



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107106655 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580069348.9

(22)申请日 2015.10.20

(30)优先权数据

62/067,337 2014.10.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/056383 2015.10.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/064817 EN 2016.04.28

(71)申请人 阿尔莫生物科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 M·奥夫特

(74)专利代理机构 北京龙双利达知识产权代理有限公司 11329

代理人 孙涛 肖鹏

(51)Int.Cl.

A61K 38/20(2006.01)

权利要求书4页 说明书52页
序列表10页 附图7页

(54)发明名称

使用白细胞介素-10治疗疾病和病症的方法

(57)摘要

提供了治疗患有响应IL-10的疾病或病症的受试者的方法,包括施用方法及其相关的给药方案。

1. 一种治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中所述量足以实现至少6.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少8.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少10.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少12.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少14.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少16.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少18.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述量足以实现至少20.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

9. 一种治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中所述量足以在一个时间段内维持平均IL-10血清谷浓度;

其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少6.0ng/mL,并且

其中将所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少90%。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少8.0ng/mL。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少10.0ng/mL。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少12.0ng/mL。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少14.0ng/mL。

14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少16.0ng/mL。

15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少18.0ng/mL。

16. 根据权利要求9所述的方法,其中所述平均IL-10血清谷浓度是至少20.0ng/mL。

17. 根据权利要求9-16中任一项所述的方法,其中所述时间段是至少12小时。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述时间段是至少24小时。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述时间段是至少48小时。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述时间段是至少72小时。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中所述时间段是至少1周。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述时间段是至少2周。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述时间段是至少1个月。

24. 根据权利要求9-23中任一项所述的方法,其中将所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少95%。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中将所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的至少98%。

26. 根据权利要求25所述的方法,其中将所述平均IL-10血清谷浓度维持所述时间段的

100%。

27. 一种治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法, 所述方法包括对所述受试者施用治疗有效量的IL-10剂, 其中所述量足以实现所述IL-10剂的至少EC50的平均IL-10血清谷浓度。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述量足以实现所述IL-10剂的至少EC60的平均IL-10血清谷浓度。

29. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述量足以实现所述IL-10剂的至少EC70的平均IL-10血清谷浓度。

30. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述量足以实现所述IL-10剂的至少EC80的平均IL-10血清谷浓度。

31. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述量足以实现所述IL-10剂的至少EC90的平均IL-10血清谷浓度。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法, 其中所述IL-10剂是成熟人IL-10。

33. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法, 其中所述IL-10剂是成熟人IL-10的变体, 并且其中所述变体表现出与成熟人IL-10的活性相当的活性。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述疾病、病症或病况是增殖性病症。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中所述增殖性病症是癌症。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述癌症是实体瘤或造血病症。

37. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述疾病、病症或病况是免疫性或炎性病症。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其中免疫性或炎性病症选自: 炎性肠病、银屑病、类风湿性关节炎、多发性硬化和阿尔茨海默氏病。

39. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述疾病、病症或病况是血栓形成或血栓病况。

40. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述疾病、病症或病况是纤维化病症。

41. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述疾病、病症或病况是病毒病症。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中所述病毒病症选自下组: 人免疫缺陷病毒、乙肝病毒、丙肝病毒和巨细胞病毒。

43. 根据权利要求1-33中任一项所述的方法, 其中所述疾病、病症或病况是心血管病症。

44. 根据权利要求43所述的方法, 其中所述心血管病症是动脉粥样硬化。

45. 根据权利要求43或44所述的方法, 其中所述受试者具有升高的胆固醇。

46. 根据权利要求1-45中任一项所述的方法, 其中所述IL-10剂包含至少一个修饰以形成经修饰的IL-10剂, 其中所述修饰不改变所述IL-10剂的氨基酸序列。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述经修饰的IL-10剂是PEG-IL-10剂。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述PEG-IL-10剂包含与IL-10的至少一个亚基的至少一个氨基酸残基共价连接的至少一个PEG分子。

49. 根据权利要求47或48所述的方法, 其中所述PEG-IL-10剂包含单PEG化和二PEG化的IL-10的混合物。

50. 根据权利要求47-49中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10剂的PEG组分具有约5kDa至约20kDa的分子量。

51. 根据权利要求47-49中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10剂的PEG组分具有大于约20kDa的分子量。

52. 根据权利要求47-49中任一项所述的方法, 其中所述PEG-IL-10剂的PEG组分具有至少约30kD的分子量。

53. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述经修饰的IL-10剂是Fc融合分子。

54. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述经修饰的IL-10剂包含血清白蛋白。

55. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述经修饰的IL-10剂是糖基化的。

56. 根据权利要求46-55中任一项所述的方法, 其中所述修饰是位点特异性的。

57. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述修饰包含接头。

58. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中至少每天两次对所述受试者施用所述IL-10剂。

59. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中至少每天一次对所述受试者施用所述IL-10剂。

60. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中至少每72小时对所述受试者施用所述IL-10剂。

61. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中至少每周一次对所述受试者施用所述IL-10剂。

62. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中至少每2周对所述受试者施用所述IL-10剂。

63. 根据权利要求1-57中任一项所述的方法, 其中至少每月一次对所述受试者施用所述IL-10剂。

64. 根据权利要求1-63中任一项所述的方法, 其还包括施用至少一种另外的预防或治疗剂。

65. 根据权利要求1-64中任一项所述的方法, 其中所述受试者是人。

66. 根据权利要求1-65中任一项所述的方法, 其中通过胃肠外注射施用。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中所述胃肠外注射是皮下的。

68. 根据权利要求1-67中任一项所述的方法, 其中所述治疗或预防是由CD8⁺T细胞介导的。

69. 一种药物组合物, 其包含一定量的根据权利要求1-56中任一项所述的IL-10剂, 和药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂。

70. 根据权利要求69所述的药物组合物, 其中所述赋形剂是等张注射溶液。

71. 根据权利要求69所述的药物组合物, 其中所述组合物适合于人施用。

72. 根据权利要求69-71中任一项所述的药物组合物, 其还包含至少一种另外的预防或治疗剂。

73. 一种无菌容器, 其包含根据权利要求69-72中任一项所述的药物组合物。

-
74. 根据权利要求73所述的无菌容器,其中所述无菌容器是注射器。
75. 一种试剂盒,其包含根据权利要求73或权利要求74所述的无菌容器。
76. 根据权利要求75所述的试剂盒,其还包含第二无菌容器,所述第二无菌容器包含至少一种另外的预防或治疗剂。

使用白细胞介素-10治疗疾病和病症的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年10月22日提交的美国临时申请序列号62/067,337的优先权权益,该申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及在治疗或预防多种多样的疾病和病症中使用IL-10和相关药剂的方法。

背景技术

[0004] 细胞因子白细胞介素-10 (IL-10) 是通过对T细胞、B细胞、巨噬细胞和抗原呈递细胞(APC)的作用来调节多种免疫应答的多效细胞因子。IL-10可通过抑制活化的单核细胞和活化的巨噬细胞中IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、GM-CSF和G-CSF的表达来抑制免疫应答,并且还抑制由NK细胞产生IFN- γ 。尽管IL-10主要在巨噬细胞中表达,但在活化的T细胞、B细胞、肥大细胞和单核细胞中也检测到表达。除了抑制免疫反应外,IL-10还表现出免疫刺激特性,包括刺激IL-2和IL-4处理的胸腺细胞的增殖、增强B细胞的活力和刺激II类MHC的表达。

[0005] 人IL-10是在破坏两个单体亚单位之间的非共价相互作用时变得无生物活性的同二聚体。从公开的IL-10晶体结构获得的数据表明功能二聚体与IFN- γ 具有一定的相似性(Zdanov等人,(1995) Structure (Lond) 3:591-601)。

[0006] 由于其多效活性,IL-10与广泛的疾病、病症和病况有关,包括炎性病况、免疫相关疾病、纤维化病症和癌症。用IL-10对许多此类疾病、病症和病况的临床和临床前评估已经巩固了其治疗潜力。此外,已证实PEG化的IL-10在某些治疗环境中比非PEG化的IL-10更有效。

[0007] 鉴于IL-10相关疾病、病症和病况的流行性和严重性,优化功效、患者耐受性等的新的给药方案和参数对于提高IL-10和PEG化IL-10及其相关药剂的治疗有用性将具有巨大的价值。

发明内容

[0008] 本公开考虑使用本文中所述的IL-10、经修饰(例如,PEG化的)IL-10和相关药剂及其组合物治疗和/或预防各种疾病、病症和病况,和/或其症状的方法。更具体地,本公开涉及优化的给药参数,以实现和维持治疗和/或预防受试者中各种疾病、病症和病况的功效,同时最小化与其相关的不良反应。如下文详述的,给药参数的此类优化涉及例如考虑到施用途径和其他因素评估与吸收、分布、代谢和排泄(“ADME”)相关的药代动力学和药效学参数。据了解,除非本文中另有说明,与ADME和其他参数相关的术语旨在在相关科学领域中具有其普遍接受的含义。举例来说,术语“血清半衰期”或“ $t_{1/2}$ ”是指消除半衰期(即,药剂的血清浓度达到其初始值或最大值的一半)的时间。

[0009] 根据本文中所述的方法,疾病、病症或病况和/或其症状可以是增殖性病症,如癌症或癌症相关病症,或纤维化病症,如肝硬化、NASH和NAFLD。虽然不限于特定的癌症,但癌症可以是实体肿瘤,包括与结肠癌、黑素瘤和鳞状细胞癌相关的肿瘤,或者它可以是造血病症。

[0010] 在其他实施方案中,疾病、病症或病况是病毒性病症,包括但不限于人免疫缺陷病毒、乙型或丙型肝炎病毒或巨细胞病毒。在另外的实施方案中,疾病、病症或病况是免疫性或炎性疾病,其可以是急性或慢性的。免疫和炎性疾病的实例包括炎性肠病、银屑病、类风湿性关节炎、多发性硬化和阿尔茨海默氏病。

[0011] 在具体的实施方案中,疾病、病症或病况是心血管病症,包括动脉粥样硬化。具有心血管病症受试者可以具有升高的胆固醇。

[0012] 在进一步的实施方案中,疾病、病症或病况是血栓形成或血栓病况。

[0013] 如下文进一步讨论,人IL-10是同二聚体,每个单体包含178个氨基酸,其中前18个包含信号肽。本公开的具体实施方案包括缺失信号肽的成熟的人IL-10多肽(参见例如美国专利号6,217,857)或成熟的人PEG-IL-10。在另外的具体实施方案中,IL-10剂是成熟的人IL-10的变体。该变体可以表现出小于、相当于或大于成熟人IL-10活性的活性;在某些实施方案中,活性与成熟人IL-10的活性相当或更大。

[0014] 本公开的某些实施方案考虑了IL-10的修饰以增强一种或多种性质(例如,药代动力学参数、功效等)。在具体实施方案中,通过例如PEG化、糖基化、白蛋白(例如人血清白蛋白(HSA))缀合和硫代酰化修饰IL-10。在另外的实施方案中,IL-10的修饰不会对免疫原性产生治疗上相关的有害影响,而在另外的实施方案中,修饰的IL-10比未修饰的IL-10具有更少的免疫原性。术语“IL-10”,“IL-10多肽”,“药剂”等意欲广义地解释,并且包括例如人和非人IL-10相关多肽,包括同源物、变体(包括突变蛋白)及其片段,以及具有例如前导序列(例如,信号肽)的IL-10多肽和前述的修饰形式。在另外的具体实施方案中,术语“IL-10”、“IL-10多肽”、“药剂”是激动剂。具体实施方案涉及PEG化的IL-10,其在本文中也称为“PEG-IL-10”。本公开还考虑编码前述物质的核酸分子。

[0015] 如实验部分中所述,PEG-hIL-10在实体瘤(如卵巢肿瘤、肾肿瘤、结肠肿瘤或胰腺肿瘤)患者中的作用评估表明,有利的是实现比最初考虑的血清浓度更大的PEG-hIL-10血清浓度,以优化疾病控制率(DCR)。在肿瘤学术语中,DCR是指表明对治疗的响应的患者的总比例;DCR是完全响应(CR)+部分响应(PR)+稳定疾病(SD)的总和。然而,应该注意的是,在较低浓度下也观察到临床效用。

[0016] 此外,在结肠直肠癌患者中分析PEG-hIL-10对肿瘤标志物CEA(癌胚抗原)的影响表明,需要比最初对此类癌症患者考虑的剂量更高的剂量(与同时更高的血清浓度偶联)以实现和维持稳定疾病。

[0017] 本公开的具体实施方案涉及治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,包括对受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中该量足以实现至少6.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。治疗或预防的方法可以由CD8⁺T细胞介导。

[0018] 其他实施方案涉及治疗或预防受试者(例如,人)中的疾病、病症或病况的方法,包括对受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中该量足以在一段时间内维持平均IL-10血清谷浓度,其中平均IL-10血清谷浓度为至少6.0ng/mL,其中平均IL-10血清谷浓度保持至少

90%的时间段。在本公开的具体的实施方案中,平均IL-10血清谷浓度是至少7.0ng/mL、至少8.0ng/mL和至少9.0ng/mL、至少10.0ng/mL、至少11.0ng/mL、至少12.0ng/mL、至少13.0ng/mL、至少14.0ng/mL、至少15.0ng/mL、至少16.0ng/mL、至少17.0ng/mL、至少18.0ng/mL、至少19.0ng/mL、至少20.0ng/mL、至少21.0ng/mL、至少22.0ng/mL或大于22.0ng/mL。

[0019] 在进一步的实施方案中,时间段是至少12小时、至少24小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少6周、至少2个月、至少3个月或大于3个月。

[0020] 在本公开的具体的实施方案中,将平均IL-10血清谷浓度维持至少85%的时间段、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的时间段。

[0021] 设想足以维持特定稳态血清谷浓度(例如2.0ng/mL)的给药方案可导致初始血清谷浓度高于期望的稳态血清谷浓度。由于哺乳动物受试者中IL-10的药效学和药代动力学特征,初始谷浓度(例如通过施用一种或多种负荷剂量,然后是一系列维持剂量实现)在一段时间内逐渐但持续降低,即使在给药参数(量和频率)保持恒定时仍如此。在这段时间之后,逐渐但持续的减少结束,并且维持稳态血清谷浓度。

[0022] 举例来说,需要将约0.1mg/kg天的IL-10剂(例如,mIL-10)对小鼠(例如C57BL/6小鼠)的肠胃外施用(例如,SC和IV)以维持例如2.0ng/mL的稳态血清谷浓度。然而,不能实现稳态血清谷浓度,直至在以0.1mg/kg/天给药开始之后(以及还在任何负荷剂量之后)约30天。相反,在实现了初始血清谷浓度(例如,2.5ng/mL)后,该浓度在例如约30天的时段过程内逐渐但持续降低,之后维持期望的稳态血清谷浓度(例如,2.0ng/mL)。本领域技术人员将能够使用例如ADME和患者特异性参数来确定维持期望的稳态谷浓度所需的剂量。

[0023] 还设想治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,包括对受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中所述量足以实现IL-10剂的至少EC50的平均IL-10血清谷浓度。在其他实施方案中,量足以实现IL-10剂的至少EC60、至少EC70、至少EC80或至少EC90的平均IL-10血清谷浓度。

[0024] 如本文中所用,术语“EC50”和短语“半最大有效浓度”具有其普遍接受的含义;也就是说,EC50是在某个指定的暴露时间之后诱导基线和最大值之间中间的响应的治疗剂(例如,IL-10剂)的浓度。本领域技术人员熟悉用于测定治疗剂的EC50的方法。例如,在基于细胞的测定法中测量治疗剂的某些浓度相关参数之后,EC50可以使用市售的软件(例如Graphpad Software, Inc.; La Jolla, CA)来确定。

[0025] 本公开内容考虑了方法,其中所述IL-10剂可以包含至少一个修饰以形成经修饰的IL-10剂,其中所述修饰不改变IL-10剂的氨基酸序列。在一些实施方案中,修饰的IL-10剂是PEG-IL-10剂。PEG-IL-10剂可以包含共价连接到IL-10的至少一个亚基的至少一个氨基酸残基的至少一个PEG分子,或者在其他实施方案中包含单PEG化和二PEG化的IL-10的混合物。PEG-IL-10剂的PEG组分可以具有大于约5kDa、大于约10kDa、大于约15kDa、大于约20kDa、大于约30kDa、大于约40kDa或大于约50kDa的分子量。在一些实施方案中,分子量为约5kDa至约10kDa、约5kDa至约15kDa、约5kDa至约20kDa、约10kDa至约15kDa、约10kDa至约20kDa、约10kDa至约25kDa或约10kDa至约30kDa。

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

剂是糖基化的、HES化的或包含至少一个白蛋白结合域。一些经修饰的IL-10剂可以包含超过一种类型的修饰。在具体实施方案中,修饰是位点特异性的。一些实施方案包括接头。下文将详细讨论经修饰的IL-10剂。

[0027] 可以通过任何有效路径施用IL-10剂。在一些实施方案中,通过胃肠外(包括皮下注射)注射施用它。

[0028] 本公开的具体实施方案涉及包含一定量的IL-10剂(例如治疗有效量)的药物组合物,包括上述那些试剂以及一种或多种药学上可接受的稀释剂、载体或赋形剂(例如,等张注射溶液)。药物组合物通常是适合于人施用的组合物。此外,在一些实施方案中,药物组合物包含至少一种另外的预防或治疗剂。

[0029] 本公开的某些实施方案涉及含有上述药物组合物之一和任选的一种或多种另外的组分的无菌容器。作为示例而非限制,无菌容器可以是注射器。在另外的实施方案中,无菌容器是试剂盒的一个组件;试剂盒还可以含有例如包含至少一种预防或治疗剂的第二无菌容器。

[0030] 本公开考虑了方法,其中每日至少两次、每日至少一次、至少每48小时至少一次、每72小时至少一次、每周至少一次、每2周至少一次、每月至少一次,每2个月至少一次或每3个月至少一次施用IL-10剂。一些实施方案还包括用至少一种另外的预防或治疗剂施用IL-10剂,其实例在下文中阐述。

[0031] 本公开还考虑结合本文的教导使用基因疗法。对于基因疗法用途和方法,可以用编码如本文阐述的IL-10相关多肽的核酸在体内转化受试者中的细胞。或者,可以用转基因或多核苷酸在体外转化细胞,然后移植到受试者的组织中以实现治疗。此外,可以用编码IL-10相关多肽的转基因或多核苷酸转化原代细胞分离物或建立的细胞系,然后任选地移植到受试者的组织中。

[0032] 本公开的另外的具体实施方案涉及治疗或预防受试者中的疾病、病症或病况的方法,包括对所述受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中所述量足以实现至少0.1ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。治疗或预防的方法可以由CD8⁺T细胞介导。

[0033] 其他实施方案涉及治疗或预防受试者(例如,人)中的疾病、病症或病况的方法,包括向受试者施用治疗有效量的IL-10剂,其中该量足以在一段时间内维持平均IL-10血清谷浓度,其中平均IL-10血清谷浓度为至少0.1ng/mL,其中平均IL-10血清谷浓度保持至少90%的时间段。在本公开的特定实施例中,平均IL-10血清谷浓度是至少0.2ng/mL、至少0.3ng/mL和至少0.4ng/mL、至少0.5ng/mL、至少0.6ng/mL、至少0.7ng/mL、至少0.8ng/mL、至少0.9ng/mL、至少1ng/mL、至少1.2ng/mL、至少1.25ng/mL、至少1.3ng/mL、至少1.4ng/mL、至少1.5ng/mL、至少1.6ng/mL、至少1.7ng/mL、至少1.8ng/mL、至少1.85ng/mL、至少1.9ng/mL、至少1.95ng/mL、至少1.97ng/mL和至少1.98ng/mL、至少1.99ng/mL、至少2.0ng/mL或大于2ng/mL。

[0034] 在进一步的实施方案中,时间段是至少12小时、至少24小时、至少48小时、至少72小时、至少1周、至少2周、至少3周、至少1个月、至少6周、至少2个月、至少3个月或大于3个月。

[0035] 在本公开的具体的实施方案中,将平均IL-10血清谷浓度维持至少85%的时间段、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的时间段。

[0036] 本文中描述了本公开的其他实施方案。

附图说明

[0037] 图1描绘了人 (SEQ ID NO:28) 和小鼠 IL-10 (SEQ ID NO:29) 的氨基酸序列。

[0038] 图2A描绘了在增加IL-10浓度时PBMC中MCP-1的浓度 (pg/mL)。在浓度为1ng/mL及以上时, IL-10增加MCP-1的分泌。

[0039] 图2B描绘了在增加IL-10浓度时用LPS刺激的PBMC中MCP-1的浓度 (pg/mL)。IL-10是LPS介导的PBMC活化的抑制剂, 并且以1ng/mL及以上的浓度添加IL-10显著抑制MCP-1的分泌。

[0040] 图3描绘了对具有指定肿瘤类型的患者施用PEG-hIL-10的剂量递增研究的结果。根据免疫相关应答标准 (irRC), 在治疗七周后测量个体肿瘤大小和总肿瘤负荷。

[0041] 图4描绘了与计算的EC50值相比, 施用1、2.5、5、10或20μg/kg PEG-hIL-10的患者中实现的平均血清浓度。

[0042] 图5A和5B描绘了与基于体外的基于细胞的活性计算的EC50值相比, 施用10μg/kg PEG-hIL-10 (图5A) 和20μg/kg PEG-hIL-10 (图5B) 的每个患者的血清浓度。

[0043] 图6描绘了在两个CRC患者中施用增加量的PEG-hIL-10对CEA肿瘤标志物的影响。

[0044] 图7A-7C描绘了PEG-hIL-10对具有三种原发性肿瘤类型 (黑素瘤 (图7A)、RCC (图7B) 和CRC (图7C)) 之一的患者中转移性损伤大小的影响。

具体实施方案

[0045] 在进一步描述本公开之前, 应当理解, 本公开不限于本文阐述的具体实施方案, 并且还应当理解, 本文使用的术语仅用于描述具体实施方案的目的, 并且不意图是限制性的。

[0046] 在提供数值范围的情况下, 应当理解, 除非背景另有明确规定, 否则本发明内涵盖所述范围的上限和下限之间的每个居间数值 (至下限单位的十分之一), 以及所述规定范围内的任何其他规定或居间数值。这些较小范围的上限和下限可以独立地包括在较小范围内, 并且还包括在本发明内, 在规定的范围内受到任何明确排除的限制。在规定的范围包括一个或两个限制的情况下, 排除那些包括的限制之一或两者的范围也包括在本发明中。除非另有定义, 本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0047] 必须指出, 如本文和所附权利要求中所使用, 单数形式“一个”、“一种”和“所述/该”包括复数指示物, 除非背景另有明确规定。还应注意, 可以撰写权利要求以排除任何可选要素。因此, 本叙述旨在充当与叙述权利要求要素或使用“否定”限制结合使用如“仅仅”, “仅”等排他性术语的先行基础。

[0048] 本文所讨论的出版物仅提供其在本申请的申请日之前的公开。此外, 提供的出版物的日期可能与实际出版日期不同, 这可能需要独立确认。

[0049] 概述

[0050] 本公开考虑使用本文所述的药剂及其组合物来治疗和/或预防各种疾病、病症和病况, 和/或其症状的用途。在本公开的某些方面, 通过利用特定的给药参数来实现这种治疗或预防。在一些实施方案中, 施用药剂以达到优化用于治疗例如炎性和免疫相关病症、纤

维化病症、癌症和癌症相关疾病或心血管疾病(例如动脉粥样硬化)的血清谷浓度。

[0051] 在本公开的一些实施方案中,以足以实现大于约6.0ng/mL的血清谷浓度,在某些实施方案中,大于约10.0ng/mL的血清谷浓度,而在其他实施方案中,大于约20.0ng/mL的血清谷浓度的量对具有或有风险具有由IL-10剂(例如IL-10多肽)可治疗的疾病或病症的受试者施用IL-10剂。

[0052] 应当注意,与本公开的多肽和核酸分子相关的对“人”的任何提及并不意味着对于获得多肽或核酸的方式或来源而言是限制性的,而是仅参考序列,因为它可以对应于天然存在的人多肽或核酸分子的序列。除了人多肽和编码它们的核酸分子之外,本公开还考虑来自其他物种的IL-10相关多肽和相应的核酸分子。

[0053] 定义

[0054] 除非另有指示,以下术语旨在具有以下阐述的含义。在贯穿本说明书的其他地方定义了其他术语。

[0055] 术语“患者”或“受试者”可互换使用,指人或非人动物(例如哺乳动物)。

[0056] 术语“施用”等当它们应用于例如受试者、细胞、组织、器官或生物流体时指例如IL-10或PEG-IL-10、核酸(例如,编码天然人IL-10的核酸)、包含前述物质的药物组合物或诊断剂;与受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。在细胞的背景中,施用包括试剂与细胞接触(例如体外或离体),以及试剂与流体接触,其中使流体与细胞接触。

[0057] 短语“治疗”、“处理”等指在已经诊断、观察到疾病、病症或病况或其症状之后启动,从而暂时或永久地消除、减少、抑制、减轻或改善至少一种折磨受试者的疾病、病症或病况的主要原因,或者与折磨受试者的疾病、病症或病况有关的至少一种症状的作用过程(如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物)。因此,治疗包括抑制(例如,阻止疾病、病症或病况或与其有关的临床症状的发展或进一步发展)活动性疾病。术语也可以用于其他情况,如IL-10或PEG-IL-10在例如流体相或胶体相中接触IL-10受体的情况。

[0058] 如本文中所用,术语“需要治疗”是指由内科医生或其他护理人员作出的受试者需要或将受益于治疗的判断。这种判断是基于内科医生或护理人员专业领域的各种因素。

[0059] 术语“预防”等指以某种方式(例如,在疾病、病症、病况或其症状发作前)启动,以便暂时或永久地预防、阻抑、抑制或减少受试者发生疾病、病症、病况等的风险(如通过例如临床症状的缺乏确定)或延迟其发作(通常在倾向于具有特定疾病、病症或病况的受试者的背景中)的作用过程(如施用IL-10或包含IL-10的药物组合物)。在某些情况下,术语还指减缓疾病、病症或病况的进展或抑制其进展成有害或其他不期望的状态。

[0060] 如本文中所用,术语“需要预防”是指内科医生或其他护理人员作出的关于受试者需要或将受益于预防性护理的判断。基于内科医生或护理人员专业领域的各种因素做出这种判断。

[0061] 短语“治疗有效量”是指单独或作为药物组合物的一部分且以单一剂量或作为一系列剂量的一部分,以在对受试者施用时能够对疾病、病症或病况的任何症状、方面或特征具有任何可检测、积极影响的量对受试者施用药剂。可以通过测量相关的生理效应来确定治疗有效量,并且它可以结合给药方案和受试者的病况的诊断分析等来调整。举例来说,在施用后产生的炎症细胞因子的量的测量可以指示是否已经使用治疗有效量。

[0062] 短语“以足以实现变化的量”是指在施用特定疗法之前(例如,基线水平)和之后测

量的指标水平之间存在可检测的差异。指标包括任何客观参数(例如,IL-10的血清浓度)或主观参数(例如受试者的幸福感)。

[0063] 术语“小分子”是指具有小于约10kDa、小于约2kDa或小于约1kDa的分子量的化学化合物。小分子包括但不限于无机分子、有机分子、含有无机组分的有机分子、包含放射性原子的分子和合成分子。在治疗上,小分子可能比大分子更易透过细胞,不易降解,并且不太可能引发免疫应答。

[0064] 术语“配体”是指例如可以起受体的激动剂或拮抗剂作用的肽、多肽、膜缔和或膜结合的分子或其复合物。“配体”涵盖天然配体和合成配体,例如细胞因子、细胞因子变体、类似物、突变蛋白和源自抗体的结合组合物。“配体”还涵盖小分子,例如细胞因子的肽模拟物和抗体的肽模拟物。术语还涵盖既不是激动剂也不是拮抗剂,但是可以结合受体而不显著影响其生物学特性(例如信号传导或粘附)的药剂。此外,术语包括已经例如通过化学或重组方法改变为膜结合配体的可溶形式的膜结合配体。配体或受体可以完全是细胞内的,也就是说,其可以驻留在胞质溶胶、细胞核或其他细胞内区室中。配体和受体的复合物称为“配体-受体复合物”。

[0065] 术语“抑制剂”和“拮抗剂”,或“活化因子”和“激动剂”分别指抑制性或活化性分子,例如用于活化例如配体、受体、辅因子、基因、细胞、组织。抑制剂是减少、阻断、阻止、延迟激活、失活、脱敏或下调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。活化因子是增加、激活、促进、增强激活、敏化或上调例如基因、蛋白质、配体、受体或细胞的分子。抑制剂也可以定义为降低、阻断或失活组成性活性的分子。“激动剂”是与靶标相互作用以引起或促进靶标激活的增加的分子。“拮抗剂”是与激动剂的作用相反分子。拮抗剂预防、减少、抑制或中和激动剂的活性,并且拮抗剂也可以预防、抑制或降低靶标(例如靶受体)的组成性活性,即使在没有鉴定的激动剂的情况下。

[0066] 术语“调节”等是指分子(例如,活化因子或抑制剂)直接或间接地增加或降低IL-10剂(或编码它们的核酸分子)的功能或活性的能力;或增强分子产生与IL-10剂相当的效果的能力。术语“调节剂”意图广泛地指可以影响上文所述活性的分子。举例来说,例如基因、受体、配体或细胞的调节剂是改变基因、受体、配体或细胞的活性的分子,其中活性可以受激活、抑制或在其调节性质上改变。调节剂可以单独起作用,或者它可以使用辅因子,例如蛋白质、金属离子或小分子。术语“调节剂”包括经由与IL-10相同的作用机制起作用(即,与IL-10以类似于其的方式调节相同的信号传导途径的药剂)并且能够引发相当于(或大于)IL-10的生物应答的生物应答的药剂。

[0067] 调节剂的实例包括小分子化合物和其他生物有机分子。许多小分子化合物的文库(例如,组合文库)是可商购的,并且可以充当用于鉴定调节剂的起点。熟练技术人员能够开发一种或多种测定法(例如,生物化学或基于细胞的测定法),其中可以筛选此类化合物文库以鉴定一种或多种具有期望性质的化合物;此后,熟练的药物化学家能够通过例如合成和评估其类似物和衍生物来优化此类一种或多种化合物。合成和/或分子建模研究也可用于鉴定活化物。

[0068] 分子的“活性”可以描述或指分子与配体或受体的结合;催化活性;刺激基因表达或细胞信号传导、分化或成熟的能力;抗原性活性;其他分子的活性的调节等。术语还可以指在调节或维持细胞与细胞相互作用(例如粘附)中的活性,或在维持细胞(例如细胞膜)结

构中的活性。“活性”也可以意指比活性,例如[催化活性]/[mg蛋白]或[免疫活性]/[mg蛋白]、生物区室中的浓度等。术语“增殖活性”涵盖促进,例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管发生,对于例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管发生必需,或者与例如正常细胞分裂以及癌症、肿瘤、发育异常、细胞转化、转移和血管发生明确相关的活性。

[0069] 如本文中所用,“相当”、“相当的活性”、“与…相当的活性”、“相当的效果”、“与…相当的效果”等是可以定量和/或定性观察的相对术语。术语的含义往往取决于使用它们的背景。举例来说,两种都激活受体的药剂可以从定性角度看作具有相当的效果,但是如果根据公认的测定法(例如剂量-响应测定法)中或在公认的动物模型中测定,一种药剂只能达到另一种药剂的活性的20%,那么这两种药剂可以从定量角度看作缺乏相当的效果。当将一个结果与另一个结果(例如,一个结果与参考标准)进行比较时,“相当的”经常意味着一个结果与参考标准偏离小于35%、小于30%、少于25%、小于20%、小于15%、小于10%、小于7%、小于5%、小于4%、小于3%、小于2%或小于1%。在具体实施方案中,如果一个结果与参考标准偏离小于15%、小于10%或小于5%,则它与参考标准是相当的。举例来说而非限制,活性或效果可以指功效、稳定性、溶解度或免疫原性。

[0070] 例如,细胞、组织、器官或生物体的术语“应答”包括生物化学或生理行为的变化,例如生物区室内的浓度、密度、粘附或迁移,基因表达速率或分化状态,其中变化与激活、刺激或治疗相关,或与内部机制如遗传编程相关。在某些情况下,术语“激活”,“刺激”等指如由内部机制以及外部或环境因素调节的细胞活化;而术语“抑制”,“下调”等指相反的效果。

[0071] 在本文中可互换使用的术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”是指任何长度的氨基酸的聚合形式,其可以包括遗传编码的和非遗传编码的氨基酸、化学或生物化学修饰的或衍生化的氨基酸和具有经修饰的多肽主链的多肽。术语包括融合蛋白,包括但不限于与异源和同源前导序列的融合蛋白;具有或不具有N-末端甲硫氨酸残基的融合蛋白;与免疫标记的蛋白质的融合蛋白等。

[0072] 应当理解,贯穿本公开,根据单字母或三字母代码提及氨基酸。为了方便读者,下文提供了单字母和三字母氨基酸代码:

[0073]	G	甘氨酸	Gly	P	脯氨酸	Pro
	A	丙氨酸	Ala	V	缬氨酸	Val
	L	亮氨酸	Leu	I	异亮氨酸	Ile
	M	甲硫氨酸	Met	C	半胱氨酸	Cys
	F	苯丙氨酸	Phe	Y	酪氨酸	Tyr
	W	色氨酸	Trp	H	组氨酸	His
	K	赖氨酸	Lys	R	精氨酸	Arg
	Q	谷氨酰胺	Gln	N	天冬酰胺	Asn
	E	谷氨酸	Glu	D	天冬氨酸	Asp
	S	丝氨酸	Ser	T	苏氨酸	Thr

[0074] 如本文中所用,术语“变体”涵盖天然存在的变体和非天然存在的变体。天然存在的变体包括同源物(从一种物种到另一种物种分别在氨基酸或核苷酸序列上不同的多肽和核酸)和等位变体(从一种物种内的一个个体到另一个分别在氨基酸或核苷酸序列上不同

的多肽和核酸)。非天然存在的变体包括分别包含氨基酸或核苷酸序列变化的多肽和核酸,其中人工引入序列的变化(例如,突变蛋白);例如,在实验室中通过人干预(“人为”)产生变化。因此,在本文中,“突变蛋白”广泛地指突变的重组蛋白,其通常携带单个或多个氨基酸取代,并且经常源自进行定点或随机诱变的克隆基因或完全合成的基因。

[0075] 术语“DNA”、“核酸”、“核酸分子”、“多核苷酸”等在本文中可互换使用,指任何长度的核苷酸(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物)的聚合形式。多核苷酸的非限制性实例包括线性和环状核酸、信使RNA(mRNA)、互补DNA(cDNA)、重组多核苷酸、载体、探针、引物等。

[0076] 如本文中在多肽结构的背景中所使用,“N-末端”(或“氨基末端”)和“C-末端”(或“羧基末端”)是指多肽的极端氨基和羧基末端,而术语“N-末端”和“C-末端”分别指多肽的氨基酸序列相对于N-末端和C-末端的相对位置,并且可以包括N-末端和C-末端的残基。“直接N-末端”或“直接C-末端”是指第一氨基酸残基相对于第二氨基酸残基的位置,其中第一和第二氨基酸残基共价结合以提供连续的氨基酸序列。

[0077] 在氨基酸序列或多核苷酸序列(例如,源自“IL-10多肽”的氨基酸序列)的背景中,“源自”意在指示多肽或核酸具有基于参考多肽或核酸(例如,天然存在的IL-10多肽或编码IL-10的核酸)序列的序列,并不意味着就制备蛋白质或核酸的来源或方法而言是限制性的。举例来说,术语“源自”包括参考氨基酸或DNA序列的同源物或变体。

[0078] 在多肽的背景中,术语“分离的”是指若天然存在的话在与其可以天然存在的环境不同的环境中所关注的多肽。“分离的”意在包括在基本上富集所关注的多肽和/或部分或基本上纯化所关注的多肽的样品内的多肽。当多肽不是天然存在时,“分离的”指示多肽已经从通过合成或重组手段制备它的环境中分离出来。

[0079] “富集”意味着样品被非天然操作(例如由科学家进行),以便以下述浓度存在所关注的多肽:a)比起始样品,如生物样品(例如,多肽天然存在或它在施用后存在的样品)中的多肽浓度大的浓度(例如,大至少3倍、大至少4倍、大至少8倍,大至少64倍或更多)或b)比制备多肽的环境(例如,与在细菌细胞中一样)更大的浓度。

[0080] “基本上纯的”指示组分(例如多肽)占组合物总含量的大于约50%,并且通常总多肽含量的大于约60%。更典型地,“基本上纯的”是指其中总组合物中至少75%、至少85%、至少90%或更多是所关注组分的组合物。在一些情况下,多肽将占组合物总含量的大于约90%,或大于约95%。

[0081] 当提到配体/受体、抗体/抗原或其他结合对时,术语“特异性结合”或“选择性结合”指示结合反应,其决定蛋白质在异质蛋白质群体及其他生物制剂中的存在。因此,在指定条件下,规定的配体结合特定受体,并且不以显著量结合样品中存在的其他蛋白质。考虑的方法的抗体或源自抗体的抗原结合位点的结合组合物以下述亲和力结合其抗原或其变体或突变蛋白,所述亲和力比任何其他抗体或自其衍生的结合组合物的亲和力大至少2倍、大至少10倍、大至少20倍或大至少100倍。在一个具体的实施方案中,抗体将具有大于约 10^9 升/摩尔的亲和力,如通过例如Scatchard分析(Munsen等人,1980Analyt.Biochem.107:220-239)测定。

[0082] IL-10和PEG-IL-10

[0083] 抗炎性细胞因子IL-10(也称为人细胞因子合成抑制因子(CSIF))分类为类型(类

别)-2细胞因子,一组包括IL-19、IL-20、IL-22、IL-24 (Mda-7) 和IL-26、干扰素 (IFN- α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 κ 、 Ω 和 τ) 和干扰素样分子(限制蛋白(limitin)、IL-28A、IL-28B和IL-29)的细胞因子。

[0084] IL-10是一种在免疫调节和炎症中具有多效性的细胞因子。它是由肥大细胞产生的,抵消这些细胞在过敏反应部位具有的炎症作用。虽然它能够抑制诸如IFN- γ 、IL-2、IL-3、TNF α 和GM-CSF的促炎细胞因子的合成,但IL-10也刺激某些T细胞和肥大细胞,并刺激B-细胞成熟、增殖和抗体产生。IL-10可阻断NF- κ B活性,并参与JAK-STAT信号传导途径的调控。它还诱导CD8+ T细胞的细胞毒活性和B细胞的抗体产生,并且其抑制巨噬细胞活性和促进肿瘤的炎症。CD8+T细胞的调节是剂量依赖性的,其中较高剂量诱导较强的细胞毒性反应。

[0085] 人IL-10是分子质量为37kDa的同二聚体,其中每个18.5kDa的单体包含178个氨基酸,其中前18个包含信号肽和两对形成两个分子内二硫键的半胱氨酸残基。IL-10二聚体在破坏两个单体亚单位之间的非共价相互作用时变得无生物学活性。

[0086] 本公开考虑表现出80%同源性的IL-10和鼠IL-10及其用途。此外,本公开的范围包括来自其他哺乳动物物种(包括大鼠(登录号NP_036986.2;GI 148747382));牛(登录号NP_776513.1;GI 41386772);羊(登录号NP_001009327.1;GI 57164347);狗(登录号ABY86619.1;GI 166244598);和兔(登录号AAC23839.1;GI 3242896)的IL-10直向同源物及其修饰形式。

[0087] 如上所述,术语“IL-10”、“IL-10多肽”、“IL-10剂”等旨在广义解释,并且包括例如人和非人IL-10相关多肽,包括同系物、变体(包括突变蛋白)及其片段,以及具有例如前导序列(例如,信号肽)的IL-10多肽,以及前述物质的修饰形式。在另外的具体实施方案中,IL-10,IL-10多肽和IL-10剂是激动剂。

[0088] IL-10受体(II型细胞因子受体)由 α 和 β 亚基,分别也称为R1和R2组成。受体激活需要与 α 和 β 结合。IL-10多肽的一个同二聚体与 α 结合,而相同IL-10多肽的另一个同二聚体与 β 结合。

[0089] 重组人IL-10的用途通常受到其相对较短的血清半衰期的限制,这可能是由于例如血清中的肾清除、蛋白水解降解和单体化所致。因此,已经探索了各种方法来改善IL-10的药代动力学特征,而不会破坏其二聚体结构从而不利地影响其活性。IL-10的PEG化导致某些药代动力学参数(例如血清半衰期)的改善和/或活性的增强。例如,本公开的具体实施方案涉及用PEG-IL-10优化对增殖性疾病(例如癌症)的治疗方法。

[0090] 如先前指示,本公开还考虑结合本文中的教导使用基因疗法。基因疗法通过将通常包装在载体中的遗传物质递送到受试者内的内源细胞来实现,以引入新基因、引入预先存在的基因的额外拷贝、损害现有基因的功能发挥或修复现有的但是不发挥功能的基因。一旦在细胞内,核酸由细胞机器表达,导致产生所关注的蛋白质。在本公开的背景中,基因疗法用作治疗剂以递送编码用于治疗或预防本文中所述的疾病、病症或病况的IL-10剂的核酸。

[0091] 如上文提到,对于基因疗法用途和方法,可以用编码如本文中阐述的IL-10相关多肽的核酸在体内转化受试者中的细胞。或者,可以用转基因或多核苷酸在体外转化细胞,然后移植到受试者的组织中以实现治疗。此外,可以用编码IL-10相关多肽的转基因或多核苷

酸转化原代细胞分离物或建立的细胞系,然后任选地移植到受试者的组织中。

[0092] 如本文中所用,术语“PEG化的IL-10”和“PEG-IL-10”是指具有共价连接到IL-10蛋白的至少一个氨基酸残基(通常通过接头),使得连接稳定的一个或多个聚乙二醇分子的IL-10分子。术语“单聚乙二醇化的IL-10”和“单PEG-IL-10”指示一个聚乙二醇分子通常通过接头共价连接到IL-10二聚体的一个亚基上的单个氨基酸残基。在某些实施方案中,本公开内容中使用的PEG-IL-10是单PEG-IL-10,其中1至9个PEG分子经由接头共价连接到IL-10二聚体的一个亚单位N位氨基酸残基的 α 氨基基团。一个IL-10亚基上的单PEG化通常由于亚基改组而导致非PEG化、单PEG化和二PEG化IL-10的非同质混合物。此外,允许PEG化反应进行至完成将通常导致非特异性和多PEG化的IL-10,从而降低其生物活性。因此,本公开的具体实施方案包括施用通过本文所述方法(例如,实验部分)产生的单和二PEG化的IL-10的混合物。

[0093] 在具体实施方案中,PEG部分的平均分子量为约5kDa至约50kDa。虽然PEG连接至IL-10的方法或位点不是关键的,但在某些实施方案中,PEG化不改变或仅最小程度地改变IL-10剂的活性。在某些实施方案中,半衰期的增加大于生物活性的任何降低。PEG-IL-10的生物学活性通常通过评估用细菌抗原(脂多糖(LPS))攻击并用PEG-IL-10治疗的受试者的血清中的炎性细胞因子(例如TNF- α 或IFN- γ)的水平来测量,如美国专利号7,052,686中所述。

[0094] IL-10变体可以考虑到各种目标制备,包括在治疗用途期间增加血清半衰期、减少针对IL-10的免疫应答、促进纯化或制备、降低IL-10转化成其单体亚基、改善治疗功效和减轻副作用的严重性或发生。氨基酸序列变体通常是自然界中未发现的预定变体,尽管有些可能是翻译后变体,例如糖基化变体。可以使用IL-10的任何变体,只要它保持适当水平的IL-10活性。在肿瘤背景中,合适的IL-10活性包括例如CD8⁺ T细胞浸润到肿瘤部位中、从这些浸润性细胞表达炎性细胞因子,如IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10和RANK-L,以及生物样品中升高的IFN- γ 水平。

[0095] 短语“保守氨基酸取代”是指通过用具有相似酸度、碱性、电荷、极性或侧链尺寸的侧链的氨基酸替换蛋白质中的氨基酸来保持蛋白质的活性的取代。保守氨基酸取代通常需要在以下组内氨基酸残基的取代:1) L、I、M、V、F; 2) R、K; 3) F、Y、H、W、R; 4) G、A、T、S; 5) Q、N; 和 6) D、E。关于取代、插入或缺失的指导可以基于不同变体蛋白或来自不同物种的蛋白质的氨基酸序列的比对。因此,除了任何天然存在的IL-10多肽之外,本公开考虑具有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个,通常不超过20、10或5个氨基酸取代,其中取代通常是保守的氨基酸取代。

[0096] 本公开还考虑含有源自成熟IL-10的连续氨基酸残基的成熟IL-10的活性片段(例如亚序列)。肽或多肽亚序列的连续氨基酸残基的长度随衍生亚序列的特定天然存在的氨基酸序列而变化。通常,肽和多肽可以是约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸直至全长肽或多肽。

[0097] 另外,IL-10多肽可以在定义长度的连续氨基酸(例如“比较窗口”)上与参考序列相比具有定义的序列同一性。用于比较的序列的比对方法是本领域中公知的。用于比较的序列的最佳比对可以例如通过Smith和Waterman、Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)的局部同源

性算法、通过Needleman和Wunsch、J.Mol.Biol.48:443 (1970)的同源性比对算法、通过Pearson和Lipman、Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 85:2444 (1988)的搜索相似性法、通过这些算法的计算机化执行(Wisconsin Genetics Software Package、Madison、Wis.中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA)或通过手动比对和目视检查(参见例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编,1995增补))进行。

[0098] 举例而言,合适的IL-10多肽可以包含与约20个氨基酸至约40个氨基酸、约40个氨基酸至约60个氨基酸、约60个氨基酸至约80个氨基酸、约80个氨基酸至约100个氨基酸、约100个氨基酸至约120个氨基酸、约120个氨基酸至约140个氨基酸、约140个氨基酸至约150个氨基酸、约150个氨基酸至约155个氨基酸、约155个氨基酸的连续区段直至全长肽或多肽具有至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约98%或至少约99%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

[0099] 如下文进一步讨论,IL-10多肽可以从天然来源(例如,除了其天然存在的环境以外的环境)中分离,并且也可以重组制备(例如,在经遗传修饰的宿主细胞,如细菌、酵母、毕赤酵母属、昆虫细胞等中),其中用包含编码多肽的核苷酸序列的核酸修饰经遗传修饰的宿主细胞。也可以合成制备IL-10多肽(例如通过无细胞化学合成)。

[0100] 本公开考虑编码IL-10剂的核酸分子,包括其天然存在和非天然存在的同种型、等位变体和剪接变体。本公开还涵盖在一个或多个碱基中与天然存在的DNA序列存在变化但由于遗传密码的简并性而仍然翻译为对应于IL-10多肽的氨基酸序列的核酸序列。

[0101] IL-10血清浓度

[0102] 本文所述方法中IL-10的血浆水平可以以几种方式表征,包括:(1)平均IL-10血清谷浓度高于某个规定水平或在水平范围内;(2)平均IL-10血清谷浓度高于某个规定水平达某个时间量;(3)稳态IL-10血清浓度水平高于或低于某个规定水平或在水平范围内;或(4)浓度特征的 C_{max} 高于或低于某个规定水平或在某些水平范围内。如本文所述,已经发现平均血清谷IL-10浓度在某些适应症中对于功效是特别重要的。

[0103] 治疗具有例如实体瘤的患者的PEG-hIL-10的血清水平。

[0104] 实验部分描述了mIL-10和PEG-mIL-10在PDV6鳞状细胞癌和CT-26结肠癌中的治疗功效的评估,其中mIL-10和mPEG-IL-10给药参数(施用量和频率)足以达到1-2ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。如实验部分所述,PEG-IL-10治疗导致完全响应,而IL-10治疗显示抗肿瘤功能但不是完全响应。

[0105] 然而,在实验部分中详细描述为进一步评估表明,更高的血清浓度可用于肿瘤学背景。特别是,对实体瘤(例如卵巢肿瘤、肾肿瘤、结肠肿瘤或胰腺肿瘤)患者的PEG-hIL-10的影响的评估表明,有利的是实现比最初考虑(并在下面描述)的血清浓度更大的PEG-hIL-10的血清浓度,以便实现最大的有效性。

[0106] 因此,本公开考虑设计治疗或预防癌症相关疾病、病症或病况的实施方案,其中通过实现至少6.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度优化疗法。在一些实施方案中,可以产生的浓度特征包括:大于约6.5ng/mL、大于约7.0ng/mL、大于约7.5ng/mL、大于约8.0ng/mL、大于约8.5ng/mL、大于约9.0ng/mL、大于约9.5ng/mL、大于约10.0ng/mL、大于约10.5ng/mL、大于约11.0ng/mL、大于约11.5ng/mL、大于约12.0ng/mL、大于约12.5ng/mL、大于约13.0ng/mL、大于约13.5ng/mL、大于约14.0ng/mL、大于约14.5ng/mL、大于约15.0ng/mL、大于约15.5ng/

mL、大于约16.0ng/mL、大于约16.5ng/mL、大于约17.0ng/mL、大于约17.5ng/mL、大于约18.0ng/mL、大于约18.5ng/mL、大于约19.0ng/mL、大于约19.5ng/mL、大于约20.0ng/mL、大于约20.5ng/mL、大于约21.0ng/mL、大于约21.5ng/mL、大于约22.0ng/mL、大于约22.5ng/mL、大于约23.0ng/mL或大于约24.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

[0107] 本公开的具体的实施方案包括范围为约6.0ng/mL至约20.0ng/mL、约7.0ng/mL至约19.0ng/mL、约8.0ng/mL至约18.0ng/mL、约9.0ng/mL至约17.0ng/mL、约10.0ng/mL至约22.0ng/mL、约10.0ng/mL至约21.0ng/mL、约10.0ng/mL至约20.0ng/mL、约10.0ng/mL至约19.0ng/mL、约10.0ng/mL至约18.0ng/mL、约10.0ng/mL至约17.0ng/mL、约10.0ng/mL至约16.0ng/mL、约10.0ng/mL至约15.0ng/mL、约10.0ng/mL至约12.5ng/mL、约12.5ng/mL至约22.0ng/mL、约12.5ng/mL至约20.0ng/mL、约12.5ng/mL至约17.5ng/mL、约12.5ng/mL至约15.0ng/mL、约15.0ng/mL至约22.0ng/mL、约15.0ng/mL至约20.0ng/mL、约15.0ng/mL至约18.0ng/mL、约15.0ng/mL至约17.0ng/mL、约17.5ng/mL至约22.0ng/mL、约17.5ng/mL至约20.0ng/mL、约18.0ng/mL至约22.0ng/mL、约18.0ng/mL至约21.0ng/mL、约18.0ng/mL至约20.0ng/mL、约6.0ng/mL至约18.0ng/mL、约6.0ng/mL至约16.0ng/mL、约6.0ng/mL至约14.0ng/mL、约6.0ng/mL至约12.0ng/mL、约6.0ng/mL至约10.0ng/mL、约8.0ng/mL至约22.0ng/mL、约8.0ng/mL至约20.0ng/mL、约8.0ng/mL至约18.0ng/mL、约8.0ng/mL至约16.0ng/mL、约8.0ng/mL至约14.0ng/mL、约10.0ng/mL至约22.0ng/mL、约10.0ng/mL至约20.0ng/mL、约10.0ng/mL至约18.0ng/mL、约10.0ng/mL至约16.0ng/mL、约10.0ng/mL至约14.0ng/mL、约12.0ng/mL至约22.0ng/mL、约12.0ng/mL至约20.0ng/mL、约12.0ng/mL至约18.0ng/mL、约12.0ng/mL至约16.0ng/mL或约12.0ng/mL至约14.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

[0108] 进一步评估患有其他疾病、病症或病况的患者可以鉴定也可受益于此类血清浓度升高的患者群体。然而,即使在此类患者群体中,也可以在较低浓度下观察临床相关效用。

[0109] 可用于治疗某些患者群体的PEG-hIL-10的血清水平。

[0110] 在本公开的一些实施方案中,可以产生的血浆水平浓度特征包括:大于约0.1ng/mL、大于约0.15ng/mL、大于约0.2ng/mL、大于约0.25ng/mL、大于约0.3ng/mL、大于约0.35ng/mL、大于约0.4ng/mL、大于约0.45ng/mL、大于约0.5ng/mL、大于约0.55ng/mL、大于约0.6ng/mL、大于约0.65ng/mL、大于约0.7ng/mL、大于约0.75ng/mL、大于约0.8ng/mL、大于约0.85ng/mL、大于约0.9ng/mL、大于约0.95ng/mL、大于约1.0ng/mL、大于约1.1ng/mL、大于约1.2ng/mL、大于约1.3ng/mL、大于约1.4ng/mL、大于约1.5ng/mL、大于约1.6ng/mL、大于约1.7ng/mL、大于约1.8ng/mL、大于约1.9ng/mL、大于约2.0ng/mL、大于约2.1ng/mL、大于约2.2ng/mL、大于约2.3ng/mL、大于约2.4ng/mL、大于约2.5ng/mL、大于约2.75ng/mL或大于约3.0ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

[0111] 本公开的具体的实施方案包括范围为约0.1ng/mL至约1.0ng/mL、约0.1ng/mL至约0.9ng/mL、约0.1ng/mL至约0.8ng/mL、约0.1ng/mL至约0.7ng/mL、约0.1ng/mL至约0.6ng/mL、约0.1ng/mL至约0.5ng/mL、约0.2ng/mL至约1.0ng/mL、约0.2ng/mL至约0.9ng/mL、约0.2ng/mL至约0.8ng/mL、约0.2ng/mL至约0.7ng/mL、约0.2ng/mL至约0.6ng/mL、约0.2ng/mL至约0.5ng/mL、约0.3ng/mL至约1.0ng/mL、约0.3ng/mL至约0.9ng/mL、约0.3ng/mL至约0.8ng/mL、约0.3ng/mL至约0.7ng/mL、约0.3ng/mL至约0.6ng/mL、约0.3ng/mL至约0.5ng/

mL、约0.3ng/mL至约0.4ng/mL、约0.4ng/mL至约1.0ng/mL、约0.4ng/mL至约0.9ng/mL、约0.4ng/mL至约0.8ng/mL、约0.4ng/mL至约0.7ng/mL、约0.4ng/mL至约0.6ng/mL、约0.4ng/mL至约0.5ng/mL、约0.5ng/mL至约1.0ng/mL、约0.5ng/mL至约0.9ng/mL、约0.5ng/mL至约0.8ng/mL、约0.5ng/mL至约0.7ng/mL、约0.5ng/mL至约0.6ng/mL、约0.7ng/mL至约2.3ng/mL、约0.8ng/mL至约2.2ng/mL、约0.9ng/mL至约2.1ng/mL、约1.0ng/mL至约2.1ng/mL、约1.0ng/mL至约2.0ng/mL、约1.0ng/mL至约1.9ng/mL、约1.0ng/mL至约1.8ng/mL、约1.0ng/mL至约1.7ng/mL、约1.0ng/mL至约1.6ng/mL、约1.0ng/mL至约1.5ng/mL、约1.9ng/mL至约2.5ng/mL、约1.9ng/mL至约2.5ng/mL、约1.9ng/mL至约2.4ng/mL、约1.9ng/mL至约2.3ng/mL、约1.9ng/mL至约2.2ng/mL或约1.9ng/mL至约2.1ng/mL的平均IL-10血清谷浓度。

[0112] 在涉及治疗或预防抗炎性疾病的具体实施方案中,通过实现0.1ng/mL至1.0ng/mL、0.1ng/mL至0.9ng/mL、0.1ng/mL至0.8ng/mL、0.1ng/mL至0.7ng/mL、0.1ng/mL至0.6ng/mL、0.1ng/mL至0.5ng/mL、0.2ng/mL至1.0ng/mL、0.2ng/mL至0.9ng/mL、0.2ng/mL至0.8ng/mL、0.2ng/mL至0.7ng/mL、0.2ng/mL至0.6ng/mL、0.2ng/mL至0.5ng/mL、0.3ng/mL至1.0ng/mL、0.3ng/mL至0.9ng/mL、0.3ng/mL至0.8ng/mL、0.3ng/mL至0.7ng/mL、0.3ng/mL至0.6ng/mL、0.3ng/mL至0.5ng/mL、0.3ng/mL至0.4ng/mL、0.4ng/mL至1.0ng/mL、0.4ng/mL至0.9ng/mL、0.4ng/mL至0.8ng/mL、0.4ng/mL至0.7ng/mL、0.4ng/mL至0.6ng/mL、0.4ng/mL至0.5ng/mL、0.5ng/mL至1.0ng/mL、0.5ng/mL至0.9ng/mL、0.5ng/mL至0.8ng/mL、0.5ng/mL至0.7ng/mL或0.5ng/mL至0.6ng/mL的平均IL-10血清谷浓度来优化疗法。

[0113] 实验部分和图4-7提供可用于实现期望IL-10血清谷浓度的给药方案的实例。参考图4,每天皮下(SC)施用20 μ g/kg PEG-hIL-10导致超过约6ng/mL的EC50(处于或高于EC50的暴露认为是有利的)并且始终高于10ng/mL的IL-10血清谷浓度的暴露,而每天SC施用10 μ g/kg的PEG-hIL-10常常导致处于或高于EC50,并且始终高于5ng/mL的IL-10血清谷浓度的暴露。在以10 μ g/kg和20 μ g/kgPEG-hIL-10每天SC给药的具有特定癌症类型的患者中实现类似的IL-10血清谷浓度(图5A和5B)。

[0114] 可以评估IL-10治疗对丙型肝炎的影响。具有易受丙型肝炎病毒感染的功能性免疫系统的小鼠模型(参见Dorner, M. (2011年6月9日) Nature 474:208-211)可用于评价mIL-10和PEG-mIL-10的药代动力学和药效学作用。使用本文所述的教导和熟练技术人员的知识库,可以评估为了达到期望的平均IL-10血清谷浓度而施用的mIL-10和PEG-mIL-10的效果。

[0115] 尽管在大多数患者群体中在治疗剂量时不普遍,但较高剂量的IL-10的施用在有限数量的受试者中引起不良反应(例如头痛、贫血和对肝脏的影响)。幸运的是,当在治疗持续时间内维持0.1-2.0ng/mL的平均IL-10血清浓度时,这种不良反应并不普遍。此外,即使在较高的平均血清浓度(例如,10.0-20.0ng/mL)下,这种不良反应通常不是普遍的,考虑到所治疗病症的严重程度,是可控制的和/或可接受的。尽管如此,本公开的另一个实施方案提供了用于监测接受IL-10治疗的受试者以预测并因此潜在地避免不良反应的方法,所述方法包括:(1)测量受试者的IL-10峰浓度;(2)测量IL-10受试者的谷浓度;(3)计算峰谷波动;并且(4)使用计算的峰-谷波动来预测受试者的潜在不良反应。较小的峰谷波动表明受试者将经历IL-10相关不良反应的可能性较低。在某些实施方案中,使用特定的给药参数来确定用于治疗特定疾病、病症和病况的特定峰-谷波动,并且这些波动用作参考标准。

[0116] 除了上述IL-10给药相关参数之外,分布考虑的量也是相关的。对于大多数药物,

血浆药物浓度以多指数方式下降。在静脉内施用后,药物立即在最初的空间(最小限定为血浆体积)迅速分布,然后发生对血管外空间(例如某些组织)较慢的平衡分布。静脉内IL-10施用与这种两室动力学模型相关(参见Rachmawati,H.等人(2004) Pharm.Res.21(11):2072-78)。还研究了皮下重组hIL-10的药代动力学(Radwanski,E.等人(1998) Pharm.Res.15(12):1895-1901)。此外,已经引入IL-10修饰以试图将细胞因子靶向到特定细胞类型(参见Rachmawati,H.(2007年5月) Drug Met.Dist.35(5):814-21)。

[0117] 如下文进一步描述,在小鼠中观察到的IL-10和PEG-IL-10抗肿瘤功效源自CD8+T细胞中细胞毒性酶的诱导,导致肿瘤细胞的杀伤。许多抗癌化合物,包括但不限于细胞凋亡诱导剂,以循环方式施用。通常,施用接近最大耐受剂量(MTD)的单一剂量或一系列剂量,包括接近最大耐受剂量(MTD)的单一应用或高剂量系列,然后停止给药(“药物假期”),以恢复患者的正常生理。举例来说,这种给药策略适用于细胞毒性化学治疗性抗体疗法,如抗VEGF(AVASTIN)和短寿命生物试剂如PROLEUKIN(IL-2)。

[0118] 进行鼠研究以产生有助于理解IL-10疗法的药代动力学参数和优化人肿瘤治疗方案的数据。如实验部分所述,虽然接受在一剂或几剂中施用的一周过程内相同量药物的小鼠具有相似的总体暴露,但是接受日剂量的小鼠表现出肿瘤大小的最大减少(表15)。此外,导致维持血清谷浓度大于约1ng/mL(例如,1.1-2.1ng/mL)的治疗方案表现出肿瘤大小和体重的最大降低(表16)。

[0119] 本公开考虑导致维持血清谷浓度大于约6.0ng/mL的任何剂量的施用。例如,当受试者是人时,可以以大于15μg/kg/天、大于18μg/kg/天、大于20μg/kg/天、大于21μg/kg/天、大于22μg/kg/天、大于23μg/kg/天、大于24μg/kg/天或大于25μg/kg/天的剂量施用非PEG化的hIL-10。当受试者是人时,可以以大于2.0μg/kg/天、大于2.3μg/kg/天、大于2.5μg/kg/天、大于2.6μg/kg/天、大于2.7μg/kg/天、大于2.8μg/kg/天、大于2.9μg/kg/天、大于3.0μg/kg/天、大于3.1μg/kg/天、大于3.2μg/kg/天、大于3.3μg/kg/天、大于3.4μg/kg/天或大于3.5μg/kg/天的剂量施用包含相对小PEG(例如5kDa单-二PEG-hIL10)的PEG-hIL-10。

[0120] CD8+ T细胞在IL-10功能中的作用

[0121] CD8(分化簇8)是充当T细胞受体(TCR)的共受体的跨膜糖蛋白。CD8共受体主要在细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的表面上表达,但它也在其他细胞类型,包括天然杀伤细胞(NK)上被发现。与TCR一样,CD8与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合,但是对于I类MHC蛋白质是特异性的。

[0122] CD8功能需要形成包含一对CD8链的二聚体。CD8有两种同种型α和β,并且最常见的CD8形式包括免疫球蛋白超家族的两个成员CD8-α和CD8-β链。CD8-α与I类MHC分子相互作用,并且这种相互作用保持细胞毒性T细胞的T细胞受体和靶细胞在抗原特异性激活期间紧密结合。具有CD8表面蛋白的细胞毒性T细胞被称为“CD8+T细胞”。CD8+T细胞(CTL和NK细胞)识别特异性感染的靶细胞的抗原(通常是源自细胞内病原体感染的细胞表面肽或蛋白质),并且如果那些抗原不同于受试者的正常抗原特征(“免疫自身”),则CD8+T细胞被激活并诱导靶细胞凋亡。

[0123] 存在抗原特征不同的几种情况。例如,当病原体(例如病毒)侵入细胞时,细胞产生“非自体”细胞表面抗原,并且CD8+ T细胞启动免疫应答以试图消除被感染的细胞。发生另一种情况,其中由于核酸和/或氨基酸水平的突变而修饰了一些细胞的蛋白质。癌细胞通常

携带许多突变,并且被CD8+T细胞识别为“不同”。人癌症中CD8+T细胞的存在与更长的存活相关。

[0124] 在上述两种情况下,活化的CD8+T细胞产生IFN γ 、穿孔蛋白和粒酶B。IFN γ 对进一步上调在I型MHC蛋白上发生的靶细胞上的抗原的“呈递”是重要的。穿孔蛋白和粒酶介导靶细胞(如病毒和癌症)的杀死。

[0125] 穿孔蛋白(CTL和NK颗粒中发现的细胞溶解蛋白)在脱粒后将其自身插入靶细胞的质膜。穿孔蛋白具有补体成分9(C9)的结构和功能相似性,并且与C9一样,穿孔蛋白产生跨膜小管,并能够非特异性裂解多种靶细胞。穿孔蛋白是T细胞和NK细胞介导的细胞溶解的关键效应分子。

[0126] 如上所述,粒酶B是由细胞毒性T淋巴细胞(CTL)和天然杀伤(NK)细胞表达的丝氨酸蛋白酶。CTL和NK细胞识别特异性感染的靶细胞群并诱导细胞凋亡,所述细胞在其表面上携带“非自身”抗原,通常是由细胞内病原体感染引起的肽或蛋白质。粒酶B对于在细胞介导的免疫应答中由CTL快速诱导靶细胞凋亡至关重要。

[0127] IL-10在CD8+T细胞的激活中起着不同的作用。例如,IL-10诱导记忆CD8+T细胞(在先前的感染或疫苗接种期间产生的细胞)中的效应分子(IFN γ 、穿孔蛋白和粒酶B)。这种记忆CD8+T细胞是负责提供受试者对抗病毒的长期保护的细胞。尽管不存在IL-10时可能发生记忆CD8+T细胞的产生和扩增(Vicari,A和Trinchieri,G.(2004) Immuno.Rev.202:223-236),IL-10直接激活此类细胞的事实提供了独特和替代的治疗方法。虽然慢性病毒感染已经与CD8+T细胞有关(Virgin,H.等人(2009) Cell 138,第30页),但是尚未描述用未PEG化的IL-10或PEG化的IL-10治疗受试者(例如,小鼠)。

[0128] 鉴于上文,本公开的实施方案基于CD8+T细胞与癌症和病毒感染之间的联系。因此,治疗和/或预防癌症相关疾病、病症和病况的某些方法也应用于治疗病毒相关疾病、病症和病况。

[0129] 与其他细胞因子相反,IL-10可被认为是有效的免疫刺激因子和免疫抑制因子。CD8+T细胞在慢性炎症中的作用尚未完全阐明。然而,由于IFN γ 在癌症和病毒相关疾病中的参与是至少部分通过CD8+T细胞介导的,并且由于涉及炎症相关疾病的控制的IL-10-T细胞途径(通过下调炎症性细胞因子)也涉及IFN γ ,CD8+T细胞也可能在炎症中起关键作用。因此,IL-10可被证明是抗炎剂的目前稳定的重要治疗剂。

[0130] IL-10的生产方法

[0131] 可以通过任何合适的方法产生本公开的多肽,所述方法包括非重组(例如,化学合成)和重组方法。

[0132] A. 化学合成

[0133] 在化学合成多肽的情况下,可以经由液相或固相进行合成。固相肽合成(SPPS)允许引入非天然氨基酸和/或肽/蛋白质主链修饰。各种形式的SPPS,如9-苄基甲氧基羰基(Fmoc)和叔丁氧基羰基(Boc)可用于合成本公开的多肽。化学合成的详情是本领域中已知的(例如,Ganesan A.(2006) Mini Rev.Med.Chem.6:3-10;和Camarero J.A.等人(2005) Protein Pept Lett.12:723-8)。

[0134] 如下文描述,可以进行固相肽合成。 α 功能(Na)和任何反应性侧链均受酸不稳定或碱不稳定基团的保护。保护基在连接酰胺键的条件下是稳定的,但是可以容易地切割而不

损害已经形成的肽链。适用于 α -氨基功能的保护基包括但不限于下列各项：Boc、苄氧基羰基(Z)、O-氯苄氧羰基、双苄基异丙氧基羰基、叔戊氧基羰基(Amoc)、 α,α -二甲基-3,5-二甲氧基-苄基氧基羰基、邻-硝基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧-羰基、Fmoc、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环亚己-1-基)乙基(Dde),等等。

[0135] 合适的侧链保护基包括但不限于：乙酰基、烯丙基(A11)、烯丙基氧基羰基(A11oc)、苄基(Bz1)、苄基氧基羰基(Z)、叔丁基氧基羰基(Boc)、苄基氧基甲基(Bom)、邻-溴苄基氧基羰基、叔丁基(tBu)、叔丁基二甲基甲硅烷基、2-氯苄基、2-氯苄基氧基羰基、2,6-二氯苄基、环己基、环戊基、1-(4,4-二甲基-2,6-二氧代环亚己-1-基)乙基(Dde)、异丙基、4-甲氧基-2,3,6-三甲基苄基磺酰基(Mtr)、2,3,5,7,8-五甲基色满-6-磺酰基(Pmc)、新戊酰基、四氢吡喃-2-基、甲苯磺酰基(Tos)、2,4,6-三甲氧基苄基、三甲基甲硅烷基和三苯甲基(Trt)。

[0136] 在固相合成中,将C-末端氨基酸与合适的支持物材料缀合。合适的支持物材料是对用于合成过程的逐步缩合和切割反应的试剂和反应条件是惰性的并且不溶于所用反应介质的那些材料。可商购的支持物材料的实例包括已经用反应性基团和/或聚乙二醇改性的苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;氯甲基化苯乙烯/二乙烯基苯共聚物;羟甲基化或氨甲基化苯乙烯/二乙烯基苯共聚物等。当期望制备肽酸时,可以使用用4-苄基氧基苄基醇(Wang-锚定)或2-氯三苯甲基氯化物衍生化的聚苯乙烯(1%)-二乙烯基苯或TentaGel®。在肽酰胺的情况下,可以使用用5-(4'-氨基甲基)-3',5'-二甲氧基苯氧基)戊酸(PAL-锚定)或对-(2,4-二甲氧基苄基-氨基甲基)-苯氧基基团(Rink酰胺锚定)衍生化的聚苯乙烯(1%)二乙烯基苯或TentaGel®。

[0137] 通过在室温或升高的温度(例如,40℃至60℃)在乙醇、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷、四氢呋喃、N-甲基吡咯烷酮或类似溶剂中加入活化剂使C-末端Fmoc-保护的氨基酸与支持物材料起反应并且例如以2至72小时反应时间实现与聚合支持物的连接。

[0138] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)与PAL、Wang或Rink锚定的缀合可以例如在1-羟基苯并三唑或1-羟基-7-氮杂苯并三唑存在或不存在下借助缀合试剂,如N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N,N'-二异丙基碳二亚胺(DIC)或其他碳二亚胺、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸盐(TBTU)或其他脲盐、O-酰基脲、苯并三唑-1-基-三-吡咯烷基-六氟磷酸磷(PyBOP)或其他磷盐、N-羟基琥珀酰亚胺、其他N-羟基酰亚胺或酐,例如借助于TBTU通过加入HOBt,在添加或不添加碱,如例如二异丙基乙胺(DIEA)、三乙胺或N-甲基吗啉,例如二异丙基乙胺的情况下,以反应时间2至72小时(例如3小时,在1.5至3倍过量的氨基酸和缀合试剂中,例如以2倍过量和约10℃至50℃之间的温度,例如在溶剂如二甲基甲酰胺、N-甲基吡咯烷酮或二氯甲烷,例如二甲基甲酰胺中25℃)进行。

[0139] 也可以在上文描述的条件下使用活性酯(例如五氟苯基、对硝基苯基等),Na-Fmoc-氨基酸的对称酸酐、其酰基氯或酰基氟代替缀合试剂。

[0140] Na-保护的氨基酸(例如,Fmoc氨基酸)可通过加入DIEA与二氯甲烷中的2-氯三苯甲基树脂缀合,反应时间为10至120分钟,例如20分钟,但不限于使用此溶剂和此碱。

[0141] 受保护的氨基酸的连续缀合可以根据肽合成中的常规方法进行,通常在自动肽合成仪中进行。在通过用例如二甲基甲酰胺中的哌啶(10%至50%)处理5至20分钟,例如,用DMF中的50%哌啶的2x2分钟和用DMF中的20%哌啶的1x15分钟切割固相上的缀合氨基酸的

Na-Fmoc保护基后,将3至10倍过量,例如10倍过量的接着的受保护的氨基酸与惰性非水极性溶剂,如二氯甲烷、DMF或两种的混合物中的先前的氨基酸并且在约10℃至50℃的温度,例如在25℃缀合。先前提及的用于将第一Na-Fmoc氨基酸缀合到PAL,Wang或Rink锚定的试剂适合作为缀合试剂。也可以使用受保护的氨基酸的活性酯,或其氯化物或氟化物或其对称酸酐作为备选。

[0142] 在固相合成结束时,从支持物材料中切割肽,同时切断侧链保护基。可以用三氟乙酸或其他强酸性介质进行切割,加入5%-20%V/V的清除剂如二甲基硫醚、乙基甲基硫醚、苯甲硫醚、硫代甲酚、间甲酚、苯甲醚乙二硫醇、酚或水,例如15%v/v二甲基硫醚/乙二硫醇/间甲酚1:1:1,在0.5至3小时内,例如2小时。通过用冰醋酸/三氟乙醇/二氯甲烷2:2:6切割2-氯三苯甲基锚定得到具有完全保护的侧链的肽。可以通过硅胶上的层析纯化受保护的肽。如果通过Wang锚将肽连接到固相,并且如果意图获得具有C-末端烷基酰胺化的肽,则可以用烷基胺或氟代烷基胺进行氨解来进行切割。氨解在约-10℃至50℃(例如约25℃)之间的温度下进行,并且反应时间在约12至24小时(例如约18小时)。此外,可以通过例如用甲醇再酯化从支持物切割肽。

[0143] 可以将获得的酸性溶液与3至20倍量的冷乙醚或正己烷(例如10倍过量的乙醚)混合,以便使肽沉淀,因此分离仍然在乙醚中的清除剂和切割的保护基团。可以通过从冰醋酸将肽再沉淀数次进行进一步纯化。可以将获得的沉淀物溶于水或叔丁醇或两种溶剂的混合物,例如叔丁醇/水的1:1混合物中,并冷冻干燥。

[0144] 可以通过各种层析法纯化获得的肽,包括以乙酸形式在弱碱性树脂上的离子交换;非衍生化的聚苯乙烯/二乙烯基苯共聚物(例如,Amberlite®XAD)上的疏水吸附层析;硅胶上的吸附层析;离子交换层析,例如在羧甲基纤维素上;分配层析,例如,在Sephadex®G-25上;反流分配层析;或高压液相层析(HPLC),例如在辛基或十八烷基甲硅烷基二氧化硅(ODS)相上的反相HPLC。

[0145] B. 重组生产

[0146] 描述人和小鼠IL-10制备的方法可以在例如美国专利号5,231,012中找到,该专利教导了生产具有IL-10活性的蛋白质的方法,包括重组和其他合成技术。IL-10可为病毒来源,Moore等人,(1990)Science248:1230中公开了来自埃巴病毒的病毒IL-10(BCRF1蛋白)的克隆和表达。可以使用本领域已知的标准技术,例如本文所述的那些技术,以多种方式获得IL-10。重组人IL-10也可商购获得,例如来自PeproTech,Inc.,Rocky Hill,N.J。

[0147] 在使用重组技术产生多肽的情况下,可以使用任何合适的构建体和任何合适的宿主细胞作为细胞内蛋白或分泌性蛋白产生多肽,所述宿主细胞可以分别是原核或真核细胞,如细菌(例如,大肠杆菌)或酵母宿主细胞。可用作宿主细胞的真核细胞的其他实例包括昆虫细胞、哺乳动物细胞和/或植物细胞。在使用哺乳动物宿主细胞的情况下,它们可以包括人细胞(例如HeLa、293、H9和Jurkat细胞);小鼠细胞(例如,NIH3T3、L细胞和C127细胞);灵长类细胞(例如Cos 1、Cos 7和CV1);和仓鼠细胞(例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)。

[0148] 可以根据本领域中已知的标准方法使用适合于多肽表达的多种宿主载体系统。参见例如Sambrook等人,1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press,New York;及Ausubel等人1995 Current Protocols in Molecular Biology,Wiley和Sons编。用于将遗传物质导入宿主细胞中的方法包括例如转化、电穿孔、

接合、磷酸钙方法等。可以选择用于转移的方法,以提供导入的多肽编码核酸的稳定表达。编码多肽的核酸可以作为可遗传的附加体元件(例如,质粒)提供,或可以是基因组整合的。用于生产所关注多肽的多种合适的载体是可商购的。

[0149] 载体可以在宿主细胞中提供染色体外维持,或可以提供对宿主细胞基因组的整合。表达载体提供转录和翻译调控序列,并且可以提供诱导型或组成性表达,其中编码区在转录启动区,以及转录和翻译终止区的转录控制下可操作地连接。通常,转录和翻译调节序列可以包括但不限于启动子序列、核糖体结合位点、转录起始和终止序列、翻译起始和终止序列,以及增强子或活化因子序列。启动子可以是组成性或诱导型,并且可以是强的组成性启动子(例如T7)。

[0150] 表达构建体通常具有位于启动子序列附近的方便的限制性位点,以提供编码所关注蛋白质的核酸序列的插入。可以存在在表达宿主中操作的选择标志物,以便于选择含有载体的细胞。此外,表达构建体可以包括额外的元素。例如,表达载体可以具有一个或两个复制系统,因此允许其保持在生物体中,例如在哺乳动物或昆虫细胞中用于表达和在原核宿主中用于克隆和扩增。此外,表达构建体可以含有选择标志物基因以允许选择经转化的宿主细胞。可选择的基因是本领域中公知的,并且将随所用的宿主细胞而变化。

[0151] 可以根据本领域已知的方法实现蛋白质的分离和纯化。例如,可以从遗传修饰为组成性和/或在诱导时表达蛋白质的细胞的裂解物中,或从合成反应混合物中通过免疫亲和纯化分离出蛋白质,所述免疫亲和纯化通常包括使样品与抗蛋白质抗体接触,清洗以除去非特异性结合的材料,并且洗脱特异性结合的蛋白质。可以通过透析和通常用于蛋白质纯化的其他方法进一步纯化分离的蛋白质。在一个实施方案中,可以使用金属螯合层析法分离蛋白质。蛋白质可含有修饰以促进分离。

[0152] 可以以基本上纯的或分离的形式(例如,不含其他多肽)制备多肽。多肽可以存在于相对于可能存在的其他成分(例如其他多肽或其他宿主细胞成分)富集多肽的组合物中。例如,可以提供纯化的多肽,使得多肽存在于基本上不含其他表达蛋白质的组合物中,例如小于约90%、小于约60%、小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%或小于约1%。

[0153] 可以使用重组技术产生IL-10多肽来操作本领域已知的不同的IL-10相关核酸以提供能够编码IL-10多肽的构建体。应当理解,当提供特定的氨基酸序列时,普通熟练技术人员鉴于她在例如分子生物学方面的背景和经验将认识到编码此类氨基酸序列的多种不同核酸分子。

[0154] 酰胺键取代

[0155] 在一些情况下,IL-10包含除肽键之外的一种或多种键,例如至少两个相邻的氨基酸通过除酰胺键之外的键连接。例如,为了减少或消除不期望的蛋白水解或其他降解手段,和/或提高血清稳定性,和/或限制或增加构象柔性,可以取代IL-10骨架内的一个或多个酰胺键。

[0156] 在另一个实例中,IL-10中的一个或多个酰胺键(-CO-NH-)可以用作为酰胺键的电子等排体的键替换,如-CH₂NH-、-CH₂S-、-CH₂CH₂-、-CH=CH- (顺式和反式)、-COCH₂-、-CH(OH)CH₂-或-CH₂SO-。IL-10中的一个或多个酰胺键也可以用例如还原的电子等排体假肽键替换。参见Couder等人(1993) Int.J.Peptide Protein Res.41:181-184。此类替换以及如何实现

它们是本领域普通技术人员已知的。

[0157] 氨基酸取代

[0158] 可以在IL-10多肽中进行一个或多个氨基酸取代。以下是非限制性实例：

[0159] a) 取代烷基取代的疏水性氨基酸，包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、正亮氨酸，(S)-2-氨基丁酸、(S)-环己基丙氨酸或由C₁-C₁₀碳的脂肪族侧链取代的其他简单的 α -氨基酸，包括支链、环状和直链烷基、烯基或炔基取代；

[0160] b) 取代芳香族取代的疏水性氨基酸，包括苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸、磺基酪氨酸、联苯丙氨酸、1-萘基丙氨酸、2-萘基丙氨酸、2-苯并噻吩丙氨酸、3-苯并噻吩丙氨酸、组氨酸，包括氨基、烷基氨基、二烷基氨基、氮杂、卤代(氟、氯、溴或碘)或烷氧基(C₁-C₄)-取代形式的上文列出的芳香族氨基酸，其示例性实例是：2-、3-或4-氨基苯丙氨酸、2-、3-或4-氯苯丙氨酸、2-、3-或4-甲基苯丙氨酸、2-、3-或4-甲氧基苯丙氨酸、5-氨基-、5-氯-、5-甲基-或5-甲氧基色氨酸、2'-、3'-或4'-氨基-、2'-、3'-或4'-氯-、2、3或4-联苯基丙氨酸、2'-、3'-或4'-甲基-、2-、3-或4-联苯基丙氨酸，以及2-或3-吡啶基丙氨酸；

[0161] c) 取代含有碱性侧链的氨基酸，包括精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、2,3-二氨基丙氨酸、高精氨酸，包括先前氨基酸的烷基、烯基或芳基取代的(C₁-C₁₀支链、直链或环状)衍生物，无论取代基是在杂原子(如 α 氮，或一个或多个远端氮)上，或在 α 碳上，例如在前-R位上。充当阐述性实例的化合物包括：N- ϵ -异丙基赖氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-甘氨酸、3-(4-四氢吡啶基)-丙氨酸、N,N- γ , γ' -二乙基-高精氨酸。还包括化合物，如 α -甲基-精氨酸、 α -甲基-2,3-二氨基丙氨酸、 α -甲基-组氨酸、 α -甲基-鸟氨酸，其中烷基占据 α -碳的前R位。还包括由烷基、芳香族、杂芳香族(其中杂芳香族基团单独或组合具有一个或多个氮、氧或硫原子)、羧酸或许多公知的活化衍生物如酰基氯、活性酯、活性杂环酰胺(azolides)和相关衍生物以及赖氨酸、鸟氨酸或2,3-二氨基丙氨酸中的任一种形成的酰胺；

[0162] d) 取代酸性氨基酸，包括天冬氨酸、谷氨酸、高谷氨酸、酪氨酸、2,4-二氨基丙氨酸的烷基、芳基、芳烷基和杂芳基磺酰胺、鸟氨酸或赖氨酸和四唑取代的烷基氨基酸；

[0163] e) 取代侧链酰胺残基，包括天冬酰胺、谷氨酰胺和天冬酰胺或谷氨酰胺的烷基或芳香族取代的衍生物；和

[0164] f) 取代含羟基的氨基酸，包括丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、2,3-二氨基丙氨酸和丝氨酸或苏氨酸的烷基或芳香族取代的衍生物。

[0165] 在某些实施方案中，IL-10包含一种或多种天然存在的非遗传编码的L-氨基酸、合成的L-氨基酸或氨基酸的D-对映异构体。例如，IL-10可以仅包含D-氨基酸。例如，IL-10多肽可以包含一个或多个以下残基：羟脯氨酸、 β -丙氨酸、邻氨基苯甲酸、间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、间氨基甲基苯甲酸、2,3-二氨基丙氨酸、 α -氨基异丁酸、N-甲基甘氨酸(肌氨酸)、鸟氨酸、瓜氨酸、叔丁基丙氨酸、叔丁基甘氨酸、N-甲基异亮氨酸、苯基甘氨酸、环己基丙氨酸、正亮氨酸、萘基丙氨酸、吡啶基丙氨酸3-苯并噻吩丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、2-氟苯丙氨酸、3-氟苯丙氨酸、4-氟苯丙氨酸、青霉胺、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、 β -2-噻吩丙氨酸、甲硫氨酸亚砷、高精氨酸、N-乙酰赖氨酸、2,4-二氨基丁酸、 ρ -氨基苯丙氨酸、N-甲基缬氨酸、高半胱氨酸、高丝氨酸、 ϵ -氨基己酸、 ω -氨基己酸、 ω -氨基庚酸、 ω -氨基辛酸、 ω -氨基十二烷酸、 ω -氨基十四烷酸、环己基丙氨酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙氨酸、 δ -氨基戊酸和2,3-二氨基丁酸。

[0166] 另外的修饰

[0167] 可以将半胱氨酸残基或半胱氨酸类似物引入IL-10多肽中提供经由二硫键与另一个肽的连接或提供IL-10多肽的环化。引入半胱氨酸或半胱氨酸类似物的方法是本领域已知的;参见例如美国专利号8,067,532。

[0168] IL-10多肽可以是环化的。可以将一个或多个半胱氨酸或半胱氨酸类似物引入IL-10多肽中,其中引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物可以与第二个引入的半胱氨酸或半胱氨酸类似物形成二硫键。其他的环化手段包括引入胍接头或羊毛硫氨酸接头;参见例如美国专利号8,044,175。可以使用和/或引入可以形成环化键的氨基酸(或非氨基酸部分)的任意组合。可以用氨基酸(或氨基酸和 $-(CH_2)_n-CO-$ 或 $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$)与允许引入桥的官能团的任意组合产生环化键。一些实例是二硫化物、二硫化物模拟物,如 $-(CH_2)_n$ -碳桥、硫缩醛、硫醚桥(胱硫醚或羊毛硫氨酸)和含有酯和醚的桥。在这些实例中,n可以是任何整数,但是通常小于10。

[0169] 其他修饰包括例如N-烷基(或芳基)取代($\psi[CONR]$)或主链交联以构建内酰胺和其他环状结构。其他衍生物包括C-末端羟甲基衍生物,o-修饰的衍生物(例如C-末端羟甲基苄基醚)、N-末端修饰的衍生物,包括取代的酰胺,如烷基酰胺和酰肼。

[0170] 在一些情况下,用一种或多种D-氨基酸取代IL-10多肽中的一种或多种L-氨基酸。

[0171] 在一些情况下,IL-10多肽是颠倒位(retroinverso)类似物(参见例如Sela和Zisman(1997)FASEB J.11:449)。颠倒位肽类似物是线性多肽的异构体,其中氨基酸序列的方向为反向(反),并且其中一个或多个氨基酸的手性D-或L-是倒置的(倒位),例如使用D-氨基酸而不是L-氨基酸。[参见例如Jameson等人(1994)Nature 368:744;及Brady等人(1994)Nature 368:692]。

[0172] IL-10多肽可以包括“蛋白转导结构域”(PTD),其指促进穿过脂质双层、胶束、细胞膜、细胞器膜或囊泡膜的多肽、多核苷酸、碳水化合物或有机或无机分子。连接到另一个分子的PTD有助于分子穿过膜,例如从细胞外空间到细胞内空间或胞质溶胶到细胞器内。在一些实施方案中,PTD与IL-10多肽的氨基末端共价连接,而在其他实施方案中,PTD与IL-10多肽的羧基末端共价连接。示例性的蛋白质转导结构域包括但不限于最小的十一肽蛋白转导结构域(对应于包含YGRKKRRQRRR的HIV-1TAT的残基47-57;SEQ ID NO:1);包含足以直接进入细胞中的精氨酸残基数目(例如,3、4、5、6、7、8、9、10或10-50个精氨酸)的聚精氨酸序列;VP22结构域(Zender等人(2002)Cancer Gene Ther.9(6):489-96);果蝇Antennapedia蛋白转导结构域(Noguchi等人(2003)Diabetes 52(7):1732-1737);截短的人降钙素肽(Trehin等人(2004)Pharm.Research 21:1248-1256);多赖氨酸(Wender等人(2000)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:13003-13008);RRQRRTSKLMKR(SEQ ID NO:2);转运蛋白GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(SEQ ID NO:3);KALAWKALAKALAKALAKHLAKALAKALCEA(SEQ ID NO:4);和RQIKIWFQNRRMKWKK(SEQ ID NO:5)。示例性PTD包括但不限于YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1)、RKKRRQRRR(SEQ ID NO:6);3个精氨酸残基至50个精氨酸残基的精氨酸均聚物;示例性的PTD结构域氨基酸序列包括但不限于以下任何一种:YGRKKRRQRRR(SEQ ID NO:1);RKKRRQRRR(SEQ ID NO:7);YARAAARQARA(SEQ ID NO:8);THRLPRRRRRR(SEQ ID NO:9);和GGRRARRRRRRR(SEQ ID NO:10)。

[0173] IL-10多肽的C端末端的氨基酸的羧基COR₃以游离形式(R₃=OH)或以生理学容许的

碱性或碱土金属盐(例如,钠、钾或钙盐)的形式存在。羧基也可以用伯、仲或叔醇,如例如甲醇、支链或非支链的C₁-C₆烷基醇,例如乙醇或叔丁醇进行酯化。羧基也可以用伯胺或仲胺,如氨、支链或非支链C₁-C₆烷基胺或C₁-C₆二烷基胺,如甲胺或二甲胺进行酰胺化。

[0174] IL-10多肽的N-末端的氨基酸NR₁R₂的氨基以游离形式存在(R₁=H和R₂=H)或以生理学容许的盐(如例如氯化物或乙酸盐)的形式存在。氨基也可以用酸乙酰化,使得R₁=H和R₂=乙酰基、三氟乙酰基或金刚烷基。氨基可以以通过通常用于肽化学中的氨基保护基,如上文提供的那些(例如Fmoc、苄氧基-羰基(Z)、Boc和Alloc)保护的形式存在。氨基可以是N-烷基化的,其中R₁和/或R₂=C₁-C₆烷基或C₂-C₈烯基或C₇-C₉芳烷基。烷基残基可以是直链、支链或环状的(例如分别是乙基、异丙基和环己基)。

[0175] 增强和/或模拟IL-10功能的特定修饰

[0176] 改善本文公开的治疗方式(例如IL-10)的一种或多种物理性质和/或施用它们的方式通常是有益的,有时是必要的。物理性质的改善包括例如调节免疫原性;增加水溶性、生物利用度、血清半衰期和/或治疗半衰期;和/或调节生物活性的方法。某些修饰也可用于例如产生用于检测测定法(例如,表位标签)的抗体并提供蛋白质纯化的容易性。通常必须赋予此类改善,而不会不利影响治疗方式的生物活性和/或增加其免疫原性。

[0177] IL-10的聚乙二醇化是本公开考虑的一个具体修饰,而其他修饰包括但不限于糖基化(N和O连接);聚唾液酸化;包含血清白蛋白(例如,人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白或牛血清白蛋白(BSA))的白蛋白融合分子;通过例如缀合的脂肪酸链的白蛋白结合(酰化);和Fc-融合蛋白。

[0178] 聚乙二醇化:蛋白质治疗剂的临床有效性通常受到短血浆半衰期和对蛋白酶降解的易感性的限制。各种治疗性蛋白质(例如非格司亭)的研究已经显示了,可以通过各种修饰来克服此类困难,所述修饰包括将多肽序列与多种非蛋白性聚合物中的任一种,例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇或聚氧化烯缀合或连接。这通常通过与蛋白质和非蛋白质聚合物(例如PEG)共价结合的连接部分来实现。已经显示了此类PEG缀合的生物分子拥有临床上有用的性质,包括更好的物理和热稳定性、针对对酶降解的易感性的保护、增加的溶解性、更长的体内循环半衰期和降低的清除、降低的免疫原性和抗原性以及降低的毒性。

[0179] 除了聚乙二醇化对药代动力学参数的有益作用外,PEG化本身可增强活性。例如,PEG-IL-10已被证明比非PEG化IL-10对某些癌症更有效(参见例如EP 206636A2)。

[0180] 适合于与多肽序列缀合的PEG通常在室温下可溶于水,并且具有通式R(O-CH₂-CH₂)_nO-R,其中R是氢或保护基,如烷基或烷醇基(alkanol),并且其中n是1至1000的整数。当R是保护基时,它通常具有1至8个碳。与多肽序列缀合的PEG可以是直链或支链的。本公开考虑支链PEG衍生物、“星形PEG”和多臂PEG。本公开中使用的PEG的分子量不限于任何特定的范围,并且本文中别处阐述了实例;举例来说,某些实施方案具有5kDa至20kDa的分子量,而其他实施方案具有4kDa至10kDa的分子量。

[0181] 本公开还考虑了缀合物的组合物,其中PEG具有不同的n值,因此各种不同的PEG以特定比率存在。例如,一些组合物包含缀合物的混合物,其中n=1、2、3和4。在一些组合物中,n=1的缀合物的百分比是18-25%,n=2的缀合物的百分比是50-66%,n=3的缀合物的百分比是12-16%,n=4的缀合物的百分比高达5%。可以通过本领域已知的反应条件和纯化方法产生此类组合物。在整个说明书中描述了示例性反应条件。可以使用阳离子交换层

析分离缀合物,然后鉴定含有缀合物的级份,所述缀合物具有例如期望数目的连接的PEG,经纯化而不含未修饰的蛋白质序列和具有其他数目的连接的PEG的缀合物。

[0182] 聚乙二醇化最常发生在多肽的N-末端的 α 氨基、赖氨酸残基的侧链上的 ϵ 氨基和组氨酸残基的侧链上的咪唑基。由于大多数重组多肽拥有单个 α 和多个 ϵ 氨基和咪唑基团,根据接头化学,可以产生许多位置异构体。可以在本文中应用本领域已知的通用聚乙二醇化策略。可以经由介导一种或多种多肽序列的游离氨基或羧基和聚乙二醇之间的键的末端反应性基团(“间隔物”)将PEG与本公开的多肽结合。具有可以与游离氨基结合的间隔物的PEG包括N-羟基琥珀酰亚胺聚乙二醇,其可以通过用N-羟基琥珀酰亚胺活化聚乙二醇的琥珀酸酯来制备。可以与游离氨基结合的另一种活化的聚乙二醇是2,4-双(0-甲氧基聚乙二醇)-6-氯-s-三嗪,其可以通过聚乙二醇单甲醚与氰尿酸氯反应来制备。与游离羧基结合的活化聚乙二醇包括聚氧乙烯二胺。

[0183] 可以通过各种常规方法进行本公开的一种或多种多肽序列与具有间隔物的PEG的缀合。例如,利用试剂与蛋白质的摩尔比4:1到30:1,可以在5至10的pH,在4℃至室温的温度在溶液中进行缀合反应30分钟至20小时。可以选择反应条件以指导反应向主要产生期望的取代度。一般来说,低温、低pH(例如pH=5)和短反应时间趋于减少连接的PEG数目,而高温、中性至高pH(例如pH $\geq$ 7)、较长的反应时间趋于增加连接的PEG的数目。可以使用本领域已知的各种手段终止反应。在一些实施方案中,通过酸化反应混合物并在例如-20℃冷冻来终止反应。在例如美国专利号5,252,714;5,643,575;5,919,455;5,932,462和5,985,263中讨论了各种分子的聚乙二醇化。PEG-IL-10记载于例如美国专利号7,052,686。实验部分中列出了本文中的用途考虑的具体反应条件。

[0184] 本公开还考虑使用PEG模拟物。已经开发出重组PEG模拟物,其保留了PEG的属性(例如,增强的血清半衰期),同时赋予几个另外的有利性质。举例来说,可以形成已经与所关注的肽或蛋白质药物重组融合的能够形成与PEG相似的扩展构象的简单多肽链(包括例如Ala、Glu、Gly、Pro、Ser和Thr)(例如,Amunix' XTEN技术;MountainView,CA)。这消除了制造过程中对额外的缀合步骤的需要。此外,已建立的分子生物学技术能够控制多肽链的侧链组成,从而优化免疫原性和制造性质。

[0185] **糖基化**:为了本公开的目的,“糖基化”意在广泛地指将聚糖连接于蛋白质、脂质或其他有机分子的酶促方法。术语“糖基化”与本公开结合使用通常意图指添加或缺失一个或多个碳水化合物部分(通过除去下面的糖基化位点或通过用化学和/或酶促手段除去糖基化),和/或添加天然序列中可能存在或不存在的一个或多个糖基化位点。此外,短语包括天然蛋白的糖基化的定性变化,其涉及存在的各种碳水化合物部分的性质和比例的变化。

[0186] 糖基化可以显著影响多肽如IL-10的物理性质(例如溶解性),并且在蛋白质稳定性、分泌和亚细胞定位中也是重要的。糖基化多肽还可以表现出增强的稳定性或可以改善一种或多种药代动力学性质,如半衰期。此外,溶解度改善可以例如能够产生与包含非糖基化多肽的制剂相比更适合于药物施用的制剂。

[0187] 适当的糖基化对生物活性可以是至关重要的。实际上,当在缺乏糖基化蛋白质的细胞过程的细菌(例如大肠杆菌)中表达时,来自真核生物体的某些基因产生蛋白质,所述蛋白质由于它们缺乏糖基化而在少许活性或没有活性的情况下回收。

[0188] 可以通过改变氨基酸序列实现糖基化位点的添加。可以例如通过一个或多个丝氨

酸或苏氨酸残基(用于O-连接的糖基化位点)或天冬酰胺残基(用于N-连接的糖基化位点)的添加或取代进行对多肽的改变。N-连接和O-连接的寡糖和每种类型中发现的糖残基的结构可能是不同的。通常在二者中发现的一类糖是N-乙酰神经氨酸(以下称为唾液酸)。唾液酸通常是N-连接和O-连接的寡糖两者的末端残基,并且由于其负电荷可能对糖蛋白赋予酸性特性。本公开的一个具体实施方案包括N-糖基化变体的产生和使用。

[0189] 任选地,本公开的多肽序列可以通过经由核酸水平变化来改变,特别是通过在预选碱基上突变编码多肽的核酸,使得产生将翻译成期望的氨基酸的密码子。增加多肽上碳水化合物部分数目的另一种手段是通过糖苷与多肽的化学或酶促缀合。碳水化合物的除去可以化学或酶促完成,或者通过取代编码糖基化的氨基酸残基的密码子实现。化学脱糖基化技术是已知的,并且多肽上的碳水化合物部分的酶促切割可以通过使用多种内切和外切糖苷酶实现。

[0190] 二氢叶酸还原酶(DHFR)缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是用于生产重组糖蛋白的常用的宿主细胞。这些细胞不表达酶 β -半乳糖苷 α -2,6-唾液酸转移酶,因此不将 α -2,6连接中的唾液酸添加到在这些细胞中产生的糖蛋白的N-连接寡糖。

[0191] 聚唾液酸化:本公开还考虑使用聚唾液酸化、多肽与天然存在的可生物降解的 α -(2 $\rightarrow$ 8)连接的聚唾液酸(“PSA”)的缀合,以便改善多肽的稳定性和体内药代动力学。PSA是一种可生物降解、无毒的天然聚合物,其是高亲水性的,对其给予在血液中的高表观分子量,从而延长其血清半衰期。此外,一系列肽和蛋白质治疗剂的聚唾液酸化导致了显著降低的蛋白水解、体内活性的保留和免疫原性和抗原性的降低(参见例如G.Gregoriadis等人,Int.J.Pharmaceutics 300(1-2):125-30)。与用其他缀合物(例如PEG)的修饰一样,用于位点特异性聚唾液酸化的各种技术是可用的(参见例如T.Lindhout等人,(2011)PNAS108(18)7397-7402)。

[0192] 白蛋白融合:用于缀合的另外的合适的组分和分子包括白蛋白,如人血清白蛋白(HSA)、猕猴血清白蛋白和牛血清白蛋白(BSA)。

[0193] 成熟HAS,一种具有约20天的血清半衰期的585个氨基酸的多肽(约67kDa),主要负责维持胶体渗透压、血液pH值,以及许多内源和外源配体的转运和分布。蛋白质具有三种结构上同源的结构域(I、II和III结构域),几乎全部处于 α -螺旋构象,并且由17个二硫桥高度稳定化。白蛋白的三种主要药物结合区域位于亚结构域IB、IIA和IIIA内的三种结构域中的每种上。

[0194] 白蛋白合成发生在肝脏中,所述肝脏产生短寿的初级产物前原白蛋白。因此,全长HSA具有18个氨基酸的信号肽(MKWVTFISLLFLFSSAYS;SEQ ID NO:11),随后是6个氨基酸的前结构域(RGVFRR;SEQ ID NO:12);该24个氨基酸残基肽可以称为前原结构域。HSA可以使用其内源性信号肽作为前原结构域表达和分泌。或者,可以使用与成熟构建体融合的IgK信号肽来表达和分泌HSA。前原白蛋白在其氨基末端的内质网管腔中快速共翻译切割,以产生稳定的609个氨基酸的前体多肽白蛋白原。然后,白蛋白原传递至高尔基体,在那里通过弗林蛋白酶依赖性氨基末端切割将其转化为585个氨基酸的成熟白蛋白。

[0195] 白蛋白的主要氨基酸序列、结构和功能在物种间是高度保守的,白蛋白合成和分泌的过程也是如此。例如,食蟹猴、牛、狗、兔和大鼠中发现与HSA相当的白蛋白血清白蛋白。在非人物种中,牛血清白蛋白(BSA)在结构上与HSA最相似(参见例如Kosa等人,2007年11月J

Pharm Sci.96 (11):3117-24)。本公开考虑了使用来自非人物种的白蛋白,包括但不限于上文列出的那些,例如在药物开发过程中。

[0196] 根据本公开,白蛋白可以在羧基末端、氨基末端、羧基和氨基末端以及内部与药物分子(例如,本文所述的多肽)缀合(参见例如USP 5,876,969和USP 7,056,701)。

[0197] 在本公开考虑的HSA-药物分子缀合物中,可以使用各种形式的白蛋白,如白蛋白分泌前序列及其变体、其片段和变体,以及HSA变体。这种形式通常拥有一种或多种期望的白蛋白活性。在另外的实施方案中,本公开涉及包含直接或间接与白蛋白、白蛋白片段和白蛋白变体等融合的多肽药物分子的融合蛋白,其中融合蛋白具有比未融合药物分子更高的血浆稳定性和/或融合蛋白保留未融合药物分子的治疗活性。在一些实施方案中,间接融合通过接头如肽接头或其修饰形式实现。

[0198] 细胞内切割可以通过例如弗林蛋白酶或胰凝乳蛋白酶酶促进行。细胞表达低水平的这些内源性酶,其能够在细胞内切割融合分子的一部分;因此,在不与HSA缀合的情况下从细胞分泌一些多肽,而一些多肽以包含HSA的融合分子的形式分泌。本公开的实施方案考虑了各种弗林蛋白酶融合构建体的使用。例如,可以设计包含序列RGRR (SEQ ID NO:13)、RKRKKR (SEQ ID NO:14)、RKKR (SEQ ID NO:15)或RRRKKR (SEQ ID NO:16)的构建体。

[0199] 本公开还考虑细胞外切割(即离体切割),由此从细胞分泌融合分子,进行纯化,然后切割。应当理解,切除可以与成熟的IL-10分离整个HSA-接头复合物,或者小于整个HSA-接头复合物。

[0200] 如上文提到,可以例如通过遗传操作实现白蛋白与本公开的一种或多种多肽的融合,使得编码HSA或其片段的核酸连接到编码一种或多种多肽序列的核酸。此后,可以用融合的核苷酸序列以例如合适的质粒的形式转化或转染合适的宿主,以便表达融合多肽。可以在体外从例如原核或真核细胞或体内从例如转基因生物体实现表达。在本公开的一些实施方案中,在哺乳动物细胞系,例如CHO细胞系中进行融合蛋白的表达。转化在本文中广义地使用,是指源自直接摄取通过细胞膜、外源遗传物质(外源核酸)的掺入和表达的细胞的遗传改变。在一些细菌物种中自然发生转化,但它也可以通过人工手段在其他细胞中实现。

[0201] 此外,可以修饰白蛋白本身以延长其循环半衰期。可以通过上文描述的遗传操作技术或通过化学缀合获得经修饰的白蛋白与IL-10的融合;所得的融合分子的半衰期超过与非修饰白蛋白的融合的半衰期(参见W02011/051489)。

[0202] 备选白蛋白结合策略:已经开发了几种白蛋白结合策略作为直接融合的备选,包括通过缀合脂肪酸链(酰化)的白蛋白结合。由于血清白蛋白是脂肪酸的转运蛋白,具有白蛋白结合活性的这些天然配体已被用于小蛋白治疗剂的半衰期延长。例如,地特胰岛素(LEVEMIR)(用于糖尿病的批准产品)包含与经遗传修饰的胰岛素缀合的肉豆蔻基链,产生长效胰岛素类似物。

[0203] 本公开还考虑包含白蛋白结合结构域(ABD)多肽序列和本文所述的一种或多种多肽的序列的融合蛋白。文献中描述的任何ABD多肽序列可以是融合蛋白的组分。融合蛋白的组分可以任选地通过接头,如本文所述的接头共价键合。在本公开的一些实施方案中,融合蛋白包含ABD多肽序列作为N-末端部分和本文所述的多肽作为C-末端部分。

[0204] 本公开还考虑包含白蛋白结合多肽的片段的融合蛋白,该片段基本上保留白蛋白结合;或者包含至少两个白蛋白结合多肽或其片段作为单体单元的白蛋白结合多肽或其片

段的多聚体。关于ABD和相关技术的一般讨论,参见WO 2012/050923、WO 2012/050930、WO 2012/004384和WO 2009/016043。

[0205] 与其他分子的缀合:用于缀合的其他合适的组分和分子包括例如甲状腺球蛋白;破伤风类毒素;白喉类毒素;聚氨基酸,如聚(D-赖氨酸:D-谷氨酸);轮状病毒的VP6多肽;流感病毒血凝素,流感病毒核蛋白;匙孔血蓝蛋白(KLH);和乙型肝炎病毒核心蛋白和表面抗原;或上述的任何组合。

[0206] 因此,本公开考虑多肽序列的N-和/或C-末端的一种或多种另外的组分或分子,如另一种多肽(例如,具有与主题多肽异源的氨基酸序列的多肽)或载体分子的缀合。因此,示性多肽序列可以作为与另一种成分或分子的缀合物提供。

[0207] 缀合物修饰可以导致多肽序列,其保留具有源自第二分子的另外或互补的功能或活性的活性。例如,多肽序列可以与分子缀合,例如以促进溶解性、储存、体内或货架半衰期或稳定性、免疫原性的降低、体内延迟或受控释放等。其他功能或活性包括相对于未缀合的多肽序列降低毒性的缀合物、比未缀合的多肽序列更有效地靶向细胞或器官类型的缀合物,或者进一步反击如本文中阐述的疾病、病症或病况(例如癌症)相关的原因或效应的药物。

[0208] IL-10多肽还可以与大的、缓慢代谢的大分子如蛋白质;多糖,如sepharose、琼脂糖、纤维素或纤维素珠;聚合氨基酸,如聚谷氨酸或聚赖氨酸;氨基酸共聚物;灭活的病毒颗粒;灭活的细菌毒素,如来自白喉、破伤风、霍乱或白细胞毒素分子的类毒素;灭活的细菌;和树突细胞缀合。若想要的话,此类缀合形式可用于产生针对本公开的多肽的抗体。

[0209] 用于缀合的其他候选组分和分子包括适合于分离或纯化的那些。具体的非限制性实例包括结合分子,如生物素(生物素-抗生物素蛋白特异性结合对)、抗体、受体、配体、凝集素或包含固体支持物的分子,包括例如塑料或聚苯乙烯珠、板或珠粒、磁珠、测试条和膜。

[0210] 可以使用如阳离子交换层析的纯化方法通过电荷差分离缀合物,所述电荷差有效地将缀合物分离成它们的各种分子量。例如,可以加载阳离子交换柱,然后用约20mM乙酸钠(pH约4)清洗,然后用约3至5.5的pH(例如pH约4.5)缓冲的线性(0M至0.5M)NaCl梯度洗脱。通过阳离子交换层析获得的级分的含量可以使用常规方法,例如质谱法、SDS-PAGE或用于通过分子量分离分子实体的其他已知方法通过分子量鉴定。

[0211] Fc融合分子:在某些实施方案中,本公开的多肽序列的氨基末端或羧基末端可与免疫球蛋白Fc区(例如人Fc)融合以形成融合缀合物(或融合分子)。已经显示Fc融合缀合物增加生物药物的系统半衰期,因此生物制药产品可能需要不太频繁的施用。Fc结合作为血管衬里的内皮细胞中的新生儿Fc受体(FcRn),并且在结合时,Fc融合分子受到保护而免于降解并再释放到循环中,使循环中的分子保持更长。认为这种Fc结合是内源性IgG保留其长血浆半衰期的机制。最近的Fc融合技术将生物药物的单拷贝与抗体的Fc区连接,以优化与传统Fc-融合缀合物相比生物药物的药代动力学和药效学性质。适合于与本文中公开的多肽一起使用的其他Fc相关技术的实例记载于WO 2013/113008。

[0212] 其他修饰:本公开考虑使用IL-10目前已知或未来开发的其他修饰以改善一种或多种性质。一种用于延长本公开的多肽的循环半衰期、增加稳定性、降低清除或改变免疫原性或变应原性的此类方法涉及通过HES化修饰多肽序列,所述HES化利用与其他分子连接的羟乙基淀粉衍生物以便改变多肽序列的特征。HES化的各个方面描述于例如美国专利申请

号2007/0134197和2006/0258607。

[0213] 本公开还考虑包含SUMO作为融合标签(LifeSensors, Inc.; Malvern, PA)的融合分子。本文所述的多肽与SUMO的融合可以传达几种有益效果,包括表达的增强、溶解性的改善和/或辅助开发纯化方法。SUMO蛋白酶识别SUMO的三级结构并在SUMO的C-末端切割融合蛋白,从而释放本文所述的具有期望的N-末端氨基酸的多肽。

[0214] 接头:上文已经描述了接头及其用途。用于修饰本公开的多肽序列的任何前述组分和分子可以任选地通过接头缀合。合适的接头包括通常具有足够长度以允许修饰的多肽序列与连接的组分和分子之间的一些移动的“柔性接头”。接头分子通常为约6-50个原子长。接头分子也可以是例如芳基乙炔、含有2-10个单体单元的乙二醇低聚物,二胺、二酸、氨基酸或其组合。合适的接头可以容易地选择并且可以是任何合适的长度,如1个氨基酸(例如Gly)、2、3、4、5、6、7、8、9、10、10-20、20-30、30-50或多于50个氨基酸。

[0215] 示例性的柔性接头包括甘氨酸聚合物(G_n)、甘氨酸-丝氨酸聚合物(例如, $(GS)_n$ 、 $GSGGS_n$ (SEQ ID NO:17)、 $GGGS_n$ (SEQ ID NO:18)、 $(G_mS_o)_n$ 、 $(G_mS_oG_m)_n$ 、 $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ (SEQ ID NO:19)、 $(GSGGS_m)_n$ (SEQ ID NO:20)、 $(GSGS_mG)_n$ (SEQ ID NO:21)和 $(GGGS_m)_n$ (SEQ ID NO:22)和其组合,其中m、n和o各自独立地选自至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的,因此可以充当组分之间的中性系链。示例性的柔性接头包括但不限于GGSG (SEQ ID NO:23)、GGSGG (SEQ ID NO:24)、GSGSG (SEQ ID NO:19)、GSGGG (SEQ ID NO:25)、GGGSG (SEQ ID NO:26)和GSSSG (SEQ ID NO:27)。

[0216] 治疗和预防用途

[0217] 本公开考虑本文所述的IL-10多肽(例如PEG-IL-10)在治疗或预防大量疾病、病症和/或病况和/或其症状中的用途。实际上,本公开的教导意图适用于任何疾病、病症或病况,对此实现或维持上文所述IL-10意指血清谷浓度参数可以是有利的。虽然在下文中详细描述了具体的用途,但是应当理解,本公开不限于此。此外,虽然以下阐述了具体疾病、病症和病况的一般类别,但是一些疾病、病症和病况可以是多于一类(例如癌症或纤维化相关病症)的成员,而其他可能不是任何公开类别的成员。

[0218] 纤维化病症和癌症。根据本公开内容,可以使用IL-10(例如,PEG-IL-10)来治疗或预防增殖性病况或病症,包括癌症(例如子宫癌、宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌、睾丸癌、胃肠癌(例如食管癌、口咽癌、胃癌、小肠癌或大肠癌、结肠癌或直肠癌)、肾癌、肾细胞癌、膀胱癌、骨癌、骨髓癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤癌、肝癌、胆囊癌、心脏癌、肺癌、胰腺癌、唾液腺癌、肾上腺癌、甲状腺癌、脑癌(例如神经胶质瘤)、神经节癌、中枢神经系统(CNS)癌和周围神经系统(PNS)癌以及造血系统和免疫系统(例如脾或胸腺)的癌症。本公开还提供了治疗或预防其他癌症相关疾病、病症或病况的方法,包括例如免疫原性肿瘤、非免疫原性肿瘤、休眠肿瘤、病毒诱导的癌症(例如,上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌和乳头瘤病毒)、腺癌、淋巴瘤、癌、黑素瘤、白血病、骨髓瘤、肉瘤、畸胎瘤、化学诱导的癌症、转移和血管生成。本公开考虑降低对肿瘤细胞或癌细胞抗原的耐受性,例如通过调节调节性T细胞和/或CD8+T细胞的活性(参见例如Ramirez-Montagut等人(2003)Oncogene 22:3180-3187;以及Sawaya等人(2003)New Engl.J.Med.349:1501-1509)。在具体实施方案中,肿瘤或癌症是结肠癌、卵巢癌、乳腺癌、黑素瘤、肺癌、成胶质细胞瘤或白血病。术语癌症相关疾病、病症和病况的使用

意在广义地指直接或间接与癌症相关的病况，并且包括例如血管发生和癌前病况如发育异常。

[0219] 在一些实施方案中，本公开提供用IL-10多肽（例如，PEG-IL-10）和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗增殖性病况、癌症、肿瘤或癌前病况的方法，其实例在本文其他地方阐述。

[0220] 本公开还提供了治疗或预防纤维化疾病、病症和病况的方法。如本文中所用，短语“纤维化疾病、病症和病况”以及类似术语（例如“纤维化疾病”）和短语应广泛解释为使得它包括任何可导致形成纤维组织或瘢痕组织（例如，一个或多个组织中的纤维化）的任何病况。举例来说，可引起瘢痕组织的损伤（例如伤口）包括皮肤、眼、肺、肾、肝脏、中枢神经系统和心血管系统的伤口。该短语还包括由中风引起的瘢痕组织形成，以及组织粘连，例如由于损伤或手术引起的。

[0221] 如本文中所用，术语“纤维化”是指作为修复或反应过程的纤维组织，而不是作为器官或组织的正常成分的形成。纤维化的特征在于在任何特定组织中超过正常沉积的成纤维细胞聚集和胶原沉积。

[0222] 纤维化病症包括但不限于由伤口愈合引起的纤维化、全身和局部硬皮病、动脉粥样硬化、再狭窄、肺部炎症和纤维化、特发性肺纤维化、间质性肺病、肝硬化、慢性乙肝或丙肝引起的纤维化、肾脏疾病（例如肾小球肾炎）、由瘢痕组织引起的心脏病、瘢痕疙瘩和肥厚性瘢痕以及眼疾病如黄斑变性和视网膜和玻璃体视网膜病变。其他纤维化疾病包括化疗药物诱发的纤维化、辐射诱导的纤维化以及损伤和烧伤。

[0223] 纤维化病症通常与肝有关，并且这种病症和肝细胞内胆固醇和甘油三酯的不适当积累之间经常存在联系。这种积累似乎导致促炎症反应，后者导致肝纤维化和肝硬化。具有纤维化组分的肝病包括非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）和非酒精性脂肪性肝炎（NASH）。

[0224] 心血管疾病。本公开还考虑本文所述的IL-10多肽（例如，PEG-IL-10）治疗和/或预防某些心血管和/或相关的代谢相关疾病、病症和病况以及其相关病症的用途。

[0225] 如本文中所用，术语“心血管疾病”、“心脏病”等指任何影响心血管系统的疾病，主要是心脏病、脑和肾的血管疾病以及外周动脉疾病。心血管疾病是大量疾病，包括冠心病（即缺血性心脏病或冠状动脉疾病）、动脉粥样硬化、心肌病、高血压、高血压性心脏病、肺源性心脏病、心律失常、心内膜炎、脑血管疾病和外周动脉疾病。心血管疾病是全球死亡的主要原因，并且虽然它通常影响老年人，但心血管疾病的前因（特别是动脉粥样硬化）从生命早期开始。

[0226] 本公开的具体实施方案涉及IL-10多肽用于治疗和/或预防动脉粥样硬化的用途，所述动脉粥样硬化是由于脂肪物质（例如胆固醇和甘油三酸酯）的积累而导致动脉壁变稠而形成斑块的慢性病症。动脉粥样硬化通常涉及动脉壁的慢性炎症应答，主要是由巨噬细胞的积累引起的，并且由低密度脂蛋白（LDL）促进，而没有通过功能性高密度脂蛋白从巨噬细胞中充分去除脂肪和胆固醇。长期扩张的动脉粥样硬化病变可导致内腔完全闭合，这可在内腔狭窄如此严重而致下游组织的血液供应不足，导致缺血时表现出来。

[0227] IL-10多肽在治疗和/或预防胆固醇相关病症中尤其有利，所述胆固醇相关病症可以与例如心血管疾病（例如动脉粥样硬化）、脑血管疾病（例如中风）和外周血管疾病有关。作为举例而非限制，IL-10多肽可用于降低受试者的血液胆固醇水平。在确定受试者是否患

有高胆固醇血症时,正常胆固醇水平与异常胆固醇水平之间没有明确的界限,并且需要对其健康状况和危险因素进行解释。然而,美国通常使用以下指南:总胆固醇<200mg/dL是可取的,200-239mg/dL是边界高, $\geq 240\text{mg/dL}$ 是高的。较高的总胆固醇水平增加心血管疾病的风险,并且LDL或非HDL胆固醇水平都是未来冠心病的前兆。当评估高胆固醇血症时,测量所有脂蛋白亚组分(VLDL、IDL、LDL和HDL)通常是有用的。特别的治疗目标是在维持或增加HDL的同时减少LDL。

[0228] 血栓形成和血栓病况。

[0229] 血栓形成(血管内形成血栓(血液凝块),导致血液流过循环系统的阻塞)可以由以下一种或多种(Virchow三单元组)的异常引起的:血凝过快或增加的血液凝固、内皮细胞损伤或扰动的血流(淤滞、湍流)。

[0230] 血栓通常分为静脉或动脉,每一种可由几种亚型呈现。静脉血栓形成包括深静脉血栓形成(DVT)、门静脉血栓形成、肾静脉血栓形成、颈静脉血栓形成、Budd-Chiari综合征、Paget-Schroetter病和脑静脉窦血栓形成。动脉血栓形成包括中风和心肌梗死。

[0231] 本公开考虑其他疾病、病症和病况,包括心房血栓形成和真性红细胞增多(也称为红斑、原发性红细胞增多症和真性红细胞增多症)、骨髓增殖性血液病症,其中骨髓产生过多的RBC、WBC和/或血小板。

[0232] 免疫和炎性病况。如本文中所用,如“免疫疾病”、“免疫病况”、“免疫病症”、“炎性疾病”、“炎性病况”、“炎性病症”等术语意图广泛地涵盖任何免疫或炎症相关病况(例如病理性炎症和自身免疫性疾病)。此类病况常常与其他疾病、病症和病况密不可分。举例来说,“免疫病况”可以指增殖性病况,如癌症、肿瘤和血管生成;包括抵抗免疫系统消除的感染(急性和慢性)、肿瘤和癌症。

[0233] 可以例如由炎性细胞因子引起的免疫和炎性相关疾病、病症和病况的非限制性列表包括关节炎肾衰竭、狼疮、哮喘、银屑病、结肠炎、胰腺炎、变态反应、纤维化、手术并发症(例如其中炎性细胞因子阻止愈合)、贫血和纤维肌痛。可能与慢性炎症有关的其他疾病和病症包括阿尔茨海默氏病、充血性心力衰竭、中风、主动脉瓣狭窄、动脉硬化、骨质疏松症、帕金森病、感染、炎性肠病(例如克罗恩病和溃疡性结肠炎)、过敏性接触性皮炎和其他湿疹、系统性硬化、移植和多发性硬化。

[0234] 在下文中更详细地描述了IL-10(例如,PEG-IL-10)可能特别有效的一些上述疾病、病症和病况(由于例如目前疗法的限制)。

[0235] 本公开的IL-10多肽可以特别有效地治疗和预防炎性肠病(IBD)。IBD包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC),这两者都是可以影响胃肠道的任何部分的特发性慢性疾病,并且与许多不利影响相关,并且长期UC患者有增加的发展结肠癌的风险。目前的IBD治疗旨在控制炎症症状,而某些药剂(例如,皮质类固醇、氨基水杨酸和标准免疫抑制剂(如环孢菌素、硫唑嘌呤和甲氨蝶呤))已经以有限的成功满足,长期治疗可能会引起肝损伤(例如纤维化或肝硬化)和骨髓抑制,并且患者通常对此类治疗变得难治。

[0236] 银屑病,一系列免疫介导性慢性皮肤病,在美国影响超过450万人,其中认为150万人患有中度至重度形式的疾病。此外,超过10%的银屑病患者会发展银屑病关节炎,从而破坏关节周围的骨骼和结缔组织。对银屑病的潜在生理学的理解改善已经导致引入例如靶向导致该疾病炎症性质的T淋巴细胞和细胞因子的活性的药剂。这些药剂包括TNF- α 抑制剂

(也用于治疗类风湿性关节炎(RA)),包括ENBREL(依那西普)、REMICADE(英利昔单抗)和HUMIRA(阿达木单抗)和T细胞抑制剂如AMEVIVE(阿来法塞)和RAPTIVA(依法珠单抗)。虽然这些药物中的几种在某些患者群体中在一定程度上有效,但无一可以显示有效地治疗所有患者。

[0237] 类风湿性关节炎(RA)影响约1%的美国人口或约210万美国人,所述类风湿性关节炎通常以关节的膜衬里(滑膜)的慢性炎症为特征。细胞因子(包括TNF- α 和IL-1)在炎症过程中的作用的进一步了解使得能够开发和引入一类新的缓解疾病的抗风湿药物(DMARD)。药剂(其中一些与其他RA的治疗方式重叠)包括ENBREL(依那西普)、REMICADE(英利昔单抗)、HUMIRA(阿达木单抗)和KINERET(阿那白滞素)。虽然这些药剂中的一些缓解症状,抑制结构性损伤的进展,并改善特定患者群体中的身体功能,但仍然需要具有改善的功效、互补作用机制和较少/较不严重的不良反应的备选药物。

[0238] 患有多发性硬化症(MS)(一种严重虚弱的自身免疫性疾病,包括脑和脊髓中髓磷脂的炎症和瘢痕形成的多个区域)的受试者可以特别由本文所述的IL-10多肽帮助,因为目前的治疗仅缓解症状或延迟残疾的进展。

[0239] 类似地,IL-10多肽可以特别有利于患有神经变性性病症的受试者,如阿尔茨海默氏病(AD)(一种严重损害患者思想、记忆和语言过程的脑部病症);帕金森病(PD)(一种以例如异常运动、僵硬和震颤为特征的进行性CNS病症)。这些疾病是进行性和虚弱的,并且没有治愈性药物可用。

[0240] 病毒性疾病。IL-10在病毒性疾病中的作用越来越受到关注。假定IL-10依赖于其受体结合活性而产生刺激和抑制作用。

[0241] 例如,已经考虑了抑制IL-10功能以提高抗病毒免疫力和疫苗功效的效果(参见Wilson,E.,(2011)Curr Top Microbiol Immunol.350:39-65)。此外,已经研究了IL-10在人免疫缺陷病毒(HIV)功能中的作用。除了抑制人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)复制之外,IL-10还可以通过效应器免疫机制的失活来促进病毒的持久性(Naicker,D.,等人,(2009)J Infect Dis.200(3):448-452)。另一项研究已经鉴定了能够调节慢性乙肝病毒(HBV)感染中的T细胞免疫的B细胞的IL-10生成性子集。

[0242] 虽然上述研究表明IL-10抑制可以是有益的,但是包含CD8+T细胞组分的特定病毒感染可以通过施用IL-10治疗和/或预防的候选者。这得到IL-10通过调控T细胞和/或CD8+T细胞的调节在某些癌症中发挥的积极作用支持。

[0243] 本公开考虑IL-10多肽在治疗和/或预防用IL-10治疗可以有益的任何病毒性疾病、病症或病况中的用途。考虑的病毒性疾病、病症和病况的实例包括乙型肝炎、丙型肝炎、HIV、疱疹病毒和巨细胞病毒(CMV)。

[0244] 药物组合物

[0245] 本公开的IL-10多肽可以是适合于对受试者施用的组合物的形式。通常,此类组合物是包含IL-10和一种或多种药学上可接受或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂的“药物组合物”。在某些实施方案中,IL-10多肽以治疗上可接受的量存在。药物组合物可用于本公开的方法中;因此,例如,药物组合物可以离体或体内施用于受试者,以便实施本文所述的治疗和预防方法和用途。

[0246] 本公开的药物组合物可以配制为与意图的施用方法或途径相容;本文阐述了示例

性施用途。此外,药物组合物可以与本文所述的其他治疗活性剂或化合物组合使用,以治疗或预防如本公开考虑的疾病、病症和病况。

[0247] 药物组合物通常包含治疗有效量的由本公开考虑的IL-10多肽和一种或多种药学上和生理上可接受的配制剂。合适的药学上可接受或生理上可接受的稀释剂、载体或赋形剂包括但不限于抗氧化剂(例如抗坏血酸和硫酸氢钠)、防腐剂(例如苄醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯或正丙酯)、乳化剂、悬浮剂、分散剂、溶剂、填充剂、增量剂、洗涤剂、缓冲剂、媒介物、稀释剂和/或佐剂。例如,合适的媒介物可以是生理盐水溶液或柠檬酸盐缓冲盐水,可能补充有用于胃肠外施用的药物组合物中常见的其他材料。中性缓冲盐水或与血清白蛋白混合的盐水是进一步的示例性媒介物。本领域技术人员将容易地认识到可用于药物组合物和本公开考虑的剂型的各种缓冲液。典型的缓冲剂包括但不限于药学上可接受的弱酸、弱碱或其混合物。例如,缓冲成分可以是水溶性物质,如磷酸、酒石酸、乳酸、琥珀酸、柠檬酸、乙酸、抗坏血酸、天冬氨酸、谷氨酸及其盐。可接受的缓冲剂包括例如Tris缓冲剂、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、2-(N-吗啉代)乙磺酸钠盐(MES)、3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)和N-三[羟甲基]甲基-3-氨基丙磺酸(TAPS)。

[0248] 在已经配制药物组合物后,可以将它作为溶液、悬浮液、凝胶、乳液、固体或脱水或冻干粉末储存在无菌小瓶中。此类制剂可以以即用形式、需要在使用前重建的冻干形式、在使用前需要稀释的液体形式或其他可接受的形式存储。在一些实施方案中,在一次性容器(例如,一次性小瓶、安瓿、注射器或自动注射器(类似于例如EpiPen®))中提供药物组合物,而在其他实施方案中提供多次使用容器(例如,多次使用小瓶)。任何药物递送装置可用于递送IL-10,包括植入物(例如可植入泵)和导管系统、缓慢注射泵和装置,所有这些都是熟练技术人员公知的。也可以利用通常皮下或肌肉内施用的积存注射在限定的时间段内释放本公开的多肽。积存注射通常是基于固体的或基于油的,并且通常包含本文阐述的至少一种制剂组分。本领域普通技术人员熟悉积存注射的可能配方和用途。

[0249] 药物组合物可以是无菌注射水性或油性悬浮液的形式。该悬浮液可根据已知技术使用本文提及的合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌可注射制剂也可以是无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或悬浮液,例如作为1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的稀释剂、溶剂和分散介质包括水、林格氏溶液、等渗氯化钠溶液、Cremophor EL™(BASF,Parsippany,NJ)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)及其合适的混合物。另外,无菌不挥发油常规用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸如油酸可用于制备注射剂。可以通过包括延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝或明胶)来实现特定可注射制剂的延长吸收。

[0250] 含有活性成分的药物组合物可以是适于口服使用的形式,如片剂、胶囊、糖锭剂、锭剂、水性或油性悬浮液、可分散的粉末或颗粒、乳剂、硬胶囊或软胶囊或糖浆、溶液、微珠或酞剂。意图用于口服使用的药物组合物可以根据本领域已知的用于制造药物组合物的任何方法制备,并且这种组合物可以含有一种或多种药剂,如例如甜味剂、调味剂、着色剂药剂和防腐剂,以提供药学上优雅且可口的制剂。片剂、胶囊等含有与适合于制造片剂的无毒性药学上可接受的赋形剂混合的活性成分。这些赋形剂可以是例如稀释剂,如碳酸钙、碳酸钠、乳糖、磷酸钙或磷酸钠;造粒剂和崩解剂,例如玉米淀粉或藻酸;粘合剂,例如淀粉、明胶

或阿拉伯胶;和润滑剂,例如硬脂酸镁、硬脂酸或滑石。

[0251] 适合于口服施用的片剂、胶囊等可以是未涂覆的或通过已知技术包被以延迟在胃肠道中的崩解和吸收,从而提供持续的作用。例如,可以使用延时材料,如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。它们也可以通过本领域已知的技术进行包被以形成用于受控释放的渗透性治疗性片剂。其他药剂包括可生物降解的或生物相容性的颗粒或聚合物,如聚酯、聚胺酸、水凝胶、聚乙烯吡咯烷酮、聚酞、聚乙醇酸、乙烯-乙酸乙烯酯、甲基纤维素、羧甲基纤维素、硫酸鱼精蛋白或丙交酯/乙交酯共聚物、聚丙交酯/乙交酯共聚物或乙烯乙酸乙烯酯共聚物以控制施用的组合物的递送。例如,口服药剂可以通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,分别通过使用羟甲基纤维素或明胶微胶囊或聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊,或在胶体药物递送系统中俘获。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、微珠和基于脂质的系统,包括水包油乳液、胶束、混合胶束和脂质体。用于制备上文提及的制剂的方法对于本领域技术人员是显而易见的。

[0252] 口服使用的制剂也可以以硬明胶胶囊形式呈现,其中活性成分与惰性固体稀释剂,例如碳酸钙、磷酸钙、高岭土或微晶纤维素混合,或作为软明胶胶囊呈现,其中活性成分与水或油介质,例如花生油、液体石蜡或橄榄油混合。

[0253] 水性悬浮液含有活性物质与适合于其制造的赋形剂的混合物。此类赋形剂可以是悬浮剂,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍胶和阿拉伯树胶;分散剂或润湿剂,例如天然存在的磷脂(例如卵磷脂)或环氧乙烷与脂肪酸的缩合产物(例如,硬脂酸聚氧乙烯酯)或环氧乙烷与长链脂肪族醇(例如十七碳亚乙基氧基鲸蜡醇)的缩合产物或环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇的偏酯的缩合产物(例如,聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯)或环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇酐的偏酯的缩合产物(例如,聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯)。水性悬浮液还可含有一种或多种防腐剂。

[0254] 油性悬浮液可以通过将活性成分悬浮在植物油,例如花生油、橄榄油、芝麻油或椰子油中,或矿物油如液体石蜡中来配制。油性悬浮液可以含有增稠剂,例如蜂蜡、硬石蜡或鲸蜡醇。可以加入甜味剂(如上文阐述)和调味剂以提供可口的口服制剂。

[0255] 适合于通过加入水制备水性悬浮液的分散粉末和颗粒提供与分散剂或润湿剂、悬浮剂和一种或多种防腐剂混合的活性成分。在本文中示例合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂。

[0256] 本公开的药物组合物也可以是水包油乳剂的形式。油相可以是植物油,例如橄榄油或花生油,或矿物油,例如液体石蜡,或这些的混合物。合适的乳化剂可以是天然存在的树胶,例如阿拉伯树胶或黄蓍胶;天然存在的磷脂,例如大豆、卵磷脂、源自脂肪酸的酯或偏酯;己糖醇酐,例如脱水山梨糖醇单油酸酯;和偏酯与环氧乙烷的缩合产物,例如聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0257] 制剂还可以包括保护组合物免受身体快速降解或消除的载体,如受控释放制剂,包括植入物、脂质体、水凝胶、前药和微囊化递送系统。例如,可以采用单独或与蜡组合的延时材料,如单硬脂酸甘油酯或硬脂酸甘油酯。

[0258] 本公开考虑以直肠施用的栓剂形式施用IL-10多肽。栓剂可以通过将药物与合适的非刺激性赋形剂混合来制备,所述赋形剂在常温下为固体但在直肠温度下为液体,因此将在直肠中融化以释放药物。此类材料包括但不限于可可脂和聚乙二醇。

[0259] 本公开考虑的IL-10多肽可以是现在已知或将来开发的任何其他合适的药物组合物(例如,用于鼻腔或吸入用途的喷雾剂)的形式。

[0260] 制剂中多肽或其片段的浓度可以广泛变化(例如,按重量计小于约0.1%,通常为或至少约2%至多至20%至50%或更高),并且通常将根据例如所选择的特定施用模式,主要基于流体体积、粘度和基于受试者的因素选择。

[0261] 施用途径

[0262] 本公开考虑以任何适当的方式施用IL-10分子及其组合物。合适的施用途径包括胃肠外(例如肌肉内、静脉内、皮下(例如注射或植入物)、腹膜内、脑池内、关节内、腹膜内、脑内(实质内)和脑室内)、口服、鼻、阴道、舌下、眼内、直肠、局部(例如透皮)、舌下和吸入。通常皮下或肌肉内施用的积存注射也可用于在限定的时间段内释放本文公开的IL-10多肽。

[0263] 本公开的具体实施方案考虑胃肠外施用,并且在进一步的具体实施方案中,胃肠外施用是皮下。

[0264] 联合疗法

[0265] 本公开考虑使用IL-10(例如PEG-IL-10)与一种或多种活性治疗剂(例如细胞因子)或其他预防或治疗方式(例如辐射)组合。在此类联合疗法中,各种活性剂经常具有不同的作用机制。通过允许一种或多种药剂的剂量减少,从而减少或消除与一种或多种药剂相关的副作用,此类联合疗法可能是特别有利的;此外,此类联合疗法可对潜在的疾病、病症或病况具有协同的治疗或预防作用。

[0266] 如本文中所用,“组合/联合”意在包括可以分开施用,例如分开配制用于分开施用(例如,如可以在试剂盒中提供)的治疗剂,以及可以在单一制剂中一起施用(即“共施用”)的疗法。

[0267] 在某些实施方案中,IL-10多肽依次施用或施加,例如其中一种药剂在一种或多种其他药剂之前施用。在其他实施方案中,IL-10多肽同时施用,例如两种或更多种药物同时或大约同时施用;两种或更多种药物可以在两种或更多种分开的制剂中存在或组合成单一制剂(即共制剂)。不管两种或更多种药剂是依次还是同时施用,为了本公开的目的,认为它们是联合施用的。

[0268] 本公开的IL-10多肽可以在任何情况下以任何合适的方式与一种或多种其他(活性)剂联合使用。在一个实施方案中,在一段时间内维持本公开的至少一种活性剂和至少一种IL-10多肽的治疗。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗(例如当受试者稳定时),而将用本公开的IL-10多肽的治疗维持于恒定的给药方案。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗(例如当受试者稳定时),而减少用本公开的IL-10多肽的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的施用或更短的治疗方案)。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗(例如当受试者稳定时),并且增加用本公开的IL-10多肽的治疗(例如,更高剂量、更频繁的施用或更长的治疗方案)。在另一个实施方案中,维持用至少一种活性剂的治疗,并且减少或中断用本公开的IL-10多肽的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的施用或更短的治疗方案)。在另一个实施方案中,减少或中断用至少一种活性剂的治疗和用本公开的IL-10多肽的治疗(例如,更低剂量、更不频繁的施用或更短的治疗方案)。

[0269] 纤维化病症和癌症。本公开提供了用IL-10多肽(例如PEG-IL-10)和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗和/或预防增殖性病况;癌症、肿瘤或癌前疾病、病症或病况的方法。

[0270] 化学治疗剂的实例包括但不限于烷化剂,如塞替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,如白消安,英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶如苯并多巴、卡波醌(carboquone)、麦曲多巴(meturedopa)和尤利多巴(uredopa);乙撑亚胺和甲基密胺,包括六甲蜜胺、曲他胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(trietylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基密胺(trimethylolomelamine);氮芥(nitrogen mustards),如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chloronaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氧化氮芥盐酸盐(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);硝基脲(nitrosureas),如卡莫司汀、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀、尼莫司汀和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,如阿克莱诺霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、奥瑟霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博莱霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、加利车霉素(calicheamicin)、卡洛比星(carabycin)、洋红霞素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycins)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、博替罗霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin);抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙;嘌呤类似物,如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-硫唑嘧啶、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氮尿苷、5-FU;雄激素,如卡普鲁酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗雄激素,如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,如叶酸;醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吖啶(amsacrine);贝曲布辛(bestrabucil);比生群(bisantrene);伊达曲仙(edatraxate);德弗法明(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);伊弗尼辛(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明;米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌;莫哌达醇(mopidamol);硝氮丙吖啶(nitracrine);喷司他丁;蛋氨酸氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);雷佐生(razoxane);西左非兰(sizofiran);锗螺胺

(spirogermanium);替奴佐酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;乌拉坦(urethan);长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露糖醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);瓜西托辛(gacytosine);阿拉伯糖苷(Ara-C);环磷酰胺;噻替派;紫杉烷,例如紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(doxetaxel);苯丁酸氮芥;吉西他滨(gemcitabine);6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氮嘌呤;铂和铂配位络合物,如顺铂和卡铂;长春碱;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);丝裂霉素C;米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨;诺维本(navelbine);诺肖林(novantrone);替尼泊苷(teniposide);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤;希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);CPT11;拓扑异构酶抑制剂;二氟甲基鸟氨酸(DMF0);视黄酸;埃斯波霉素(esperamicins);卡培他滨;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0271] 化学治疗剂还包括作用为调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,如抗雌激素,包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制性4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、可莫昔芬、奥那司酮和托瑞米芬;和抗雄激素如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及上述任何一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在某些实施方案中,联合疗法包括施用激素或相关激素剂。

[0272] 可以与IL-10多肽联合使用的其他治疗方式包括细胞因子或细胞因子拮抗剂,如IL-12、INF α 或抗表皮生长因子受体、放疗、针对另一肿瘤抗原的单克隆抗体、单克隆抗体和毒素的复合物、T细胞佐剂、骨髓移植或抗原呈递细胞(例如树突细胞疗法)。本文中还提供了疫苗(例如,作为可溶性蛋白质或编码蛋白质的核酸)。

[0273] 心血管疾病。本公开提供了用IL-10多肽(例如PEG-IL-10)和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗和/或预防某些心血管和/或代谢相关疾病、病症和病况以及与之相关的病症的方法。

[0274] 用于治疗高胆固醇血症(因此经常是动脉粥样硬化)的联合疗法的实例包括抑制胆固醇酶促合成的他汀类(例如CRESTOR、LESCOL、LIPITOR、MEVACOR、PRAVACOL和ZOCOR);胆汁酸树脂(例如,COLESTID、LO-CHOLEST、PREVALITE、QUESTRAN和WELCHOL),其螯合胆固醇并阻止其吸收;依泽替米贝(ZETIA),阻断胆固醇吸收;苯氧酸(fibric acid)(例如TRICOR),其减少甘油三酯并可适度增加HDL;烟酸(例如,NIACOR),其适度降低LDL胆固醇和甘油三酯;和/或前述物质的组合(例如VYTORIN(依泽替米贝与辛伐他汀))。可以作为与本文所述的IL-10多肽组合使用的候选者的备选胆固醇治疗包括各种补充剂和药草(例如,大蒜、甘蔗脂肪醇和印度没药(guggul))。本公开包括上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0275] 免疫和炎性病况。本公开提供了用IL-10多肽(例如PEG-IL-10)和至少一种另外的治疗剂或诊断剂治疗和/或预防免疫和/或炎性相关疾病、病症和病况以及与其相关的病症的方法。

[0276] 可用于联合疗法的治疗剂的实例包括但不限于以下:非类固醇抗炎药(NSAID),如阿司匹林、布洛芬和其他丙酸衍生物(阿利洛芬,苯恶洛芬、布氯酸、卡洛芬、芬布芬、非诺洛芬、氟洛芬、氟比洛芬、吲哚洛芬、酮洛芬、咪洛芬、萘普生、奥沙普秦、吡洛芬、普拉洛芬、舒洛芬、噻洛芬酸和硫恶洛芬)、乙酸衍生物(吲哚美辛,阿西美辛,阿氯芬酸,环氯茛酸,双氯芬酸,芬氯酸,芬克洛酸,芬替酸、吠罗芬酸(fuirofenac)、异丁芬酸、伊索克酸、奥西平酸

(oxpinac)、舒林酸、硫平酸、托美丁、齐多美辛和佐美酸)、灭酸衍生物(氟芬那酸、甲氯芬那酸、甲芬那酸、尼氟酸和托芬那酸)、联苯羧酸衍生物(二氟尼柳和氟苯柳)、昔康类(伊索昔康、吡罗昔康、舒多昔康和替诺昔康)、水杨酸盐(乙酰水杨酸、柳氮磺吡啶)和吡唑啉酮(阿扎丙宗、苄哌立隆(bezpiperylon)、非普拉宗、莫非布宗、羟布宗、保泰松)。其他组合包括环氧合酶-2(COX-2)抑制剂。

[0277] 用于组合的其他活性剂包括类固醇,如泼尼松龙、泼尼松、甲泼尼龙、倍他米松、地塞米松或氢化可的松。此类组合可能是特别有利的,因为与本发明IL-10多肽组合治疗患者时可以通过逐渐减少需要的类固醇剂量减少或甚至消除类固醇的一种或多种副作用。

[0278] 可以联合用于治疗例如类风湿性关节炎的活性剂的其他实例包括细胞因子抑制性抗炎药(CSAID);其他人细胞因子或生长因子(例如,TNF、LT、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-15、IL-16、IL-18、EMAP-II、GM-CSF、FGF或PDGF)的抗体或拮抗剂。

[0279] 活性剂的具体组合可能会干扰自身免疫和随后的炎性级联中的不同点,并且包括TNF拮抗剂,如嵌合、人源化或人TNF抗体、REMICADE、抗TNF抗体片段(例如CDP870)和可溶性p55或p75TNF受体、其衍生物、p75TNFR1gG(ENBRELE.)或p55TNFR1gG(LENERCEPT)、可溶性IL-13受体(sIL-13),以及还有TNF α 转化酶(TACE)抑制剂;类似地,IL-1抑制剂(例如白细胞介素-1转化酶抑制剂)可能是有效的。其他组合包括白细胞介素11、抗P7s和p-选择蛋白糖蛋白配体(PSGL)。可与本文所述的IL-10多肽组合使用的药剂的其他实例包括干扰素- β 1a(AVONEX);干扰素- β 1b(BETASERON);克帕松(copaxone);高压氧;静脉内免疫球蛋白;克拉屈滨(clabribine);以及其他细胞因子或生长因子的抗体或拮抗剂(例如,CD40配体和CD80的抗体)。

[0280] 本公开包括上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0281] 病毒性疾病。本公开提供用于用IL-10多肽(例如PEG-IL-10)和至少一种另外的治疗剂或诊断剂(例如一种或多种其他抗病毒剂和/或一种或多种其他非病毒剂)治疗和/或预防病毒性疾病、病症和病况以及与其相关的病症的方法。

[0282] 此类联合疗法包括靶向各种病毒生命周期阶段并具有不同作用机制的抗病毒剂,包括但不限于以下:病毒脱壳抑制剂(例如金刚烷胺和金刚乙胺(rimantidine));逆转录酶抑制剂(例如,阿昔洛韦,齐多夫定和拉米夫定);靶向整合酶的药剂;阻断转录因子连接到病毒DNA的药剂;影响翻译的药剂(例如反义分子)(例如福米韦生);调节翻译/核酶功能的药剂;蛋白酶抑制剂;病毒装配调节剂(例如利福平);以及阻止病毒颗粒释放的药剂(例如,扎那米韦和奥塞米韦)。某些病毒感染(如HIV)的治疗和/或预防通常需要抗病毒剂组(“鸡尾酒”)。

[0283] 考虑与IL-10多肽联合使用的其他抗病毒药物包括但不限于:阿巴卡韦、阿德福韦、金刚烷胺、安普那韦(amprenavir)、安普利近(ampligen)、arbidol、阿扎那韦(atazanavir)、依发韦仑(atrila)、boceprevirertet、西多福韦(cidofovir)、双汰芝(combivir)、地瑞那韦(darunavir)、地拉韦啉(delavirdine)、去羟肌苷(didanosine)、二十二醇(docosanol)、依度尿苷(edoxudine)、依法韦伦(efavirenz)、恩曲他滨(emtricitabine)、恩夫韦地(enfuvirtide)、恩替卡韦(entecavir)、泛昔洛韦(famciclovir)、呋山那韦(fosamprenavir)、膦甲酸(foscarnet)、膦乙酸(fosfonet)、更昔洛韦(ganciclovir)、伊巴他滨(ibacitabine)、imunovir、碘苷、咪喹莫特(imiquimod)、茚

地那韦(indinavir)、肌苷、各种干扰素(例如聚乙烯乙二醇 α -2a)、洛匹那韦(lopinavir)、洛韦胺(loviride)、马拉维诺(maraviroc)、吗啉胍(moroxydine)、美替沙脞(methisazone)、奈非那韦(nelfinavir)、奈韦拉平(nevirapine)、nexavir、喷昔洛韦(penciclovir)、帕拉米韦(peramivir)、普来可那立(pleconaril)、鬼臼毒素(podophyllotoxin)、雷特格韦(raltegravir)、利巴韦林(ribavirin)、利托那韦(ritonavir)、嘧啶(pyrimidine)、沙奎那韦(saquinavir)、司他夫定(stavudine)、特拉匹韦(telaprevir)、去羟肌苷加(tenofovir)、替拉那韦(tipranavir)、曲氟尿苷(trifluridine)、三协唯(trizivir)、曲金刚胺(tromantadine)、特鲁瓦达(truvada)、伐昔洛韦(valaciclovir)、缬更昔洛韦(valganciclovir)、vicriviroc、阿糖腺苷(vidarabine)、韦拉密汀(viramidine)和扎西他滨(zalcitabine)。

[0284] 本公开包括上述任一项的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0285] 给药

[0286] 本公开的IL-10多肽可以以一定量对受试者施用,所述量取决于例如施用目标(例如,期望的消退程度);接受制剂施用的受试者的年龄、重量、性别、健康和身体状况;施用的途径;以及疾病、病症、病况或其症状的性质。给药方案还可以考虑与所施用的制剂相关的任何不良反应的存在、性质和程度。有效的剂量和剂量方案可以容易地从例如安全性和剂量递增试验、体内研究(例如,动物模型)以及本领域技术人员已知的其他方法来确定。

[0287] 本公开考虑了施用IL-10以实现某些血清谷浓度和/或维持某些平均血清谷浓度。IL-10特异性的方法在本文中和本节下面的其他部分进行了描述。

[0288] 通常,给药参数决定了剂量的量小于对受试者可以不可逆地有毒性的量(即最大耐受剂量,“MTD”),并且不小于对受试者产生可测量的影响所需的量。这些量通过例如与ADME相关的药代动力学和药效学参数来确定,考虑到施用的途径和其他因素。

[0289] 有效剂量(ED)是在一定分数的服用制剂的受试者中产生治疗响应或期望效果的制剂的剂量或量。制剂的“中值有效剂量”或ED50是在接受其施用的群体的50%中产生治疗响应或期望效果的制剂的剂量或量。虽然ED50通常用作对制剂效果合理预期的量度,但并不一定是考虑到所有相关因素,临床医生认为合适的剂量。因此,在一些情况下,有效量超过计算的ED50,在其他情况下有效量小于计算的ED50,而在其他情况下,有效量与计算的ED50相同。

[0290] 此外,本公开的IL-10多肽的有效剂量可以是当对受试者以一个或多个剂量施用相对于健康受试者产生期望结果的量。例如,对于经历特定病症的受试者,有效剂量可以是所述病症的诊断参数、测量、标志物等改善至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或超过90%的剂量,其中100%定义为正常受试者展现的诊断参数、测量、标志物等。

[0291] 治疗本文所述的疾病、病症或病况必需的PEG-IL-10的量基于缀合蛋白的IL-10活性,其可以通过本领域已知的IL-10活性测定法确定。举例来说,在肿瘤背景下,合适的IL-10活性包括例如CD8+T细胞浸润到肿瘤部位、自这些浸润细胞表达炎性细胞因子如IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10和RANK-L以及生物样品中IFN- γ 水平的升高。

[0292] IL-10剂的治疗有效量的范围可以为约0.01至约100 μ g蛋白/kg体重/天、约0.1至20 μ g蛋白/kg体重/天、约0.5至10 μ g蛋白质/kg体重/天或约1至4 μ g蛋白/kg体重/天。在一些

实施方案中,通过连续输注施用IL-10剂以递送约50至800 μ g蛋白质/kg体重/天(例如约1至16 μ g蛋白质/kg体重/天的IL-10剂)。输注速率可以随着对例如不良反应和血细胞计数的评估而变化。

[0293] 对于口服药剂的施用,组合物可以以片剂、胶囊等形式提供,其含有1.0-1000毫克的活性成分,特别是1.0、3.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0和1000.0毫克的活性成分。

[0294] 本文中其他地方描述了IL-10多肽的特定给药方案(例如给药频率)。

[0295] 在某些实施方案中,以“单位剂型”含有所公开的IL-10多肽的剂量。短语“单位剂型”是指物理上离散的单位,每个单位含有单独或与一种或多种额外的药剂组合的预定量的本公开的IL-10多肽,足以产生期望的效果。应当理解,单位剂型的参数将取决于具体药剂和待实现的效果。

[0296] 试剂盒

[0297] 本公开还考虑包含IL-10及其药物组合物的试剂盒。试剂盒通常为容纳各种组分的物理结构的形式,如下文所述,并且可以用于例如实施上文所述的方法(例如对需要恢复胆固醇稳态的受试者施用IL-10多肽)。

[0298] 试剂盒可以包括本文所公开的一种或多种IL-10多肽(在例如无菌容器中提供),其可以是适合于对受试者施用的药物组合物的形式。IL-10多肽可以以准备使用的形式提供,或者以施用前需要例如重建或稀释的形式提供。当IL-10多肽是需要由使用者重建的形式时,试剂盒还可以包含与IL-10多肽包装或分开的缓冲液、药学上可接受的赋形剂等。当考虑联合疗法时,试剂盒可以单独含有几种药剂,或者它们可以已经被含在试剂盒中。试剂盒的每种组分可以封闭在单独的容器内,并且所有的各种容器可以在单个包装内。本公开的试剂盒可以设计用于适当维持容纳在其中的组分所必需的条件(例如冷藏或冷冻)。

[0299] 试剂盒可以包含标签或包装插页,包括其中组分的鉴定信息及其使用说明(例如,给药参数、活性成分的临床药理学,包括作用机理、药代动力学和药效学、不良反应、禁忌症等)。标签或插页可以包括制造商信息,如批号和失效期。标签或包装插页可以例如集成到容纳组分的物理结构中、单独含在物理结构内,或者固定到试剂盒的组件(例如,安瓿、管或小瓶)。

[0300] 标签或插页可另外包括或并入计算机可读介质,如盘(例如,硬盘、卡、存储盘),光盘,如CD或DVD-ROM/RAM、DVD、MP3、磁带或电存储介质如RAM和ROM或这些杂合物,如磁/光存储介质/FLASH介质或存储器型卡。在一些实施方案中,实际指令不存在于试剂盒中,而是提供用于从远程源获得指令(例如通过因特网)的手段。

[0301] 实施例

[0302] 提出以下实施例,以便为本领域普通技术人员提供如何产生和使用本发明的完整公开和描述,而不意图限制发明人视为其发明的范围,它们也不意图表示以下实验是实施的,并且是可以实施的所有实验。应当理解,以现在进行时书写的示例性描述不一定是实施的,而是可以实施描述以产生其中描述的数据等。已经努力确保使用的数字(例如量,温度等)的准确性,但是应该考虑一些实验误差和偏差。

[0303] 除非另有指示,份为重量份,分子量为重均分子量,温度为摄氏度($^{\circ}$ C),并且压力为或接近大气压。使用标准缩写,包括以下:bp=碱基对;kb=千碱基;pl=皮升;s或sec=

秒;min=分钟;h或hr=小时;aa=氨基酸;kb=千碱基;nt=核苷酸;ng=纳克; μ g=微克;mg=毫克;g=克;kg=千克;d1或dL=分升; μ l或 μ L=微升;ml或mL=毫升;l或L=升; μ M=纳摩尔;mM=微摩尔;M=摩尔;kDa=千道尔顿;i.m.=肌内;i.p.=腹膜内;i.v.或IV=静脉内;s.c.或SC=皮下;QD=每日;BID=每日两次;QW=每周;QM=每月;HPLC=高效液相层析;BW=体重;U=单位;ns=统计学不显著;PBS=磷酸盐缓冲盐水;PCR=聚合酶链式反应;NHS=N-羟基琥珀酰亚胺;DMEM=伊格尔培养基的Dulbeco改良;GC=基因组拷贝;EDTA=乙二胺四乙酸。

[0304] 材料和方法

[0305] 可以在下述实施例中使用以下通用材料和方法:

[0306] 描述了分子生物学中的标准方法(参见例如Sambrook和Russell (2001) *Molecular Cloning*,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;和Ausubel等人(2001) *Current Protocols in Molecular Biology*,第1-4卷,John Wiley and Sons,Inc.New York,N.Y.,其描述了在细菌细胞中的克隆和DNA诱变(第1卷)、在哺乳动物细胞和酵母中的克隆(第2卷)、糖缀合物和蛋白质表达(第3卷)和生物信息学(第4卷))。

[0307] 科学文献描述了蛋白质纯化的方法,包括免疫沉淀、层析、电泳、离心和结晶,以及化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生和蛋白质的糖基化(参见例如Coligan等人(2000) *Current Protocols in Protein Science*,第1-2卷,John Wiley and Sons, Inc.,NY)。

[0308] 描述了多克隆和单克隆抗体的生产、纯化和片段化(例如,Harlow和Lane (1999) *Using Antibodies*,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY);用于表征配体/受体相互作用的标准技术是可用的(参见例如Coligan等人(2001) *Current Protocols in Immunology*,第4卷,John Wiley,Inc.,NY);用于流式细胞术(包括荧光激活细胞分选(FACS))的方法是可用的(参见例如,Shapiro (2003) *Practical Flow Cytometry*,John Wiley and Sons,Hoboken,NJ);适用于修饰核酸,包括核酸引物和探针、多肽和抗体的荧光试剂(例如用作诊断试剂)是可用的(*Molecular Probes* (2003) *Catalogue*,Molecular Probes,Inc.,Eugene,OR.;Sigma-Aldrich (2003) *Catalogue*,St.Louis,MO.)。

[0309] 描述了免疫系统的组织学的标准方法(参见例如Louis等人(2002) *Basic Histology:Text and Atlas*,McGraw-Hill,New York,NY)。

[0310] 免疫细胞(CD4⁺和CD8⁺T-细胞)的消减可以通过抗体介导的消除来实现。例如,可以每周注射250 μ g的CD4-或CD8-特异性抗体,并使用FACS和IHC分析来验证细胞消减。

[0311] 用于确定例如抗原片段、前导序列、蛋白质折叠、功能结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库是可用的(参见例如GCGWisconsin包(Accelrys,Inc.,San Diego,CA);以及DeCypherTM(TimeLogic Corp.,Crystal Bay,NV)。

[0312] 免疫感受态Balb/C或B细胞缺陷型Balb/C小鼠从The Jackson Lab.,Bar Harbor,ME获得,并且按照标准程序(参见例如Martin等人(2001) *Infect.Immun.*,69(11):7067-73和Compton等人(2004) *Comp.Med.*54(6):681-89)使用。适用于本公开考虑的实验工作的其他小鼠品系是熟练技术人员已知的,并且通常可从The Jackson Lab获得。

[0313] 除非另有说明,本文所述的实验中使用皮肤PDV6鳞状细胞癌(参见例如Langowski

等人(2006) Nature 442:461-465)。可以使用其他肿瘤学相关模型和细胞系,如Ep2乳腺癌、CT26结肠癌和4T1乳腺癌模型(参见例如Langowski等人(2006) Nature 442:461-465),并且对熟练技术人员是已知的。也可以使用非肿瘤学相关模型和细胞系(例如炎症模型)并且是熟练技术人员已知的。

[0314] 血清IL-10浓度水平和暴露水平可以通过本领域中使用的标准方法测定。例如,可以如下进行血清暴露水平测定法:通过将来自小鼠尾巴剪断的全血(约50 μ l/小鼠)收集到普通毛细血管,通过离心分离血清和血细胞,并通过标准ELISA试剂盒和技术测定IL-10暴露水平。下文描述了测量IL-10血清浓度的另外的手段。

[0315] 本公开考虑通过熟练技术已知的任何手段(参见例如美国专利号7,052,686和美国专利公开号2011/0250163)合成PEG化的IL-10。

[0316] 下面列出的材料,直到并包括表15及其描述,从美国专利公开号2011/0091419(美国专利公开号2011/0091419的共同发明人也是本申请的发明人)再现,并且其中的教导及其变体可广泛应用并且在许多不同的上下文中利用和/或修改。类似地,相关领域和/或技术领域的其他出版物的教导(参见例如USP号6,387,364和7,052,684和PCT公开号WO 2006/075138)以及熟练技术人员的一般知识可以形成额外的实验工作的基础。

[0317] 肿瘤模型和肿瘤分析

[0318] 可以使用任何公认的肿瘤模型、测定法等评价本文所述的IL-10和PEG-IL-10分子对各种肿瘤的影响。下文描述的肿瘤模型和肿瘤分析是可以利用的肿瘤模型和肿瘤分析的代表,可将它们用于生成和评估表1-15中列出的数据。

[0319] 每个肿瘤接种,以 10^4 、 10^5 或 10^6 个细胞皮下或皮内注射同基因小鼠肿瘤细胞。可以使用Ep2乳腺癌、CT26结肠癌、PDV6鳞状皮肤癌和4T1乳腺癌模型(参见例如Langowski等人(2006) Nature 442:461-465)。可以使用免疫感受态Balb/C或B细胞缺陷型Balb/C小鼠。可以将PEG-mIL-10施用于免疫感受态小鼠,而PEG-hIL-10处理可用于B细胞缺陷型小鼠。在开始处理前,允许肿瘤达到100-250mm³的大小。IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10或缓冲液对照在远离肿瘤植入的部位皮下施用。通常使用电子测径器每周两次监测肿瘤生长。

[0320] 在各种终点收获肿瘤组织和淋巴器官以测量许多炎症标志物的mRNA表达,并对几种炎性细胞标志物进行免疫组织化学。将组织在液氮中快速冷冻并储存在-80℃下。通常使用电子测径器每周两次监测原发性肿瘤生长。可以使用公式(宽度²×长度/2)计算肿瘤体积,其中长度是较长的尺度。在开始处理前,允许肿瘤达到90-250mm³的大小。

[0321] 施用IL-10和/或PEG-IL-10

[0322] 利用上述肿瘤模型和肿瘤分析方法产生下文阐述的数据。然而,如上所述,这些相同的模型和方法可以用于其他实验设置。

[0323] 将鼠IL-10(mIL-10)或PEG-mIL-10施用于有免疫能力的小鼠,而在B细胞缺陷小鼠中使用PEG-hIL-10处理。在远离肿瘤植入物的部位皮下施用鼠IL-10、PEG-mIL-10、PEG-hIL-10或媒介物对照。用SC-PEG-12K接头制备用于这些研究的PEG-mIL-10。通过应用短期增殖生物测定评估mIL-10和PEG-mIL-10的生物活性,所述短期增殖生物测定利用表达内源性mIL-10受体(R1和R2)的MC/9,小鼠肥大细胞系。MC/9细胞响应用mIL-4和mIL-10的共刺激而增殖(MC/9细胞仅在mIL-4或mIL-10的情况下增殖)。使用Alamar Blue(一种基于代谢活性检测的生长指示剂染料)通过比色手段测量增殖。通过EC50值或在剂量-响应曲线中观

察到半最大刺激的蛋白质浓度来评估重组体或PEG-mIL-10的生物学活性(表1)。

[0324] 表1

用于评估这些研究中使用的mIL-10和PEG-mIL10试剂的生物活性的MC/9增殖生物测定法	
蛋白质	MC/9测定法中的EC50 (ng/mL)
mIL-10	0.5711
PEG-mIL-10	4.039

[0326] 如表1中所示,基于MC/9生物测定,实验中使用的PEG-mIL-10的比活性比mIL-10的活性低约7倍。

[0327] 也可以每隔一天对患Ep2乳腺癌肿瘤的小鼠施用PEG-mIL-10。治疗有效减少肿瘤大小和诱导肿瘤排斥。

[0328] 表2

PEG mIL-10降低Balb/C小鼠中的Ep2乳腺癌模型中的肿瘤大小(mm ³)							
接种后的天数							
	11	15	18	21	25	27	33
对照	300	450	500	750	1300	1500	2700
PEG-IL-10	300	400	310	280	250	50	0

[0330] 用PEG-mIL-10处理也有效减少PDV6,CT-26和4T1同基因免疫能力的小鼠肿瘤模型的肿瘤大小(见表3、4和5)。

[0331] 表3

研究 04-M52 338: 植入后第36天开始的PEG mIL-10在C57B/6小鼠中降低PDV6肿瘤大小(mm ³)							
接种后天数							
	36	38	42	44	46	48	52
对照	200	255	290	380	395	420	485
PEG-mIL-10	210	265	200	190	155	110	55

[0333] 表4

植入后第7天开始的PEG mIL-10在BALB/c小鼠中相对于CT26肿瘤的媒介物对照降低肿瘤大小(mm^3)。

[0334]	接种后天数					
	10	15	17	20	22	24
媒介物对照	155	424	791	1274	1737	2170
PEG-mIL-10	136	212	291	336	450	455

[0335] 表5

IL-10和PEG mIL-10降低4T1乳腺癌的肿瘤大小(mm^3)					
[0336]	治疗天数	20	24	29	33
	对照	200	410	584	1000
	PEG-mIL-10	200	320	560	350
	IL-10	200	290	575	400

[0337] 剂量滴定研究

[0338] 在剂量滴定研究中,从对应于预期峰和谷剂量水平的时间从每组的代表性小鼠收集尾静脉血。使用基于多阵列技术、电化学发光检测和图案化阵列的组合的Meso Scale Discovery平台,测定收获的血清的mIL-10浓度。使用双尾非配对的学生t检验来比较通过血清mIL-10浓度分组的mIL-10或PEG-mIL-10处理的小鼠的平均肿瘤体积与其相应的媒介物对照组的平均肿瘤体积。当两组具有不等的方差时使用Welch校正(来自t检验的 $p < 0.05$)。

[0339] 在患4T1乳腺癌小鼠中PEG-mIL-10和mIL-10的剂量滴定显示,原发性肿瘤和肺转移的控制可用mIL-10和PEG-mIL-10两者剂量滴定。如表6中阐述,在任何给定剂量下,PEG-mIL-10比mIL-10更有效。植入后第17天,当平均肿瘤体积为 $84\text{--}90\text{mm}^3$ 时,开始每日两次处理。处理组由每组14只小鼠组成,而对照组每组有8只小鼠。Tris和Hepes缓冲液分别是mIL-10和PEG mIL-10的对照。

[0340] 表6

研究06-M175-1103, mIL-10和PEG-mIL-10以剂量依赖性方式降低BALB/c小鼠中的4T1乳腺癌的原发性肿瘤大小(mm³)。

		植入后天数							
		17	21	24	27	30	34	38	42
[0341]	Tris 媒介物对照	90	184	288	448	560	861	1126	1248
	Hepes 媒介物对照	90	215	344	476	658	940	1261	1520
	PEG-mIL-10 (0.5 mg/kg)	86	107	117	129	150	165	204	195
	PEG-mIL-10 (0.1 mg/kg)	84	112	142	152	224	256	286	356
	PEG-mIL-10 (0.01 mg/kg)	85	140	200	240	288	462	627	773
	PEG-mIL-10 (0.001 mg/kg)	88	168	239	262	373	532	729	942
	mIL-10 (1.0 mg/kg)	85	117	168	207	256	350	446	497
	mIL-10 (0.1 mg/kg)	84	136	180	251	337	424	641	704
	mIL-10 (0.01 mg/kg)	86	121	165	231	331	436	631	809

[0342] 在患PDV6鳞状细胞癌小鼠中PEG-mIL-10和mIL-10的剂量滴定显示,原发性肿瘤的控制可用mIL-10和用PEG-mIL-10两者剂量滴定,尽管在任何给定剂量下PEG-mIL-10比mIL-10更有效(表7)。高剂量PEG-mIL-10处理导致近100%的肿瘤消退,以及随后对再次攻击的耐受性(表8)。在植入后第23天,当平均肿瘤体积为107-109mm³时开始每日两次处理,并且对于所有mIL10处理组和0.01mg/kg PEG mIL-10处理组,持续到第55天为止。当观察到100%的肿瘤消退时,在第48天停止0.1mg/kg PEG-mIL-10处理,而处理剩余的组直至第51天。处理组由每组10只小鼠组成,而每种媒介物对照含有6只小鼠。Tris缓冲液和Hepes缓冲液分别为mIL-10和PEGmIL-10的媒介物对照。在初次植入后85天和最后一次PEG-mIL10处理后4周完成再植入。每组有10只小鼠。

[0343] 表7

研究06-M52-1106, mIL-10和PEG-mIL-10以剂量依赖性方式降低C57Bl6/J小鼠中的PDV6鳞状细胞癌的肿瘤大小(mm³)。

	植入后天数									
	23	27	30	33	36	40	43	47	51	55
Tris	111	179	232	318	412	493	635	848	958	
媒介物对照										
Hepes	107	210	293	433	541	653	712	761	986	
媒介物对照										
PEG-mIL-10	108	99	55	31	17	11	3	1	1	1
(0.1 mg/kg)										
PEG-mIL-10	107	131	92	97	95	114	119	123	183	228
(0.01 mg/kg)										
PEG-mIL-10	109	191	191	241	327	455	535			
(0.001 mg/kg)										
mIL-10	107	129	144	143	124	87	51	36	52	75
(1.0 mg/kg)										
mIL-10	107	85	85	88	117	121	130	143	182	217
(0.1 mg/kg)										

[0344]

研究06-M52-1106, mIL-10和PEG-mIL-10以剂量依赖性方式降低C57Bl6/J小鼠中的PDV6鳞状细胞癌的肿瘤大小(mm³)。

	植入后天数									
	23	27	30	33	36	40	43	47	51	55
mIL-10	107	120	150	146	196	244	262	263	249	250
(0.01 mg/kg)										

[0345] 表8

研究06-M52-1106, 在3周PEG-mIL-10处理后已经清除PDV6鳞状细胞癌肿瘤的C57Bl6/J小鼠在不存在另外的处理的情况下对再植入有抗性。

	植入后天数						肿瘤阳性 的小鼠%
	0	16	21	28	36	49	
媒介物对照	0	113	145	188	418	761	100
PEG-mIL-10 (0.1 mg/kg)	0	0.3	0	7	16	47	10

[0347] 肺转移研究

[0348] 在肺切除术后用肉眼(表9)或通过计数培养后的肺转移集落(表10)量化4T1乳腺癌模型中的肺转移,如Current Protocols in Immunology(第20.2.4节)John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999)中所述。简言之,将从患4T1肿瘤的小鼠收获

的肺切碎并用胶原酶/弹性蛋白酶混合物消化,随后在有限稀释测定中含有6-硫鸟嘌呤的培养基中培养。仅仅4T1细胞是6-硫鸟嘌呤耐药性的,并且可以通过计数10-14天培养后的集落数进行定量。植入后第17天,当平均肿瘤体积为84-90mm³时,开始每日两次处理。Tris和Hepes缓冲液分别是mIL-10和PEG mIL-10的对照。按每肺培养的转移性集落数测量肺转移。

[0349] 表9

研究 05-M52-496. 在植入后19天开始用 mIL-10 和 PEG-mIL-10 处理2周减少4T1乳腺癌的转移(按每只小鼠的肺转移数目测量)

接种后33天的肺转移

[0350]

	媒介物 对照	mIL-10	PEG-mIL-10
小鼠编号1	7	0	0
小鼠编号2	7	0	0
小鼠编号3	7	0	0
小鼠编号4	8	0	0
小鼠编号5	20	4	0

[0351] 表10

研究06-M175-1103. mIL-10 和 PEG-mIL-10 以剂量依赖性方式降低 BALB/c小鼠中的4T1乳腺癌的肺转移。

植入后42-45天的肺转移
每肺的集落数($\times 10^3$)

[0352]

小鼠	Tris 缓冲液 媒介物 对照	Hepes 缓冲液 媒介物 对照	mIL-10 1.0 mg/kg	mIL-10 0.1 mg/kg	mIL-10 0.01 mg/kg	PEG- mIL-10 0.5 mg/kg	PEG- mIL-10 0.1 mg/kg	PEG- mIL-10 0.01 mg/kg	PEG- mIL-10 0.001 mg/kg
1	362	481	76	116	1064	7.1	89	0.43	366
2	2.12	533	20	5.6	150	1.0	0.7	234	212
3	152	264	28.1	8.1	67.4	0.4	0.01	377	0.6
4	0.4	218	1.2	137	18	1.5	223	315	586
5	1000	517	45.7	257	77	0.3	0.07	0.54	486
6	474	93	21.7	2.72	1.2	0.02	10.1	1.67	844
7	524	1000	4.4	364	285	0	7.6	68	6.5
8	1000	1026	128.6	772	9.7	0.002	1.85	27	265
9			13.3	348	878	0.3	0.01	139	338
10			51.2	204	45	0.03	0.01	177	824
11			9.4	49	56	0.01	2.68	597	263
12			0.1	635	17.1	240	0.01	7.4	
13			5.1	19.7	1014	0.02	2.94	0.01	
14			0.02	750	72.2	0.01	0.01	0.01	
中值	418.0	499.0	16.7	170.5	69.8	0.17	1.28	47.5	338.0
平均值	502.0	579.0	28.9	262.0	268.2	17.9	24.1	138.0	381.0
S.D.	519.0	467.0	36.5	276.9	397.1	64.0	61.8	183.7	284.0

[0353] 如通过定量RT-PCR测量,将PEG-mIL-10或IL-10施用到患4T1乳腺癌的小鼠降低转移速率并增加CD8⁺ T细胞浸润和免疫刺激细胞因子的表达(表11和12)。从CD8表面标志物免疫组织化学染色的几个肿瘤的代表性切片计数浸润性CD8⁺ T细胞数,并用抗CD3和抗TCR $\alpha\beta$ 抗体染色证实。

[0354] 表11

IL-10 和 PEG mIL-10 诱导4T1癌中的
CD8⁺ T 细胞浸润

[0355]

	对照	IL-10	PEG-IL-10
CD8 ⁺ 细胞的平均数/视野	6.4	25.8	39.2

[0356] PEG-mIL-10在炎性细胞因子诱导中比IL-10更有效。提取来自均质化肿瘤样品的总RNA,并且逆转录,如先前描述(参见例如Homey等人(2000) J. Immunol. 164:3465-3470)。通过荧光5'-核酸酶PCR测定法定量分析互补DNA的细胞因子表达(参见例如Holland等人(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7276-7280)。通过ABI PRISM 7700序列检测系统(Applied Biosystems)在40个循环期间连续测量特异性PCR产物。将数值相对于泛素标准化。将对数转化数据进行Kruskal-Wallis统计分析(中值法)。表达水平(对数转化)对应于肿瘤样品中表达的炎性细胞因子的量,使得表达水平(对数转化)越高,肿瘤样品中表达的炎性细胞因子的量越大。

[0357] 表12

施用的PEG-mIL-10在剂量施用后24小时诱导4T1癌中炎性
细胞因子的维持水平。

	细胞因子	对照	IL-10	PEG-mIL-10
[0358]	IFN γ	36.04	68.51	98.96
	IL-4	7.77	13.13	40.32
	IL-6	43.64	50.59	111.98
	IL-10	9.94	41.62	106.16
	RANK- 配体	19.14	36.13	46.08

[0359] 免疫细胞消耗

[0360] 通过抗体介导的消除来消耗CD4⁺和CD8⁺ T细胞。为此目的,每周注射250 μ g的CD4-或CD8-特异性抗体。使用FACS和IHC分析确认细胞消耗。

[0361] 用CD4抗体在B细胞缺陷型BALB/c小鼠(C.129-Igh-6^{tm1Cgn})中消耗CD4⁺ T细胞抑制肿瘤上的PEG-hIL-10功能(表13)。

[0362] 表13

肿瘤植入后8天开始的PEG-hIL-10处理在B细胞缺陷BALB/c小鼠 (C.129-Igh-6^{tm1Cgn}) 中的CD4消耗后未能降低CT-26结肠癌的肿瘤大小(mm³)。

[0363]

植入后天数	8	10	13	19	27
PBS	173	322	391	841	1979
PEG-hIL-10	184	276	251	602	1332

[0364] CD8+ T细胞的消耗完全抑制PEG mIL-10对同基因肿瘤生长的影响(表14)。

[0365] 表14

肿瘤植入后8天开始的PEG-hIL-10处理在B细胞缺陷BALB/c小鼠中的CD8消耗后未能降低CT-26结肠癌的肿瘤大小(mm³)。

[0366]

植入后天数	8	10	13	19	27
PBS	151	335	584	1434	2746
PEG-hIL-10	226	575	1047	2449	4799

[0367] IL-10给药频率和血清谷浓度

[0368] 设计和进行小鼠研究以增强对IL-10疗法药代动力学参数的理解,并产生可用于优化人受试者中重组人IL-10(rhIL-10)的肿瘤治疗方案的小鼠中的数据。

[0369] 用PDV6肿瘤细胞接种小鼠,并且允许肿瘤生长2.5周达到100mm³。然后用相同的每周剂量(0.7mg/kg/周)处理荷瘤小鼠组(n=10/组),施用5kDa单-二PEGmIL-10作为a)每周一次的一个推注SC注射,或b)在整个一周内以分次剂量进行几次SC注射,包括每周两次(0.35mg/kg)、每隔一天(约0.25mg/kg,使得总每周剂量=0.7mg/kg)和每日(0.1mg/kg/天)。由于所有小鼠在一周过程内接受相同量的药物,因此观察到类似的总体暴露(曲线下面积AUC)。每周一次给药的动物的峰值暴露最高,而接受较小日剂量的小鼠的最小药物暴露(谷)最高。令人惊讶的是,如表15中所示,每日给药的动物表现出最高的抗肿瘤功效,表明血清谷暴露对于抗肿瘤功能是重要的,而峰值暴露对抗肿瘤功能的影响不是决定性的。

[0370] 表15

[0371]

给药日程表	肿瘤大小 (mm ³)
对照	813.9522
每日	43.196
每隔一天	170.186

每两周	347.315
每周	425.572

[0372] 在两种肿瘤模型中进一步探索所需要的血清谷浓度：C57BL/6小鼠中的PDV6肿瘤和Balb/C小鼠中的CT26结肠癌细胞。使用标准方法，使小鼠生长至100mm³，然后通过施用5kDa单-二PEGmIL-10开始处理4周。此后，在接受不同治疗日程表的荷瘤小鼠中测量IL-10的血清谷浓度。然后将IL-10血清谷浓度与所得肿瘤大小相关联。如表16中所示，具有超过1ng/mL的IL-10血清谷的小鼠具有一致的小肿瘤并且排斥其肿瘤。

[0373] 表16

IL-10 血清谷范围 [pg/ml]	IL-10 血清谷 (平均值) [pg/ml]	肿瘤大小 (平均值) [mm ³]	肿瘤重量 (平均值) [g]
30-73	47	846	1.1
105-246	164	610	0.7
250-629	433	570	0.6
1155-2095	1619	148	0.2

[0375] 为了确认人细胞中的临界谷浓度，将hIL-10以增加的浓度添加到人外周血单核细胞(PBMC)培养物。将PBMC培养物保持未处理或用脂多糖(LPS)刺激。已知IL-10抑制LPS介导的PBMC活化。活性测量为趋化因子MCP-1的分泌。LPS和IL-10二者诱导MCP-1的分泌，但在诱导趋化因子中抑制彼此的活性。当浓度为1ng/mL及以上时，IL-10在不存在LPS的情况下增加MCP-1的分泌(图2A)。相比之下，在用LPS刺激的PBMC中，以1ng/mL的浓度添加IL-10显著抑制MCP-1的分泌(图2B)。这证实了IL-10对诱导和抑制各生物过程的生物学活性。

[0376] IL-10对人受试者中的细胞因子和胆固醇的影响

[0377] 人受试者中血清IL-10浓度的测定。对人志愿者SC或IV施用期望量的rhIL-10，并在施用后的期望时间将全血样品吸入含肝素抗凝血剂的容器。使用标准夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒测定血清rhIL-10或PEG-rhIL-10浓度。通常，在0.1至10ng/mL的浓度范围内，ELISA测定确定为选择性、线性和可重复性的，并且定量限(L00)为0.1ng/mL。还通过ELISA分析对血清样品分析结合hIL-10的抗体的存在。此外，使用包含小鼠肥大细胞系MC9的验证生物测定法分析所选择的血清样品；该细胞系响应IL-10而增殖。使用生物测定法测定GMP产生的rHuIL-10和PEG-rHuIL-10的生物活性，并测定IL-10在患者血清中的生物学活性。通常，IL-10的浓度和活性的ELISA和生物测定法测定揭示了相应的值。

[0378] 人受试者中TNFα和IL-1β浓度的测定。IL-10在患有慢性炎症性疾病的患者中具有抗炎功能，并且TNFα和IL-1β代表在此类疾病中释放的关键炎性细胞因子。在从人受试者获得的血液样品中测定TNFα和IL-1β浓度。通常，刚好在rhIL-10的SC或IV施用(0小时)前和在给药后0.5、2、3、4、6、8、12、16、24、48、72和96小时时，无菌收集3mL静脉血。在LPS和抗凝血剂存在下对样品进行全血细胞因子释放测定，并用ELISA测定法测量TNFα和IL-1β浓度。LPS刺激血细胞中TNFα和IL-1β的释放。

[0379] 在用rHuIL-10对个体给药IV后0.5-12小时收集的样品中，TNFα和IL-1β的释放受到抑制。在从用rHuIL-10SC给药的个体收集的样品中，TNFα和IL-1β的释放从0.5小时至24

小时受到抑制。通过ELISA测定那些人受试者中rHuIL-10的血清浓度。TNF α 和IL-1 β 的抑制与rHuIL-10的血清浓度相关。rHuIL-10的血清浓度在给药后增加并保持升高48小时。然而,只要rHuIL-10的浓度在0.2ng/mL以上,TNF α 和IL-1 β 的释放就受到抑制;当浓度低于0.1ng/mL时,TNF α 和IL-1 β 的释放不受抑制。在rHuIL-10的IV给药后12小时后和在SC给药后24小时后,血清浓度降至0.2ng/mL以下,并且观察到TNF α 和IL-1 β 的释放。这些数据表明,有必要实现处于或高于0.2ng/mL的IL-10血清谷浓度或在患有慢性炎症疾病的患者中观察抗炎功能。

[0380] 通过PEG-IL-10在人癌症患者中测定INF γ 和胆固醇调节。IL-10在CD8+T细胞中诱导INF γ , 并且INF γ 诱导对于小鼠中IL-10介导的肿瘤排斥是必需的。当在对照小鼠中诱导肿瘤消退的浓度用PEG-rmIL-10处理时,INF γ 缺陷型小鼠未能排斥其肿瘤(数据未显示)。因此,在用PEG-rhIL-10治疗的患者的血清中测量INF γ 。

[0381] 在关于适当的施用技术的教育后,癌症患者每天自己以各种剂量注射PEG-rhIL-10SC。如前所述,使用夹心ELISA测定血清IL-10浓度。使用Luminex珠测定(Luminex Corp.; Austin, TX)在第一次给药前或给药28天后采集的血清样品中测量INF γ 。

[0382] 如表17中所示,接受1 μ g/kg PEG-IL-10的患者具有约0.4-约1.1ng/mL IL-10之间的血清谷水平,而接受2.5 μ g/kg PEG-IL-10剂量的患者具有约0.4和约2.6ng/mL IL-10之间的血清谷水平。

[0383] INF γ 主要通过Jak-Stat途径发出信号。Jak-Stat信号传导涉及Janus家族激酶(Jak: Jak 1-3和Tyk2)和Stat (Stat 1-6, 包括Stat5a和Stat5b)的成员的顺序受体募集和激活,以通过特异性响应元件控制靶基因的转录。由于这种信号传导机制是细胞因子受体超家族的许多成员的特征,INF γ 诱导的Jak-Stat信号传导是目前用于II类细胞因子受体信号转导的范例。如表17中所示,具有1ng/mL或更大的血清谷浓度的患者显示出血清中INF γ 的诱导,而血清谷水平低于1ng/mL的患者未能显示INF γ 的诱导。参考表17, INF γ 诱导定义为大于1的值。

[0384] 表17

患者	01	02	03	04	05
剂量(μ g/kg PEG-rHuIL-10)	1	1	2.5	2.5	2.5
血清谷(ng/mL)	0.392	1.11	2.64	0.42	1.84
INF γ 诱导	0.55	1.35	2.4	0.97	11.2

[0386] 这些数据表明,有必要实现处于或高于1ng/mL的IL-10血清谷浓度或观察癌症/肿瘤背景中的治疗效果。重要的是,血清谷浓度是INF γ 诱导,而不是剂量水平的决定因素。

[0387] 在施用PEG-rhIL-10之前或每天SC给药(1 μ g/kg; 2.5 μ g/kg; 或5 μ g/kg; n=3-4名患者/剂量)1周后在从癌症患者抽出的血清样品中测量胆固醇。参照表18,接受1 μ g/kg的患者实现0.4ng/mL的平均每日血清胆固醇浓度,并且具有7.8%的胆固醇降低;接受2.5 μ g/kg的患者实现1ng/mL的平均每日血清胆固醇浓度,并且具有19%的胆固醇降低;并且接受5 μ g/kg的患者实现2ng/mL的平均血清谷胆固醇浓度,并且具有38%的胆固醇降低。因此,每种给

药方案导致血清胆固醇的治疗上相关的降低,表明约0.2ng/mL至0.4ng/mL的平均IL-10血清谷浓度是有效的。

[0388] 表18

[0389]

剂量	1ug/kg	2.5	5
n	4	4	3
平均血清谷 (第15天)	0.4	1.8	3.6
平均胆固醇降低 (1周)	7.8%	20%	37%

[0390] PEG-hIL-10在实体瘤患者中的效果

[0391] 剂量递增研究。评估了对具有特定类型的实体瘤的患者施用不同量的PEG-hIL-10的效果。如图3中所示,共28名患者每日接受1、2.5、5、10或20μg/kg PEG-hIL-10SC,并且通过免疫相关响应标准(irRC)评估那些患者中的24名的肿瘤,所述免疫相关响应标准是一种用免疫治疗剂测定响应模式的常用方法(参见例如Wolchok等人,Clin.Cancer Res.15(23):7412-20(2009年12月1日))。患者患有卵巢肿瘤、肾肿瘤、结肠肿瘤、胰腺肿瘤或黑素瘤。

[0392] 图3列出了如使用irRC测定的疾病控制率(DCR)。在肿瘤学术语中,DCR是指表明对治疗的响应的患者的总比例;DCR是完全响应(CR)+部分响应(PR)+稳定疾病(SD)的总和。在此背景中,SD定义为肿瘤负荷<25%增加,其中使用irRC方法在7周治疗后测定肿瘤负荷。如图3中所示,在10μg/kg的PEG-hIL-10,DCR为40%(5名可评估患者中的2名),并且这两名患者都患有结肠肿瘤。在20μg/kg的PEG-hIL-10,DCR为80%(5名可评估患者中的4名):在那4名患者中,1名患有结肠肿瘤,1名患有胰腺肿瘤,1名患有黑素瘤,并且1名患有肾肿瘤。

[0393] 增加PEG-hIL-10血清浓度。评估与PEG-hIL-10疗法相关的药代动力学参数以优化肿瘤治疗给药方案。使用与上述方法相似的方法,在利用PEG-hIL-10的基于细胞的测定中测定EC50值,并且与在接受10或20μg/kg PEG-hIL-10的剂量递增研究中的那些患者中实现的IL-10血清水平比较。如图4中所示,EC50测定为约6000pg/mL(约6ng/mL)。接下来,对于参与剂量递增研究的每位患者,测定由每天施用1、2.5、5、10或20μg/kg PEG-hIL-10SC引起的血清浓度,并且计算那些接受相同剂量的患者的平均血清浓度。图4中给出了数据。参考图4,施用20μg/kg PEG-hIL-10导致超过EC50的暴露,而施用10μg/kg的PEG-hIL-10经常导致处于或高于EC50的暴露(认为处于或高于EC50的暴露是有利的)。

[0394] 图5A和B列出了在每名接受10μg/kg PEG-hIL-10(图5A)和20μg/kg PEG-hIL-10(图5B)的患者中测定的来自图4的数据。每条线代表个体患者,其中CRC=结肠直肠癌,RCC=肾细胞癌,Panc=胰腺癌,MEL=黑素瘤,CRPC=去势抗性前列腺癌。在经验证的电化学发光(ECL)测定中测量血清浓度。与图4一致,接受20μg/kgPEG-hIL-10的患者常规实现超过EC50的暴露,而接受10μg/kgPEG-hIL-10的患者常规实现接近EC50的暴露。

[0395] PEG-hIL-10对结肠直肠癌患者中的肿瘤标志物CEA的影响

[0396] 癌胚抗原(CEA)是指在胎儿发育期间在胃肠组织中产生,但在健康成人的血清中仅以非常低的水平存在的一组细胞表面锚定的糖蛋白。CEA血清水平在某些类型的癌症(例如CRC)中升高,并且CEA可以在临床试验期间用作肿瘤标志物,预测临床响应。

[0397] 评估了对CRC患者每天施用增加量的PEG-hIL-10SC的效果。在较低剂量(例如,1、

2.5或5 μ g/kg)的大多数CRC患者在治疗期间CEA缓慢增加,而接受最高剂量的PEG-hIL-10(20 μ g/kg)的CRC患者经历CEA的急剧下降(数据未显示)。图6描绘了在治疗过程中接受递增量的PEG-hIL-10的两名患者中的CEA稳定效果。参考图6,1名患者以2.5 μ g/kg开始PEG-hIL-10疗法,并且CEA水平持续升高,即使治疗约130天后剂量增加至5 μ g/kg后。当治疗约190天后剂量随后增加至10 μ g/kg时,CEA血清浓度趋于平稳,表明以足以实现对于维持稳定疾病必需的PEG-hIL-10血清浓度的剂量施用PEG-hIL-10。第二名患者的疗法以每天5 μ g/kg PEG-hIL-10SC开始。在该患者中,在第30天左右开始测量CEA水平。参考图6,CEA水平逐渐升高,然后变得稳定。在约第100天,PEG-hIL-10的剂量增加至10 μ g/kg,此后CEA水平逐渐降低,表明施用足以实现对于至少维持稳定疾病必需的PEG-hIL-10血清浓度的剂量。

[0398] PEG-hIL-10对转移性肿瘤损伤大小的降低的影响

[0399] 评估了PEG-hIL-10对具有三种原发性肿瘤类型(黑素瘤、RCC和CRC)之一的患者中的转移性损伤的影响。对于每名患者,在PEG-hIL-10处理(20 μ g/kg PEG-hIL-10SC QD)的过程中使用计算机断层摄影术(CT)成像测定转移性损伤大小(体积)的百分比变化(图7A-C中每个的左图)。测量每名患者的PEG-hIL-10血清浓度,并与上文测定的EC50值(图7A-C中每个的右图)进行比较。

[0400] 在黑素瘤患者中,在疗法过程中测量两个肺转移损伤、两个淋巴结转移损伤和五个肝转移损伤的大小。如图7A的左图中描绘,肝脏损伤对治疗最具响应性。图7A的右图描绘了在开始治疗后的各个时间测定的IL-10血清浓度。在测量它的每个时间点时,血清浓度大于10ng/mL,并且它在那些时间点的每个时超过EC50值。

[0401] 在RCC患者中,在疗法的第7周测量了两个肺转移损伤和一个骨骼转移损伤的大小。如图7B的左图中描绘,两个损伤类型都对治疗有响应,其中一例肺损伤大小减小24%。图7B的右图描绘了在开始治疗后的各个时间测定的IL-10血清浓度。在测量它的每个时间点时,血清浓度大于10ng/mL,并且它在那些时间点的每个时超过EC50值。

[0402] 在CRC患者中,在疗法的第7周测量了四个肺转移损伤和两个肝转移损伤的大小。如图7C的左图中描绘,每个肺损伤对治疗都有响应,肝脏损伤中的一例大小保持稳定。图7C的右图描绘了在开始治疗后的各个时间测定的PEG-hIL-10血清浓度。在测量它的每个时间点时,血清浓度大于10ng/mL,并且它在那些时间点的每个时超过EC50值。

[0403] PEG-hIL-10在黑素瘤和肾细胞癌患者中的效果

[0404] 评估了对具有两种类型的实体瘤(黑素瘤或肾细胞癌)之一的患者施用不同量的PEG-hIL-10的效果。在黑素瘤给药分组中,在表19中所示的周数中对一名患者每日每剂(1、5、20和40 μ g/kg) SC施用PEG-hIL-10。在肾细胞癌给药分组中,在表19中所示的周数中每天对两名患者以每剂量2.5 μ g/kg和一名患者各以每剂量5、10和20 μ g/kg SC施用PEG-hIL-10。对于大多数患者,继续给药超出指定的周数。

[0405] 通过计算机断层摄影术(CT)检查以定义的间隔(例如,约每7-8周)评估对PEG-hIL-10治疗的肿瘤响应,尽管对于诸如确认响应或进展等目的必要的话进行更短的间隔随访(例如4周)。通过免疫相关响应标准(irRC)评估每名患者的肿瘤负荷的百分比变化,所述免疫相关响应标准是一种用免疫治疗剂测定响应模式的常用方法(参见例如Wolchok等人, Clin.Cancer Res.15(23):7412-20(2009年12月1日))。在表19中,列出的百分比是“最佳响应”,其不包括后来的进展;举例而言,对于在8周时导致41%肿瘤响应的接受2.5 μ g/kg

PEG-hIL-10的RCC患者,患者具有14周时49%的响应、22周时62%的响应和28周时85%的响应。

[0406] 表19

总体肿瘤响应*						
剂量分组 ($\mu\text{g/kg}$)	1	2.5	5	10	20	40
黑素瘤	在约 8 周时 26%		在约 8 周时 35%		在约 20 周时-4% (MX)	在约 43 周时 -57%
RCC		41%和 12%(在 8 周时)	在约 22 周时 4%	在约 8 周时 41% (MX)	在约 32 周时-71%	
* =总体肿瘤负荷中的最佳变化 MX = 混合响应(一些损伤降低)						

[0408] 如表19中列出的数据所示,较高的剂量对于黑素瘤和肾细胞癌给药分组趋向于较高的响应率。这些发现与实现较高的IL-10血清谷浓度(例如 $>10\text{ng/mL}$)以治疗各种肿瘤的需要是一致的。

[0409] 本文描述了本发明的具体实施方案,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。在阅读前述内容后,所公开的实施方案的描述、变化对于本领域技术人员来说可变得显而易见,并且预期熟练技术人员可以适当采用此类变化。因此,意图以与本文具体描述的方式不同的方式实施本发明,并且本发明包括根据适用法律允许的所附权利要求中所述的主题的所有修改和等同方案。此外,除非本文另有说明或根据背景明显矛盾,否则本发明涵盖了其所有可能变化的上述要素的任何组合。

[0410] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请、登录号和其他参考文献通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利申请具体和单独地指明通过引用并入本文一样。

序列表

<110> 阿尔莫生物科技股份有限公司

M·奥夫特

<120> 使用白细胞介素-10治疗疾病和病症的方法

<130> ARM0-014W0

<150> US 62/067,337

<151> 2014-10-22

<160> 29

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 1

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 2

Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg

1 5 10

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 3

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu

1 5 10 15

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu

20 25

<210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 4

Lys Ala Leu Ala Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala

1 5 10 15

Leu Ala Lys His Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Cys Glu

20 25 30

Ala

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 5

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys

1 5 10 15

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 6

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 7

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 8

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 9

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 10

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10

<210> 11

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 11

Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala

1 5 10 15

Tyr Ser

<210> 12

<211> 6

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 12
Arg Gly Val Phe Arg Arg
1 5
<210> 13
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 13
Arg Gly Arg Arg
1
<210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 14
Arg Lys Arg Lys Lys Arg
1 5
<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 15
Arg Lys Lys Arg
1
<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的多肽序列

<400> 16

Arg Arg Arg Lys Lys Arg

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5) .. (5)

<223> 该残基可重复至少一次

<400> 17

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 该残基可重复至少一次

<400> 18

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (1)

<223> 该残基可重复至少一次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 该残基片段可重复不止一次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> 该残基可重复至少一次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3) .. (3)
<223> 该残基可重复至少一次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4) .. (4)
<223> 该残基可重复至少一次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> 该残基可重复至少一次
<400> 19
Gly Ser Gly Ser Gly
1 5
<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1) .. (5)
<223> 该残基片段可重复至少一次
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5) .. (5)
<223> 该残基可重复至少一次
<400> 20

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (5)

<223> 该残基片段可重复至少一次

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 该残基可重复至少一次

<400> 21

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的多肽序列

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (4)

<223> 该残基片段可重复至少一次

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4) .. (4)

<223> 该残基可重复至少一次

<400> 22

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 23
Gly Gly Ser Gly
1
<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 24
Gly Gly Ser Gly Gly
1 5
<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 25
Gly Ser Gly Gly Gly
1 5
<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列
<400> 26
Gly Gly Gly Ser Gly
1 5
<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的多肽序列

<400> 27

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 28

<211> 178

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val

1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His

20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu

50 55 60

Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys

65 70 75 80

Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro

85 90 95

Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu

100 105 110

Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg

115 120 125

Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn

130 135 140

Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu

145 150 155 160

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile

165 170 175

Arg Asn

<210> 29

<211> 178

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 29

Met Pro Gly Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Leu Leu Leu Thr Gly Met

1 5 10 15

Arg Ile Ser Arg Gly Gln Tyr Ser Arg Glu Asp Asn Asn Cys Thr His

[illegible]

人 IL-10 (NP_000563) (SEQ ID NO: 28):

1 mhssallecl vlltgvrasp gqgtqsense thfpgnlpnm lrdlrdafr vktffqmkdq
61 ldnlllkesl ledfkgylgc qalsemiqfy lcevmppaen qdpdikahvn slgenlkltr
121 lrlrrchrfl pckenkskave qvknafnklq ekgiykamse fdifinyiea ymtmkim

小鼠 IL-10 (NP_034678) (SEQ ID NO: 29):

1 mpgsallecl llltgmrir gqysrednne thfpvgqshm llelrtafsq vktffqtkdq
61 ldnilltdsl mqdfkgylgc qalsemiqfy lvevmppaek hgpeikehln slgeklkltr
121 mrlrrchrfl pckenkskave qvksdfnklq dqgykamne fdifinciea ymmikmks

图1

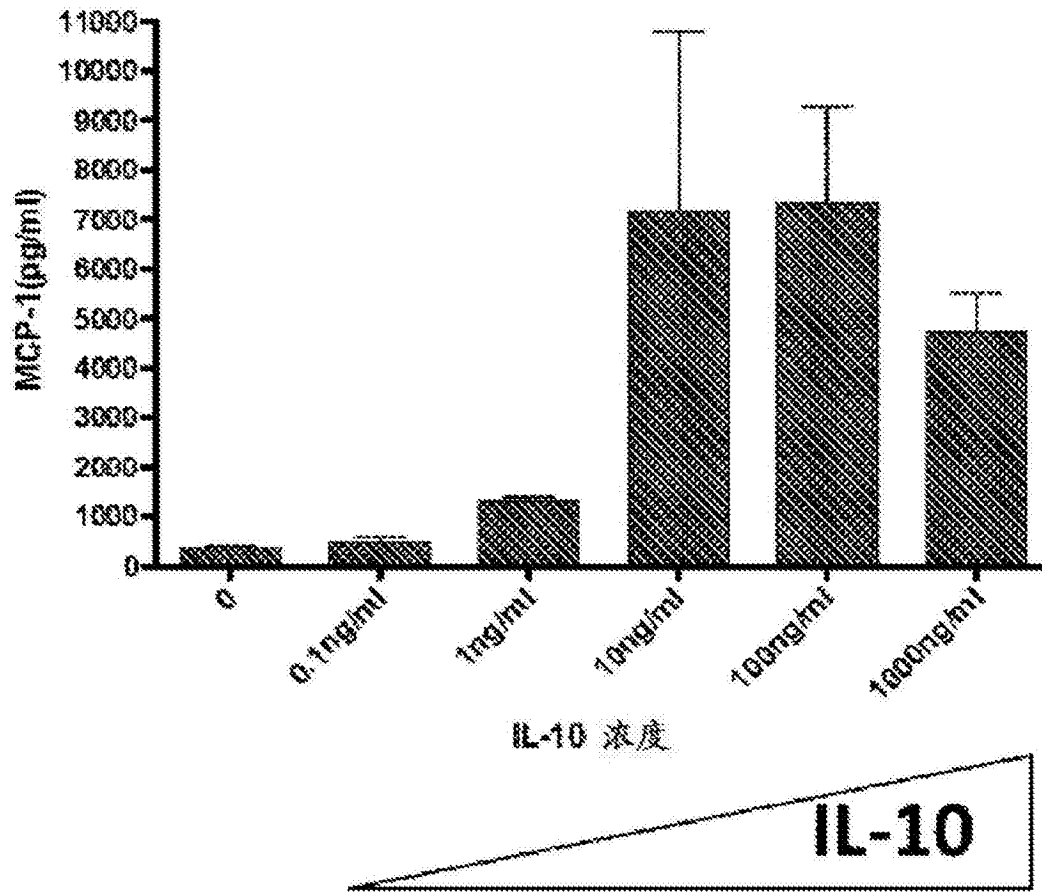
(-)LPS

图2A

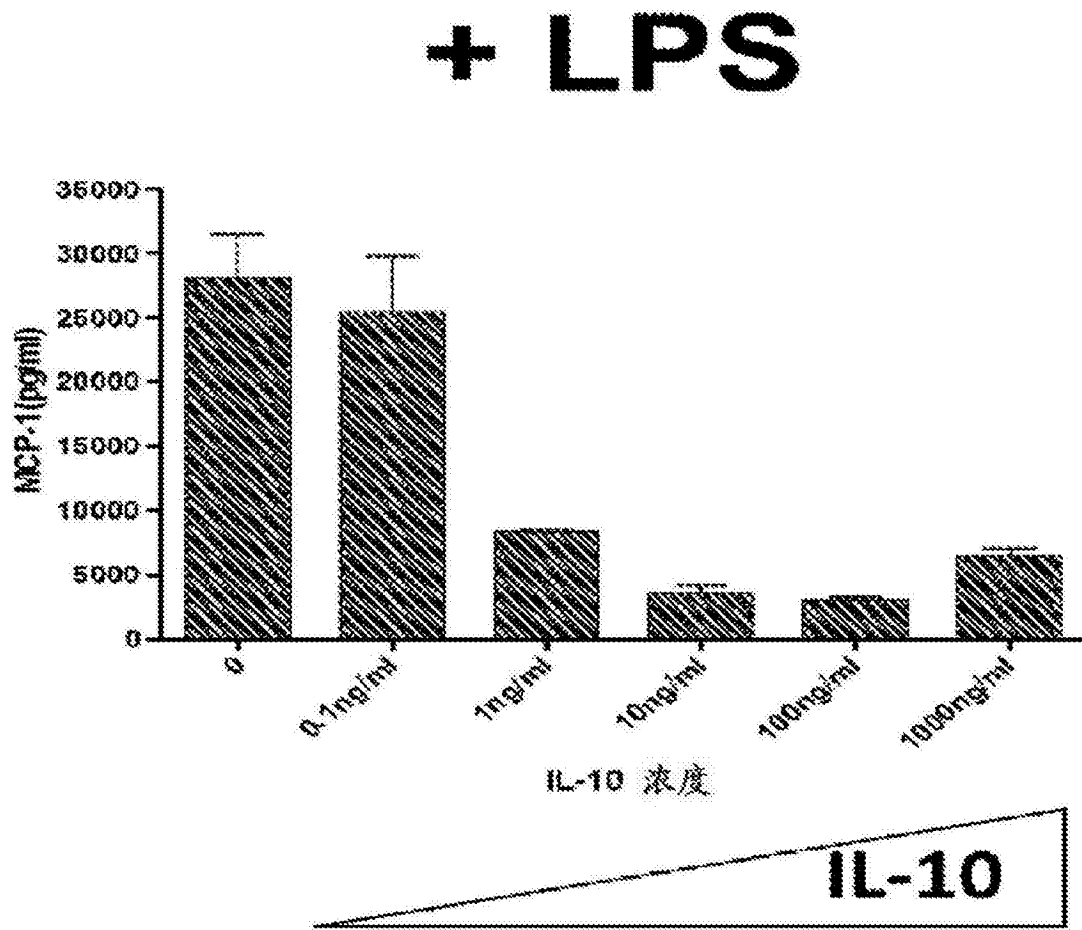


图2B

剂量递增 (µg/kg)	入选 (n)	可评估 irRC (n)	DCR (SD+PR+CR)	肿瘤 类型	肿瘤 负荷 (irRC)	损伤变化	稳定疾病的 持续时间
1	4	3	1 (33%)	卵巢	+16%	+20%; +15%; +16%	退出后8周
2.5	6	5	1 (20%)	肾	+12%	+0.5%; +95%; +18%; +16%; +14%	13 周
5	6	6	2 (33%)	肾	+4%	+3.9%; +15%; -9%	21 周
10	6	5	2 (40%)	结肠	+8%	+2.8%; +4.4%; -0.5%; +1.3%	21 + 周
20	6	5	4 (80%)	结肠	+9%	+22%; -3.2%	8 周
				结肠	+24%	0%; -5.5%; +48%	8 周
				结肠	+18%	0%; -22%; -17%; -7.7%; -6.6%; +47%	8 周
				结肠	+9%	0%; +5.3%; +12%; -2.2%	8 + 周
				黑色素瘤	0%	+42%; +30%; +7%; -4.5%; -87%; -6.2%; -10.5%; -78%; -25%	16 + 周
				肾	-12%	-2.4%; -2.6%; -25%	8 + 周
总计	28	24	10 (42%)				

图3

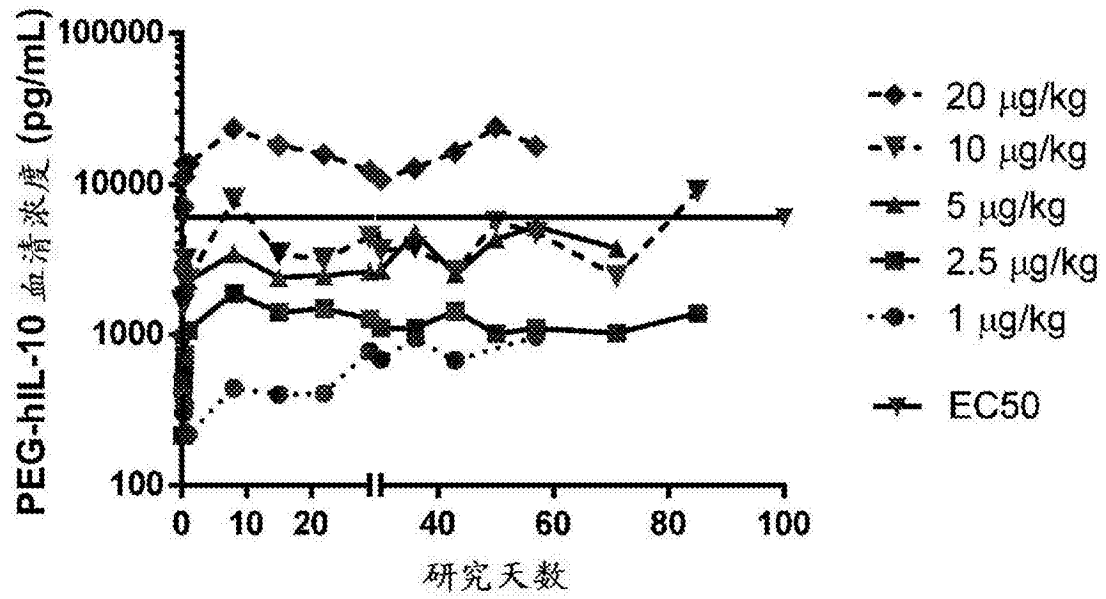


图4

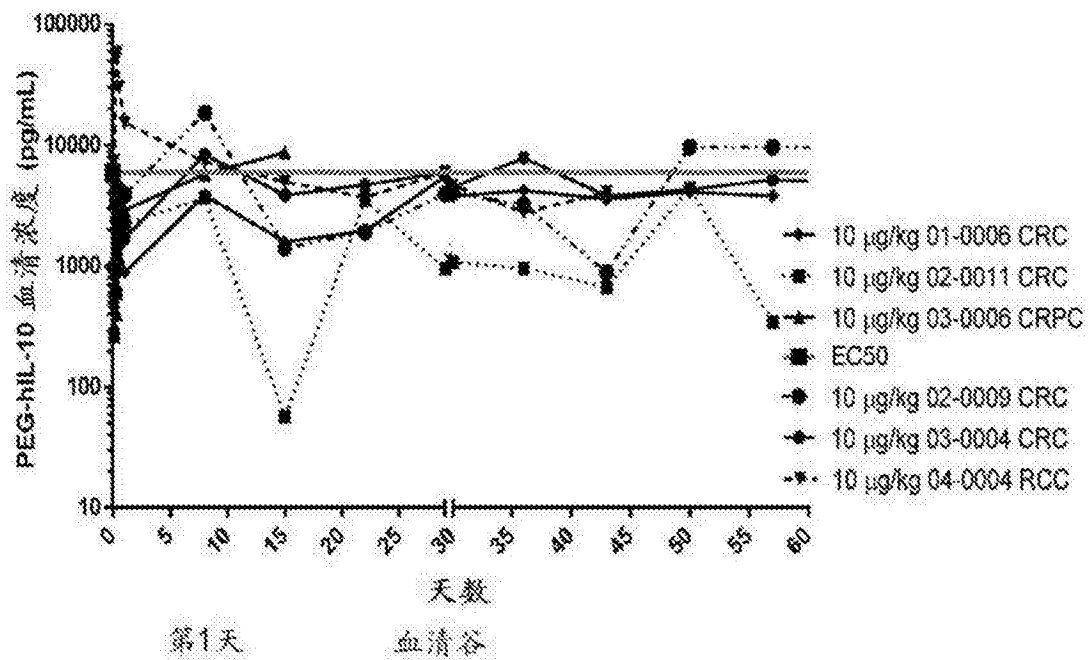


图5A

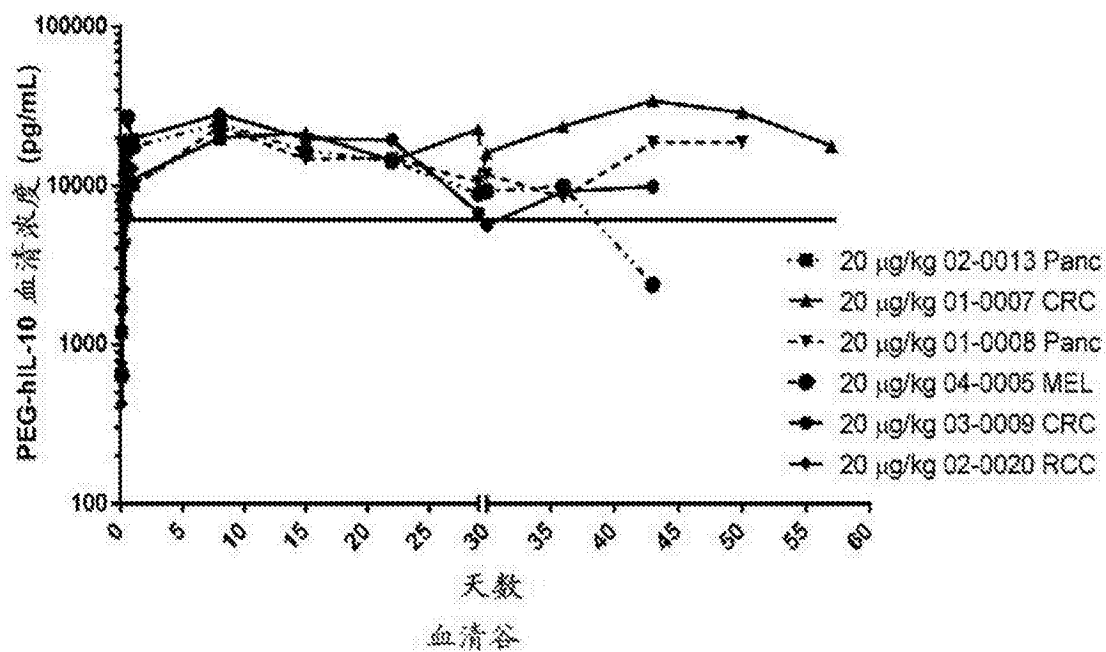


图5B

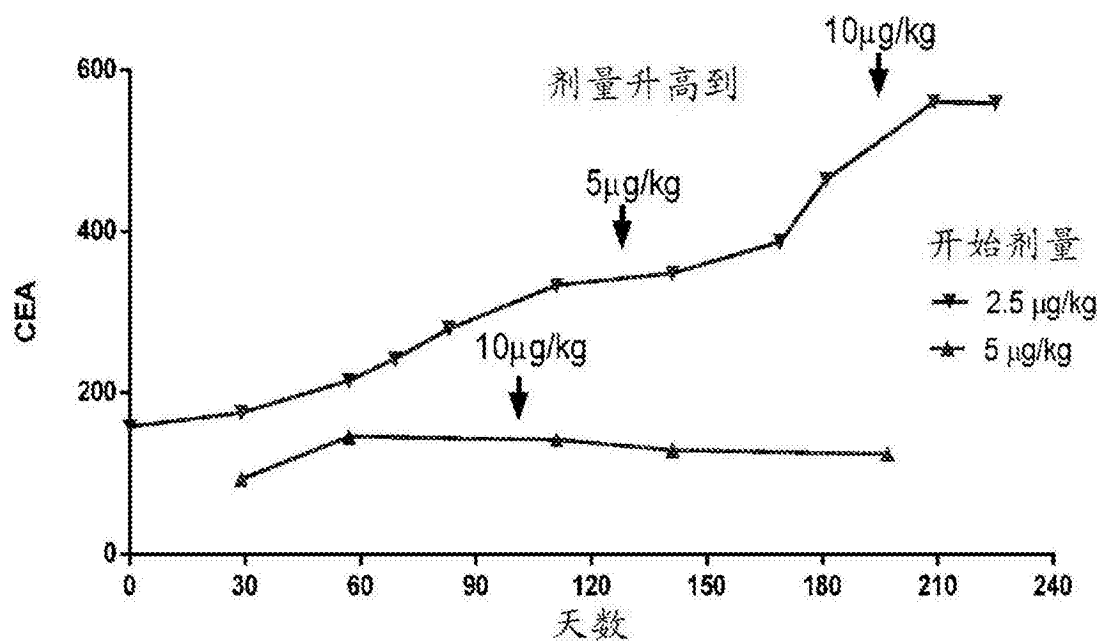


图6

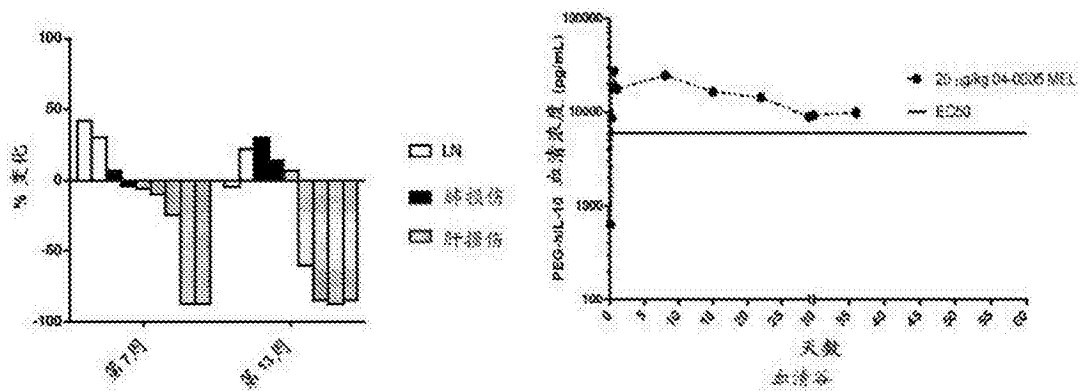


图7A

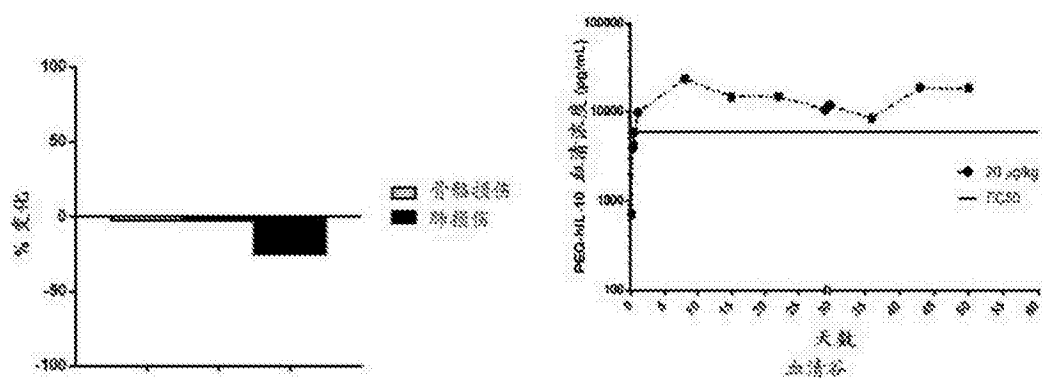


图7B

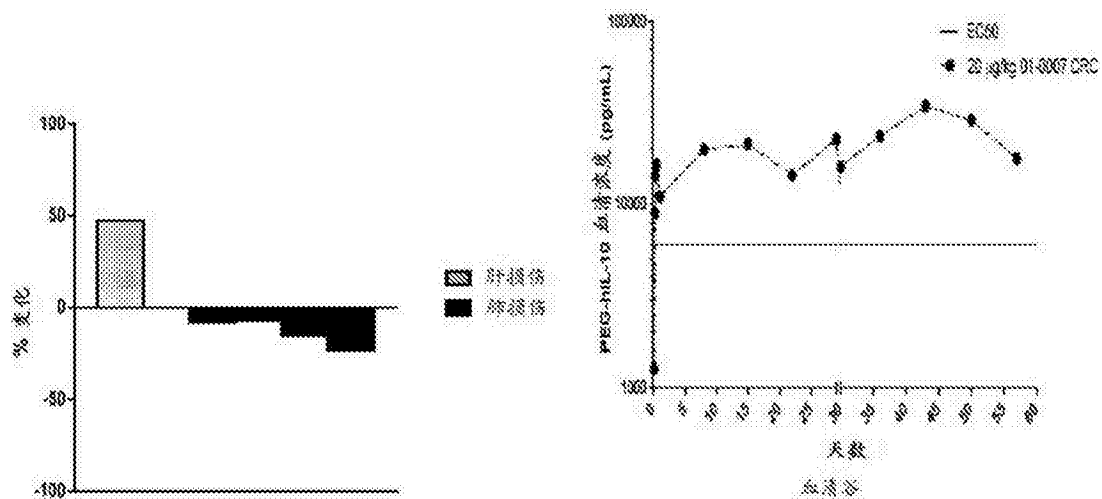


图7C