doi: 10.2745/dds.28.35

Fujii S et al., Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8(+) T-cell effector function in situ, *Blood*, 2001年10月, Vol. 98, No. 7, p. 2143-2151, doi: 10.1182/blood.v98.7.214

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A61K39/00-44

A61K35/00-768

A61K38/00-58

A61K 9/00-72

A61K47/00-69

A61K48/00

P u b M e d