



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0100133
(43) 공개일자 2018년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/20 (2006.01) A61K 47/60 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/08 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/2066 (2013.01)
A61K 38/208 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7019681
(22) 출원일자(국제) 2016년12월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년07월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/068945
(87) 국제공개번호 WO 2017/120081
국제공개일자 2017년07월13일
(30) 우선권주장
62/275,127 2016년01월05일 미국(US)

(71) 출원인
아르모 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 캘리포니아 94603 레드우드 시티 체사피크
드라이브 575
(72) 발명자
뎀 존 브라이언
미국 캘리포니아 94022 로스 알토스 힐즈 페이지
밀 로드 12121
찬 이반 호
미국 캘리포니아 94063 레드우드 시티 베라 애비
뉴 124에이
(74) 대리인
장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 73 항

(54) 발명의 명칭 질환 및 장애를 치료하기 위한 인터류킨-10을 사용하는 방법

(57) 요약

IL-12 제제와 병용된 PEG-IL-10의 투여를 통해 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 갖는 대상체를 치료하거나, 상기 질환, 장애 또는 병태의 발병을 예방하는 방법.

대표도 - 도1

인간 IL-12, 섹 A (승인 번호 1F45_A) - 306 아미노산 잔기

```
1 iwelkkdvyy veldwydpap gemvvlctdt peedgitwtl dqssevlsg ktltiqvkef
61 gdagqytchk ggevlshsl1 llhkkgdgiw stdilkdqke pknktflrce aknysgrftc
121 wwlttistdl tfsvkssrgs sdpggvtcga atlsaervrg dnkeyeysve cqedasacpaa
181 eeslpievmv davorhkyen ytssffirdi ikpdpknlg lkplknsrqv evsweypdtw
241 stphsyfslt fcvqvqgksk rekkdrvftd ktsatvicrk nasisvraqd ryyssswsew
301 asvpcs
```

인간 IL-12, 섹 B (승인 번호 1F45_B) - 197 아미노산 잔기

```
1 rnlpvatpdp gmfpclhhsq nllravsnml qkarqtleyf pctseeidhe ditkdktstv
61 eacplpeltk nesclnsret sfitngscla srktsfmmal clssiyedlk myqvefktmn
121 akllmdpkrq ifldqnmav idelmqaln nsetvpqkss leepdfyktk iklcillhaf
181 riravtidrv msylnas
```

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/08 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게

- a) 치료학적 유효량의 IL-12 제제, 및
- b) 치료학적 유효량의 PEG-IL-10을 투여함을 포함하고;

여기서, PEG-IL-10의 양은 IL-12 단독치료요법을 사용하여 관찰된 것 보다 적은 수준으로 IL-12-연관 독성을 감소시키기에 충분한, 방법.

청구항 2

대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게

- a) 치료학적 유효량의 IL-12 제제; 및
- b) 치료학적 유효량의 PEG-IL-10을 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 양은 i) 적어도 1.0 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 성취하고, ii) 상기 IL-12 - 연관 독성을 IL-12 단독치료요법으로 관찰된 것 보다 적은 수준으로 감소시키기에 충분한, 방법.

청구항 3

대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게

- a) 치료학적 유효량의 IL-12 제제; 및
- b) 치료학적 유효량의 PEG-IL-10을 투여함을 포함하고, 여기서, 상기 양은:
 - i) 기간 경과에 따른 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 유지하고 (여기서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 1.0 ng/mL이고, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 기간의 적어도 90% 동안 유지된다);
 - ii) 상기 IL-12 단독치료요법을 사용하여 관찰된 것 보다 적은 수준으로 IL-12-연관 독성을 감소시키기에 충분한, 방법.

청구항 4

청구항 2 또는 3에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 2.5 ng/mL인, 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 5.0 ng/mL인, 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 7.5 ng/mL인, 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 10.0 ng/mL인, 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 15.0 ng/mL인, 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 적어도 20.0 ng/mL인, 방법.

청구항 10

청구항 3에 있어서, 상기 기간이 적어도 12 시간인, 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 기간이 적어도 24 시간인, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 기간이 적어도 48 시간인, 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 기간이 적어도 72 시간인, 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 기간이 적어도 1주인, 방법.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 기간이 이 적어도 2 주인, 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 기간이 적어도 1개월인, 방법.

청구항 17

청구항 3에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 상기 기간의 적어도 95% 동안 유지되는, 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 상기 기간의 적어도 98% 동안 유지되는, 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도가 상기 기간의 100% 동안 유지되는, 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 성숙한 인간 IL-10을 포함하는, 방법.

청구항 21

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 성숙한 인간 IL-10의 변이체를 포함하고, 상기 변이체가 성숙한 인간 IL-10의 활성화에 상응하는 활성을 나타내는, 방법.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 양이 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 20.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 23

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 양이 11.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 19.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 24

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 양이 12.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 18.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 25

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 양이 13.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 17.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 26

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 양이 14.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 16.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 27

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 양이 약 15.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 28

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 29

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 0.05 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 9.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 30

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 0.1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 31

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 0.1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 9.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 32

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 0.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 8.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 33

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 1.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 34

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 1.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 8.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 35

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 1.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 7.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 36

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 2.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 7.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 37

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 2.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 6.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 38

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 3.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 6.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 39

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 3.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 5.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 40

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 4.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 5.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 41

청구항 1 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12제제의 양이 약 4.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 인, 방법.

청구항 42

청구항 1 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 IL-10의 적어도 하나의 서브유니트의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 1 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 모노-페길화되고 디-페길화된 IL-10의 혼합물을 포함하는, 방법.

청구항 44

청구항 42 또는 43에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 PEG 성분이 약 5kDa 내지 약 20kDa의 분자량을 갖는, 방법.

청구항 45

청구항 42 또는 43에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 PEG 성분이 약 20kDa 초과인 분자량을 갖는, 방법.

청구항 46

청구항 42 또는 43에 있어서, 상기 PEG-IL-10의 PEG 성분이 적어도 약 30kD의 분자량을 갖는, 방법.

청구항 47

청구항 1 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12 제제가 성숙한 인간 IL-12인, 방법.

청구항 48

청구항 1 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-12 제제가 성숙한 인간 IL-12의 변이체이고, 상기 변이체가 성숙한 인간 IL-12의 활성화에 상응하는 활성을 나타내는, 방법.

청구항 49

청구항 1 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암-관련 질환, 장애 또는 병태가 고형 종양 또는 림프종인, 방법.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 고체 종양이 유방암, 전립선암, 폐암, 간암, 췌장암, 뇌암, 위암, 난소암, 신장암, 고환암 및 흑색종으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 51

청구항 1 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암-관련 질환, 장애 또는 병태가 면역-불감성 종양인, 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 면역-불감성 종양이 결장암, 위식도암, 췌장암 및 유방암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 53

청구항 1 내지 52 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 효과가 부가적인, 방법.

청구항 54

청구항 1 내지 52 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 효과가 상승작용적인, 방법.

청구항 55

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 적어도 하루 2회 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 56

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 적어도 하루 1회 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 57

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 적어도 72시간 마다 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 58

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 적어도 1주 1회 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 59

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 적어도 2주 마다 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 60

청구항 1 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG-IL-10이 적어도 1개월 1회 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 61

청구항 1 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제를 투여함을 추가로 포함하는 방법.

청구항 62

청구항 61에 있어서, 상기 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제가 화학치료학적 제제인, 방법.

청구항 63

청구항 1 내지 62 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체가 인간인, 방법.

청구항 64

청구항 1 내지 63 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 비경구 주사에 의한 것인, 방법.

청구항 65

청구항 64에 있어서, 상기 비경구 주사가 피하 주사인, 방법.

청구항 66

청구항 1 내지 65 중 어느 한 항의 일정 양의 PEG-IL-10 및 IL-12 제제, 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 상기 부형제가 등장성 주사 용액인, 약제학적 조성물.

청구항 68

청구항 66에 있어서, 상기 조성물이 인간 투여를 위해 적합한, 약제학적 조성물.

청구항 69

청구항 66 내지 68 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 70

청구항 67 내지 69 중 어느 한 항의 약제학적 조성물을 포함하는 멸균 컨테이너.

청구항 71

청구항 70에 있어서, 상기 멸균 컨테이너가 시린지인, 멸균 컨테이너.

청구항 72

청구항 70 또는 71의 멸균 컨테이너를 포함하는 키트.

청구항 73

청구항 72에 있어서, 적어도 하나의 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제를 포함하는 제2 멸균 컨테이너를 추가로 포함하는, 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 1월 5일자로 출원된 미국 가출원 일련 번호 제62/275,127호에 대한 우선권을 주장하고 이의 기재내용은 이의 전문이 참조로 인용된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 암 및 면역-관련 장애를 포함하는 다양한 일련의 질환 및 장애의 치료또는 예방에서 다른 제제와 병용하여 PEG-IL-10을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 사이토카인 인터류킨-10 (IL-10)은 T 세포, B 세포, 대식세포 및 항원 제공 세포 (APC)에 대한 작용을 통해 다수의 면역 반응을 조절하는 다면발현성 사이토카인이다. IL-10은 활성화된 단핵구 및 활성화된 대식세포에서 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF 및 G-CSF의 발현을 억제함에 의해 면역 반응을 억제할 수 있고 이것은 또한 NK 세포에 의한 IFN- γ 생성을 억제한다. IL-10은 주로 대식세포에서 발현되지만, 발현은 또한 활성화된 T 세포, B 세포, 비만 세포 및 단핵구에서 검출되었다. 면역 반응을 억제하는 것뿐만 아니라, IL-10은 IL-2- 및 IL-4-처리된 흉선세포의 증식을 자극하고, B 세포의 생존력을 증진시키고 MHC 부류 II의 발현을 자극함을 포함하는 면역-자극 성질을 나타낸다.

[0006] 인간 IL-10은 2개의 단량체 서브유닛 간의 비-공유 상호작용의 붕괴시 생물학적으로 불활성이 되는 동종이량체이다. IL-10의 공개된 결정 구조로부터 수득된 데이터는 기능성 이량체가 IFN- γ 와 특정 유사성을 나타냄을 명시한다(문헌참조: Zdanov 등, (1995) Structure (Lond) 3: 591-601).

[0007] 다면발현성 활성의 결과로서, IL-10은 염증 병태, 면역-관련 장애, 섬유성 장애, 대사 장애 및 암을 포함하는, 광범위한 질환, 장애 및 병태와 연계되어 있다. 다수의 상기 질환, 장애 및 병태에 대한 IL-10을 사용한 임상 및 임상전 평가는 치료학적 잠재력을 확고히 하였다. 더욱이, 폐결화된 IL-10은 특정 치료학적 세팅에서 비-폐결화된 IL-10 보다 더 효능적인 것으로 나타났다.

[0008] 과제의 해결 수단

[0009] 본원 개시내용은 암-관련 질환, 장애 및 병태, 및/또는 이의 증상의 치료 및/또는 예방을 위해 IL-12 제제 (예를 들어, rHuIL-12), 및 이의 조성물과 병용된 PEG-IL-10 (예를 들어, rHuPEG-IL-10) 및 이의 조성물을 사용하

는 방법을 고려한다. 상기 방법은 본원에 기재된 암-관련 질환, 장애 및 병태의 치료 및/또는 예방에서 부가적, 및 아마 또는 상승작용 효과에 대한 기회를 제공한다. 더욱이, 상기 병용 요법은 흔히 이것이 병용되는 경우 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제의 투여량 및/또는 횟수를 감소시킬 수 있어, 임의의 부작용을 최소화하거나 제거할 수 있다. 병용 요법은 PEG-IL-10 및 IL-12 제제가 별도로 (예를 들어, 2개의 구분된 약제학적 조성물) 또는 함께 (예를 들어, PEG-IL-10 및 IL-12 제제 둘 다를 포함하는 하나의 약제학적 조성물) 투여되는 경우의 동시 투여를 포함한다.

[0010] 본원에서 상세히 논의된 바와 같이, IL-10은 IFN γ , IL-12 및 TNF α 의 분비를 억제하는 항-염증 및 면역-억제 사이토카인 것으로 간주된다. 이것은 또한 CD4⁺ T 세포의 항원 제공 및 후속적 활성화를 억제하고 따라서 광범위하게 강력한 면역 억제 사이토카인 것으로 간주된다. 다양한 암 환자 집단을 포함하는 임상 연구에서, 면역치료요법으로서 PEG-IL-10의 피하 투여는 이러한 결과를 나타내었다.

[0011] 특히, 최근 증거는 면역종양학과 관련하여 면역자극 효과를 나타냄을 지적한다(Infante, J.R., 등, ASCO Meeting Abstracts, 2015. 33(15_suppl): p. 3017). 상기 항-종양 효과의 특이적 기작의 이해가 본원의 개시내용을 수행하는데 요구되지 않지만, 상기 효과는 CD8⁺ T 세포 및 내인성 IFN γ 둘 다를 요구하는 것으로 나타났다(Mumm, J.B., 등, Cancer Cell, 2011. 20(6): p. 781-96; Emmerich, J., 등, Cancer Res, 2012. 72(14): p. 3570-81). 구체적으로, PEG-IL-10으로의 CD8⁺ T 세포 노출은 IFN γ , 그랜자임 B 및 퍼포린 분비의 제공을 유도한다. IFN γ 및 그랜자임 B 둘 다의 분비는 동족 MHC I/항원 복합체와 함께 T 세포 수용체 관여에 의존한다(Chan, I.H., 등, J Interferon Cytokine Res, 2015).

[0012] PEG-rHuIL-10을 사용한 인간 암 환자의 치료는 그랜자임 B⁺ 종양내 CD8⁺ T 세포 침윤에서 실질적 증가를 특징으로 하는 실질적 단독치료요법 항-종양 반응을 유도한다. 상기 활성화된 CD8⁺ 종양내 T 세포 침윤물과 동시에 혈청 사이토킨 IFN γ , IL-18, IL-7, IL-4, GM-CSF 및 활성화된 T 세포 마커 FasL에서 재현가능한 증가가 있다. 추가로, PEG-rHuIL-10을 사용한 치료는 혈청 TGF- β 를 감소시킨다. 이들 사이토킨은 광범위 면역 활성화의 특징이다.

[0013] 인간 IL-10은 동종이량체이고 각각의 단량체는 178개의 아미노산을 포함하고 이의 처음 18개 아미노산은 신호 펩티드를 포함한다. 달리 명시되지 않는 경우, 본원에서 인간 IL-10에 대한 언급은 신호 펩티드가 없는 성숙한 형태를 언급하고, 여기서, 각각의 단량체는 160개 아미노산을 포함한다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 번호 6,217,857). 본원에 사용된 바와 같은 용어 “PEG-IL-10”은 폐결화된 유리 IL-10 및 폐결화된 형태의 다른 IL-10 오토로그와 같은, 성숙한 인간 PEG-IL-10의 활성화에 상응하는 활성을 나타내는 폐결화된 인간 IL-10 및 이의 변이체를 언급한다.

[0014] 인터류킨-12 (IL-12)는 항원성 자극에 응답하여 대식세포, B-림프아구성 세포, 수지상 세포 및 호중구에 의해 천연적으로 생성되는 다면발현성 사이토카인이다. 이것은 순수 T 세포의 Th1 세포로의 분화에 관여하여 T 세포의 성장 및 기능을 자극할 수 있고 NK 세포 및 CD8⁺ 세포독성 T 림프구의 세포독성 활성화의 증진을 매개한다. 본원에서 추가로 논의된 바와 같이, IL-12는 또한 T 세포 및 NK 세포로부터 IFN γ 및 TNF α 의 생성을 자극하고 IFN γ 의 IL-4 매개된 억제를 감소시킨다. IFN γ 는 항암 방어 of 천연 기작에 협력하는 것으로 나타났다(Jakobisiak, M. 등 (2013) Immunol Lett 90: 103-22). 부분적으로 IFN γ 생성의 강력한 자극으로 인해, IL-12는 처음으로 종양 면역치료요법에 대해 이상적인 후보물을 나타내는 것으로 사료된다. 그러나, 초기 임상 연구 동안에 IL-12의 전신 투여는 매우 좁은 치료학적 지수를 산출하였고 허용되지 않는 역효과 프로필을 유도하였다. 결과로서, 종양학 세팅에서 면역치료요법으로서 IL-12의 전신 투여는 대체로 실행가능하지 않은 것으로서 간주되었다. (문헌참조: 예를 들어, Teng, M. 등 (2015) Nature Medicine 21(7): 719-29).

[0015] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “IL-12”, “IL-12 폴리펩티드(들)”, “IL-12-제제(들)”, “IL-12 분자(들)” 등은 광범위하게 해석되는 것으로 의도되고 예를 들어, 리더 서열 (예를 들어, 신호 펩티드)을 갖는 IL-12 폴리펩티드 뿐만 아니라 동족체, 변이체 (뮤테인을 포함하는), 및 이의 단편을 포함하는, 예를 들어, 인간 및 비-인간 IL-12-관련 폴리펩티드를 포함한다.

[0016] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 고려하고, 상기 방법은 a) 치료학적 유효량의 IL-12 제제, 및 b) 치료학적 유효량의 PEG-IL-10을 대상체에게 투여함을 포함하고; 여기서, 상기 PEG-IL-10의 양은 IL-12 -관련 독성을 IL-12 단독치료요법을 사용하여 관찰된 것 미만의 수준으로 감소시키기에 충분하다.

[0017] IL-12 - 관련 독성은 감기 유사 증상 (예를 들어, 두통, 열, 한기, 피로 및 근관절통); 혈구 백감소증 및 혈소

관 감소증을 포함하는 혈액학적 독성; 및 트랜스아미나제의 용량-의존적 증가에 의해 나타나는 간 독성, 고빌리루빈혈증, 및 저알부민혈증을 포함한다. 다른 IL-12 관련 역효과는 점액성 막의 염증 (예를 들어, 경구 점막염, 구내염 및 대장염), 저혈압, 신장 손상 및 위장 출혈을 포함한다. 이들 독성 효과는 다른 사이토킨 (예를 들어, IP-10 및 MIG) 뿐만 아니라 IFN γ 및 TNF α 의 2차 생성과 관련되었다. (문헌참조: 예를 들어, Lasek, 등 (2014) Cancer Immunol Immunother 63:419-35; Xu, 등 Clinical and Developmental Immunology, volume 2010, Article ID 832454, 9 pp.); Cebon, J., 등, Cancer Immun, 2003. 3: p. 7).

[0018] 다른 구현예에서, 본원의 개시내용은 대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 고려하고, 상기 방법은 a) 치료학적 유효량의 IL-12 제제, 및 b) 치료학적 유효량의 PEG-IL-10을 대상체에게 투여함을 포함하고; 여기서, 상기 PEG-IL-10의 양은 i) 적어도 1.0ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 성취하고, ii) IL-12 -관련 독성을 IL-12 단독치료요법을 사용하여 관찰된 것 미만의 수준으로 감소시키기에 충분하다.

[0019] 여전히 추가의 구현예에서, 본원의 개시내용은 대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 고려하고, 상기 방법은 a) 치료학적 유효량의 IL-12 제제, 및 b) 치료학적 유효량의 PEG-IL-10을 대상체에게 투여함을 포함하고; 여기서, 상기 양은 i) 특정 기간 동안 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 유지하고 (여기서, 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 1.0ng/mL이고 상기 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 특정 시기의 적어도 90% 동안 유지된다), ii) IL-12 -관련 독성을 IL-12 단독치료요법을 사용하여 관찰된 것 미만의 수준으로 감소시키기에 충분하다.

[0020] 목적하는 IL-10 혈청 최저 농도는 질환, 장애 또는 병태 (예를 들어, 국소화된 종양 또는 전이성 질환)의 특성, 대상체가 병을 앓는 정도 (예를 들어, 조기 대 후기 단계 질환), 병용 요법이 투여되는지 및 환자-특이적 파라미터 (예를 들어, 간 및 신장 기능)를 포함하는 다수의 인자에 의존할 수 있다. 예를 들어, PEG-IL-10 및 화학 치료학적 제제의 동시 투여는 임상적 이득을 관찰하기 위해 ~1-2 ng/mL 범위내 혈청 최저만을 요구할 수 있고, 전이성 암은 상응하는 임상적 이득을 성취하기 위해 6-10 ng/mL 이상을 요구할 수 있다 (문헌참조: 예를 들어, WO 2014/172392). 당업자가 인지하는 바와 같이, 목적하는 혈청 최저 수준은 전후사정 의존성 (예를 들어, 특이적 암의 특징)이고 환자-특이적이다.

[0021] 따라서, 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 1.0 ng/mL, 적어도 1.5 ng/mL, 적어도 2.0 ng/mL, 적어도 2.5 ng/mL, 적어도 3.0 ng/mL, 적어도 3.5 ng/mL, 적어도 4.0 ng/mL, 적어도 4.5 ng/mL, 적어도 5.0 ng/mL, 및 적어도 5.5 ng/mL, 적어도 6.0 ng/mL, 적어도 6.5 ng/mL, 적어도 7.0 ng/mL, 적어도 7.5 ng/mL, 적어도 8.0 ng/mL, 및 적어도 9.0 ng/mL, 적어도 10.0 ng/mL, 적어도 11.0 ng/mL, 적어도 12.0 ng/mL, 적어도 13.0 ng/mL, 적어도 14.0 ng/mL, 적어도 15.0 ng/mL, 적어도 16.0 ng/mL, 적어도 17.0 ng/mL, 적어도 18.0 ng/mL, 적어도 19.0 ng/mL, 적어도 20.0 ng/mL, 적어도 21.0 ng/mL, 적어도 22.0 ng/mL, 또는 22.0 ng/mL 초과이다.

[0022] 추가 구현예에서, 기간은 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 6주, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 또는 3개월 초과이다.

[0023] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 기간의 적어도 85 %, 기간의 적어도 90 %, 적어도 92.5 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 적어도 99 % 또는 100 % 동안 유지된다.

[0024] 특정 안정 상태의 혈청 최저 농도를 유지하기에 충분한 투여 용법이 고려되고 (예를 들어, 2.0 ng/mL) 이것은 목적하는 안정 상태의 혈청 최저 농도 보다 높은 초기 혈청 최저 농도를 유도할 수 있다. 포유동물 대상체에서 IL-10의 약력학적 및 약동학적 특성 때문에, 초기 최저 농도 (예를 들어, 하나 이상의 로딩 용량에 이어서 일련의 유지 용량의 투여를 통해 성취된다)는 점진적으로 그러나 계속적으로 특정 기간 동안 용량 파라미터 (양 및 횟수)가 일정하게 유지되는 경우에도 감소한다. 특정 기간 후, 점진적이지만 연속적인 감소는 멈추고 안정 상태의 혈청 최저 농도는 유지된다.

[0025] 예를 들어, 하기의 비경구 투여 (예를 들어, SC 및 IV), ~0.1 mg/kg/일의 IL-10 제제 (예를 들어, mIL-10)의 마우스 (예를 들어, C57BL/6 마우스)로의 투여는 예를 들어, 2.0 ng/mL의 안정 상태 혈청 최저 농도를 유지하기 위해 요구된다. 그러나, 상기 안정 상태의 혈청 최저 농도는 0.1 mg/kg/일에서 투여 개시 후 (및 또한 임의의 로딩 투여(들) 후) 대략 30일 때까지 성취될 수 없다. 차라리, 초기 혈청 최저 농도가 성취된 후 (예를 들어, 2.5 ng/mL), 상기 농도는 점진적이지만 연속적으로 예를 들어, 대략 30일 기간의 과정 동안 감소하고, 이 시간 이후 목적하는 안정 상태의 혈청 최저 농도 (예를 들어, 2.0 ng/mL)가 유지된다. 당업자는 예를 들어, ADME 및

환자-특이적 파라미터를 사용하여 목적하는 안정상태의 최저 농도를 유지하기 위해 요구되는 용량을 결정할 수 있다.

- [0026] 본원 개시내용의 PEG-IL-10은 IL-10의 적어도 하나의 서브유닛의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된 적어도 하나의 PEG 분자를 포함하거나 다른 구현예에서 모노-페길화된 IL-10과 디-페길화된 IL-10의 혼합물 (예를 들면, 1:1)을 포함할 수 있다. PEG-IL-10의 PEG 성분은 약 5 kDa 초과, 약 10 kDa 초과, 약 15 kDa 초과, 약 20 kDa 초과, 약 30 kDa 초과, 약 40 kDa 초과, 또는 약 50 kDa 초과 분자량을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 분자량은 약 5 kDa 내지 약 10 kDa, 약 5 kDa 내지 약 15 kDa, 약 5 kDa 내지 약 20 kDa, 약 10 kDa 내지 약 15 kDa, 약 10 kDa 내지 약 20 kDa, 약 10 kDa 내지 약 25 kDa 또는 약 10 kDa 내지 약 30 kDa이다.
- [0027] 본원에 명시된 바와 같이, PEG-IL-10은 일부 구현예에서 성숙한 인간 PEG-IL-10이고, 다른 구현예에서 성숙한 인간 PEG-IL-10의 활성화에 상응하는 활성을 나타내는 성숙한 인간 PEG-IL-10의 변이체이다.
- [0028] 본원 개시내용은 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하기 위해 대상체에게 투여되는 병용 요법의 PEG-IL-10 성분의 양이 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 20.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인 구현예를 고려한다. 일부 구현예에서, 투여되는 PEG-IL-10의 양은 12.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 18.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 이다. 일부 구현예에서, 상기 양은 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만이고, 다른 구현예에서 20.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과이다.
- [0029] 본원의 개시내용에 따라, PEG-IL-10은 대상체에서 암-관련 질환, 장애 또는 병태의 치료를 위해 IL-12 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 이전의 질환, 장애 및 병태의 상세한 기재는 본원의 다른 곳에서 제시된다. 일부 구현예에서, 상기 암은 고형 종양, 예를 들어, 유방암, 전립선암, 폐암, 간암, 췌장암, 뇌암, 위암, 난소암, 신장암, 고환암 및 흑색종과 관련된 종양이다. 특정 구현예에서, 상기 암은 혈액학적 장애이고, 이는 B-세포 림프종 또는 백혈병과 같은 림프종을 포함한다.
- [0030] 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, 암-관련 질환, 장애 또는 병태는 면역-불감성 종양이다. 치료학적 면역 조작에 불감성인 종양은 하기의 2개의 특징을 나타내는 것으로서 기재될 수 있다: 1) 면역계의 활성 억제, 및 2) 이의 치료로부터 비롯되는 면역-억제 기작의 동시 활성화를 수반하는 염증 반응(Galon 등 (July 25 2013) Immunity 39:11-26 (PubMed PMID: 23890060)). 면역-불감성 종양의 예는 결장암, 위식도암, 췌장암 및 유방암을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 치료학적 효과는 부가적이고 다른 구현예에서 이들은 상승작용적이다.
- [0032] PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 임의의 효과적인 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들은 피하 주사를 포함하는 비경구 주사에 의해 투여된다. 특정 구현예에서, PEG-IL-10은 IL-12 제제와 별도로 투여되고 다른 구현예에서 PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 함께 투여된다. 본원에 지적된 바와 같이, 본원 개시내용의 목적을 위해 PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 별도로 또는 함께 투여되는 경우 또는 하나 이상의 전달 수단 (예를 들어, 바이알, IV 백 또는 시린지)으로 투여되는 경우 동시 투여되는 것으로 간주된다.
- [0033] 상기 주지된 바와 같이, 본원의 개시내용의 조합 치료요법에 사용하기 위한 다양한 유형의 IL-12 제제는 인간 및 비-인간 IL-12-관련 폴리펩타이드를 포함하고 이는 동족체, 변이체 (뮤테인을 포함하는) 및 이의 단편을 포함한다. 본원에서는 또한 활성 이중이성체 (p70) 뿐만 아니라 IL-12 복합체의 기능적 활성 성분이 고려된다. 일부 구현예에서, IL-12 펩타이드는 306 아미노산 잔기 인간 IL-12A 폴리펩타이드 및/또는 197 아미노산 잔기 인간 IL-12B 폴리펩타이드의 적어도 85%, 적어도 87%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%를 갖는다. 다른 구현예에서, IL-12 펩타이드는 306 아미노산 잔기 인간 IL-12A 폴리펩타이드 및/또는 197 아미노산 잔기 인간 IL-12B 폴리펩타이드와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다.
- [0034] 본원에 지적된 바와 같이, 상기 IL-12 제제는 일부 구현예에서 성숙한 인간 IL-12이고, 다른 구현예에서 IL-12 제제는 성숙한 인간 IL-12의 활성화에 상응하는 활성을 나타내는 성숙한 인간 IL-12의 변이체이다.
- [0035] 또한 본원에서 암 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하기 위해 대상체에게 투여되는 조합 치료요법의 IL-12 제제의 양이 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$, 0.1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$, 또는 1.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 인 구현예가 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 양은 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만이고, 다

른 구현예에서 10.0 µg/kg/일 초과이다.

[0036] 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 혈청 농도가 피크를 성취하도록 IL-12 제제를 투여하는 것을 고려하고 있어서 이것이 다시 투여되기 전에 필수적으로 측정가능하지 않을 정도로 제거된다. 일부 구현예에서, IL-12 치료는 로딩 용량으로 개시됨에 이어서 일련의 유지 용량이 이어질 수 있고 이는 한정된 간격일 수 있다. 잠재적 독성을 회피하기 위해, 투여는 IL-12 수준이 이의 최대 관용 수준을 초과하지 않도록 조정되어야만 한다. PEG-IL-10의 투여와 관련하여, IL-12 제제의 용량은 다수의 인자들에 의존하고 이는 질환, 장애 또는 병태의 특성(예를 들어, 국소 종양 또는 전이성 질환), 대상체가 병을 앓는 정도(예를 들어, 초기 대 후기 단계 질환), 조합 치료요법이 적용되는지의 여부 및 환자-특이적 파라미터 (예를 들어, 간 및 신장 기능)를 포함한다.

[0037] 본원 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 PEG-IL-10 및 IL-12 제제, 및 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 일부 구현예에서, PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 각각 약제학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 별개의 약제학적 조성물에 존재한다. 일부 구현예에서, 부형제는 등장성 주사 용액이다. 약제학적 조성물은 대상체 (예를 들어, 인간)로의 투여에 적합할 수 있고 하나 이상의 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 약제학적 조성물은 하나 이상의 멸균 컨테이너 (예를 들어, 단일 또는 다중 용도 바이얼 또는 시린지)에 함유된다. 키트는 멸균 용기(들)를 함유할 수 있고, 키트는 또한 적어도 하나의 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제 또는 약제학적 요법에 사용될 수 있는 임의의 다른 제제를 포함하는 하나 이상의 추가의 멸균 용기를 함유할 수 있다. 하나 이상의 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제는 PEG-IL-10 및 IL-12 제제 전, 이와 동시에 또는 이에 후속적으로 투여될 수 있다.

[0038] 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하고/하거나 예방하는 방법과 함께 사용될 수 있는 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제 (또한 본원에 보충제 등으로 언급됨)는 일부 치료학적 이득을 제공할 수 있는 임의의 제제를 포함한다. 예를 들어, 국한되지 않지만, 예방학적 또는 치료학적 제제는 화학치료학적 제제, 면역- 또는 염증-관련 제제, 대사 제제, 항바이러스 제제 또는 항-트롬빈 제제일 수 있다. 본원 개시내용의 방법은 또한 비-약리학적 제제(예를 들어, 방사선)와 병용하여 사용될 수 있다.

[0039] 특정 구현예에서, 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제는 화학치료학적 제제이고이의 예는 본원에 명시되어 있다. 일부 구현예에서, 화학치료학적 제제는 백금 배위 착물로서도 언급되는 백금계 항신생물제이다. 이들 백금계 항신생물제는 DNA를 가교결합시켜 암 세포에서 DNA 복구 및/또는 DNA 합성을 억제한다. 상기 제제의 예는 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴, 피코플라틴, 네다플라틴 및 트리플라틴을 포함한다.

[0040] 본원에 기재된 PEG-IL-10 및 IL-12 제제에 대한 투여 용법을 최적화하기 위한 방법 및 모델은 또한 본원 개시내용의 구현예에 의해 고려된다. 다른 구현예에서, 본원 개시내용은 본원에 기재된 병용 요법에 최적으로 적합한 특정 환자 집단의 동정을 위한 방법을 고려한다. 일부 구현예에서, 특정 바이오마커의 존재 및/또는 정도는 상기 방법에서 활용을 찾을 수 있다.

[0041] 다른 양상 및 구현예는 본원 개시내용을 검토한 후 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 인간 IL-12,쇄 A (서열번호: 1); 및 인간 IL-12,쇄 B (서열번호: 2)의 아미노산 서열을 도시한다.

도 2는 4T1 종양-함유 마우스에서 단독치료요법으로서 또는 조합 치료요법으로서 21일 동안 하루 SC로 투여되는 PEG-rMuIL-10 (1 mg/kg) 및/또는 rMuIL-12 (0.05, 0.1, 또는 0.5 mg/kg)의 효과를 도시한다. 종양 중량은 연구 종료 후 평가하였다.

도 3a 및 3b는 혈청 IFN γ (도 3a) 및 혈청 TNF α (도 3b)에 대해 4T1 종양-함유 마우스에 단독치료요법으로서 또는 조합 치료요법으로서 하루 SC로 투여되는 PEG-rMuIL-10 (1 mg/kg) 및/또는 rMuIL-12 (0.05, 0.1, 또는 0.5 mg/kg)의 효과를 도시한다. 혈청 IFN γ 및 TNF α 수준은 투여 9일 후, 용량 투여 4시간 후 평가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본원 개시내용이 추가로 기재되기 전에, 본원 개시내용이 본원에 기재된 특별한 구현예에 국한되지 않는 것으로 이해되어야 하고, 또한 본원에 사용된 용어는 특별한 구현예만을 기재하기 위한 것이며, 제한적이지는 않음이 이해되어야 한다.

[0044] 값의 범위가 제공되는 경우, 맥락이 명확히 달리 지시하지 않는 한 하한의 단위의 열번째까지, 그 범위의 상한

과 하한 및 그 언급된 범위에서 임의의 다른 언급된 또는 개입 값 사이에서, 각 개입 값이 본 발명 내에서 포함되는 것이 이해된다. 보다 작은 범위의 상한치 및 하한치는 보다 작은 범위에서 독립적으로 포함될 수 있고 또한 본 발명 내에 포함되고 진술된 범위내 임의의 특이적으로 배제된 한계치에 적용된다. 언급된 범위가 한계의 한쪽 또는 양쪽을 포함하는 경우, 상기 포함된 한계의 한쪽 또는 양쪽을 배제한 범위가 본 발명에 또한 포함된다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 이용된 모든 기술 용어와 과학 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0045] 본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같은 단수 형태 “a,” “an,” 및 “the” 는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다는 것을 주시해야 한다. 청구범위가 임의의 선택적인 구성요소를 배제하도록 작성될 수 있다는 것이 추가로 주목된다. 이와 같이, 이 진술은 청구범위 요소의 인용 또는 “부정적인” 제한의 사용과 관련하여 “단독”, “유일한” 등과 같은 이러한 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기준으로서의 역할을 하기 위한 것이다.

[0046] 본원에서 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 이전에 그들의 개시를 위해서만 제공된다. 추가로, 제공된 공개일은 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.

[0047] 개관

[0048] 본원에 기재된 바와 같이, 본원의 발명자들은 특정 조건 및 파라미터 하에 PEG-IL-10 및 IL-12의 동시 투여가 여전히 이의 강력한 항-종양 활성을 유지하면서 IL-12의 원치않는 부작용을 완화시킬 수 있음을 발견하였다. 상기 발견의 관점에서, 본원 개시내용은 암-관련 질환, 장애 및 병태, 및/또는 이의 증상의 치료 및/또는 예방을 위해 IL-12 제제 (예를 들어, rHuIL-12), 및 이의 조성물과 병용하여 PEG-IL-10 (예를 들어, rHuPEG-IL-10) 및 이의 조성물을 사용하는 방법을 고려한다. 상기 방법은 특정 투여 용법을 포함하고 본원에 기재된 장애의 치료 및/또는 예방에서 부가적 또는 상승작용적 효과에 대한 기회를 제공한다.

[0049] 본원 개시내용의 폴리펩티드와 핵산 분자와 관련하여 “인간” 에 대한 임의의 언급은 폴리펩티드 또는 핵산이 수득되는 방식 또는 공급원과 관련하여 제한되는 것으로 의미되지 않고 차라리 이것이 천연의 인간 폴리펩티드 또는 핵산 분자의 서열에 상응할 수 있음으로 단지 상기 서열과 관련된 것으로 주지되어야 한다. 그들을 코딩하는 인간 폴리펩티드 및 핵산 분자 이외에, 본 발명은 IL-10- 및 IL-12-관련 폴리펩티드 및 다른 종으로부터 상응하는 핵산 분자를 고려한다.

[0050] 정의

[0051] 달리 명시되지 않는 한, 다음 용어는 이하 기재된 의미를 갖는 것으로 의도된다. 다른 용어는 명세서 전반에 걸쳐 다른 곳에서 정의된다.

[0052] 용어 “환자” 또는 “대상체” 는 인간 또는 비인간 동물 (예: 포유동물)을 의미하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0053] 이들이 예를 들어, 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 적용되는 용어 “투여”, “투여하다” 등은 예를 들어, IL-10 또는 PEG-IL-10), 핵산 (예를 들어, 천연 인간 IL-10을 코딩하는 핵산); 이전의 것들을 포함하는 약제학적 조성물의 접촉, 또는 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체로의 진단학적 제제의 접촉을 언급한다. 세포의 맥락에서, 투여는 시약의 상기 세포에의 접촉 (예: 시험관내 또는 생체외)뿐만 아니라 시약의 유체에의 접촉을 포함하고, 여기서 유체는 세포에 접촉한다.

[0054] 용어 “치료하다”, “치료하는”, “치료” 등은 질환, 장애 또는 병태, 또는 이의 증상이대상체가 앓는 질환, 장애 또는 병태의 근본 원인 중 적어도 하나, 또는 대상체가 앓는 질환, 장애, 병태와 관련된 증상 중 적어도 하나를 일시적으로 또는 영구적으로 제거하거나, 감소시키거나, 억제하거나, 완화시키거나 개선시키기 위해 진단되고, 관찰된 후 개시된 작용 과정(예를 들어, IL-10 또는 IL-10을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 것과 같은)을 언급한다. 따라서, 치료는 활성 질환을 억제함 (예를 들어, 이와 관련된 질환, 장애 또는 병태 또는 임상 증상의 발병 또는 추가의 발병을 중지시키는)을 포함한다. 용어는 IL-10 또는 PEG-IL-10이, 예를 들어, 유체 상 또는 콜로이드 상 중의 IL-10 수용체와 접촉하는 상황과 같은 다른 맥락에서 사용될 수도 있다.

[0055] 본원에 사용된 용어 “치료가 필요한” 은 대상체가 치료를 필요로 하거나 도움이 될 것으로 의사 또는 다른 간병인이 내리는 판단을 언급한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 인자를 기반으로 하여 내려진다.

[0056] 용어 “예방하다”, “예방하는”, “예방” 등은 일반적으로 특정 질환, 장애 또는 상태를가질 성향이 있는 대

상체의 맥락에서 질환, 장애, 상태 등 (예를 들어, 임상 증상의 부재로 측정됨)을 발생시키거나 이의 발병을 지연시키는 대상체의 위험을 일시적으로 또는 영구적으로 예방하고, 억제하고, 억제하거나 감소시키는 방식으로 (예: 질환, 장애 또는 상태 또는 이의 증상의 발병 전에) 개시된 작용의 과정 (예: IL-10 또는 IL-10를 포함하는 억제학적 조성물의 투여)을 언급한다. 특정 예에서, 상기 용어는 또한 질환, 장애 또는 상태의 진행을 늦추거나 유해한 또는 달리 바람직하지 않은 상태로의 이의 진행을 억제함을 언급한다.

[0057] 본원에 사용된 용어 “예방이 필요한”은 대상체가 예방적 치료를 필요로 하거나 이로부터 이익을 얻을 것이라는 의사 또는 다른 간병인에 의해 내려진 판단을 언급한다. 이 판단은 의사 또는 간병인의 전문 지식의 영역에 있는 다양한 요소를 기반으로 하여 내려진다.

[0058] “치료적 유효량”이란 어구는 대상체에게 투여될 경우, 질환, 장애 또는 상태의 임의의 증상, 국면 또는 특징에 대한 임의의 검출 가능한 긍정적인 효과를 가질 수 있는 양으로 단독으로 또는 억제학적 조성물의 일부로서, 단일 용량 또는 일련의 용량의 일부로서 대상체에게 제제의 투여를 언급한다. 치료적 유효량은 관련 생리학적 효과를 측정함으로써 확인될 수 있으면, 이는 투여 용법 및 대상체 상태의 진단 분석 등과 관련하여 조정될 수 있다. 예를 들어, 투여 후 생성된 염증 사이토카인의 양의 측정은 치료학적 유효량이 사용되었는지를 나타낼 수 있다.

[0059] “변화에 영향을 미치기에 충분한 양”이란 어구는 특정 요법의 투여 전 (예: 기준선 수준) 및 투여 후 측정된 지시제의 수준 사이의 검출 가능한 차이가 존재함을 의미한다. 지시제는 임의의 객관적인 파라미터 (예: IL-10의 혈청 농도) 또는 주관적인 파라미터 (예: 대상체의 웰빙 느낌)를 포함한다.

[0060] 용어 “소분자”는 약 10 kDa 미만, 약 2 kDa 또는 약 1 kDa 미만의 분자량을 갖는 화학적 화합물을 언급한다. 소분자는 무기 분자, 유기 분자, 무기 성분을 함유하는 유기 분자, 방사성 원자를 포함하는 분자, 및 합성 분자를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 치료학적으로, 소분자는 대형 분자 보다 세포에 보다 투과성일 수 있고, 분해에 덜 민감성이고 면역 반응을 유발할 가능성이 적다.

[0061] 용어 “리간드”는 예를 들어, 수용체의 효능제 또는 길항제로서 작용할 수 있는 펩티드, 폴리펩티드, 막-연합 또는 막-결합된 분자, 또는 이의 복합체를 언급한다. “리간드”는 천연 및 합성 리간드, 예를 들어, 사이토카인, 사이토카인 변이체, 유사체, 뮤테인, 및 항체로부터 유래된 결합 조성물을 포함한다. “리간드”는 또한 소분자, 예를 들어, 사이토카인의 펩티드 모방체 및 항체의 펩티드 모방체를 포함한다. 상기 용어는 또한 작용제도 길항제도 아니지만, 이의 생물학적 특성, 예를 들어, 신호전달 또는 접착에 크게 영향을 미치지 않고 수용체에 결합할 수 있는 제제를 포함한다. 또한, 상기 용어는, 예를 들어, 화학적 또는 제조법 방법에 의해 막-결합 리간드의 가용성 버전으로 변화된 막-결합 리간드를 포함한다. 리간드 또는 수용체는 전반적으로 세포내일 수 있고, 즉, 이것은 세포질, 핵 또는 일부 다른 세포내 격실에 거주할 수 있다. 리간드와 수용체의 복합체는 “리간드-수용체 복합체”로서 명명된다.

[0062] 용어 “억제제” 및 “길항제”, 또는 “활성화제” 및 “효능제”는 각각 예를 들어, 리간드, 수용체, 조인자, 유전자, 세포, 조직 또는 기관의 활성화를 위한 억제성 또는 활성화 분자를 언급한다. 억제제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 감소시키고, 차단하고, 방지하고, 활성화 지연시키고, 불활성화시키고, 탈감작화하거나 하향 조절하는 분자이다. 활성화제는, 예를 들어, 유전자, 단백질, 리간드, 수용체 또는 세포를 증가시키고, 활성화시키고, 촉진시키고, 활성화 개선시키고, 감작화하거나 상향 조절하는 분자이다. 억제제는 또한 항상성 활성을 감소시키거나, 차단시키거나 불활성화시키는 분자로서 정의될 수 있다. “작용제”는 표적의 활성화의 증가를 일으키거나 촉진시키기 위해 표적과 상호작용하는 분자이다. “길항제”는 작용제의 작용(들)에 대항하는 분자이다. 길항제는 작용제의 활성을 방지하거나 감소시키거나 억제하거나 중화시키고, 길항제는 또한 동정된 작용제가 존재하지 않는 경우에도 표적, 예를 들어, 표적 수용체의 구성적 활성을 방지하거나 억제하거나 감소시킬 수 있다.

[0063] 용어 “조절하다”, “조절” 등은 직접적으로 또는 간접적으로 PEG-IL-10 (또는 이들을 코딩하는 핵산 분자)의 기능 또는 활성을 증가시키거나 감소시키거나 PEG-IL-10의 것과 상응하는 효과를 생성하는 분자의 능력을 증진시키는 분자의 능력 (예를 들어, 활성화제 또는 억제제)을 언급한다. 용어 “조절제”는 광범위하게, 상기한 활성에 영향을 미칠 수 있는 분자를 의미한다. 예로서, 예를 들어, 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 조절제는 유전자, 수용체, 리간드 또는 세포의 활성을 변경하는 분자이고, 이때 활성은 이의 조절 특성에서 활성화되거나 억제되거나 변경될 수 있다. 조절제는 단독으로 작용할 수 있거나, 이것은 조인자, 예를 들어, 단백질, 금속 이온 또는 소분자를 사용할 수 있다. 용어 “조절제”는 IL-10과 동일한 작용 메커니즘을 통해 작동하는 제제 (즉, 이와 유사한 방식으로 IL-10과 동일한 신호전달 경로를 조절하는 제제) 및 IL-10에 필적하고 (또는 이보다

더 큰) 생물학적 반응을 유발할 수 있는 제제를 포함한다.

- [0064] 조절제의 예는 소분자 화합물 및 다른 생체유기 분자를 포함한다. 소분자 화합물의 다수의 라이브러리 (예: 병용 라이브러리)는 시판되고, 조절제를 동정하기 위한 출발점으로서 작용할 수 있다. 당업자는, 이러한 화합물 라이브러리가 목적하는 특성을 갖는 하나 이상의 화합물을 동정하기 위해 스크리닝될 수 있는 하나 이상의 검정 (예: 생화학적 또는 세포 기반 검정)을 개발할 수 있고; 이후, 숙련된 의학 화학자는, 예를 들어, 이의 유사체 및 유도체를 합성하고 평가함으로써 그러한 하나 이상의 화합물을 최적화할 수 있다. 합성 및/또는 분자 모델링 연구는 또한 활성화 인자의 동정에 사용될 수 있다.
- [0065] 분자의 “활성”은 분자의 리간드로 또는 수용체로의 결합; 촉매 활성; 유전자 발현 또는 세포 신호전달, 분화 또는 성숙화를 자극하는 능력; 항원성 활성; 다른 분자의 활성의 조절 등을 기재하거나 언급할 수 있다. 용어는 또한 세포-대-세포 상호작용 (예를 들어, 접착)을 조절하거나 유지하는데 있어서의 활성 또는 세포의 구조 (예를 들어, 세포막)를 유지하는데 있어서의 활성을 언급할 수 있다. “활성”은 또한 하기를 의미할 수 있다: 특정 활성, 예를 들어, [촉매적 활성]/[mg 단백질], 또는 [면역학적 활성]/[mg 단백질], 생물학적 구획 중의 농도 등. 용어 “증식성 활성”은 암, 종양, 형성 장애, 세포 형질전환, 전이 및 혈관 신생 뿐만 아니라, 예를 들어, 정상 세포 분열을 촉진하거나, 즉 이를 위해 필요하거나 또는 특이적으로 이와 관련되는 활성을 포함한다.
- [0066] 본원에 사용되는 “필적할 만한”, “필적할 만한 활성”, “에 필적할 만한 활성”, “필적할 만한 효과”, “에 필적할 만한 효과” 등은 정량적 및/또는 정성적으로 관찰될 수 있는 상대적인 용어이다. 상기 용어의 의미는 흔히 그들이 사용되는 맥락에 의존한다. 예로서, 모두 수용체를 활성화시키는 두 제제는 정성적인 관점에서 필적할 만한효과를 갖는 것으로 볼 수 있지만, 두 제제는 하나의 제제가 당해 분야에서 허용되는 검정 (예: 용량-반응 검정) 또는 당해 분야에서 허용되는 동물 모델에서 측정된 다른 제제의 활성의 20 %만을 달성할 수 있는 경우 정량적인 관점에서 필적할 만한 효과가 결여된 것으로 볼 수 있다. 하나의 결과를 또 다른 결과 (예를 들어, 참조 표준에 대한 하나의 결과)와 비교하는 경우, “상응하는”은 흔하게 하나의 결과가 35 % 미만에 의해, 30 % 미만에 의해, 25 % 미만에 의해, 20 % 미만에 의해, 15 % 미만에 의해, 10 % 미만에 의해, 7 % 미만에 의해, 5 % 미만에 의해, 4 % 미만에 의해, 3 % 미만에 의해, 2 % 미만에 의해, 또는 1 % 미만에 의해 참조 표준으로부터 벗어남을 의미한다. 특별한 구현예에서, 하나의 결과는, 그것이 참조 표준으로부터 15 % 미만, 10 % 미만 또는 5 % 미만으로 벗어나는 경우, 참조 표준에 필적할 만하다. 예를 들어, 이에 국한되지 않지만 활성 또는 효과는 효능, 안정성, 가용성 또는 면역원성을 언급할 수 있다.
- [0067] 예를 들어, 세포, 조직, 기관 또는 유기체의 “반응”이라는 용어는 생화학적 또는 생리학적 거동, 예를 들어, 생물학적 구획 내의 농도, 밀도, 접착 또는 이동, 유전자 발현율, 또는 분화 상태의 변화를 포함하고, 이때 상기 변화는 활성화, 자극 또는 처리, 또는 유전적 프로그래밍과 같은 내부 메커니즘과 상관관계가 있다. 특정 맥락에서, 용어 “활성화”, “자극” 등은 외부 또는 환경적 메커니즘 뿐만 아니라 내부 메커니즘에 의해 조절되는 세포 활성화를 언급하는 반면, 용어 “억제”, “하향 조절” 등은 반대의 효과를 언급한다.
- [0068] 본원에 상호교환적으로 사용된 용어 “폴리펩티드”, “펩티드” 및 “단백질”은 유전적으로 코딩된 및 비유전적으로 코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 비화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산을 포함할 수 있는 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태 및 변형된 폴리펩티드 골격을 갖는 폴리펩티드를 언급한다. 상기 용어는 이중성 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질; 이중성 및 동종성 리더 서열을 갖는 융합 단백질; N-말단 메티오닌 잔기를 갖거나 갖지 않는 융합 단백질; 면역학적으로 태그된 단백질을 갖는 융합 단백질 등을 포함하지만 이에 국한되지 않는 융합 단백질을 포함한다.
- [0069] 본 명세서 전반에 걸쳐, 단일 문자 또는 3개 문자 코드에 따르는 아미노산이 참조된다는 것이 이해될 것이다. 리더의 편의상, 단일 및 3개 문자 아미노산 코드가 하기에 제공된다:

G	글리신	Gly	P	프롤린	Pro
A	알라닌	Ala	V	발린	Val
L	류신	Leu	I	이소류신	Ile
M	메티오닌	Met	C	시스테인	Cys
F	페닐알라닌	Phe	Y	티로신	Tyr
W	트립토판	Trp	H	히스티딘	His
K	리신	Lys	R	아르기닌	Arg
Q	글루타민	Gln	N	아스파라긴	Asn
E	글루탐산	Glu	D	아스파르트산	Asp
S	세린	Ser	T	트레오닌	Thr

[0070]

[0071]

본원에 사용된 바와 같은 용어 “변이체”는 천연적으로 존재하는 변이체 및 비-천연적으로 존재하는 변이체를 포함한다. 천연 발생 변이체는 동족체 (하나의 종에서 다른 종으로 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열이 상이한 폴리펩티드 및 핵산), 및 대립유전자 변이체 (한 종 내의 하나의 개체로부터 다른 개체로 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열이 상이한 폴리펩티드 및 핵산)을 포함한다. 비-천연-발생 변이체는 각각 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열에서의 변화를 포함하는 폴리펩티드 및 핵산을 포함하고, 상기 서열에서의 변화는 인공적으로 도입되고 (예를 들어, 뮤테인); 예를 들어, 상기 변화는 인간 중재 (“인간의 손”)에 의해 실험실에서 생성된다. 따라서, 본원에서 “뮤테인”은 광범위하게 일반적으로 단일 또는 다중 아미노산 치환을 갖고 흔히 부위 지시되거나 무작위 돌연변이 유발에 적용된 클로닝된 유전자, 또는 완전한 합성 유전자로부터 유래되는 돌연변이된 재조합 단백질을 언급한다.

[0072]

용어 “DNA”, “핵산”, “핵산 분자”, “폴리뉴클레오타이드” 등은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 유사체를 언급하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오타이드의 비제한적인 예는 선형 및 환형 핵산, 메신저 RNA (mRNA), 상보성 DNA (cDNA), 재조합 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 프로브, 프라이머 등을 포함한다.

[0073]

폴리펩티드의 구조의 맥락에서 사용된 바와 같은 “N-말단” (또는 “아미노 말단”) 및 “C-말단” (또는 “카복실 말단”)은 각각 폴리펩티드의 극단적인 아미노 및 카복실 말단을 의미하는 반면, 용어 “N-말단” 및 “C-말단”은 각각 N-말단 및 C-말단을 향한 폴리펩티드의 아미노산 서열 중의 상대적 위치를 언급하고, 각각 N-말단 및 C-말단에 잔기를 포함할 수 있다. “즉시 N-말단” 또는 “즉시 C-말단”은 제1 및 제2 아미노산 잔기가 공유 결합하여 인접한 아미노산 서열을 제공하는 제2 아미노산 잔기에 대한 제1 아미노산 잔기의 위치를 언급한다.

[0074]

아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오타이드 서열 (예: IL-10 폴리펩티드”로부터 유래된” 아미노산 서열)의 맥락에서, “로부터 유래된”은 폴리펩티드 또는 핵산이 참조 폴리펩티드 또는 핵산 (예: 천연 발생 IL-10 폴리펩티드 또는 IL-10-코딩 핵산)의 것을 기본으로 하는 서열을 갖는다는 것을 의미하고, 단백질 또는 핵산이 제조되는 공급원 또는 방법에 대해 제한적인 것으로 의미하지 않는다. 예로서, 용어 “로부터 유래된”은 참조 아미노산 또는 DNA 서열의 동족체 또는 변이체를 포함한다.

[0075]

폴리펩티드와 관련하여, 용어 “단리된”은 천연 발생하는 경우 이것이 천연 발생할 수 있는 환경과는 상이한 환경에 있는 목적하는 폴리펩티드를 언급한다. “단리된”은 실질적으로 관심 있는 폴리펩티드가 풍부하고/하거나 관심 있는 폴리펩티드가 부분적으로 또는 실질적으로 정제되는 샘플 내에 존재하는 폴리펩티드를 포함하는 것을 의미한다. 폴리펩티드가 천연 발생하지 않는 경우, “단리된”은 폴리펩티드가 그것이 합성 또는 재조합 수단에 의해 제조된 환경으로부터 분리되었음을 나타낸다.

[0076]

“풍부한”이란 샘플이 비-천연 조작되어 (예: 과학자에 의해) 관심 있는 폴리펩티드가 a) 생물학적 샘플과 같은 출발 샘플 (예: 폴리펩티드가 천연 발생하거나 그것이 투여 후에 존재하는 샘플) 중의 폴리펩티드의 농도보다 큰 농도 (예: 적어도 3배 초과, 적어도 4배 초과, 적어도 8배 초과, 적어도 64배 초과 또는 그 이상) 또는 b) 폴리펩티드가 제조된 환경 (예: 세균성 세포에서와 같이)에서보다 큰 농도로 존재함을 의미한다.

[0077]

“실질적으로 순수한 (substantially pure)”이란 성분 (예: 폴리펩티드)이 조성물의 총 함량의 약 50 % 초과, 전

형적으로 총 폴리펩티드 함량의 약 60 % 초과로 구성됨을 나타낸다. 보다 전형적으로, “실질적으로 순수한”은 전체 조성물의 적어도 75 %, 적어도 85 %, 적어도 90 % 또는 그 이상이 관심 있는 성분인 조성물을 의미한다. 일부의 경우에, 폴리펩티드는 조성물의 총 함량의 약 90 % 초과, 또는 약 95 % 초과를 구성할 것이다.

[0078] 리간드/수용체, 항체/항원 또는 다른 결합 쌍을 언급할 때, 용어 “특이적으로 결합한다” 또는 “선택적으로 결합한다”는 단백질의 이중 집단 및 다른 생물체제 중에 단백질의 존재의 결정인자인 결합 반응을 나타낸다. 따라서, 지정된 조건하에, 특정 리간드는 특별한 수용체에 결합하고, 샘플 중에 존재하는 다른 단백질에 상당량으로 결합하지 않는다. 고려되는 방법의, 항체 또는 항체의 항원-결합 부위로부터 유래된 결합 조성물은 임의의 다른 항체, 또는 이로부터 유래된 결합 조성물과의 친화성 보다 적어도 2배 큰, 적어도 10배 큰, 적어도 20배 큰, 또는 적어도 100배 큰 친화성으로 이의 항원, 또는 이의 변이체 또는 뮤테인에 결합한다. 특별한 구현예에서, 항체는 하기에 의해 결정된 바와 같이, 약 10^9 l/mol을 초과하는 친화도를 가질 것이다: 예를 들어, 스캐차드 분석 (Scatchard analysis)(참조: Munsen, 등 1980 Analyt. Biochem. 107: 220-239).

[0079] IL-10 및 PEG-IL-10

[0080] 인간 사이토카인 합성 억제 인자 (CSIF)로서도 공지된 항-염증성 사이토카인 IL-10은 유형(부류)-2 사이토카인으로서, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (Mda-7), 및 IL-26, 인터페론 (IFN- α , - β , - γ , - δ , - ϵ , - κ , - ω , 및 - τ) 및 인터페론 유사 분자 (리미틴, IL-28A, IL-28B, 및 IL-29)를 포함하는 사이토카인 세트로서 분류된다.

[0081] IL-10은 면역조절 및 염증에서 다면발현성 효과를 갖는 사이토카인이다. 이것은 비만 세포에 의해 생성되고, 이는 이들 세포가 알레르기성 반응의 부위에서 갖는 염증 효과에 대응한다. 이것은 IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF α 및 GM-CSF와 같은 염증 촉진 사이토카인의 합성을 억제할 수 있지만, IL-10은 또한 특정 T 세포 및 비만 세포에 대해 자극성이고 B-세포 성숙화, 증식 및 항체 생성을 자극한다. IL-10은 NF- κ B 활성을 차단할 수 있고 JAK-STAT 신호전달 경로의 조절에 관여한다. 이것은 또한 CD8+ T-세포의 세포독성 활성 및 B 세포의 항체 생성을 유도하고, 이것은 대식세포 활성 및 종양-촉진 염증을 억제한다. CD8+ T-세포의 조절은 용량-의존성이고, 여기서, 보다 높은 용량은 보다 강한 세포독성 반응을 초래한다.

[0082] 본원에서 다른 곳에서 지적된 바와 같이, IL-10은 IFN- γ , IL-12(D' Andrea, A., 등 (1993) J Exp Med 178(3): 1041-48) 및 TNF α (Armstrong, L., 등 (1996) Thorax 51(2): 143-49)의 분비를 억제하는 항-염증 및 면역-억제 사이토카인 것으로 간주된다. IL-10은 또한 항원 제공에 이어서 CD4+ T 세포의 활성화를 억제하고 (de Waal Malefyt, R., 등 (1991) J Exp Med 174(5): 1209-20; de Waal Malefyt, R., 등 (1991) J Exp Med 174(4): 915-24) 따라서 광범위하게 강력한 면역 억제 사이토카인 것으로 고려된다.

[0083] 인간 IL-10은 분자량이 37 kDa인 동중이량체이고, 여기서, 각각의 18.5 kDa 단량체는 178개 아미노산을 포함하고 이의 처음 18개는 신호 펩티드를 포함하고 2개의 시스테인 잔기는 2개의 분자내 디설파이드 결합을 형성한다. 상기 IL-10 이량체는 2개의 단량체 서브유닛 간의 비-공유 상호작용의 붕괴시 생물학적으로 불활성이 된다.

[0084] 상기 시사된 바와 같이, 용어 “IL-10”, “IL-10 폴리펩티드(들)”, “IL-10 분자(들)”, “IL-10 체제(들)” 등은 광범위하게 해석되는 것으로 의도되고 예를 들어, 인간 및 비-인간 IL-10-관련 폴리펩티드를 포함하고, 예를 들어, 리더 서열 (예를 들어, 신호 펩티드) 및 이전 것들의 변형된 버전뿐만 아니라 이의 동족체, 변이체 (뮤테인을 포함하는) 및 단편을 포함한다. 본원 개시내용은 80 % 상동성을 나타내는 인간 IL-10 (NP_000563) 및 뮤린 IL-10 (NP_034678)의 폐길화된 형태, 및 이의 용도를 고려한다. 또한, 본원 개시내용의 범위는 래트 (승인번호 NP_036986.2; GI 148747382); 소 (승인번호 NP_776513.1; GI 41386772); 양 (승인번호 NP_001009327.1; GI 57164347); 개 (승인번호 ABY86619.1; GI 166244598); 및 토끼 (승인번호 AAC23839.1; GI 3242896)를 포함하는, 다른 포유동물 종으로부터의 폐길화된 IL-10 오톨로그 및 이의 변형된 형태를 포함한다.

[0085] IL-10 수용체, II형 사이토카인 수용체는 또한 각각 R1 및 R2로서 언급되는 알파 및 베타 서브유닛으로 이루어진다. 수용체 활성화는 알파 및 베타 둘 다로의 결합을 요구한다. IL-10 폴리펩티드의 하나의 동중이량체는 알파에 결합하고 동일한 IL-10 폴리펩티드의 다른 동중이량체는 베타에 결합한다.

[0086] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “폐길화된 IL-10”, “PEG-IL-10” 등은 접착이 안정하도록 일반적으로 링커를 통해 IL-10 단백질의 적어도 하나의 아미노산 잔기에 공유적으로 부착된 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 갖는 IL-10 분자를 언급한다. 상기 용어 “단일폐길화된 IL-10” 및 “모노-PEG-IL-10”은 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 일반적으로 링커를 통해 IL-10 이량체의 하나의 서브유닛 상의 단일 아미노산 잔기에 공유적으로

부착되어 있음을 명시한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 “이폐길화된 IL-10” 및 “디-PEG-IL-10”은 적어도 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 일반적으로 링커를 통해 IL-10 이량체의 각각의 서브유닛 상의 단일 잔기에 부착되어 있음을 명시한다.

[0087] 특정 구현예에서, 본원에 사용된 PEG-IL-10은 모노-PEG-IL-10이고, 여기서, 1개 내지 9개의 PEG 분자들은 링커를 통해 IL-10 이량체의 하나의 서브유닛의 N-말단에서 아미노산 잔기의 알파 아미노 그룹으로 공유적으로 부착되어 있다. 하나의 IL-10 서브유닛 상의 단일폐길화는 일반적으로 서브유닛 서플링으로 인한 비-폐길화된, 단일폐길화된 및 이폐길화된 IL-10의 비-균일한 혼합물을 초래한다. 더욱이, 폐길화 반응이 완성으로 진행하도록 하는 것은 일반적으로 비-특이적 및다중-폐길화된 IL-10을 유도함에 따라서 이의 생활성을 감소시킨다. 따라서, 본원 개시내용의 특정 구현예는 본원에 기재된 방법에 의해 생성되는 모노- 및 디-폐길화된 IL-10의 투여를 포함한다.

[0088] 특별한 구현예에서, PEG 잔기의 평균 분자량은 약 5 kDa 내지 약 50 kDa이다. IL-10으로의 PEG 부착 방법 또는 부위가 중요하지 않지만, 특정 구현예에서, 폐길화는 IL-10 펩티드의 활성을 변화시키지 않거나 단지 최소로 변화시킨다. 특정 구현예에서, 반감기의 증가는 생물학적 활성에서의 임의의 감소 보다 더 크다. PEG-IL-10의 생물학적 활성은 전형적으로 염증성 사이토카인의 수준을 평가함에 의해 측정되고, 상기 사이토카인 (예를 들어, TNF α 또는 IFN γ)은 세균 항원 (리포다당류 (LPS))이 쉼지되고 PEG-IL-10으로 처리된 대상체의 혈청 중에 있고, 이는 하기 문헌에 기재되어 있다: 미국특허번호 7,052,686.

[0089] IL-10 변이체는 의증의 다양한 목적으로 제조될 수 있고, 이는 혈청 반감기를 증가시키고, IL-10에 대한 면역 반응을 감소시키고, 정제 또는 제조를 촉진시키고, IL-10의 이의 단량체성 서브유닛으로의 전환을 감소시키고, 치료학적 효능을 개선시키고, 치료학적 사용 동안에 부작용의 중증도 및 이의 발생을 감소시킴을 포함한다. 아미노산 서열 변이체는 일반적으로 천연에서 발견되지 않는 미리 결정된 변이체이지만, 일부는 해독 후 변이체, 예를 들어, 당화된 변이체일 수 있다. 본원 개시내용은 이것이 IL-10 활성의 적합한 수준을 보유한다면, IL-10의 임의의 폐길화된 변이체의 용도를 고려한다.

[0090] “보존적 아미노산 치환”이란 어구는 단백질 중의 아미노산(들)을 유사한 산도, 염기도, 전하, 극성 또는 측쇄의 크기를 갖는 아미노산으로 치환함으로써 단백질의 활성을 보존하는 치환을 언급한다. 보존적 아미노산 치환은 일반적으로 다음 그룹 내의 아미노산 잔기의 치환을 수반한다: 1) L, I, M, V, F; 2) R, K; 3) F, Y, H, W, R; 4) G, A, T, S; 5) Q, N; 및 6) D, E. 치환, 삽입 또는 결실을 위한 지침은 상이한 변이체 단백질 또는 상이한 종 기원의 단백질의 아미노산 서열의 정렬을 기준으로 할 수 있다. 따라서, 임의의 천연 발생 IL-10 폴리펩티드 이외에, 본원 개시내용은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 통상적으로 20, 10 또는 5개 이하의 아미노산 치환을 갖는 것을 고려하고, 이때 치환은 일반적으로 보존적 아미노산 치환이다.

[0091] 본원 개시내용은 또한 성숙한 IL-10으로부터 유래된 연속 아미노산 잔기를 함유하는 성숙한 IL-10의 활성 단편 (예를 들어, 서브서열)의 폐길화된 형태를 고려한다. 펩티드 또는 폴리펩티드 서브서열의 인접한 아미노산 잔기의 길이는 서브서열이 유래되는 특정 천연 발생 아미노산 서열에 의존한다. 일반적으로, 펩티드 및 폴리펩티드는 약 20개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 40개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 60개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 80개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 100개 아미노산 내지 약 120개 아미노산, 약 120개 아미노산 내지 약 140개 아미노산, 약 140개 아미노산 내지 약 150개 아미노산, 약 150개 아미노산 내지 약 155개 아미노산, 약 155개 아미노산 내지 전장 펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다.

[0092] 추가로, IL-10 폴리펩티드는 연속 아미노산의 한정된 길이 상에 참조 서열 (예를 들어, “비교 윈도우”)과 비교하여 한정된 서열 동일성을 가질 수 있다. 비교용 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다. 비교를 위한 서열의 최적의 정렬은, 예를 들어, 하기에 의해 수행될 수 있다: 하기 문헌의 국소 상동성 알고리즘: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), 하기 문헌의 상동성 정렬 알고리즘: Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), 하기 문헌의 유사성 방법의 검색: Pearson & Lipman, Proc. Nat’l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), 이러한 알고리즘(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Madison, Wis.)의 컴퓨터화된 구현 또는 수동 정렬 및 육안 검사(참조: 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel 등, eds.1995 supplement)).

[0093] 하나의 예로서, 폐길화될 수 있는 적합한 IL-10 폴리펩티드는 약 20개 아미노산 내지 약 40개 아미노산, 약 40개 아미노산 내지 약 60개 아미노산, 약 60개 아미노산 내지 약 80개 아미노산, 약 80개 아미노산 내지 약 100개 아미노산, 약 100개 아미노산 내지 약 120개 아미노산, 약 120개 아미노산 내지 약 140개 아미노산, 약 140개 아미노산 내지 약 150개 아미노산, 약 150개 아미노산 내지 약 155개 아미노산, 약 155개 아미노산 내지 전

장 IL-10 펩티드 또는 폴리펩티드의 연속 스트레치와 적어도 약 75 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 85 %, 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 98 %, 또는 적어도 약 99 %의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0094] 하기에 추가로 논의된 바와 같이, IL-10 폴리펩티드는 천연 공급원 (예를 들어, 이의 천연 환경외의 다른 환경)으로부터 분리될 수 있고 또한 재조합적으로 (예를 들어, 유전학적으로 변형된 숙주 세포, 예를 들어, 세균, 효모, 피키아, 곤충 세포 등) 제조될 수 있고, 여기서, 유전학적으로 변형된 숙주 세포는 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산으로 변형된다. IL-10 폴리펩티드는 또한 합성적으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 세포 부재 화학적 합성에 의해).

[0095] IL-10 분자를 암호화하는 핵산 분자는 본원의 개시내용에 의해 고려되고, 이는 이의 천연적으로 존재하고 비-천연적으로 존재하는 이소형, 대립형질 변이체 및 스플라이스 변이체를 포함한다. 본원의 개시내용은 또한 천연적으로 존재하는 DNA 서열과 하나 이상의 염기가 상이하지만 유전학적 축퇴성으로 인해 IL-10 폴리펩타이드에 상응하는 아미노산 서열로 해독되는 핵산 서열을 포함한다.

[0096] IL-12

[0097] 인터류킨-12 (IL-12)는 항원성 자극에 응답하여 대식세포, B-림프아구성 세포, 수지상 세포 및 호중구에 의해 천연적으로 생성되는 다면발현성 사이토킨이다. 이것은 처음으로 PMA-유도된 EBV-형질전환된 B-세포주로부터 분리된 인자로서 기재되었다. IL-12는 순수 T 세포의 Th1 세포로의 분화에 관여하여 T 세포의 성장 및 기능을 자극할 수 있고 NK 세포 및 CD8+ 세포독성 T 림프구의 세포독성 활성의 증진을 매개한다. 이와 같이, IL-12는 선천적 (NK 세포) 및 적응성 (세포독성 T 림프구) 둘 다를 활성화시킨다. IL-12는 또한 T 세포 및 NK 세포로부터 IFN γ 및 TNF α 의 생성을 자극하고 IFN γ 의 IL-4-매개된 억제를 감소시킨다.

[0098] 본원의 다른 곳에서 지적된 바와 같이, 용어 “IL-12”, “IL-12 폴리펩타이드(들)”, “IL-12-제제(들)”, “IL-12 분자(들)” 등은 광범위하게 해석되는 것으로 의도되고 예를 들어, 리더 서열(예를 들어, 신호 펩타이드)을 갖는 IL-12 폴리펩타이드 뿐만 아니라 인간 및 비-인간 IL-12 - 관련 폴리펩타이드를 포함하고 이는 동족체, 변이체 (뮤테인을 포함하는), 및 이의 단편을 포함한다.

[0099] 구조적으로, IL-12는 4개의 알파 나선구조의 복합체를 포함한다. 2개의 별도의 유전자에 의해 암호화된 이중이량체 사이토킨, IL-12, 체 A (p35) 및 IL-12, 체 B (p40)이다. 인간 IL-12A는 306 아미노산 잔기 폴리펩타이드 (도 1; 승인 번호 1F45_A)이고, 인간 IL-12B는 197 아미노산 잔기 폴리펩타이드 (도 1; 승인 번호 1F45_B)이다. 활성 이중이량체 (p70) 및 p40의 동중이량체는 단백질 합성 후 형성된다. IL-12는 IL-12R- β 1 및 IL-12R- β 2에 의해 형성되는 이중이량체 수용체인 IL-12 수용체에 결합하고, 이것은 JAK-STAT 경로에 포함되는 여러 전사 인자를 포함하는 신호전달 캐스케이드를 개시한다.

[0100] 본원의 개시내용은 성숙한 IL-12로부터 유래된 연속 아미노산 잔기를 함유하는 성숙한 IL-12의 활성 단편 (예를 들어, 서브서열)을 고려한다. 펩타이드 또는 폴리펩타이드 서브서열의 연속 아미노산 잔기의 길이는 서브서열이 유래되는 특정 천연적으로 존재하는 아미노산 서열에 따라 다양하다. 일반적으로, 펩타이드 및 폴리펩타이드는 약 20 아미노산 내지 약 40 아미노산, 약 40 아미노산 내지 약 60 아미노산, 약 60 아미노산 내지 약 80 아미노산, 약 80 아미노산 내지 약 100 아미노산, 약 100 아미노산 내지 약 120 아미노산, 약 120 아미노산 내지 약 140 아미노산, 약 140 아미노산 내지 약 160 아미노산, 약 160 아미노산 내지 약 180 아미노산, 약 180 아미노산 내지 약 190 아미노산, 약 190 아미노산 내지 약 194 아미노산, 약 194 아미노산 내지 약 196 아미노산, 약 196 아미노산 내지 약 210 아미노산, 약 210 아미노산 내지 약 230 아미노산, 약 230 아미노산 내지 약 250 아미노산, 약 250 아미노산 내지 약 270 아미노산, 약 270 아미노산 내지 약 290 아미노산, 약 290 아미노산 내지 약 295 아미노산, 약 295 아미노산 내지 약 300 아미노산, 약 300 아미노산 내지 약 304 아미노산, 및 약 304 아미노산 내지 약 306 아미노산일 수 있다.

[0101] 추가로, IL-12 폴리펩타이드는 연속 아미노산의 한정된 길이 상에서 참조 서열 (예를 들어, “비교 윈도우”)과 비교하여 한정된 서열 동일성을 가질 수 있다. 비교를 위한 서열의 정렬 방법은 당업계에 널리 공지되어 있고 상기되어 있다. 하나의 예로서, 적합한 IL-12 폴리펩타이드는 약 20 아미노산 내지 약 40 아미노산, 약 40 아미노산 내지 약 60 아미노산, 약 60 아미노산 내지 약 80 아미노산, 약 80 아미노산 내지 약 100 아미노산, 약 100 아미노산 내지 약 120 아미노산, 약 120 아미노산 내지 약 140 아미노산, 약 140 아미노산 내지 약 160 아미노산, 약 160 아미노산 내지 약 180 아미노산, 약 180 아미노산 내지 약 190 아미노산, 약 190 아미노산 내지 약 195 아미노산, 약 194 아미노산 내지 약 196 아미노산, 약 196 아미노산 내지 약 210 아미노산, 약 210 아미노산 내지 약 230 아미노산, 약 230 아미노산 내지 약 250 아미노산, 약 250 아미노산 내지 약 270 아미노산, 약 270 아미노산 내지 약 290 아미노산, 약 290 아미노산 내지 약 295 아미노산, 약 295 아미노산 내지 약 300 아미노산, 약 300 아미노산 내지 약 304 아미노산, 및 약 304 아미노산 내지 약 306 아미노산일 수 있다.

노산 내지 약 230 아미노산, 약 230 아미노산 내지 약 250 아미노산, 약 250 아미노산 내지 약 270 아미노산, 약 270 아미노산 내지 약 290 아미노산, 약 290 아미노산 내지 약 295 아미노산, 약 295 아미노산 내지 약 300 아미노산, 약 300 아미노산 내지 약 304 아미노산, 및 약 304 아미노산 내지 약 306 아미노산의 연속 스트레치에 대해 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0102] 본원의 다른 곳에서 지적된 바와 같이, IL-12 폴리펩타이드는 천연 공급원 (예를 들어, 이의 천연적으로 존재하는 환경과는 다른 환경)으로부터 단리될 수 있고 또한 재조합적으로 (예를 들어, 세균, 효모, 피키아, 곤충 세포 등과 같은 유전학적으로 변형된 숙주 세포에서) 제조될 수 있고, 여기서, 유전학적으로 변형된 숙주 세포는 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로 변형된다. IL-12 폴리펩타이드는 또한 합성적으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 세포 부재 화학적 합성에 의해).

[0103] IL-12 분자를 암호화하는 핵산 분자는 본원의 개시내용에 의해 고려되고, 이는 이의 천연적으로 존재하고 비-천연적으로 존재하는 이소형, 대립형질 변이체 및 스플라이스 변이체를 포함한다. 본원의 개시내용은 또한 천연적으로 존재하는 DNA 서열과 하나 이상의 염기가 상이하지만 유전학적 축퇴성으로 인해 IL-12 폴리펩타이드에 상응하는 아미노산 서열로 해독되는 핵산 서열을 포함한다.

[0104] IFN γ 는 항암 방어의 천연 기작에 협력하는 것으로 나타났다(Jakobisiak, M. 등 (2013) Immunol Lett 90:103-22). IFN γ 의 생성을 자극함에 의해, IL-12는 유도성 단백질-10 케모킨(IP-10 또는 CXCL10)의 생성을 증가시키고, 이는 이어서 IL-12의 항-혈관형성 효과를 매개한다. 면역 반응을 유도하는 이의 능력 및 이의 항-혈관형성 활성 때문에, IL-12는 종양학 치료제로서 평가되었다. IL-12는 건선 및 염증 장 질환을 포함하는 다른 장애를 치료하는데 유용할 수 있다.

[0105] 무엇보다, 항-IL-12/23p40 중화 항체 (우스테키누맵)는 임상에서 건선, 강직성 척추염, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 아토피 피부염, 1차 담관 간경화증, 유육종증 및 전신 홍반성 낭창을 포함하는 여러 면역-매개 장애의 치료를 위해 평가되었다. 가장 진전된 연구는 건선의 치료에 관한 것이다. (문헌참조: 예를 들어, Teng, M. 등 (2015) Nature Medicine 21(7): 719-29).

[0106] 선천성 및 적응성 면역 아암을 상호연결시키는 이의 능력 및 IFN γ 생성의 강력한 자극으로 인해, IL-12는 처음으로 종양 면역치료요법에 대해 이상적인 후보물을 나타내는 것으로 사료된다. 실제로, 동물 모델에서 초기 연구로부터의 결과는 암 치료제로서 이의 잠재적 용도를 지지하였다. 그러나, IL-12가 전신 투여되는 임상 연구는 매우 좁은 치료학적 지수를 산출하였고 상당히 증가된 혈청 사이토킨 (주로 IFN γ 및 TNF α) 및 자가면역 간염 둘 다로 인해 상당한 면역-관련 독성을 유도하였다. 함께, 이들 사이토킨은 용량-제한 치명적 독성을 유도하고 IL-12에 대한 최대 관용 용량은 하루 피하투여시 0.3 μ g/kg이다(문헌참조: Bajetta, E., 등, Clin Cancer Res, 1998. 4(1): p. 75-85; Motzer, R.J., 등, J Interferon Cytokine Res, 2001. 21(4): p. 257-63; Cebon, J., 등, Cancer Immun, 2003. 3: p. 7; Younes, A., 등, Clin Cancer Res, 2004. 10(16): p. 5432-8; and Ansell, S.M., 등, Blood, 2002. 99(1): p. 67-74). 결과로서, 종양학 세팅에서 IL-12의 전신 투여는 대체로 실행가능하지 않은 것으로서 간주되었다. [문헌참조: 예를 들어, Teng, M. 등 (2015) Nature Medicine 21(7): 719-29).

[0107] IL-12의 항-종양 효과를 이용하고 이의 고유 단점을 회피하고자 하는 노력에서, 전신 투여에 대한 대안적 접근법이 탐구되었다. IL-12 및 IL-10을 발현하는 자가 불활성화된 종양 세포는 결장 또는 유방 종양 및 폐 전이를 갖는 마우스에서 이로운 효과를 유도하는 것으로 밝혀졌다(Lopez 등 (2005) J Immunol 175:5885-94). 상기 명백한 양성 효과에도 불구하고, 이러한 2005 연구 보고는 가능하게는 임상 세팅에서 IL-12가 이전에 경험된 독성 문제로 인해 IL-10/IL-12 전신 조합 치료요법을 개발하기 위한 결연한 노력을 유도하지 않았다. 상기 지적된 바와 같이, 관찰된 IL-12 - 관련 독성은 감기 유사 증상 (예를 들어, 두통, 열, 한기, 피로 및 근관절통); 백혈구 감소증 및 혈소판 감소증을 포함하는 혈액학적 독성; 및 트랜스아미나제의 용량-의존적 증가에 의해 나타나는 간 독성, 고빌리루빈혈증, 및 저알부민혈증을 포함한다. 다른 IL-12 관련 역효과는 점액성 막의 염증 (예를 들어, 경구 점막염, 구내염 및 대장염), 저혈압, 신장 손상 및 위장 출혈을 포함한다. 이들 독성 효과는 다른 사이토킨 (예를 들어, IP-10 및 MIG) 뿐만 아니라 IFN γ 및 TNF α 의 2차 생성과 관련되었다. (문헌참조: 예를 들어, Lasek, 등 (2014) Cancer Immunol Immunother 63:419-35; Xu, 등 Clinical and Developmental Immunology, volume 2010, Article ID 832454, 9 pp.); Cebon, J., 등, Cancer Immun, 2003. 3: p. 7).

[0108] 종양학에서 IL-12의 잠재적 유용성을 탐구하기 위한 최근 노력은 상이한 방향을 취하였다. 예를 들어, 임상 연구가 개시되었고, 여기서, IL-12는 암 백신에서, IL-12 플라스미드의 국소적 주사를 포함하는 유전자 치료요법

에서 및 종양-표적화 면역사이토킨 형태의 보조제 적용된다. 다른 전략은 Treg 세포-고갈 항체(예를 들어, 항-CD25 항체), 면역 억제 신호(예를 들어, CTLA-4)에 대한 항체, 및 항암 약물과의 동시 투여를 포함한다. (문헌 참조: 예를 들어, Lasek, 등 (2014) Cancer Immunol Immunother 63:419-35; Xu, 등 Clinical and Developmental Immunology, volume 2010, Article ID 832454, 9 pp.)). 이들 접근법은 종양학 위원회가 IL-10/IL-12 전신 조합 치료요법이 매우 다루기 힘든 것으로 결론지을 수 있도록 추가로 자명하게 한다.

[0109] **IL-10 및 IL-12의 동시 투여**

[0110] PEG-IL-10 및 IL-12의 조합은 적어도 부가적임을 나타내고 능히 상승작용적 항-종양 효능을 나타내는 것으로 사료된다. 그러나, IL-12 단독치료요법을 사용하여 관찰된 독성은 지금까지 인간 대상체에서 상기 조합 치료요법의 탐구를 제한하였다. 특히, IL-12는 강력한 면역자극 생물학을 나타내고 이는 이의 최대 관용 용량 (이는 0.5 - 1.25 $\mu\text{g/kg}$ 로서 기재되었다; 문헌참조: Cebon, J., 등, Cancer Immun, 2003. 3: p. 7)을 최대 효과적인 용량 미만인 양으로 제한한다. 상기 현상의 바탕이 되는 기작에 대한 이해가 본원의 개시내용을 수행하는데 요구되지 않지만, 이것은 NK 세포뿐만 아니라 항원-비-특이적 순수 CD4+ 및 CD8+ T 세포 및 항원-특이적 CD4+ 및 CD8+ T 세포 둘 다의 IL-12에 의한 활성화로 인한 것으로 사료된다. IL-12는 항원-특이적 및 항원-비-특이적 둘 다인 광범위한 면역 자극을 나타내지만, PEG-IL-10 노출은 단지 CD8+ T 세포의 항원-특이적 집단을 활성화시킨다. 하기 지적된 바와 같이, 조합되는 경우, PEG-IL-10은 능히 IL-12의 비-항원-특이적 면역 자극을 제한하고 IL-12의 면역자극 효과를 면역계의 항원 특이적 적응성 CD8+ T 세포 아암으로 집중시킨다.

[0111] IL-12의 면역자극 반응은 부분적으로 이들 세포로부터 $\text{IFN}\gamma$ 및 $\text{TNF}\alpha$ 분비 및 혈청 $\text{IFN}\gamma$ 의 상기 상승의 유도를 포함하고, 보다 적은 정도로 혈청 $\text{TNF}\alpha$ 는 면역-관련 독성의 개시와 상호 관련된다. PEG-IL-10 치료는 또한 혈청 $\text{IFN}\gamma$ 수준의 상승을 유도하지만, 이의 MTD는 하루 피하내로 투여되는 5-40 $\mu\text{g/kg}$ 범위의 용량에서 수득되는 치료학적 이득으로 인해 확립되지 않았다.

[0112] 실험 섹션에서 상세히 기재된 바와 같이, 인간 4T1 종양 모델에서 종양 크기에 대한 PEG-IL-10 및 IL-12의 조합 효과를 평가하였다. 도 2에 지적된 바와 같이, PEG-rMuIL-10 및 rMuIL-12의 조합 투여는 단독으로 어느 하나의 제제의 투여 후 관찰되는 것 보다 종양 중량의 보다 큰 감소를 유도하였다. 이들 데이터는 조합 치료요법의 이러한 항-종양 효과를 나타낸다.

[0113] 이어서, 4T1 종양 함유 마우스에서 단독으로 또는 조합으로 PEG-rMuIL-10 및 rMuIL-12에 의해 유도되는 혈청 수준 $\text{IFN}\gamma$ 및 $\text{TNF}\alpha$ 를 평가하였다. 데이터는 PEG-rMuIL-10 및 rMuIL-12 둘 다의 노출이 개별적으로 혈청 $\text{IFN}\gamma$ 및 $\text{TNF}\alpha$ 의 유도를 유발함을 지적한다. 놀랍게도, 조합되는 경우, IL-12 및 PEG-rMuIL-10의 투여는 보다 낮은 $\text{IFN}\gamma$ (도 3a) 및 $\text{TNF}\alpha$ (도 3b) 혈청 수준을 유도하였다. 특히, IL-12 및 PEG-rMuIL-10의 조합된 노출은 단독의 IL-12 보다 상당히 낮은 혈청 $\text{IFN}\gamma$ 를 나타냈다. 본원의 개시내용의 특정 구현예는 IL-12를 해독하기 위해, IL-12 치료에 의해 유도된 혈청 사이토킨 ($\text{IFN}\gamma$ 및 $\text{TNF}\alpha$) 수준을 저하시키면서 동시에 2개 항원을 함께 투여하는 항-종양 이득을 증진시키기 위한 PEG-IL-10의 용도를 포함한다.

[0114] 상기 주지된 바와 같이, 면역종양학 세팅에서 IL-10 및 IL-12의 조합에 관한 최근 보고는 잠재적 상승작용 항-종양 기능을 보고하였지만, 상기 조합 치료요법에 의한 IL-12 - 매개된 독성의 잠재적 제어에 대한 기재는 없다. 따라서, IL-12 및 PEG-IL-10의 조합이 혈청 $\text{IFN}\gamma$ 에서 상당한 감소 (IL-12 단독치료요법 후 관찰된 것과 상대적으로)에 의해 지적된 바와 같이 IL-12-연관된 독성의 제어를 유도한다는 본원에 보고된 데이터 및 다른 발견은 둘 다 놀랍고 예상치 못한 것이었다.

[0115] **혈청 농도**

[0116] 본원에 기재된 방법에서 IL-10의 혈장 수준은 하기를 포함하는 여러 방식으로 특징화될 수 있다: (1) 일부 특정 수준 초과 또는 수준의 범위에서 평균 IL-10 혈청 최저 농도; (2) 일부 시간의 양 동안 일부 특정 수준 초과 또는 평균 IL-10 혈청 최저 농도; (3) 일부 특정 수준 초과 또는 미만 또는 수준의 범위에서 일정 상태의 IL-10 혈청 농도 수준; 또는 (4) 일부 특정 수준 초과 또는 미만 또는 수준의 일부 범위의 농도 프로파일의 $C_{\text{최대}}$. 본원에 명시된 바와 같이, 평균 혈청 최저 IL-10 농도는 특정 징후에서 효능을위한 특정 임포트인 것으로 밝혀졌다. IL-12의 혈장 수준은 유사한 방식으로 특징화될 수 있다.

[0117] 상기된 바와 같이, 목적하는 IL-10 혈청 최저 농도는 질환, 장애 또는 병태 (예를 들어, 국소화된 종양 또는 전이성 질환)의 특성, 대상체가 병을 앓는 정도 (예를 들어, 조기 대 후기 단계 질환), 병용 요법이 투여되는지, 및 환자-특이적 파라미터 (예를 들어, 간 및 신장 기능)를 포함하는 다수의 인자에 의존할 수 있다. 예를 들어, PEG-IL-10 및 화학치료학적 제제의 동시 투여는 임상적 이득을 관찰하기 위해 ~1-2 ng/mL 범위에서 혈청 최저만

을 요구할 수 있고, 전이성 암은 상응하는 임상적 이득을 성취하기 위해 6-10 ng/mL 이상을 요구할 수 있다.

- [0118] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 6.0 ng/mL, 적어도 7.0 ng/mL, 적어도 8.0 ng/mL, 및 적어도 9.0 ng/mL, 적어도 10.0 ng/mL, 적어도 11.0 ng/mL, 적어도 12.0 ng/mL, 적어도 13.0 ng/mL, 적어도 14.0 ng/mL, 적어도 15.0 ng/mL, 적어도 16.0 ng/mL, 적어도 17.0 ng/mL, 적어도 18.0 ng/mL, 적어도 19.0 ng/mL, 적어도 20.0 ng/mL, 적어도 21.0 ng/mL, 적어도 22.0 ng/mL, 또는 22.0 ng/mL 초과이다.
- [0119] 다른 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 적어도 1.0 ng/mL, 적어도 1.5 ng/mL, 적어도 2.0 ng/mL, 적어도 2.5 ng/mL, 적어도 3.0 ng/mL, 적어도 3.5 ng/mL, 적어도 4.0 ng/mL, 적어도 4.5 ng/mL, 적어도 5.0 ng/mL, 및 적어도 5.5 ng/mL, 적어도 6.0 ng/mL, 적어도 6.5 ng/mL 또는 7 ng/mL 초과이다.
- [0120] 추가 구현예에서, 기간은 적어도 12시간, 적어도 24시간, 적어도 48시간, 적어도 72시간, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 6주, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 또는 3개월 초과이다.
- [0121] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 기간의 적어도 85 %, 기간의 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 적어도 99 % 또는 100 % 동안 유지된다.
- [0122] 본원 개시내용의 계속 추가 구현예에서, 생성될 수 있는 혈장 및/또는 혈청 수준 농도 프로파일은 다음을 포함한다: 약 1.0 pg/mL 초과, 약 10.0 pg/mL 초과, 약 20.0 pg/mL 초과, 약 30 pg/mL 초과, 약 40 pg/mL 초과, 약 50.0 pg/mL 초과, 약 60.0 pg/mL 초과, 약 70.0 pg/mL 초과, 약 80.0 pg/mL 초과, 약 90 pg/mL 초과, 약 0.1 ng/mL 초과, 약 0.2 ng/mL 초과, 약 0.3 ng/mL 초과, 약 0.4 ng/mL 초과, 약 0.5 ng/mL 초과, 약 0.6 ng/mL 초과, 약 0.7 ng/mL 초과, 약 0.8 ng/mL 초과, 약 0.9 ng/mL 초과, 약 1.0 ng/mL 초과, 약 1.5 ng/mL 초과, 약 2.0 ng/mL 초과, 약 2.5 ng/mL 초과, 약 3.0 ng/mL 초과, 약 3.5 ng/mL 초과, 약 4.0 ng/mL 초과, 약 4.5 ng/mL 초과, 약 5.0 ng/mL 초과, 약 5.5 ng/mL 초과, 약 6.0 ng/mL 초과, 약 6.5 ng/mL 초과, 약 7.0 ng/mL 초과, 약 7.5 ng/mL 초과, 약 8.0 ng/mL 초과, 약 8.5 ng/mL 초과, 약 9.0 ng/mL 초과, 약 9.5 ng/mL 초과, 또는 약 10.0 ng/mL 초과,의 평균 IL-10 혈장 및/또는 혈청 최저 농도.
- [0123] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 1.0 pg/mL 내지 10 ng/mL의 범위에 있다. 일부 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 1.0 pg/mL 내지 100 pg/mL 범위에 있다. 다른 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 0.1 ng/mL 내지 1.0 ng/mL 범위에 있다. 계속 다른 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 1.0 ng/mL 내지 10 ng/mL의 범위이다. 본원 개시내용은 심지어 상기 범위가 명확히 기재되어 있지 않더라도 본원에 제시된 것들에 의해 포함되는 임의의 농도를 기재하는 범위를 고려하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 하나의 구현예에서 평균 혈청 IL-10 농도는 0.5 ng/mL 내지 5 ng/mL 범위일 수 있다. 추가로 예를 들어, 본원 개시내용의 특정 구현예는 약 0.5 ng/mL 내지 약 10.5 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 10.0 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 9.0 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 8.0 ng/mL, 약 1.0 ng/mL 내지 약 7.0 ng/mL, 약 1.5 ng/mL 내지 약 10.0 ng/mL, 약 1.5 ng/mL 내지 약 9.0 ng/mL, 약 1.5 ng/mL 내지 약 8.0 ng/mL, 약 1.5 ng/mL 내지 약 7.0 ng/mL, 약 2.0 ng/mL 내지 약 10.0 ng/mL, 약 2.0 ng/mL 내지 약 9.0 ng/mL, 약 2.0 ng/mL 내지 약 8.0 ng/mL, 및 약 2.0 ng/mL 내지 약 7.0 ng/mL 범위의 평균 IL-10 혈청 최저 농도이다.
- [0124] 특정 구현예에서, 1 내지 2 ng/mL의 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 치료 기간 동안에 유지된다. 본원 개시내용은 또한 평균 IL-10 혈청 피크 농도가 치료 기간 동안에 약 10.0 ng/mL 이하인 구현예를 고려한다. 추가 구현예는 약 10.0 ng/mL 이상의 평균 IL-10 혈청 최저 농도를 고려한다. 최적의 평균 혈청 농도는 일반적으로 이러한 농도에서 목적하는 치료학적 효과가 목적하지 않은 부작용을 도입하는 것 없이 성취된다는 것이다.
- [0125] 본원 개시내용의 특정 구현예는 IL-10 요법을 받은 대상체를 모니터링하여 부작용을 예측하고 잠재적으로 이를 회피하기 위한 방법을 제공하고, 상기 방법은 다음을 포함한다: (1) IL-10의 대상체의 피크 농도를 측정하고; (2) IL-10의 대상체의 최저 농도를 측정하고; (3) 피크-최저 변동을 계산하고; (4) 상기 계산된 피크-최저 변동을 사용하여 대상체에서 잠재적 부작용을 예측한다. 특정 대상체 집단에서, 보다 작은 피크-최저 변동은 대상체가 IL-10-관련 부작용을 경험할 보다 낮은 가능성을 명시한다. 또한, 일부 구현예에서, 특정 피크-최저 변동은 특정 투여 용량 파라미터를 사용하여 특정 질환, 장애 및 병태의 치료를 위해 결정되고 이들 변동은 참조 표준 물로서 사용된다.
- [0126] 다수의 약물에 대해, 혈장 약물 농도는 다중-대수 양상으로 감소한다. 정맥내 투여 직후, 상기 약물은 초기 공간 (최소로 혈장 용적으로서 정의되는)에 걸쳐 신속하게 분포되고 이어서 혈관 외부 공간 (예를 들어, 특정 조직)으로의 보다 느린 평형 분포가 일어난다. 정맥내 IL-10 투여는 상기 2개 격실 동력 모델과 관련된다 (문헌 참조: Rachmawati, H. 등 (2004) *Phar M. Res.* 21(11): 2072-78). 피하 재조합체 hIL-10의 약동학이 또한 연구

되었다 (문헌참조: Radwanski, E. 등 (1998) *Phar M. Res.* 15(12): 1895-1901). 따라서, 용적-오브-분포 고려는 적당한 IL-10 투여 용량-관련 파라미터를 평가하는 경우 적절하다. 더욱이, IL-10 제제를 특정 세포 유형에 표적화하기 위한 노력이 수행되었고 (문헌참조: 예를 들어, Rachmawati, H. (May 2007) *Drug Met. Dist.* 35(5): 814-21), IL-10 약동학 및 투여 원리의 영향력은 상기 노력의 성공에 매우 유용함을 입증할 수 있다.

[0127] 본원 개시내용은 상기 제시된 임의의 IL-10 혈청 최저 농도를 유지시키는 임의의 용량의 투여 및 투여 용법을 고려한다. 예를 들어, 국한되지 않지만, 대상체가 인간인 경우, 비-페길화된 hIL-10은 0.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 1.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 2.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 7.5 $\mu\text{g/kg}$ 초과, 10.0 $\mu\text{g/kg}$ 초과, 12.5 $\mu\text{g/kg}$ 초과, 15 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 17.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 20 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 22.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 25 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 30 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 또는 35 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과 용량으로 투여될 수 있다. 또한, 예를 들어, 국한되지 않지만 대상체가 인간인 경우, 비교적 작은 PEG를 포함하는 페길화된 hIL-10 (예를 들어, 5 kDa 모노-디-PEG-hIL-10)은 0.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 0.75 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 1.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 1.25 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 1.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 1.75 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 2.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 2.25 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 2.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 2.75 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 3.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 3.25 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 3.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 3.75 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 4.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 4.25 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 4.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 4.75 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과, 또는 5.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 초과 용량으로 투여될 수 있다.

[0128] 당업자 (예를 들어, 약리학자)는 PEG-IL-10이 IL-12 제제와 병용되어 투여되는 경우 최적의 투여 용법(들)을 결정할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서 최적 PEG-IL-10 투여 용법은 용량 당 투여되는 PEG-IL-10의 양 (예를 들어, 1.0 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만, 0.75 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만, 0.5 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만, 0.25 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만, 또는 0.125 $\mu\text{g/kg/일}$ 미만)의 감소를 요구할 수 있다. 본원 개시내용의 특정 예시적 구현예에서, 평균 IL-10 혈청 최저 농도는 약 0.1 ng/mL 내지 약 9.5 ng/mL, 약 0.25 ng/mL 내지 약 8.0 ng/mL, 약 0.5 ng/mL 내지 약 7.0 ng/mL, 약 0.75 ng/mL 내지 약 6.0 ng/mL, 또는 약 1.0 ng/mL 내지 약 5.0 ng/mL의 범위일 수 있다.

[0129] 본원 개시내용은 혈청 농도가 피크를 성취하도록 IL-12 제제를 투여하고 이어서 이것이 다시 투여되기 전에 필수적으로 측정될 수 없도록 세정된다. 예를 들어, PEG-IL-10이 ~ 10 ng/mL의 혈청 최저 농도를 유지하기 위해 24시간 마다 투여되는 경우, IL-12 제제는 이의 MTD 보다 적은 피크를 유도하는 양 (예를 들어, 5 $\mu\text{g/kg/일}$)으로 동시 투여될 수 있고 이어서 대사되어 24시간 투여 사이클 말기에는 어떠한 측정가능한 혈청 수준이 없다. PEG-IL-10의 투여의 경우와 같이, IL-12 제제의 용량은 질환, 장애 또는 병태 (예를 들어, 국소화된종양 또는 전이성 질환)의 특성, 대상체가 병을 앓는 정도 (예를 들어, 초기 대 후기 단계 질환), 병용 요법이 투여되는지 및 환자-특이적 파라미터 (예를 들어, 간 및 신장 기능)를 포함하는 다수의 인자에 의존할 수 있다.

[0130] PEG-IL-10이 본원에 기재된 것들과 같은 IL-12 제제와 병용되어 투여되는 경우, 단독요법에 적용될 수 있는 PEG-IL-10의 투여 파라미터 중 하나 이상은 변형될 수 있고 단독요법에 적용될 수 있는 IL-12 제제의 투여 파라미터는 동일하게 유지될 수 있고; 단독요법에 적용될 수 있는 PEG-IL-10의 투여 파라미터 중 하나 이상은 동일하게 유지될 수 있고 단독요법에 적용될 수 있는 IL-12 제제의 투여 파라미터 중 하나 이상은 변형될 수 있거나; 단독요법에 적용될 수 있는 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 투여 파라미터 중 하나 이상은 변형될 수 있거나; PEG-IL-10 및 IL-12 제제 각각의 투여 파라미터는 동일하게 유지될 수 있다.

[0131] IL-10의 생산 방법

[0132] 본원 개시내용의 폴리펩티드는 비재조합 (예; 화학적 합성) 및 재조합 방법을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 생성될 수 있다.

[0133] A. 화학적 합성

[0134] 폴리펩티드가 화학적으로 합성되는 경우, 상기 합성은 액체 상 또는 고체 상을 통해 진행할 수 있다. 고체 상 펩티드 합성 (SPPS)은 비천연 아미노산의 도입 및/또는 펩티드/단백질 골격 변형을 가능하게 한다. 다양한 형태의 SPPS, 예를 들어, 9-플루오레닐메톡시카보닐 (Fmoc) 및 3급-부틸옥시카보닐 (Boc)이 본 발명의 폴리펩티드를 합성하기 위해 이용 가능하다. 화학적 합성의 세부사항은 당해 분야에 공지되어 있다 (예: Ganesan A. (2006) *Mini Rev. Med. Chem.* 6: 3-10; 및 Camarero J. A. 등, (2005) *Protein Pept Lett.* 12: 723-8).

[0135] 고체 상 펩티드 합성은 이후 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 알파 작용기 (Na) 및 임의의 반응성 측쇄는 산 불안정성 또는 염기 불안정성 그룹으로 보호된다. 보호 그룹은 아미드 결합을 연결시키기 위한 조건하에 안정하지만, 형성된 펩티드 쇄를 손상시키지 않고 쉽게 절단될 수 있다. α -아미노 작용기에 적합한 보호 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: Boc, 벤질옥시카보닐 (Z), O-클로르벤질옥시카보닐, 바이-페닐이소프로

필옥시카보닐, 3급-아밀옥시카보닐 (Amoc), α , α -디메틸-3,5-디메톡시-벤질옥시카보닐, *o*-니트로설페닐, 2-시아노-3급-부톡시-카보닐, Fmoc, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde) 등.

[0136] 적합한 측쇄 보호 그룹은 다음을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 아세틸, 알릴 (Al1), 알릴옥시카보닐 (Al1oc), 벤질 (Bz1), 벤질옥시카보닐 (Z), 3급-부틸옥시카보닐 (Boc), 벤질옥시메틸 (Bom), *o*-브로모벤질옥시카보닐, 3급-부틸 (tBu), 3급-부틸디메틸실릴, 2-클로로벤질, 2-클로로벤질옥시카보닐, 2,6-디클로로벤질, 사이클로헥실, 사이클로펜틸, 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소사이클로헥스-1-일리덴)에틸 (Dde), 이소프로필, 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤질설포닐 (Mtr), 2,3,5,7,8-펜타메틸크로만-6-설포닐 (Pmc), 피발릴, 테트라하이드로피란-2-일, 토실 (Tos), 2,4,6-트리메톡시벤질, 트리메틸실릴 및 트리틸 (Trt).

[0137] 고체 상 합성에서, C-말단 아미노산은 적합한 지지체 재료에 결합된다. 적합한 지지체 재료는 합성 공정의 단계별 축합 및 절단 반응을 위한 시약 및 반응 조건에 대해 불활성이고 사용되는 반응 매질에 용해되지 않는 것들이다. 시판되는 지지체 재료의 예는 반응성 그룹 및/또는 폴리에틸렌 글리콜로 변형된스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 클로로메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체; 하이드록시메틸화 또는 아미노메틸화 스티렌/디비닐벤젠 공중합체 등을 포함한다. 펩티드산의 제조가 목적시 되는 경우, 4-벤질옥시벤질-알코올 (Wang-앵커) 또는 2-클로로트리틸 클로라이드로 유도체화된 폴리스티렌 (1 %) -디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다. 펩티드 아미드의 경우, 5-(4'-아미노메틸)-3',5'-디메톡시페녹시)발레르산 (PAL-앵커) 또는 *p*-(2,4-디메톡시페닐-아미노메틸)-페녹시 그룹 (Rink 아미드 앵커)으로 유도체화된 폴리스티렌 (1 %) 디비닐벤젠 또는 TentaGel®이 사용될 수 있다.

[0138] 중합성 지지체에 대한 연결은 실온 또는 승온 (예: 40 °C 내지 60 °C)에서, 다음의 반응 시간으로 에탄올, 아세토니트릴, N,N-디메틸포름아미드 (DMF), 디클로로메탄, 테트라하이드로푸란, N-메틸피롤리돈 또는 유사한 용매에 활성화 시약을 첨가하여 C-말단 Fmoc-보호된 아미노산을 지지체 재료와 반응시킴으로써 달성될 수 있다: 예를 들어, 2 내지 72시간.

[0139] PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 Na-보호된 아미노산 (예: Fmoc 아미노산)의 커플링은, 예를 들어, 1-하이드록시벤조트리아졸 또는 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸의 존재 또는 부재하에 커플링제, 예를 들어, N,N'-디사이클로헥실카보디이미드 (DCC), N,N'-디이소프로필카보디이미드 (DIC) 또는 다른 카보디이미드, 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 테트라플루오로보레이트 (TBTU) 또는 다른 우로늄 염, O-아실-우레아, 벤조트리아졸-1-일-트리스-피롤리디노-포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBOP) 또는 다른 포스포늄 염, N-하이드록시석신아미드, 다른 N-하이드록시아미드 또는 옥심의 도움으로, 예를 들어, HOBt를 첨가하고, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민 (DIEA), 트리에틸아민 또는 N-메틸모르폴린, 예를 들어, 디이소프로필에틸아민과 같은 염기를 첨가하거나 첨가하지 않고 TBTU의 도움으로 다음과 같은 반응 시간으로 수행될 수 있다: 2 내지 72시간 (예: 3시간, 아미노산 및 커플링 시약의 1.5배 내지 3배 과량으로, 예를 들어, 2배 과량으로, 디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈 또는 디클로로메탄, 예를 들어, 디메틸포름아미드와 같은 용매 중에서 약 10° C 내지 50° C의 온도, 예를 들어, 25° C에서).

[0140] 커플링 시약 대신에, 활성 에스테르 (예: 펜타플루오로페닐, *p*-니트로페닐 등), Na-Fmoc-아미노산의 대칭성 무수물, 이의 산 클로라이드 또는 산 플루오라이드를 상기한 조건하에 사용하는 것도 또한 가능하다.

[0141] Na-보호된 아미노산 (예: Fmoc 아미노산)은 DIEA를 첨가하고 다음의 반응 시간으로 디클로메탄 중의 2-클로로트리틸 수지에 커플링될 수 있다: 10 내지 120분, 예를 들어, 20분, 그러나 이 용매 및 이 염기의 사용에 한정되지는 않는다.

[0142] 보호된 아미노산의 연속 커플링은 통상적인 방법에 따라서 펩티드 합성으로, 전형적으로 자동화 펩티드 합성화기에서 수행될 수 있다. 하기로 처리하여 고체 상에서 커플링된 아미노산의 Na-Fmoc 보호 그룹을 절단후: 예를 들어, 디메틸포름아미드 중의 피페리딘 (10 % 내지 50 %)으로 5 내지 20분 동안, 예를 들어, DMF 중의 50 % 피페리딘으로 2 x 2분 및 DMF 중의 20 % 피페리딘으로 1 x 15 분, 다음 보호된 아미노산을 3 내지 10배 과량으로, 예를 들어, 10배 과량으로 약 10 °C 내지 50 °C의 온도, 예를 들어, 25 °C에서 디클로로메탄, DMF 또는 둘의 혼합물과 같은 불활성, 비수성 극성 용매 중에서 이전 아미노산에 커플링된다. 제1의 Na-Fmoc 아미노산의 PAL, Wang 또는 Rink 앵커에의 커플링을 위한 이전에 언급된 시약은 커플링 시약으로서 적합하다. 보호된 아미노산, 또는 염화물 또는 불소화물 또는 이의 대칭 무수물의 활성 에스테르는 또한 대안으로서 사용될 수 있다.

[0143] 고체 상 합성의 종결시, 펩티드는 측쇄 보호 그룹을 동시에 절단하면서 지지체 재료로부터 절단된다. 절단은 하기를 첨가하면서 트리플루오로아세트산 또는 다른 강산성 매질로 수행될 수 있다: 5 %-20 % V/V의 스캐빈저, 예

를 들어, 디메틸설파이드, 에틸메틸설파이드, 티오아니솔, 티오크레졸, m-크레졸, 아니솔 에탄디티올, 페놀 또는 물, 예를 들어, 15 % v/v 디메틸설파이드/에탄디티올/m-크레졸 1: 1: 1, 0.5 내지 3시간 이내, 예를 들어, 2 시간. 완전 보호된 측쇄를 갖는 펩티드는 2-클로로트리틸 앵커를 빙초산/트리플루오로에탄올/디클로로메탄 2: 2: 6으로 절단시킴으로써 수득된다. 보호된 펩티드는 실리카 겔 상에서 크로마토그래피로 정제될 수 있다. 펩티드가 Wang 앵커를 통해 고체 상에 연결되는 경우 및 C-말단 알킬아미드화로 펩티드를 수득하고자 하는 경우, 절단은 알킬아민 또는 플루오로알킬아민을 사용하는 아미노분해에 의해 수행될 수 있다. 아미노분해는 약 -10 °C 내지 50 °C의 온도 (예: 약 25 °C) 및 약 12 내지 24시간 (예: 약 18시간)의 반응 시간으로 수행된다. 또한, 상기 펩티드는 예를 들어, 메탄올을 사용하여 재-에스테르화함에 의해 지지체로부터 절단될 수 있다.

[0144] 수득되는 산성 용액은 펩티드를 침전시키고 따라서 에테르 중에 남아있는 스캐빈저 및 절단된 보호 그룹을 분리하기 위해 3 내지 20배 양의 냉 에테르 또는 n-헥산, 예를 들어, 10배 과다한 디에틸 에테르와 과 혼합될 수 있다. 추가의 정제는 펩티드를 빙초산으로부터 수회 재침전시킴으로써 수행될 수 있다. 수득된 침전물을 물 또는 3급-부탄올 또는 두 용매의 혼합물, 예를 들어, 3급-부탄올/물의 1: 1 혼합물에 용해시키고, 동결 건조시킬 수 있다.

[0145] 수득된 펩티드는 다음을 포함하는 다양한 크로마토그래피 방법에 의해 정제될 수 있다: 아세테이트 형태의 약염기성 수지를 통한 이온 교환; 하기 상의 소수성 흡착 크로마토그래피: 비유도체화 폴리스티렌/디비닐벤젠 공중합체 (예: Amberlite® XAD); 실리카 겔 상의 흡착 크로마토그래피; 예를 들어, 카복시메틸셀룰로스 상의 이온 교환 크로마토그래피; 예를 들어, Sephadex® G-25 상의 분배 크로마토그래피; 역류 분배 크로마토그래피; 또는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC), 예를 들어, 옥틸 또는 옥타데실실릴실리카 (ODS) 상의 역상 HPLC.

[0146] B. 재조합 생산

[0147] 인간 및 마우스 IL-10의 제조를 기재하는 방법은 예를 들어, 하기의 특허 문헌에서 찾을 수 있다: 미국특허 번호 5,231,012, 이는 재조합 및 다른 합성 기술을 포함하는, IL-10 활성을 갖는 단백질의 제조 방법을 교시하고 있다. IL-10는 바이러스 기원일 수 있고, 엡스타인 바 바이러스 (Epstein Barr virus) (BCRF1 단백질)로부터 바이러스 IL-10의 클로닝 및 발현은 다음 문헌에 개시되어 있다: Moore 등, (1990) Science 248: 1230. IL-10은 본원에 기재된 것들과 같은, 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 다수의 방식으로 수득될 수 있다. 재조합 인간 IL-10은 또한 예를 들어, 하기의 제조원으로부터 시판된다: PeproTech, Inc., Rocky Hill, N.J.

[0148] 폴리펩티드가 재조합 기술을 사용하여 제조되는 경우, 폴리펩티드는 임의의 적합한 작제물, 및 세균과 같은 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있는 임의의 적합한 숙주 세포를 사용하여, 세포내 단백질로서 또는 분비된 단백질로서 제조될 수 있고 상기 세포는 각각 (예를 들어, 이. 콜리) 또는 효모 숙주 세포이다. 숙주 세포로부터 사용될 수 있는 진핵 세포의 다른 예는 세포, 포유동물 세포 및/또는 식물 세포를 포함한다. 포유동물 숙주 세포가 사용되는 경우, 이들은 하기의 인간 세포를 포함할 수 있다: (예를 들어, HeLa, 293, H9 및 Jurkat 세포); 마우스 세포 (예: NIH3T3, L 세포, 및 C127 세포); 영장류 세포 (예: Cos 1, Cos 7 및 CV1); 및 햄스터 세포 (예: 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포).

[0149] 폴리펩티드의 발현에 적합한, 다양한 숙주-벡터 시스템은 당업계에 공지된 표준 과정에 따라 사용될 수 있다. 참고: 예를 들면, Sambrook 등, 1989 Current Protocols in Molecular Biology Cold Spring Harbor Press, New York; 및 Ausubel 등 1995 Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Wiley and Sons. 숙주 세포에 유전 재료를 도입하는 방법, 예를 들어, 형질전환, 전기천공, 접합, 인산칼슘 방법 등을 포함한다. 전달 방법은 도입된 폴리펩티드 코딩 핵산의 안정한 발현을 제공하도록 선택될 수 있다. 폴리펩티드 코딩 핵산은 유전되는 에피솜 요소 (예: 플라스미드)로서 제공될 수 있거나 게놈적으로 통합될 수 있다. 관심 있는 폴리펩티드의 생산에 사용하기 위한 다양한 적합한 벡터는 시판된다.

[0150] 벡터는 숙주 세포에서 염색체의 유지를 제공할 수 있거나 숙주 세포 게놈으로의 통합을 제공할 수 있다. 상기 발현 벡터는 전사 및 해독 조절 서열을 제공하고 유도성 또는 항상성 발현을 제공할 수 있으며, 상기 코딩 영역은 전사 개시 영역, 및 전사 및 해독 종결 영역의 전사 제어하에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, 전사 및 해독 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 개시 및 종료 서열, 전사 개시 및 종료 서열 및 인핸서 또는 활성화인자 서열을 포함할 수 있지만 이에 국한되지 않는다. 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있고, 하기될 수 있다: 강한 구성적 프로모터 (예: T7).

[0151] 발현 작제물은 일반적으로 관심 있는 단백질을 코딩하는 핵산 서열의 삽입을 제공하기 위해 프로모터 서열 근처에 위치하는 편리한 제한 부위를 갖는다. 발현 숙주에서 작동하는 선택가능한 마커는 벡터를 함유하는 세포의

선택을 촉진시키기 위해 존재할 수 있다. 더욱이, 발현 작제물은 추가의 요소들을 포함할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 1개 또는 2개의 복제 시스템을 가질 수 있고 따라서 이것이 유기체, 예를 들어, 발현을 위해 포유 동물 또는 곤충 세포에서 및 클로닝 및 증폭을 위한 원핵 세포 숙주에 유지될 수 있게 한다. 또한, 발현 작제물은 형질전환된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하기 위해 선택가능한 마커 유전자를 함유할 수 있다. 선택 가능한 유전자는 당해 분야에 익히 공지되어 있고, 사용되는 숙주 세포에 따라 변할 것이다.

[0152] 단백질의 분리 및 정제는 당해 분야에 공지된 방법에 따라서 달성될 수 있다. 예를 들어, 단백질은 단백질을 항 상성으로 및/또는 유도시 발현하도록 유전학적으로 변형된 세포의 용해물로부터 또는 일반적으로 샘플과 항-단백질 항체와의 접촉, 비-특이적으로 결합된 물질을 제거하기 위한 세척 및 특이적으로 결합된 단백질을 용출시킴을 포함하는, 면역친화성 정제에 의해 합성 반응 혼합물로부터 분리될 수 있다. 분리된 단백질은 투석 및 단백질 정제에 통상적으로 사용되는 다른 방법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 하나의 구현예에서, 단백질은 금속 킬레이트 크로마토그래피 방법을 사용하여 분리될 수 있다. 단백질은 분리를 촉진시키기 위한 변형을 함유할 수 있다.

[0153] 폴리펩티드는 실질적으로 순수하거나 분리된 형태 (예를 들어, 다른 폴리펩티드가 없는)로 제조될 수 있다. 폴리펩티드는 존재할 수 있는 다른 성분 (예를 들어, 다른 폴리펩티드 또는 다른 숙주 세포 성분)에 상대적으로 폴리펩티드가 집적된 조성물 중에 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제된 폴리펩티드는 폴리펩티드가 실질적으로 다른 발현된 단백질이 없는 예를 들어, 약 90 % 미만, 약 60 % 미만, 약 50 % 미만, 약 40 % 미만, 약 30 % 미만, 약 20 % 미만, 약 10 % 미만, 약 5 % 미만, 또는 약 1 % 미만으로 조성물 중에 존재하도록 제공될 수 있다.

[0154] IL-10 폴리펩티드는 IL-10 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 작제물을 제공하기 위해 당업계에 공지된 상이한 IL-10-관련 핵산을 조작하기 위한 재조합 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 특별한 아미노산 서열이 제공될 때, 당업자는, 예를 들어, 분자 생물학에서 그의 배경 및 경험의 견지에서 이러한 아미노산 서열을 코딩하는 다양한 상이한 핵산 분자를 인식할 것이라는 것이 이해될 것이다.

[0155] 아미드 결합 치환

[0156] 일부의 경우에, IL-10은 펩티드 결합 이외의 하나 이상의 결합을 포함하고, 예를 들어, 적어도 2개의 인접 아미노산은 아미드 결합 이외의 결합을 통해 결합된다. 예를 들어, 목적하지 않은 단백질 분해 또는 다른 분해 수단을 감소시키거나 제거하고/하거나 혈청 안정성을 증가시키고/시키거나 형태 가요성을 제한하거나 증가시키기 위해, IL-10의 골격 내의 하나 이상의 아미드 결합이 치환될 수 있다.

[0157] 또 다른 예에서, IL-10에서 하나 이상의 아미드 결합 ($-CO-NH-$)은 아미드 결합의 이소스테레인, 예를 들어, $-CH_2NH-$, $-CH_2S-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH=CH-$ (시스 및 트랜스), $-COCH_2-$, $-CH(OH)CH_2-$ 또는 $-CH_2SO-$ 인 연결기로 대체될 수 있다. IL-10에서 하나 이상의 아미드 연결기는 또한 예를 들어, 환원된 이소스테레 슈도펩티드 결합에 의해 대체될 수 있다. 다음을 참조한다: Couder 등 (1993) *Int. J. Peptide Protein Res.* 41: 181-184. 이러한 대체 및 그들을 수행하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0158] 아미노산 치환

[0159] 하나 이상의 아미노산 치환이 IL-10 폴리펩티드에서 수행될 수 있다. 다음은 비제한적인 예이다:

[0160] a) 측쇄, 사이클릭 및 직쇄 알킬, 알케닐 또는 알킬닐 치환을 포함하는 C_1-C_{10} 탄소로부터의 지방족 측쇄에 의해 치환된 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 노르류신, (S)-2-아미노부티르산, (S)-사이클로헥실알라닌 또는 다른 단순 알파-아미노산을 포함하는 알킬-치환된 소수성 아미노산의 치환;

[0161] b) 상기 나열된 방향족 아미노산의 아미노, 알킬아미노, 디알킬아미노, 아자, 할로젠화 (플루오로, 클로로, 브로모 또는 요오도) 또는 알콕시 (C_1-C_4 로부터)-치환된 형태를 포함하여 페닐알라닌, 트립토판, 티로신, 설포티로신, 비페닐알라닌, 1-나프틸알라닌, 2-나프틸알라닌, 2-벤조티에닐알라닌, 3-벤조티에닐알라닌, 히스티딘을 포함하는 방향족-치환된 소수성 아미노산의 치환, 이의 예시적 예는 하기와 같다: 2-, 3- 또는 4-아미노페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-클로로페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메틸페닐알라닌, 2-, 3- 또는 4-메톡시페닐알라닌, 5-아미노-, 5-클로로-, 5-메틸- 또는 5-메톡시트립토판, 2'-, 3'- 또는 4'-아미노-, 2'-, 3'- 또는 4'-클로로-, 2, 3 또는 4-비페닐알라닌, 2'-, 3'- 또는 4'-메틸-, 2-, 3- 또는 4-비페닐알라닌 및 2- 또는 3-피리딜알라닌;

[0162] c) 치환체가 헤테로원자 (예: 알파 질소, 또는 원위 질소 또는 질소들, 또는, 예를 들어, 프로-R 위치에서 알파 탄소 상에 존재하는지의 여부에 관계 없이 이전 아미노산의 알킬, 알케닐 또는 아릴 치환된 (C_1-C_{10} 측쇄, 직쇄

또는 사이클릭으로부터) 유도체를 포함하여, 아르기닌, 리신, 히스티딘, 오르니틴, 2,3-디아미노프로피온산, 호모아르기닌을 포함하는 염기성 측쇄를 함유하는 아미노산의 치환.예시적인 예로서 작용하는 화합물은 하기를 포함한다: N-엡실론-이소프로필-리신, 3-(4-테트라하이드로피리딜)-글리신, 3-(4-테트라하이드로피리딜)-알라닌, N,N-감마,감마'-디에틸-호모아르기닌.알킬 그룹이 알파-탄소의 프로-R 위치를 차지하는 알파-메틸-아르기닌, 알파-메틸-2,3-디아미노프로피온산, 알파-메틸-히스티딘, 알파-메틸-오르니틴과 같은 화합물도 또한 포함된다. 알킬, 방향족, 헤테로방향족 (여기서, 헤테로방향족 그룹은 단독으로 또는 병용하여 하나 이상의 질소, 산소 또는 황 원자를 갖는다), 카복실산 또는 임의의 다수의 익히 공지된 활성화 유도체, 예를 들어, 산 클로라이드, 활성 에스테르, 활성 아졸리드 및 관련 유도체, 및 리신, 오르니틴 또는 2,3-디아미노프로피온산으로부터 형성된 아미드도 또한 포함된다;

[0163] d) 아스파르트산, 글루탐산, 호모글루탐산, 티로신, 2,4-디아미노프로피온산의 알킬, 아릴, 아릴알킬, 및 헤테로아릴 설포나미드, 오르니틴 또는 리신 및 테트라졸-치환된 알킬 아미노산을 포함하는 산성 아미노산의 치환;

[0164] e) 아스파라긴, 글루타민, 및 아스파라긴 또는 글루타민의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 측쇄 아미드 잔기의 치환; 및

[0165] f) 세린, 트레오닌, 호모세린, 2,3-디아미노프로피온산, 및 세린 또는 트레오닌의 알킬 또는 방향족 치환된 유도체를 포함하는 하이드록실-함유 아미노산의 치환.

[0166] 일부 경우에, IL-10는 아미노산의 하나 이상의 천연 발생하는 비유전적으로 코딩된 L-아미노산, 합성 L-아미노산, 또는 D-에난티오머를 포함한다. 예를 들어, IL-10은 오직 D-아미노산만을 포함할 수 있다. 예를 들어, IL-10 폴리펩티드는 하기 잔기 중의 하나 이상을 포함할 수 있다: 하이드록시프롤린, β -알라닌, o-아미노벤조산, m-아미노벤조산, p-아미노벤조산, m-아미노메틸벤조산, 2,3-디아미노프로피온산, α -아미노이소부티르산, N-메틸글리신 (사르코신), 오르니틴, 시트룰린, 3급-부틸알라닌, 3급-부틸글리신, N-메틸이소류신, 페닐글리신, 사이클로헥실알라닌, 노르류신, 나프틸알라닌, 피리딜알라닌, 3-벤조티에닐 알라닌, 4-클로로페닐페닐알라닌, 2-플루오로페닐알라닌, 3-플루오로페닐알라닌, 4-플루오로페닐알라닌, 페니실라민, 1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카복실산, β -2-티에닐알라닌, 메티오닌 설포사이드, 호모아르기닌, N-아세틸 리신, 2,4-디아미노 부티르산, 로우-아미노페닐알라닌, N-메틸발린, 호모시스테인, 호모세린, ϵ -아미노 헥산산, ω -아미노헥산산, ω -아미노헵탄산, ω -아미노옥탄산, ω -아미노데칸산, ω -아미노테트라데칸산, 사이클로헥실알라닌, α , γ -디아미노부티르산, α , β -디아미노프로피온산, δ -아미노 발레르산, 및 2,3-디아미노부티르산.

[0167] 추가의 변형

[0168] 시스테인 잔기 또는 시스테인 유사체는 디설파이드 연결기를 통해 또 다른 펩티드에 대한 연결기를 제공하거나 IL-10 폴리펩티드의 사이클릭화를 제공하기 위해 IL-10 폴리펩티드에 도입될 수 있다. 시스테인 또는 시스테인 유사체를 도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있다; 문헌참조: 예를 들어, 미국특허 번호 8,067,532.

[0169] IL-10 폴리펩티드는 폐환될 수 있다. 하나 이상의 시스테인 또는 시스테인 유사체는 IL-10 폴리펩티드로 도입될 수 있고, 상기 도입된 시스테인 또는 시스테인 유사체는 제2 도입된 시스테인 또는 시스테인 유사체와 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 사이클릭화의 다른 수단은 옥심 링커 또는 란티오닌 링커의 도입을 포함하고; 다음을 참조한다: 예를 들어, 미국특허 번호 8,044,175호. 사이클릭화 결합을 형성할 수 있는 아미노산 (또는 비아미노산 잔기)의 임의의 병용이 사용될 수 있고/있거나 도입될 수 있다. 사이클릭화 결합은 연결기의 도입을 가능하게 하는 작용성 그룹과 아미노산의 임의의 병용으로 (또는 아미노산 및 $-(CH_2)_n-CO-$ 또는 $-(CH_2)_n-C_6H_4-CO-$ 으로) 생성될 수 있다. 일부 예는 디설파이드, 디설파이드 모방체, 예를 들어, $-(CH_2)_n-$ 카바 연결기, 티오아세탈, 티오에터 연결기 (시스타티오닌 또는 란티오닌) 및 에스테르 및 에테르를 함유하는 연결기이다. 이러한 예에서, n은 임의의 정수일 수 있지만, 흔히 10 미만이다.

[0170] 다른 변형은, 예를 들면, N-알킬 (또는 아릴) 치환 ($\psi[CONR]$), 또는 락탐 및 다른사이클릭 구조물을 삭제하기 위한 골격 가교결합을 포함한다. 다른 유도체는 하기를 포함한다: C-말단 하이드록시메틸 유도체, o-변형된 유도체(예: C-말단 하이드록시메틸 벤질 에테르), 알킬아미드 및 하이드라지드와 같은 치환된 아미드를 포함하는 N-말단 변형된 유도체.

[0171] 일부 경우에, IL-10 폴리펩티드 중의 하나 이상의 L-아미노산은 하나 이상의 D-아미노산으로 대체된다.

[0172] 일부 경우에, IL-10 폴리펩티드는 레트로인버소 (retroinverso) 유사체이다 (참조: 예를 들어, Sela and Zisman (1997) FASEB J. 11: 449). 레트로-인버소 펩티드 유사체는 아미노산 서열의 방향이 역전되고 (레트로),

내부의 하나 이상의 아미노산의 키랄성 D- 또는 L-이, 예를 들어, L-아미노산보다 오히려 D-아미노산을 사용하여 반전되는 (인버스) 선형 폴리펩티드의 이성체이다. [참조: 예를 들어, Jameson 등 (1994) Nature 368: 744; 및 Brady 등 (1994) Nature 368: 6920].

[0173] IL-10 폴리펩티드는 지질 이중층, 미셀, 세포 막, 유기 막 또는 소포 막을 가로지르는 것을 용이하게 하는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 탄수화물 또는 유기 또는 무기 분자를 의미하는 “단백질 형질도입 도메인” (PTD) 을 포함할 수 있다. 또 다른 분자에 부착된 PTD는 분자가 막을 가로지르는 것, 예를 들어, 세포외 공간으로부터 세포내 공간으로, 또는 세포질에서 세포 기관 내로 이동하는 것을 촉진시킨다. 일부 구현예에서, PTD는 IL-10 폴리펩티드의 아미노 말단에 공유 결합되는 반면, 다른 구현예에서, PTD는 IL-10 폴리펩티드의 카복실 말단에 공유 결합된다. 예시적인 단백질 형질도입 도메인은 하기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 최소의 운데카펩티드 단백질 형질도입 도메인 (YGRKKRRQRRR을 포함하는 HIV-1 TAT의 잔기 47-57에 상응; 서열번호: 3); 하기를 포함하는 폴리아르기닌 서열: 세포에 직접 도입하기에 충분한 아르기닌 잔기의 수 (예: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10 내지 50개 아르기닌); VP22 도메인 (Zender 등 (2002) Cancer Gene Ther. 9(6): 489-96); 드로소필라 안테나페디아 단백질 형질도입 도메인 (Noguchi 등 (2003) Diabetes 52(7): 1732-1737); 절단된 인간 칼시토닌 펩티드 (Trehin 등 (2004) Phar. M. Research 21: 1248-1256); 폴리리신 (Wender 등 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 13003-13008); RRQRRTSKLMKR (서열번호: 4); Transportan GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (서열번호: 5); KALAWAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA (서열번호: 6); 및 RQIKIWQNRRMKWKK (서열번호: 7). 예시적인 PTD는 YGRKKRRQRRR (서열번호: 3), RKKRRQRRR (서열번호: 8); 3개의 아르기닌 잔기 내지 50개의 아르기닌 잔기의 아르기닌 단독중합체를 포함하지만, 이에 한정되지 않고; 예시적인 PTD 도메인 아미노산 서열은 하기 중의 어느 하나를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: YGRKKRRQRRR (서열번호: 3); RKKRRQRR (서열번호: 9); YARAAARQARA (서열번호: 10); THRLPRRRRRR (서열번호: 11); 및 GRRARRRRRRR (서열번호: 12).

[0174] IL-10 폴리펩티드의 C-말단에서 아미노산의 카복실 그룹 COR₃은 유리 형태 (R₃ = OH) 또는 생리학적 관용성 알칼린 또는 알칼린 토금속 염, 예를 들어, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘 염 형태로 존재할 수 있다. 카복실 그룹은 또한 1차, 2차 또는 3차 알코올, 예를 들어, 메탄올, 분지되거나 비분지된 C₁-C₆-알킬 알코올, 예를 들어, 에틸 알코올 또는 3급-부탄올로 에스테르화될 수 있다. 카복실 그룹은 또한 1급 또는 2급 아민, 예를 들어, 암모니아, 분지되거나 비분지된 C₁-C₆-알킬아민 또는 C₁-C₆ 디-알킬아민, 예를 들어, 메틸아민 또는 디메틸아민으로 아마이드화될 수 있다.

[0175] IL-10 폴리펩티드의 N-말단에서 아미노산 NR₁R₂의 아미노 그룹은 유리 형태 (R₁ = H 및 R₂ = H) 또는 생리학적 관용성 염, 예를 들어, 클로라이드 또는 아세테이트의 형태로 존재할 수 있다. 아미노 그룹은 또한 R₁ = H이고, R₂ = 아세틸, 트리플루오로아세틸 또는 아다만틸이도록 산으로 아세틸화될 수 있다. 아미노 그룹은 펩티드 화학에 통상적으로 사용되는 아미노-보호 그룹, 예를 들어, 하기로 보호된 형태로 존재할 수 있다: 상기 제공된 것들 (예: Fmoc, 벤질옥시-카보닐 (Z), Boc, 및 Alloc). 아미노 그룹은 N-알킬화될 수 있고, 여기서 R₁ 및/또는 R₂ = C₁-C₆ 알킬 또는 C₂-C₈ 알케닐 또는 C₇-C₉ 아르알킬이다. 알킬 잔기는 직쇄, 측쇄 또는 사이클릭 (예를 들어, 각각, 에틸, 이소프로필 및 사이클로헥실)일 수 있다.

[0176] IL-10의 폐길화

[0177] IL-10의 폐길화는 IL-10 폴리펩티드 서열을 임의의 다양한 비-단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 접합시키거나 연결시킴을 포함한다. 이것은 흔하게 단백질 및 비단백질성 중합체, 예를 들어, PEG 둘 다에 공유적으로 결합된 연결 모이어티에 의해 수행된다. 이러한 PEG-접합 생체분자는 보다 우수한 물리적 및 열적 안정성, 효소 분해에 대한 민감성으로부터 보호, 증가된 용해도, 보다 긴 생체내 순환 반감기 및 감소된 클리어런스, 감소된 면역원성 및 항원성, 및 감소된 독성을 포함하는 임상적으로 유용한 특성을 포함하는 것으로 나타났다. 약동학적 파라미터에 대한 폐길화의 이로운 효과에 더하여, 폐길화 자체는 활성을 증진시킬 수 있다. 예를 들어, PEG-IL-10은 비폐길화된 IL-10 보다 특정 암에 대해 보다 효능적인 것으로 나타났다 (문헌참조: 예를 들어, EP 206636A2).

[0178] 폴리펩티드 서열에의 접합에 적합한 PEG는 일반적으로 실온에서 물에 가용성이고, 화학식 R(O-CH₂-CH₂)_nO-R를 갖고, 여기서 R은 수소 또는 보호 그룹, 예를 들어, 알킬 또는 알칸올 그룹이고, n은 1 내지 1000의 정수이다. R이 보호 그룹이면, 이는 일반적으로 1 내지 8개의 탄소를 갖는다. 폴리펩티드 서열에 접합된 PEG는 선형이거나

분지될 수 있다. 분지된 PEG 유도체, “스타-PEG” 및 다중-암 PEG가 본 발명에 의해 고려된다. 본원 개시내용에 사용된 PEG의 분자량은 임의의 특정 범위로 국한되지 않고, 이의 예는 본원의 다른 곳에 제시되어 있고; 예를 들어, 특정 구현에는 5 kDa 내지 20 kDa의 분자량을 갖고, 다른 구현에는 4 kDa 내지 10 kDa의 분자량을 갖는다.

[0179] 본 발명은 또한 PEG가 상이한 n 값을 갖고, 따라서 다양한 상이한 PEG가 특정비율로 존재하는 접합체의 조성물을 고려한다. 예를 들어, 일부 조성물은 $n=1, 2, 3$ 및 4인 접합체의 혼합물을 포함한다. 일부 조성물에서, $n=1$ 인 접합체의 비율은 18 내지 25 %이고, $n=2$ 인 접합체의 비율은 50 내지 66 %이고, $n=3$ 인 접합체의 비율은 12 내지 16 %이고, $n=4$ 인 접합체의 비율은 5 % 이하이다. 이러한 조성물은 당해 분야에 공지된 반응 조건 및 정제 방법에 의해 생성될 수 있다. 예시적인 반응 조건은 명세서 전반에 걸쳐 기재된다. 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 접합체를 분리할 수 있고 이어서 비변형된 단백질 서열이 없고 다른 수의 PEG가 부착된 접합체가 없는 정제된 목적하는 수의 PEG를 갖는 접합체를 함유하는 분획이 동정된다.

[0180] 폐길화는 폴리펩티드의 N-말단의 알파 아미노 그룹, 리신 잔기의 측쇄 상의 엡실론 아미노 그룹 및 히스티딘 잔기의 측쇄 상의 이미다졸 그룹에서 가장 빈번하게 발생한다. 대부분의 재조합 폴리펩티드가 단일 알파 및 다수의 엡실론 아미노 및 이미다졸그룹을 포함하기 때문에, 다수의 위치 이성체가 링커 화학에 따라 생성될 수 있다. 당해 분야에 공지된 일반적인 폐길화 전략이 본원에서 적용될 수 있다.

[0181] 2개의 광범위하게 사용되는 제1 세대 활성화된 모노메톡시 PEG (mPEG)는 숙시닐 카보네이트 PEG (SC-PEG; 문헌참조: 예를 들어, Zalipsky, 등 (1992) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 15: 100-114; 및 Miron and Wilcheck (1993) *Bio-conjug. Chem.* 4: 568-569) 및 벤조트리아졸 카보네이트 PEG (BTC-PEG; 문헌참조: 예를 들어, Dolence, 등 미국 특허 번호 5,650,234)이고, 이는 라이신 잔기와 우선적으로 반응하여 카바메이트 연결기를 형성하지만 또한 히스티딘 및 티로신 잔기와 반응하는 것으로 공지되어 있다. 하기 특정 분자 상에 히스티딘 잔기로의 연결기 (예를 들어, IFN- α)는 가수분해적으로 불안정한 아미다졸카바메이트 연결기인 것으로 나타났다 (문헌참조: 예를 들어, Lee and McNemar, U.S. 특허 번호 5,985,263). 제2 세대 폐길화 기술은 잔기 반응성에서 선택성의 부재뿐만 아니라 불안정한 연결을 회피하도록 디자인 되었다. PEG-알데하이드 링커의 사용은 환원 아민화를 통해 폴리펩티드의 N-말단 상의 단일 부위를 표적화한다.

[0182] PEG는 폴리펩티드 서열의 하나 이상의 유리된 아미노 또는 카복실 그룹과 폴리에틸렌 그룹 간의 결합을 매개하는 말단 반응성 그룹 (“스페이서”)을 통해 본원 개시내용의 폴리펩티드에 결합될 수 있다. 유리된 아미노 그룹에 결합될 수 있는 스페이서를 갖는 PEG는 폴리에틸렌 글리콜의 숙신산 에스테르를 N-하이드록시숙시닐이미드로 활성화시킴에 의해 제조될 수 있는 N-하이드록시숙시닐이미드 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 유리된 아미노 그룹에 결합될 수 있는 또 다른 활성화된 폴리에틸렌 글리콜은 2,4-비스(0-메톡시폴리에틸렌글리콜)-6-클로로-s-트리아진이고 이는 폴리에틸렌 글리콜 모노메틸 에테르를 염화시아누르와 반응시킴에 의해 제조될 수 있다. 유리 카복실 그룹에 결합된 활성화 폴리에틸렌 글리콜은 폴리옥시에틸렌디아민을포함한다.

[0183] 본원 개시내용의 하나 이상의 폴리펩티드 서열의, 스페이서를 갖는 PEG로의 접합은 다양한 통상적인 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 접합 반응은 5 내지 10의 pH에서, 4 ° C 내지 실온의 온도에서 30분 내지 20시간 동안 시약 대 단백질의 몰 비 4: 1 내지 30: 1을 사용하여 용액 중에서 수행될 수 있다. 반응 조건은 반응이 주로 목적하는 정도의 치환을 생성하도록 지시하기 위해 선택될 수 있다. 일반적으로 저온, 낮은 pH (예: pH=5), 및 짧은 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 감소시키는 경향이 있는 반면, 고온, 중성 내지 높은 pH (예: pH \geq 7), 및 긴 반응 시간은 부착된 PEG의 수를 증가시키는 경향이 있다. 당업계에 공지된 다양한 수단이 반응을 종결시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 반응은 반응 혼합물을 산성화시키고, 하기에서 동결시킴으로써 종결된다: 예를 들어, -20 ° C. 다양한 분자의 폐길화는, 예를 들어, 하기에서 논의된다: U.S. 특허번호들 5,252,714; 5,643,575; 5,919,455; 5,932,462; 및 5,985,263. PEG-IL-10은 예를 들어, 하기 문헌에 기재되어 있다: 예를 들어, 미국특허번호 7,052,686. 본원에 사용하기 위해 고려되는 특정 반응 조건은 실험 섹션에 제시되어 있다.

[0184] 본 발명은 또한 PEG 모방체의 사용을 고려한다. PEG의 특성 (예: 향상된 혈청 반감기)을 유지하면서 몇 가지 추가적인 유리한 특성을 부여하는 재조합 PEG 모방체가 개발되었다. 예로서, PEG와 유사한 확장된 형태를 형성할 수 있는 (예를 들어, Ala, Glu, Gly, Pro, Ser 및 Thr을 포함하는) 단순한 폴리펩티드 쇠는 하기에 이미 재조합적으로 융합되어 생성될 수 있다: 관심 있는 펩티드 또는 단백질 약물 (예: Amunix’ XTEN technology; Mountain View, CA). 이는 제조 공정 동안 추가의 접합 단계의 필요성을 제거한다. 또한, 확립된 분자 생물학 기술은 폴리펩티드 쇠의 측쇄 조성의 제어를 가능하게하여 면역원성 및 제조 특성의 최적화를 허용한다.

- [0185] 링커: 링커 및 그들의 용도는 상기 기재되었다. 적합한 링커는 일반적으로 변형된 폴리펩티드 서열과 연결된 성분 및 분자 사이의 일부 이동을 허용하기에 충분한 길이의 “가요성 링커”를 포함한다. 링커 분자는 일반적으로 약 6 내지 50 원자 길이이다. 링커 분자는 또한, 예를 들어, 아릴 아세틸렌, 2 내지 10개 단량체 단위를 함유하는 에틸렌 글리콜 올리고머, 디아민, 이산, 아미노산 또는 이들의 병용일 수 있다. 적합한 링커는 용이하게 선택될 수 있고, 하기와 같은 임의의 적합한 길이일 수 있다: 1 아미노산 (예: Gly), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50 또는 50 이상 아미노산.
- [0186] 가요성 링커의 예는 글리신 중합체 $(G)_n$, 글리신-알라닌 중합체, 알라닌-세린 중합체, 글리신-세린 중합체 (예를 들어, $(G_mS_o)_n$, $(GSGGS)_n$ (서열번호: 13), $(G_mS_oG_m)_n$, $(G_mS_oG_mS_oG_m)_n$ (서열번호: 14), $(GSGGS_m)_n$ (서열번호: 15), $(GSGS_mG)_n$ (서열번호: 16) 및 $(GGGS_m)_n$ (서열번호: 17), 및 이들의 병용물을 포함하고, 여기서, m, n, 및 o는 각각 독립적으로 적어도 1 내지 20의 정수로부터 선택되고, 예를 들어, 1-18, 2-16, 3-14, 4-12, 5-10, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10)로부터 선택됨), 및 기타 가요성 링커. 글리신 및 글리신-세린 중합체는 상대적으로 비구조화되고, 따라서 성분들 사이에 중성 테테르로서 작용할 수 있다. 가요성 링커의 예는 GSGS (서열번호: 18), GSGG (서열번호: 19), GSGSG (서열번호: 14), GSGGG (서열번호: 20), GGGSG (서열번호: 21), 및 GSSSG (서열번호: 22)를 포함하지만 이에 국한되지 않는다.
- [0187] 가요성 링커의 추가의 예는 하기 글리신 중합체 $(G)_n$ 또는 글리신-세린 중합체를 포함한다 (예를 들어, $(GS)_n$, $(GSGGS)_n$ (서열번호: 13), $(GGGS)_n$ (서열번호: 23) 및 $(GGGGS)_n$ (서열번호: 24)이고, 여기서, $n=1$ 내지 50, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 30-50이다). 예시적 가요성 링커는 GGG (서열번호: 23), GGGGS (서열번호: 24), GSGS (서열번호: 18), GSGG (서열번호: 19), GSGSG (서열번호: 14), GSGGG (서열번호: 20), GGGSG (서열번호: 21), 및 GSSSG (서열번호: 22)를 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 이들 링커 서열의 다량체 (예를 들면, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-20, 20-30, 또는 30-50)를 함께 연결하여 본원에 기재된 폴리펩티드로 이중성 아미노산 서열을 접합시키기 위해 사용될 수 있는 가요성 링커를 제공할 수 있다.
- [0188] **치료적 및 예방적 용도**
- [0189] 특정 구현예에서, 본원 개시내용은 암-관련 질환, 장애 또는 병태의 치료 및/또는 예방에서 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 사용을 고려한다. 특별한 용도가 이후 상세히 기재되지만, 본 발명이 그렇게 국한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.
- [0190] 본원에 기재된 병용 요법을 사용하여 치료되거나 예방될 수 있는 대표적인 암은 자궁암, 경부암, 난소암, 유방암, 전립선암, 고환암, 위장관암(예를 들어, 식도암, 인두암, 위암, 소장 또는 대장암, 결장암, 또는 직장암), 신장암, 신장 세포암, 방광암, 골암, 골수암, 피부암, 두경부암, 간암, 담낭암, 심장암, 폐암, 췌장암, 침샘암, 부신암, 갑상선암, 뇌암 (예를 들어, 신경교종암), 신경절암, 중추신경계 (CNS) 암 및 말초 신경계 (PNS) 암, 및 면역계 (예를 들어, 비장 또는 흉선) 암을 포함한다.
- [0191] 본원 개시내용은 또한 예를 들어, 면역원성 종양, 비-면역원성 종양, 휴면기 종양, 바이러스-유도된 암 (예를 들어, 상피세포 암, 내피세포 암, 편평 세포 암종 및 파필로마바이러스), 선암, 림프종 (예를 들면, B-세포 림프종), 백혈병, 암종, 흑색종, 골수종, 육종, 기형암종, 화학적으로 유도된 암 및 전이를 포함하는 다른 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 종양 또는 암은 결장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 또는 악성뇌교종이다.
- [0192] 추가의 특정 구현예에서, 암은 유방 선암종, 폐 폐포 암종, 섬유육종, 및 흑색종의 폐 전이이다(Pegram 등 (2012) *Advancements in Tumor Immunotherapy and Cancer Vaccines*, Dr. Hilal Arnouk (Ed.), ISBN: 978-953-307-998-1, InTech). 조합 치료요법 또는 유전자 치료요법에서 IL-12 기반 치료의 항종양 효과를 탐구하는 임상 연구는 하기의 종양의 치료를 포함한다: 유방, 췌장, 간, 신장, 자궁, 위장 암종, 결장직장, 비-호지킨 림프종, 흑색종 (예를 들어, 다발성 흑색종), 및 AIDS-연관된 카포시 육종 (Lasek 등 (2014) *Cancer Immunol Immunother* 63:419-35).
- [0193] 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, 암-관련 질환, 장애 또는 병태는 면역-불감성 종양이다. 치료학적 면역 조작에 불감성인 종양은 하기의 2개의 특징을 나타내는 것으로서 기재될 수 있다: 1) 면역계의 활성 억제, 및 2) 이의 치료로부터 비롯되는 면역-억제 기작의 동시 활성화를 수반하는 염증 반응(Galon 등 (July 25 2013) *Immunity* 39:11-26 (PubMed PMID: 238900600)). 면역-불감성 종양의 예는 결장암, 위식도암, 췌장암 및 유방암

을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0194] 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 일부 구현예에서 본원 개시내용은 이의 예가 본원에 제공된 적어도 하나의 추가의 치료학적 제제 또는 진단학적 제제와 병용된 PEG-IL-10 및 IL-12 제제로 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위한 방법을 제공한다.

[0195] 약학 조성물

[0196] 본원 개시내용에 의해 고려되는 PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 대상체에게 투여하기에 적합한 조성물 형태일 수 있다. 일반적으로, 상기 조성물은 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제 및 하나 이상의 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 “약제학적 조성물”이다. 특정 구현예에서, PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 각각 치료학적으로 허용되는 양으로 존재한다. 약제학적 조성물은 본원 개시내용의 방법에 사용될 수 있고, 따라서, 예를 들어, 약제학적 조성물은 본원에 기재된 치료학적 및 예방학적 방법 및 용도를 수행하기 위해 생체외 또는 생체내 대상체에게 투여될 수 있다.

[0197] 약제학적 조성물의 기재 및 이에 따르는 양상에서, 약제학적 조성물은 일반적으로 PEG-IL-10과 관련하여 기재된다. 그러나, 상기 기재는 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 병용물을 포함하는 약제학적 조성물로 또는 상기 성분들 중 단지 하나를 포함하는 약제학적 조성물로 본원 개시내용의 IL-12 제제에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0198] 본 발명의 약제학적 조성물은 의도된 투여 방법 및 투여 경로에 적합하도록 제형화될 수 있고; 예시적인 투여 경로는 본원에 제시된다. 추가로, 상기 약제학적 조성물은 본원 개시내용에 의해 고려되는 바와 같은 질환, 장애 및 병태를 치료하거나 예방하기 위해 본원에 기재된 바와 같은 다른 치료학적 활성제 또는 화합물과 병용하여 사용될 수 있다.

[0199] 상기 약제학적 조성물은 전형적으로 본원 개시내용에 의해 고려되는 치료학적 유효량의 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제, 및 하나 이상의 약제학적으로 및 생리학적으로 허용되는 제형화제를 포함한다. 적합한 약제학적으로 허용되거나 생리학적으로 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제는 산화방지제(예: 아스코르브산 및 중황산나트륨), 방부제(예: 벤질 알코올, 메틸 파라벤, 에틸 또는 n-프로필, p-하이드록시벤조에이트), 유화제, 현탁화제, 분산제, 용매, 충전제, 벌크화제, 세정제, 완충제, 비히클, 희석제 및/또는 보조제를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 적합한 비히클은 능히 비경구 투여를 위해 약제학적 조성물에 통상적인 다른 물질이 능히 보충된, 생리학 적 식염용액 또는 시트레이트 완충 식염수일 수 있다. 중성 완충 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 추가 예시적인 비히클이다. 당업자는 본원에서 고려되는 약제학적 조성물 및 투여 형태에 사용될 수 있는 다양한 완충제를 용이하게 인식할 것이다. 전형적인 완충제는, 약제학적으로 허용되는 약산, 약 염기 또는 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 예로서, 완충제 성분은 수용성 재료, 예를 들어, 인산, 타르타르산, 락트산, 석신산, 시트르산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 글루탐산 및 이의 염일 수 있다. 허용되는 완충제는, 예를 들어, 트리스 완충제, N-(2-하이드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설포산) (HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄설포산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄설포산 나트륨 염 (MES), 3-(N-모르폴리노)프로판설포산 (MOPS), 및 N-트리스[하이드록시메틸]메틸-3-아미노프로판설포산 (TAPS)을 포함한다.

[0200] 약제학적 조성물이 제형화된 후, 이것은 용액, 현탁액, 겔, 에멀전, 고체 또는 탈수되거나 동결건조된 산제로서 멸균 바이알에 저장될 수 있다. 상기 제제는 이미 준비된 형태, 사용전 재구성을 요구하는 동결건조된 형태, 사용전 희석을 요구하는 액체 형태 또는 다른 허용되는 형태로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 단일 사용 용기(예: 단일 사용 바이알, 앰플, 주사기 또는 자동 주입기(예를 들어, EpiPen®과 유사))로 제공되는 반면, 다용도 용기(예: 다용도 바이알)가 다른 구현예에서 제공된다. 이 모두가 당업자에게 널리 공지된 이식물(예를 들어, 이식가능한 펌프) 및 카테터 시스템, 느린 주사 펌프 및 장치를 포함하는 임의의 약물 전달 장치를 사용하여 PEG-IL-10 또는 IL-12 제제를 전달할 수 있다. 일반적으로 피하내 또는 근육내 투여되는 데포 주사제를 또한 사용하여 한정된 기간 동안 본원에 기재된 폴리펩티드를 방출시킬 수 있다. 데포 주사제는 일반적으로 고체- 또는 오일 기반이고, 일반적으로 본원에 제시된 제형화 성분 중 적어도 하나를 포함한다. 당업자는 데포 주사제의 가능한 제형 및 용도에 친숙하다.

[0201] 약제학적 조성물은 멸균 주사가 가능한 수성 또는 유성 현탁액 형태일 수 있다. 본 현탁액은 본원에 언급된 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 제제는 또한 예를 들어, 1,3-부탄 디올의 용액으로서 비-독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중에서 멸균 주사가 가능한 용액 또는 현탁액일 수 있다. 사용될 수 있는 허용되는 희석제, 용매 및 분산 매질은 물, 링거 용액, 등장성 염화나트륨 용액, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) 또는 인산 완충 식염수 (PBS), 에탄올, 폴리올

(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적합한 혼합물을 포함한다. 또한, 멸균된 비휘발성 오일이 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용된다. 상기 목적을 위해, 임의의 블랜드 불휘발성 오일이 사용될 수 있고, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함한다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주 사제의 제조에서 용도를 찾는다. 특별한 주사 가능한 제형의 장기형 흡수는 흡수를 지연시키는 제제 (예: 알루미늄모노스테아레이트 또는 젤라틴)를 포함시킴으로써 달성될 수 있다.

[0202] 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물은 경구 사용을 위해, 예를 들어, 정제, 캡슐제, 트로키제, 로젠지제, 수성 또는 유성 현탁액, 분산가능한 산제 또는 과립, 유제, 경질 또는 연질 캡슐제 또는 시럽, 용제, 마이크로비드 또는 엘릭시르로서 적합한 형태일 수 있다. 특정 구현예에서, 본원에 기재된 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제로 동시 투여되는 제제의 활성 성분은 경구 사용을 위해 적합한 형태이다. 경구 사용을 위해 의도된 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 제조를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있고 상기 조성물은 약제학적 엘리전트 및 순화가능한 제제를 제공하기 위해, 예를 들어, 감미제, 착향제, 착색제 및 보존제와 같은 하나 이상의 제제를 함유할 수 있다. 정제, 캡슐제 등은 정제의 제조용으로 적합한 무독성의 약제학적으로 허용되는 부형제와 혼합물로 활성 성분을 함유한다. 이들 부형제는 예를 들어, 회석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 탄산나트륨, 락토스, 인산칼슘 또는 인산나트륨; 과립화제 및 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 또는 알긴산; 결합제, 예를 들어, 전분, 젤라틴 또는 아카시아, 및 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 또는 탈크일 수 있다.

[0203] 경구 투여를 위해 적합한 정제, 캡슐제 등은 코팅되지 않거나 위장관에서 봉해 및 흡수를 지연시키고 이에 의해 지연 작용을 제공하기 위해 공지된 기술에 의해 코팅될 수 있다. 예를 들어, 시간-지연 물질, 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 사용될 수 있다. 이들은 또한 조절 방출을 위한 삼투압 치료학적 정제를 형성하기 위해 당업계에 공지된 기술에 의해 코팅될 수 있다. 추가의 제제는 투여된 조성물의 전달을 조절하기 위해 생분해성 또는 생체적합성입자 또는 중합체성 물질, 예를 들어, 폴리에스테르, 폴리아민산, 하이드로겔, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜산, 에틸렌-비닐아세테이트, 메틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 프로타민 설페이트, 또는 락티드/글리콜리드 공중합체, 폴리락티드/글리콜리드 공중합체 또는 에틸렌비닐아세테이트 공중합체를 포함한다. 예를 들어, 경구 제제는 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 또는 폴리(메틸메타크롤레이트) 마이크로캡슐을 사용하여 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 또는 콜로이드 약물 전달 시스템에 포획될 수 있다. 콜로이드성 분산 시스템은 수중유 에멀전, 미셀, 혼합 미셀 및 리포솜을 포함하는 거대분자 복합체, 나노-캡슐, 마이크로스피어, 마이크로비드 및 지질계 시스템을 포함한다. 상기 언급된 제형의 제조방법은 당업자에게 자명할 것이다.

[0204] 경구용 제형은 또한 경질 젤라틴 캡슐제로서 제공될 수 있거나 (여기서, 활성 성분은 불활성 고체 회석제, 예를 들어, 탄산칼슘, 인산칼슘, 카올린 또는 미세결정 셀룰로스와 혼합된다) 연질 젤라틴 캡슐제로서 제공될 수 있다 (여기서, 활성 성분은 물, 또는 유성 매질, 예를 들어, 땅콩 오일, 액체 파라핀 또는 올리브유와 혼합된다).

[0205] 수성 현탁액은 이의 제조에 적합한 부형제와 혼합물로 활성 재료를 함유한다. 이러한 부형제는 현탁화제, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시-프로필메틸셀룰로스, 나트륨 알기네이트, 폴리비닐-피롤리돈, 트라가칸트 겔 및 아카시아 겔; 분산제 또는 습윤제, 예를 들어, 천연 발생 포스포타이드 (예: 레시틴), 또는 알킬렌과 지방산의 축합 생성물 (예: 폴리옥시-에틸렌 스테아레이트) 또는 에틸렌 옥사이드와 장쇄 지방족 알코올 (예: 헵타데카에틸렌옥시세탄올의 경우)의 축합 생성물 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분 에스테르의 축합 생성물 (예: 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레에이트) 또는 에틸렌 옥사이드와 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래된 부분 에스테르의 축합 생성물 (예: 폴리에틸렌 소르비탄 모노올레에이트)일 수 있다. 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 방부제를 함유할 수 있다.

[0206] 유성 현탁액은 활성 성분을 식물성 오일, 예를 들어, 아라키스유, 올리브유, 참깨유 또는 코코넛유에서 또는 액체 파라핀과 같은 광유에 현탁시킴에 의해 제형화될 수 있다. 상기 유성 현탁액은 증점제, 예를 들어, 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올을 함유할 수 있다. 상기 제시된 것들과 같은 감미제 및 착향제는 순응성 경구 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다.

[0207] 물의 추가에 의해 수성 현탁액을 제조하는데 적합한 분산가능한 분말들 및 과립은 분산 또는 가습 물질, 현탁 물질 그리고 하나 또는 그 이상의 보존제들과 혼합된 활성 성분을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제는 본원에 예시된다.

[0208] 본원 개시내용의 약제학적 조성물은 또한 수중유 에멀전 형태일 수 있다. 유성상은 식물성 오일, 예를 들어, 올

리브유 또는 아라키스유 또는 광유, 예를 들어, 액체 파라핀 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 천연 발생 검, 예를 들어, 아카시아 검 또는 트라가칸트 검; 천연적으로 존재하는 포스파티드, 예를 들어, 대두, 렉시틴 및 지방산으로부터 유래된 에스테르 또는 부분 에스테르; 헥시톨 무수물, 예를 들어, 소르비탄 모노올레이트; 및 부분 에스테르와 에틸렌 옥사드의 축합 생성물, 예를 들어, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트일 수 있다.

[0209] 제형은 또한 임플란트, 리포솜, 하이드로겔, 프로드럭 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함하는 조절 방출 제형과 같은, 신체로부터 신속한 분해 또는 제거로부터 조성을 보호하는 담체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 시간 지연 물질, 예를 들어, 단독으로 또는 왁스와 병용된 디글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 스테아레이트가 사용될 수 있다.

[0210] 본 발명은 직장 투여용 좌제 형태로 IL-10 폴리펩티드의 투여를 고려한다. 좌제는 약물을 상온에서 고체이지만 직장 온도에서 액체이고, 따라서 직장에서 용해되어 약물을 방출시키는 적합한 비자극성 부형제와 혼합함으로써 제조될 수 있다. 이러한 재료는 코코아 버터 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0211] 본원 개시내용에 의해 고려되는 PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 현재 공지되거나 향후 개발된 임의의 다른 적합한 약제학적 조성물 (예를 들어, 비강 또는 흡입 용도를 위한 분무제) 형태일 수 있다.

[0212] 제형 중의 폴리펩티드 또는 이의 단편의 농도는 광범위하게 가변적일 수 있고 (예: 약 0.1 중량% 미만, 통상적으로 약 2 중량% 또는 적어도 약 2 중량% 내지 20 중량% 내지 50 중량% 이상), 일반적으로, 예를 들어, 선택된 특별한 투여 방식에 따라서 유체 용적, 점도 및 대상체 기반 인자에 기초하여 주로 선택된다.

[0213] 투여 경로

[0214] 본원 개시내용은 임의의 적당한 방식으로 PEG-IL-10 및 IL-12 제제, 및 이의 조성물의 투여를 고려한다. 적합한 투여 경로는 비경구 (예: 근육내, 정맥내, 피하(예: 주사 또는 임플란트), 복강내, 대장내, 관절내, 복강내, 대뇌내 (뇌실질내) 및 뇌실내), 경구, 비강, 질내, 설하, 안내, 직장, 국소 (예: 경피), 설하 및 흡입을 포함한다. 일반적으로 피하내 또는 근육내 투여되는 데포 주사제를 또한 사용하여 한정된 기간 동안 본원에 기재된 폴리펩티드를 방출시킬 수 있다.

[0215] 본원 개시내용의 특정 구현예는 비경구 투여를 고려한다. 비경구 투여는 일부 구현예에서 정맥내이고 기타 구현예에서 피하이다.

[0216] 보충 병용 요법

[0217] 본원 개시내용은 하나 이상의 활성 치료학적 제제 또는 다른 예방학적 또는 치료학적 모드 (예를 들어, 방사선)와 추가로 병용된 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 병용의 용도를 고려한다. 본원의 목적을 위해, 상기 추가의 병용은 때로는 “보충 병용”, “보충 병용 요법”, “추가적 예방학적 또는 치료학적 제제와의 병용” 등으로서 언급되고 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 병용에 첨가되는 제제는 “보충 제제” 등으로서 언급될 수 있다. 상기 보충 병용 요법에서, 다양한 보충 활성 제제(들)은 흔히 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제와는 상이한 작용 메커니즘을 갖는다. 상기 보충 병용 요법은 특히 하나 이상의 제제의 용량 감소를 가능하게 함에 의해 유리할 수 있고, 이에 의해 하나 이상의 제제와 연관된 부작용을 감소시키거나 제거할 수 있고; 추가로, 상기 보충 병용 요법은 근본 증식 질환, 장애 또는 병태에서 상승작용적 치료학적 또는 예방학적 효과를 가질 수 있다. 본원 개시내용의 일부 구현예에서 보충 제제(들)는 진단학적 제제(들)이다.

[0218] 특정 구현예에서, 본원 개시내용은 PEG-IL-10 및 IL-12 제제, 및 적어도 하나의 추가의 치료학적 또는 진단학적 제제를 사용하여 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하고/하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0219] 본원 개시내용의 일부 구현예에서, PEG-IL-10, IL-12 제제 및 보충 제제(들)의 각각은 별도의 용량 형태로 있을 수 있다. 예를 들어, PEG-IL-10은 SC 투여를 위해 적합한 제형 중에 있을 수 있고, IL-12 제제는 IV 투여에 적합한 제형 중에 있을 수 있고, 보충 제제는 경구 투여에 적합한 제형 중에 있을 수 있고; 이와 관련하여, 제제의 각각은 별도로 하우징되거나 2개 이상의 제제는 함께 (예를 들어, 키트의 구분된 성분으로서) 하우징될 수 있다. 본원 개시내용의 다른 구현예에서, 2개 이상의 PEG-IL-10, IL-12 제제 및 보충제제(들)은 동일한 투여 형태로 존재한다. 예를 들어, PEG-IL-10, IL-12 제제 및 보충 제제(들)은 IV 투여를 위해 제형화될 수 있고; 이와 관련하여 하나 이상의 제제는 동시 제형화 (예를 들어, 시린지 내 활성 치료학적 제제로서)될 수 있다.

[0220] 특정 구현예에서, PEG-IL-10, IL-12 제제, 및 보충 제제(들) (예를 들어, 화학치료학적 제제)는 연속으로 투여되거나 적용될 수 있고, 예를 들어, 여기서, PEG-IL-10은 먼저 투여되고 IL-12 제제는 2번째로 투여되고 보충

제제는 마지막으로 투여된다. 다른 구현예에서, PEG-IL-10, IL-12 제제 및 보충 제제(들)은 동시에 투여되고, 예를 들어, 여기서, 이들 중 2개는 동시에 투여되고 3번째는 전에 또는 후에 투여된다. PEG-IL-10, IL-12 제제, 및 보충 제제(들)가 연속으로, 동시에 또는 이의 일부 변형으로 투여되는지에 상관없이, 이들은 본원 개시내용의 목적을 위해 보충 병용 요법으로서 투여되는 것으로 고려된다.

[0221] 본원 개시내용은 상기 상황하에서 허용되거나, 적당하거나 최적일 수 있는 보충 병용 요법에 대한 임의의 가능한 투여 용법의 용도를 고려한다. 이후 기재된 용법은 예시적인 것이고 배타적인 것이 아니다. 하나의 구현예에서, PEG-IL-10, IL-12 제제 및 보충 제제(들)를 사용한 치료는 특정 기간 동안 유지된다. 또 다른 구현예에서, PEG-IL-10, IL-12 제제, 및 보충 제제(들)를 사용한 치료는 특정 기간 동안 감소되거나 연속될 수 있다 (예를 들어, 대상체가 안정한 경우). 또 다른 구현예에서, 보충 제제(들)를 사용한 치료는 감소되거나 중단될 수 있고 (예를 들어, 대상체가 안정한 경우), PEG-IL-10 및 IL-12 제제를 사용한 치료는 일정한 투여 용법으로 유지된다. 추가 구현예에서, 보충 제제(들)를 사용한 치료는 감소되거나 중단될 수 있고 (예를 들어, 대상체가 안정한 경우), PEG-IL-10을 사용한 치료는 감소되고 (예를 들어, 하한 용량, 덜 빈번한 투여 또는 보다 짧은 치료 용법), IL-12 제제를 사용한 치료는 일정한 투여 용법으로 유지된다. 추가 구현예에서, 보충 제제(들)를 사용한 치료는 감소되거나 중단되고 (예를 들어, 대상체가 안정한 경우), PEG-IL-10을 사용한 치료는 감소되고 (예를 들어, 하한 용량, 덜 빈번한 투여 또는 보다 짧은 치료 용법) IL-12 제제를 사용한 치료는 일정한 투여 용법으로 유지된다.

[0222] 계속 또 다른 구현예에서, 보충 제제(들) 및 PEG-IL-10을 사용한 치료는 일정한 투여 용법으로 유지되고, IL-12 제제를 사용한 치료는 감소되거나 중단된다 (예를 들어, 대상체가 안정한 경우). 계속 추가 구현예에서, 보충 제제(들) 및 IL-12 제제를 사용한 치료는 일정한 투여 용법으로 유지되고, PEG-IL-10을 사용한 치료는 감소되거나 중단된다 (예를 들어, 하한 용량, 덜 빈번한 투여 또는 보다 짧은 투여 용법). 다른 투여 용법의 동정 및 사용은 당업자에게 자명할 것이다.

[0223] 본원에 기재된 PEG-IL-10 및 IL-12 제제와 병용하여 사용하기 위해 적합한 특정 제제는 이후에 명시되는 한편, 본원 개시내용은 국한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 국한되지 않지만, 예방학적 또는 치료학적 제제는 화학치료학적 제제, 면역- 또는 염증-관련 제제, 대사 제제, 항바이러스 제제 또는 항-트롬빈 제제일 수 있다. 본원 개시내용의 방법은 또한 비-약리학적 제제(예를 들어, 방사선)와 병용하여 사용될 수 있다.

[0224] 특정 구현예에서, 본원 개시내용은 암, 종양 또는 전암성 또는 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하고/하거나 예방하기 위한 화학치료학적 제제(들)와 함께 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 용도를 고려한다. 화학치료학적 제제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레티아민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리에틸렌올로멜라미네를 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 키오람부실, 클로르나프진, 클로로포스포미드, 에스트라무스틴, 이포스포미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드리무스틴, 트로포스포미드, 우라실, 머스타드와 같은 질소 머스타드; 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴과 같은 니트로소우레아; 아클라시노마이신, 액티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 브레오마이신, 카크티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신과 같은 항생제; 메토크세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU)과 같은 항-대사물; 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토크세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로젠, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-아드레날, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 리플레니셔, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도스포스포미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메폴신; 디아지쿠온; 엘포르미딘; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미토산트론; 모피다물; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2''-트리클로로트리메틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카바진; 마노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로

만; 가시토신; 아라비노사이드 (Ara-C); 사이클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 독세탁셀; 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머카토피린; 메토티렉세이트; 백금 및 백금 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT11; 토포이소머라제 억제제; 디플루오로메틸로르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 상기 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함하지만 이에 국한되지 않는다.

[0225] 화학치료학적 제제는 또한 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬 제제, 예를 들어, 항-에스트로겐이 있고, 예를 들어, 타목시펜, 팔록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, 오나프리스톤, 및 토레미펜; 및 항안드로겐, 예를 들어, 플루타미드, 니루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 및 상기 임의의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 특정 구현예에서, 병용 요법은 호르몬 또는 관련 호르몬제의 투여를 포함한다.

[0226] 본원에 기재된 암 병태의 치료 또는 예방에서 유용한 임의의 다른 제제는 보충제로서 고려되고 사이토카인 또는 사이토카인 길항제, 예를 들어, IL-12, INF α , 또는 항-표피 성장 인자 수용체, 방사선요법, 또는 또 다른 종양 항원에 대한 모노클로날 항체, 모노클로날 항체와 독소의 복합체, T-세포 보조제, 골수 이식, 또는 항원 제공 세포 (예를 들어, 수지상 세포 요법)를 포함하지만 이에 국한되지 않는다. 백신 (예를 들어, 가용성 단백질로서 또는 단백질을 코딩하는 핵산으로서)도 또한본원에 제공된다.

[0227] 특정 구현예에서, 추가의 예방학적 또는 치료학적 제제는 화학치료학적 제제이고이의 예는 본원에 명시되어 있다. 일부 구현예에서, 화학치료학적 제제는 백금 배위 착물로서도 언급되는 백금계 항신생물제이다. 이들 백금계 항신생물제는 DNA를 가교결합시켜 암 세포에서 DNA 복구 및/또는 DNA 합성을 억제한다. 상기 제제의 예는 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴, 피코플라틴, 네다플라틴 및 트리플라틴을 포함한다.

[0228] 본 발명은 상기 중 어느 하나의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0229] 투약

[0230] 본원 개시내용의 PEG-IL-10 및 IL-12 제제는 예를 들어, 투여 목표 (예를 들어, 목적하는 분리 정도); 대상체의 연령, 체중, 성별, 및 건강 및 신체 조건, 투여되는 제형, 투여 경로 및 질환, 장애 또는 이의 증상의 특성에 의존하는 양으로 대상체에게 투여될 수 있다. 상기 투여 요법은 또한 투여되는 제제(들)와 관련된 임의의 부작용의 존재, 특성 및 정도를 고려할 수 있다. 효과적인 투여량 및 투여 요법은, 예를 들어, 안전성 및 용량 증가 시험, 생체내연구 (예: 동물 모델), 및 당업자에게 공지된 다른 방법으로부터 용이하게 결정될 수 있다.

[0231] 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 본원의 개시내용은 PEG-IL-10 및 IL-12 제제 조합 치료요법의 구현예를 고려하고, 여기서 PEG-IL-10은 목적하는 혈청 최저 농도 (예를 들어, ≥ 10 ng/mL)가 유지되도록 하는 양 또는 빈도로 투여된다. PEG-IL-10 및 IL-12 제제 조합 치료요법의 구현예가 또한 고려되고, 여기서, IL-12 제제는 혈청 농도가 피크를 성취하도록 투여되고 이어서 이것이 다시 투여되기 전 측정가능하지 않은 수준으로 제거된다.

[0232] 일반적으로, 투약 파라미터는 복용량이 대상체에게 비가역적으로 독성일 수 있는 양 (즉, 최대 내성 용량, "MTD")보다 작고 그리고 대상체에 대해 측정가능한 효과를 생성하는데 필요한 양보다 적지 않게 되도록 규정한다. 이러한 양은, 예를 들어, 투여 경로 및 다른 인자를 고려하여 ADME와 관련된 약동학적 및 약력학적 파라미터에 의해 결정된다.

[0233] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "EC50" 및 용어 "절반 최대 유효 농도"는 이들의 일반적으로 허용되는 의미를 갖고; 즉, EC50은 일부 특정 노출 시간 후 기준선과 최대 사이의 중간 반응을 유도하는 치료학적 제제 (예를 들어, PEG-IL-10)의 농도이다. 당업자는 치료학적 제제의 EC50을 결정하기 위한 수단에 친숙하다. 예를 들어, EC50은 세포 기반 검정에서 치료학적 제제의 특정 농도 관련 파라미터를 측정한 후 시판되는 소프트웨어 (예를 들어, Graphpad Software, Inc.; La Jolla, CA)를 사용하여 결정할 수 있다.

[0234] 유효 투여량 (ED)은 그것을 복용하는 대상체의 일부분에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. 제제의 "중간 유효 투여량" 또는 ED50은 그것이 투여되는 집단의 50 %에서 치료 반응 또는 목적하는 효과를 생성하는 제제의 투여량 또는 양이다. ED50은 일반적으로 제제의 효과의 합리적인 기대치의 척도로서 사용되지만, 임상이가 모든 관련 인자를 고려하여 적절하다고 간주할 수 있는 투여량일 필요는 없다. 따라서, 일부 상황에서, 유효량은 계산된 ED50 초과일 수 있고, 다른 상황에서유효량은 계산된 ED50 미만일 수 있고 여전히 다른 상황에서 유효량은 계산된 ED50과 동일할 수 있다.

- [0235] 추가로, 본원 개시내용은 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 유효량은 대상체에게 하나 이상의 용량으로 투여되는 경우 건강한 대상체에 상대적으로 목적하는 결과는 나타내는 양일 수 있다. 예를 들어, 특정 장애를 경험한 대상체에 대해, 유효량은 상기 장애의 진단학적 파라미터, 측정, 마커 등을 적어도 약 5 %, 적어도 약 10 %, 적어도 약 20 %, 적어도 약 25 %, 적어도 약 30 %, 적어도 약 40 %, 적어도 약 50 %, 적어도 약 60 %, 적어도 약 70 %, 적어도 약 80 %, 적어도 약 90 %, 또는 90 % 초과로 개선시키는 양일 수 있고, 100 %는 정상 대상체가 나타나는 진단학적 파라미터, 측정 및 마커 등으로서 정의된다.
- [0236] 본원에 기재된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기 위해 필요한 PEG-IL-10 및 IL-12 제제의 양은 당업계에 공지된 활성 검정에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 종양과 관련하여, 적합한 IL-10 활성은 예를 들어, 종양 부위의 CD8+ T-세포 침윤, 염증 사이토카인, 예를 들어, 이들 침윤 세포로부터 IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, 및 RANK-L의 발현, 및 생물학적 샘플에서 TNF α 또는 IFN γ 의 증가된 수준을 포함한다.
- [0237] 치료학적 유효량의 PEG-IL-10은 약 0.01 내지 약 100 μ g 단백질/kg 체중/일, 약 0.1 내지 20 μ g 단백질/kg 체중/일, 약 0.5 내지 10 μ g 단백질/kg 체중/일, 또는 약 1 내지 4 μ g 단백질/kg 체중/일의 범위일 수 있다. 본원 개시내용은 병용 요법의 PEG-IL-10 화합물의 양이 10.0 μ g/kg/일 내지 20.0 μ g/kg/일인 구현예를 고려한다. 일부 구현예에서, 투여되는 PEG-IL-10의 양은 12.0 μ g/kg/일 내지 18.0 μ g/kg/일이다.
- [0238] 일부 구현예에서, 조합 치료요법의 PEG-IL-10 성분은 약 50 내지 800 μ g 단백질/kg 체중/일 (예를 들어, 약 1 내지 16 μ g 단백질/kg 체중/일의 PEG-IL-10)의 전달을 제공하도록 투여(예를 들어, 연속 주입에 의해)된다. 주입에 의해 전달되는 경우, 주입율은 예를 들어, 부작용 및 혈액 세포 계수의 평가를 기준으로 다양할 수 있다. PEG-IL-10에 대한 다른 특정 투여 파라미터는 본원의 다른 곳에 기재되어 있다.
- [0239] 본원 개시내용은 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하기 위해 대상체에게 투여되는 PEG-IL-10 병용 요법의 IL-12 성분의 양이 0.01 μ g/kg/일 내지 10.0 μ g/kg/일인 구현예를 기재한다. 다른 구현예에서, IL-12 제제의 양은 0.1 μ g/kg/일 내지 10.0 μ g/kg/일이고, 여전히 다른 구현예에서 IL-12 제제의 양은 1.0 μ g/kg/일 내지 10.0 μ g/kg/일이다. 계속 추가 구현예에서, 병용 요법의 IL-12 성분의 양은 암-관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하거나 예방하기 위해 투여되는 병용 요법의 IL-12 성분의 양은 0.1 μ g/kg/일 내지 15.0 μ g/kg/일이다. 다른 구현예에서, IL-12 제제의 양은 1.0 μ g/kg/일 내지 15.0 μ g/kg/일이고, 여전히 다른 구현예에서, IL12-제제의 양은 10.0 μ g/kg/일 내지 15.0 μ g/kg/일이다.
- [0240] 본원의 개시내용은 PEG-IL-10/IL-12 제제 조합 치료요법의 구현예를 고려하고, 여기서, 투여되는 PEG-IL-10의 양은 10.0 μ g/kg/일 내지 20.0 μ g/kg/일; 11.0 μ g/kg/일 내지 19.0 μ g/kg/일; 12.0 μ g/kg/일 내지 18.0 μ g/kg/일; 13.0 μ g/kg/일 내지 17.0 μ g/kg/일; 14.0 μ g/kg/일 내지 16.0 μ g/kg/일; 또는 약 15.0 μ g/kg/일이다. 본원의 개시내용은 PEG-IL-10/IL-12 제제 조합 치료요법의 구현예를 고려하고, 여기서, 투여되는 IL-12 제제의 양은 0.01 μ g/kg/일 내지 10.0 μ g/kg/일; 0.05 μ g/kg/일 내지 9.5 μ g/kg/일; 0.1 μ g/kg/일 내지 10.0 μ g/kg/일; 0.1 μ g/kg/일 내지 9.0 μ g/kg/일; 0.5 μ g/kg/일 내지 8.5 μ g/kg/일; 1.0 μ g/kg/일 내지 10.0 μ g/kg/일; 1.0 μ g/kg/일 내지 8.0 μ g/kg/일; 1.5 μ g/kg/일 내지 7.5 μ g/kg/일; 2.0 μ g/kg/일 내지 7.0 μ g/kg/일; 2.5 μ g/kg/일 내지 6.5 μ g/kg/일; 3.0 μ g/kg/일 내지 6.0 μ g/kg/일; 3.5 μ g/kg/일 내지 5.5 μ g/kg/일; 4.0 μ g/kg/일 내지 5.0 μ g/kg/일; 또는 4.5 μ g/kg/일이고, 이는 본원에 제시된 PEG-IL-10의 임의의 양과 함께 투여된다 (예를 들어, PEG-IL-10은 10.0 μ g/kg/일 내지 20.0 μ g/kg/일; 11.0 μ g/kg/일 내지 19.0 μ g/kg/일; 12.0 μ g/kg/일 내지 18.0 μ g/kg/일; 13.0 μ g/kg/일 내지 17.0 μ g/kg/일; 14.0 μ g/kg/일 내지 16.0 μ g/kg/일; 또는 약 15.0 μ g/kg/일의 양으로 투여된다).
- [0241] 경구 제제의 투여를 위해, 조성물은 1.0 내지 1000 밀리그램의 활성 성분, 특히 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, 및 1000.0 밀리그램의 활성 성분을 함유하는 정제, 캡슐 등의 형태로 제공될 수 있다.
- [0242] 특정 구현예에서, 기재된 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제의 투여 용량은 “단위투여형태”로 함유된다. 용어 “단위 투여 형태”는 물리적으로 구분된 단위를 언급하고, 각각의 단위는 단독으로 또는 목적하는 효과를 생성하기에 충분한 하나 이상의 추가의 제제와 병용된, 본원에 기재된 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제의 미리결정된 양을 함유한다. 단위 투여 형태의 파라미터는 특별한 제제 및 달성되는 효과에 의존하는 것으로 이해된다.
- [0243] **키트**
- [0244] 본원 개시내용은 또한 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제, 및 이의 약제학적 조성물을 포함하는 키트를 고려한다. 상기 키트는 일반적으로 하기된 바와 같이 다양한 성분을 하우징하는 물리적 구조 형태로 있고 예를 들어, 상기

된 방법을 수행하는데 사용될 수 있다. 키트의 하나 이상의 성분은 멸균 컨테이너 (예를 들어, 멸균 바이얼)에 존재할 수 있다.

[0245] 키트는 대상체에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물 형태로 있을 수 있는, 본원에 기재된 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제를 포함할 수 있다. PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제는 사용할 준비가 되어 있는 형태 또는 예를 들어, 투여 전 재구성 또는 희석을 요구하는 형태로 제공될 수 있다. PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제는 사용자에게 의해 재구성될 필요가 있는 형태로 있을 시, 키트는 또한 PEG-IL-10 및/또는 IL-12 제제와 패키징되거나 이들로부터 별도로 있는 완충제, 약제학적으로 허용되는 부형제 등을 포함할 수 있다. 키트는 또한 본원에 기재된 바와 같이 PEG-IL-10 및 IL-12 제제 둘 다를 함유할 수 있고; 키트는 별도로 여러 제제를 함유할 수 있거나 이들은 이미 키트에서 병용될 수 있다. 유사하게, 보충 요법 (예를 들어, PEG-IL-10, IL-12 제제 및 보충 제제)이 고려되는 경우, 키트는 별도로 여러 제제를 함유할 수 있거나 이들 중 2개 이상은 이미 키트에서 병용될 수 있다. 본 개시내용의 키트는 그 안에 수용된 구성 요소를 적절하게 유지하는 데 필요한 상태를 위해 설계될 수 있다(예를 들어, 냉동 또는 동결).

[0246] 키트는 여기 안의 성분들에 대한 동정 정보 및 이들의 사용 (예를 들어, 작용 메커니즘, 약동학 및 약역학, 부작용, 금기사항 등을 포함하는, 투여 파라미터, 활성 성분(들)의 임상 약리학 등)을 위한 지침서를 포함하는 라벨 또는 패키징 삽입물을 포함할 수 있다. 키트의 각각의 성분은 개별 컨테이너내에 내포되고 다양한 컨테이너 모두는 단일패키지내에 있을 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 로트 번호 및 유효 기간과 같은 제조업자 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 패키징 삽입물은 예를 들어, 성분들을 하우징하는 물리적 구조물로 통합될 수 있고, 물리적 구조물 내에 별도로 함유되거나 키트의 성분 (예를 들어, 앰플, 시린지 또는 바이얼)에 부착될 수 있다.

[0247] 라벨 또는 삽입물은 디스크 (예: 하드 디스크, 카드, 메모리 디스크), CD- 또는 DVD-ROM/RAM과 같은 광학 디스크, DVD, MP3, 자기 테이프, 또는 RAM 및 ROM과 같은 전기 저장 매체 또는 자기/광학 저장 매체, 플래시 매체 또는 메모리-타입 카드와 같은 이들의 하이브리드와 같은 컴퓨터 판독 가능한 매체를 추가로 포함하거나 이에 통합될 수 있다. 일부 구현예에서, 실제 지침서는 키트에 존재하지 않지만 원격지 소스, 예를 들어, 인터넷 부위를 통해 지침서를 획득하기 위한 수단이 제공된다.

[0248] 실험적

[0249] 하기의 실시예는 본 발명을 구성하고 사용하는 방법에 대한 완전한 기재 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되고, 본원 발명자가 이들의 발명에 관한 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않거나 이들은 하기 실험이 수행되었고 수행될 수 있는 모든 실험을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 본 시제로 기술된 예시적 설명은 반드시 수행될 필요는 없고, 오히려 설명이 본원에 기재된 데이터 등을 생성하기 위해 수행될 수 있음이 이해되어야 한다. 사용된 숫자 (예: 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력이 수행되었지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다.

[0250] 다르게 기술되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도 (°C)이고, 압력은 대기압 또는 대기압 부근이다. 하기를 포함하는 표준 약어가 사용된다: s 또는 sec = 초(들); min = 분(들); h 또는 hr = 시간 (s); aa = 아미노산 (들); bp = 염기쌍 (들); kb = 킬로베이스 (들); nt = 뉴클레오타이드 (들); ng = 나노그램; μ g = 마이크로그램; mg = 밀리그램; g = gram; kg = 킬로그램; dl 또는 dL = 데실리터; μ l 또는 μ L = 마이크로리터; ml 또는 mL = 밀리리터; l 또는 L = 리터; nM = 나노몰; μ M = 마이크로몰; mM = 밀리몰; M = 몰; kDa = 킬로달톤; i.M. = 근육내(로); i.p. = 복강내(로); SC 또는 SQ = 피하(로); HPLC = 고성능 액체 크로마토그래피; BW = 체중; U = 유닛; ns = 통계학적으로 유의적이지 않은; PMA = 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트; PBS = 인산-완충 식염수; HSA = 인간 혈청 알부민; DMEM = 이글스 배지의 둘베코 변형; PBMCs = 주요 말초 혈액 단핵 세포; FBS = 태아 소 혈청; FCS = 태아 송아지 혈청; HEPES = 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄선폰산; LPS = 리포다당류; ATCC = 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection).

[0251] 재료 및 방법.

[0252] 명시된 경우, 하기의 일반 재료 및 방법이 사용되거나 하기의 실시예에 사용될 수 있다:

[0253] 분자 생물학 과정. 분자 생물학에서 표준 방법은 하기 과학 문헌에 기재되어 있다. (문헌참조: 예를들어, Sambrook and Russell(2001) Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; 및 Ausubel, 등 (2001) Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y., 이는 하기를 기재한다: 세균 세포에서 클로닝 및 DNA 돌연변이 생성 (Vol. 1), 포

유동물 세포 및 효모에서 클로닝 (Vol.2), 당접합체 및 단백질 발현 (Vol.3), 및 생물 정보학 (Vol.4)).

- [0254] 항체-관련 공정. 폴리클로날 및 모노클로날 항체의 생산, 정제 및 단편화가 기재되고 (예: Harlow and Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY); 리간드/수용체 상호작용을 특성화하는 표준 기술이 이용 가능하고 (참조: 예를 들어, Coligan 등 (2001) Current Protocols in Immunology, Vol.4, John Wiley, Inc., NY); 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 포함하는 유동 세포 계측법이 이용 가능하고 (참조: 예를 들어 Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ); 예를 들어, 진단학적 시약으로서 사용하기 위한 핵산 프라이머 및 프로브를 포함하는 핵산을 변형시키기 위해 적합한 형광성 시약, 폴리펩티드 및 항체가 시판되고 있다 (Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR.; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, ST. Louis, MO.). 항체의 추가의 논의는 본원의 다른 곳에 기재되어 있다.
- [0255] 소프트웨어. 예를 들어, 항원성 단편, 리더 서열, 단백질 폴딩, 기능적 도메인, 글리코실화 부위 및 서열 정렬을 결정하기 위한 소프트웨어 패키지 및 데이터베이스가 이용 가능하다 (참조: 예를 들어, GCG 위스콘신 패키지 (Accelrys, Inc., San Diego, CA); 및 DeCypherTM (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV)).
- [0256] 폐길화. 본원에 기재된 바와 같은 폐길화된 IL-10은 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 합성될 수 있다. 모노-PEG-IL-10 및 모노-/디-PEG-IL-10의 혼합물을 제조하기 위한 예시적 합성 계획은 기재되었다 (문헌참조: 예를 들어, 미국특허 번호 7,052,686; US 특허 공개 번호 2011/0250163; WO 2010/077853). 본원의 기재내용의 특정 구현예는 선택적으로 폐길화된 모노- 및 디-PEG-IL-10의 혼합물을 포함한다. 본원 개시내용의 수행에 적합한 PEG의 제조 및 용도에서 자신의 기술을 레버리징하는 것 (및 다른 약물 전달 기술) 뿐만 아니라, 당업자는 하기와 같은 PEG-관련 기술의 많은 상업적 공급업체에 친숙하다 (예를 들어, NO America Corp (Irvine, CA) 및 Parchem (New Rochelle, NY)).
- [0257] 마우스. 다양한 마우스 및 다른 동물 종은 본원 개시내용의 기술과 연계하여 사용될 수 있다. 예를 들어, 면역적격 Balb/C 또는 B-세포-결핍 Balb/C 마우스는 하기 연구소로부터 수득될 수 있고 (The Jackson Lab., Bar Harbor, ME) 표준 절차에 따라 사용된다 (문헌참조: 예를 들어, Martin et al (2001) Infect. Immun., 69(11): 7067-73 and Compton 등 (2004) Comp. Med. 54(6): 681-89). 본원 개시내용에 의해 고려되는 실험 작업을 위해 적합한 다른 마우스 종은 당업자에게 공지되어 있고 일반적으로 실험실 (The Jackson Lab) 또는 다른 공급업체로부터 가용하다.
- [0258] IL-10 농도. 혈청 IL-10 농도 수준 및 노출 수준은 당업계에 사용되는 표준 방법에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 혈청 노출 수준 검정은 마우스 꼬리 스nip으로부터의 전혈 (~50 μ L/마우스) 플레인 모세관 튜브에 수거하고 혈청 및 혈액 세포를 원심분리에 의해 분리하고 표준 ELISA 키트 및 기술에 의해 IL-10 노출 수준을 결정함에 의해 수행될 수 있다.
- [0259] 이후 기재된 검정은 대표적이고, 배타적이지 않다.
- [0260] 시험관내 사이토카인 분비 검정. 활성화된 1차 인간 CD8+ T-세포는 PEG-IL-10으로 처리되고 이어서 항-CD3 항체로 처리되는 경우 IFN- γ 를 분비한다. 하기의 프로토콜은 사이토카인 분비를 조사하기 위한 예시적 검정을 제공한다.
- [0261] 인간 PBMC는 임의의 표준 프로토콜에 따라 단리될 수 있다 (문헌참조: 예를 들어, Fuss 등 (2009) Current Protocols in Immunology, Unit 7.1, John Wiley, Inc., NY). CD8+ T-세포는 제조업자의 프로토콜에 따라 Miltenyi Biotec's MACS 세포 단리 기술을 사용하여 단리될 수 있다 (Miltenyi Biotec; Auburn, CA). 활성화 동안에 검정을 위해, 단리된 CD8+ T-세포 (2×10^6 세포/mL, 표준 96-웰 플레이트의 웰 당 5×10^5 세포)는 플레이트-결합된 항-CD3 및 항-CD28 (플레이트는 10 μ g/mL 항-CD3 및 2 μ g/mL 항-CD28으로 미리 코팅된다; Affymetrix eBioscience; San Diego, CA) 및 AIM V 배지 (Life Technologies; Carlsbad, CA)에서 3일 동안 적당한 농도의 IL-12 또는 PEG-IL-10으로 활성화시킬 수 있다. 상기 배지는 제조업자의 프로토콜 (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)에 따라 시판되는 ELISA를 사용하여 이어서 수거되고 IFN- γ 에 대해 수거되고 결정될 수 있다. 휴식기 동안에 검정 동안, 단리된 CD8+ T-세포 (3×10^6 세포/mL, 표준 24-웰 플레이트의 웰 당 3×10^6 세포)는 3일 동안 플레이트-결합된 항-CD3 및 항-CD28 (플레이트는 10 μ g/mL 항-CD3 및 2 μ g/mL 항-CD28로 미리 코팅된다; Affymetrix eBioscience; San Diego, CA)로 활성화될 수 있다. 활성화 후, 이어서 세포를 수거하고, 재-분주하고 (2×10^6 세포/mL, 표준 96-웰 플레이트의 웰 당 5×10^5 세포) AIM V 배지에서 3일

동안 적당한 농도의 IL-12 또는 PEG-hIL-10으로 처리할 수 있다. 처리 후, 세포는 수거되고, 재분주하고 (2×10^6 세포/mL, 표준 96-웰 플레이트의 웰 당 5×10^5 세포) AIM V 배지에서 4시간 동안 $1 \mu\text{g/mL}$ 가용성 항-CD3으로 처리할 수 있다. 이어서 배지를 수거할 수 있고 제조업자의 프로토콜에 따라 시판되는 ELISA 키트를 사용하여 IFN- γ (Affymetrix eBioscience; San Diego, CA), 그랜자임 B 및 퍼포린 (Mabtech; Cincinnati, OH)에 대해 분석하였다.

[0262] TNF α 억제 검정. U937 세포 (제조사 (Sigma-Aldrich (#85011440)으로부터 시판되는 폐 기원의 림프아구세포 인간 세포주; ST. Louis, MO)의 PMA-자극은 세포가 TNF α 를 분비하도록 하고, 이들 TNF α -분비 세포의 인간 IL-10으로의 후속적 처리는 용량 의존적 방식으로 TNF α 분비를 감소시킨다. 예시적 TNF α 억제 검정은 하기의 프로토콜을 사용하여 수행될 수 있다.

[0263] 10 % FBS/FCS 및 항생제를 함유하는 RPMI에서 U937 세포를 배양한 후, 96웰 평저 플레이트에서 1×10^5 , 90 % 생존 U937 세포를 분주하고 (임의의 혈장 처리된 조직 배양 플레이트 (예를 들어, Nunc; Thermo Scientific, USA)가 사용될 수 있다) 조건 당 3회 실시한다. 하기의 조건에 대해 제공하도록 세포를 분주한다(모두 적어도 3회; “단독 배지”에 대해 웰의 수는 절반이 10 nM PMA로 배양 후 생존능에 대해 사용될 수 있기 때문에 2배가 되게 한다: 5 ng/mL LPS 단독; 5 ng/mL LPS + 0.1 ng/mL rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 1 ng/mL rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 10 ng/mL rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 100 ng/mL rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 1000 ng/mL rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 0.1ng/mL PEG-rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 1 ng/mL PEG-rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 10 ng/mL PEG-rhIL-10; 5 ng/mL LPS + 100 ng/mL PEG-rhIL-10; 및 5 ng/mL LPS + 1000 ng/mL PEG-rhIL-10.5% CO₂ 배양기 중에서 37 °C에서 배양하고 이 시간 후 세포의 ~90 %가 접착되도록 하면서 24시간 동안 200 μL 에서 10nM PMA에 각각의 웰을 노출시킨다. 3개의 여분의 웰을 재현타시킬 수 있고 세포를 계수하여 생존능을 평가한다 (>90 %는 생존성이어야 한다). 세포가 여전히 웰이 있도록 보장하면서 새로운, 비-PMA-함유 배지로 3회 약하게 세척하지만 완전하게 세척한다. 적당한 농도 (용적의 2X가 100 %에 의해 희석된다)의 rhIL-10 또는 PEG-rhIL-10을 함유하는 배지 웰 당 100 μL 를 첨가하고, 30분동안 5 % CO₂ 배양기에서 37 °C에서 배양한다. 각각의 웰에서 5 ng/mL LPS의 최종 농도를 성취하기 위해 웰당 10 ng/mL 스톱 LPS의 100 μL 를 첨가하고 18 내지 24시간 동안 5 % CO₂ 배양기에서 37 °C에서 배양한다. 상등액을 제거하고 제조업자의 지침에 따라 TNF α ELISA를 수행한다. 각각의 조건화된 상등액을 ELISA에서 2회 전개한다.

[0264] MC/9 세포 증식 검정. MC/9 세포 (제조사 (Cell Signaling Technology; Danvers, MA)로부터 시판되는 비만 세포의 특징을 갖는 뮤린 세포주)로 IL-10 투여는 용량 의존적 방식으로 증가된 세포 증식을 초래한다. 톰슨-스닙, 엘 등 (Thompson-Snipes, L. 등)(1991) J. Exp. Med.173: 507-10)은 MC/9 세포가 IL3 + IL-10 및 IL-3 + IL-4 + IL-10으로 보충된 표준 검정 프로토콜을 기재한다. 판매자 (예를 들어, R&D Systems, USA; 및 Cell Signaling Technology, Danvers, MA)는 rhIL-10에 대한 많은 방출 검증으로서의 검정을 사용한다. 당업자는 세포가 단지 IL-10으로 보충되도록 문헌[참조: Thompson-Snipes, L. et al]에 기재된 표준 검정 프로토콜을 변형시킬 수 있다.

[0265] 종양 모델 및 종양 분석. 임의의 당해 분야에서 허용되는 종양 모델, 검정 등을 사용하여 다양한 종양에 대한 본원에 기재된 IL-10 분자의 영향을 평가할 수 있다. 이후 기재되는 종양 모델 및 종양 분석은 이용될 수 있는 것들의 대표이다. 동계 마우스 종양 세포를 종양 접종당 10^4 , 10^5 또는 10^6 세포로 피하 또는 피내로 주사한다. Ep2 유방 암종, CT26 결장 암종, 피부의 PDV6 편평상피 암종 및 4T1 유방암종 모델이 사용될 수 있다 (참조: 예를 들어, Langowski 등 (2006) Nature 442: 461-465). 면역적격 Balb/C 또는 B-세포 결핍 Balb/C 마우스가 사용될 수 있다. PEG 10-mIL-10은 면역적격 마우스에 투여될 수 있고 PEG-hIL-10 처리는 B-세포결핍 마우스에 있을 수 있다. 종양은 치료가 시작되기 전에 100 내지 250 mm³의 크기에 도달하도록 허용된다. IL-10, PEG-mIL-10, PEG-hIL-10, 또는 완충액 대조군은 종양 이식으로부터 원거리부위에 SC 투여된다. 종양 성장은 전형적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다. 종양 조직 및 림프 기관을 다수의 염증 마커에 대한 mRNA 발현을 측정하고, 다수의 염증 세포 마커에 대한 면역조직화학을 수행하기 위해 다양한 종점에서 수거한다. 조직을 액체 질소에서 급속 동결시키고, -80 °C에 저장한다. 1차 종양 성장은 전형적으로 전자 캘리퍼스를 사용하여 매주 2회 모니터링한다. 종양 용적은 화학식 (너비² x 길이/2) (여기서, 길이는 보다 긴 차원이다)을 사용하여 계산될 수 있다. 종양은 치료가 시작되기 전에 90 내지 250 mm³의 크기에 도달하도록 허용된다.

[0266] 실시예 1

[0267] **IL-12와 조합된 PEG-IL-10의 항종양 효과**

[0268] 본 실시예는 쥐 4T1 종양 모델에서 종양 크기에 대한 PEG-IL-10 및 IL-12의 조합 효과를 입증한다.

[0269] 간략하게, 100 μ l 용적의 1×10^4 4T1 세포 (CRL-2539; ATCC, Manassas, VA)는 4 내지 6주령의 암컷 BALB/c 마우스 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)의 우측 하부 측면으로 SC 이식하였다. 일단 감지할 수 있게 되면, 종양 성장을 1주에 2회 측정하고 - 종양 용적은 수학적 (폭² x 길이/2)을 사용하여 계산할 수 있고, 여기서, 길이는 보다 긴 디멘전이다. 종양이 용적이 평균 75 mm³에 도달하는 경우, 동물을 제충화하였다.

[0270] 코호트 당 8마리의 마우스에 비히클 및/또는 1 mg/kg의 PEG-rMuIL-10 (ARMO Biosciences, Redwood City, CA), 및/또는 0.05, 0.1, 또는 0.5 mg/kg의 rMuIL-12 (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 21 또는 28일 동안 하루에 SC로 투여하였다. 각각의 마우스에 2개의 별도의 주사(예를 들어, IL-10 및 비히클, 또는 IL-10 및 IL-12, 또는 비히클 및 비히클)를 투여하였다. 투여 21일 후 에, 각각의 그룹으로부터의 4마리의 마우스를 조직 및 종양 분석을 위해 희생시켰다. 투여 28일 후 에, 각각의 그룹으로부터의 나머지 마우스를 조직 및 종양 분석을 위해 희생시켰다.

[0271] 종양 중량은 21일 후에 평가하고 데이터는 도 2에 나타낸다. 투여된 rMuIL-12의 양은 X-축 상에 나타내고; 상기된 바와 같이 PEG-rMuIL-10이 투여되는 경우, 용량은 1 mg/kg이었다. 도 2에 지적된 바와 같이, PEG-rMuIL-10 및 rMuIL-12의 조합 각각의 투여는 단독으로 어느 하나의 제제의 투여 보다 종양 중량의 보다 큰 감소를 유도하였다. 상기 효과는 rMuIL-12의 보다 높은 용량 (즉, 0.5 및 0.1 mg/kg; * = P < 0.05)에서 보다 현저하였다. 도 2에서의 막대는 개별 마우스 데이터의 평균을 나타낸다. 28일 후 평가된 마우스는 동일한 일반적 경향 (데이터는 나타내지 않음)을 나타냈다.

[0272] **실시예 2**

[0273] **혈청 사이토킨 수준에 대한 IL-12와 조합된 PEG-IL-10의 효과**

[0274] 본 실시예는 종양 함유 마우스에서 혈청 IFN γ 및 TNF α 수준에 대한 PEG-IL-10 및 IL-12의 조합 효과를 입증한다. 본원에 기재된 바와 같이, 개별적으로 IL-10 및 IL-12 각각에 대한 노출과 특히 IL-12에 대한 노출은 혈청 사이토킨 IFN γ 및 TNF α 의 유도를 유발한다. IFN γ 및 TNF α (주로 IFN γ 를 통한)의 증가된 혈청 수준은 IL-12의 전신 독성과 연관된다.

[0275] 간략하게, IFN γ 및 TNF α 수준은 투여 9일 후, 용량 투여 4시간 후 실시예 1에 기재된 마우스 (즉, 비히클, 1 mg/kg PEG-rMuIL-10, 및/또는 0.05, 0.1, 또는 0.5 mg/kg rMuIL-12 SC 하루 투여받은 마우스)에서 평가하였다. 혈장 사이토킨 수준은 제조업자의 지침에 따라 수행되는, 메소 스케일 디스커버리의 V-PLEX 염증촉진 패널 1 (마우스) 키트(Rockville, Maryland)를 사용하여 검출하였다. 상기 결과는 도 3a 및 도 3b에 제공된다. 투여된 rMuIL-12의 양은 도 3a 및 3b 각각에서 X-축 상에 나타내고; 상기된 바와 같이 PEG-rMuIL-10이 투여되는 경우, 용량은 1 mg/kg이었다.

[0276] 도 3a에 나타난 바와 같이, 3개의 rMuIL-12 용량 각각과 PEG-rMuIL-10의 동시 투여는 3개의 단독의 rMuIL-12 용량 각각의 투여 후 관찰되는 혈청 IFN γ 수준에서 감소를 유도하였다. 더욱이, 0.5 mg/kg rMuIL-12가 1 mg/kg의 PEG-rMuIL-10과 동시 투여되는 경우, 단독의 0.5 mg/kg rMuIL-12의 투여와 비교하여 혈청 IFN γ 수준에서 통계학적으로 유의적 감소 (***) = P < 0.001)가 있었다. 이들 데이터는 IL-12가 동시 투여되는 경우 PEG-IL-10이 갖는 효과를 나타내고 - 조합 치료요법으로부터 비롯되는 증진된 항-종양 반응 (도 2 참조)은 손상되지 않고 IL-12와 연관된 추정 독성 "지수"는 감소된다.

[0277] 도 3b에 나타난 바와 같이, 3개의 rMuIL-12 용량 각각과 PEG-rMuIL-10의 동시 투여는 3개의 단독의 rMuIL-12 용량 각각의 투여 후 관찰되는 혈청 TNF α 수준에서 감소를 유도하였다. 더욱이, 0.5 mg/kg rMuIL-12이 1 mg/kg의 PEG-rMuIL-10과 동시 투여되는 경우, 단독의 0.5 mg/kg rMuIL-12의 투여와 비교하여 혈청 TNF α 수준에서 통계학적으로 유의적 감소 (***) = P < 0.001)가 있었다. 이들 데이터는 IL-12가 동시 투여되는 경우 PEG-IL-10이 갖는 효과를 나타내고 - 조합 치료요법으로부터 비롯되는 증진된 항-종양 반응 (도 2 참조)은 손상되지 않고 IL-12와 연관된 추정 독성 "지수"는 감소된다.

[0278] 본 발명을 수행하기 위한 발명자에게 공지된 최선의 방식을 포함하는 본 발명의 특별한 구현예가 본원에 기재된다. 상기한 설명을 관독시, 개시된 구현예의 변형이 당업자에게 명백해질 수 있고, 당업자는 그러한 변형을 적절하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명은 본원에 구체적으로 기재된 바와 다르게 실시되고,

본 발명은 적용 가능한 법률에 의해 허용되는 바와 따라 본원에 첨부된 특허청구범위에 인용된 주제의 모든 변형 및 등가물을 포함하는 것이 의도된다. 게다가, 이들의 모든 가능한 변형에서 상기 기재한 구성요소의 어떤 병용은 본 명세서에 달리 표시되지 않거나 또는 문맥에 의해 달리 명확하게 모순되지 않는다면, 본 발명에 의해 포함된다.

[0279] 본원에 인용된 모든 간행물, 특허 출원, 수탁 번호, 및 기타 참고문헌이 구체적으로 및 개별적으로 참조로 인용되도록 기재된 것처럼 본원에 참고로 인용된다.

도면

도면1

인간 IL-12, 섹 A (승인 번호 1F45_A) - 306 아미노산 잔기

```

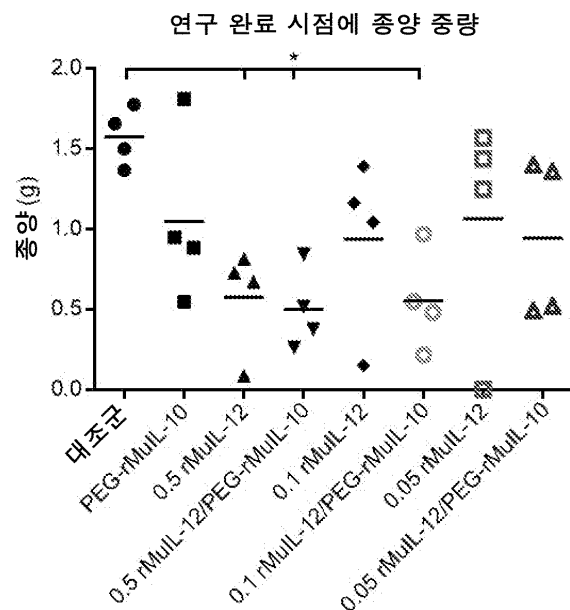
1 iwelkkdvvy veldwypdap gemvvlctdt peedgitwtl dqssevlgsq ktltiqvkef
61 gdagqytchk ggevlshsl1 llhkkgedgiw stdilkdqke pknktflrce aknysgrftc
121 wwlттistdl tfsvkssrgs sdpqgvtcga atlsaervrg dnkeyeysve cqedsaapaa
181 eeslpievmv davhklkyen ytssffirdi ikpdpknlg lkplknsrqv evsweypdtw
241 stphsyfslt fcvqvqgksk rekkdrvftd ktsatvicrk nasisvraqd ryyssswsew
301 asvpas
    
```

인간 IL-12, 섹 B (승인 번호 1F45_B) - 197 아미노산 잔기

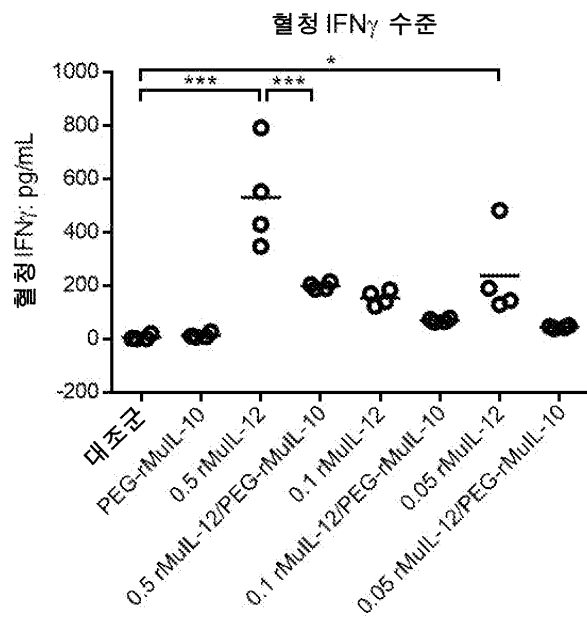
```

1 rnlpvatpdp gmfpclhhsq nllravsnml qkarqtleyf pctseeidhe ditkdktstv
61 eacplleltk nesclnsret sfitngscla srktsfmmal clssiyedlk myqvefktmn
121 akllmdpkrq ifldqnmav idelmqaln nsetvpqkss leepdfyktk iklcillhaf
181 riravtidrv msylnas
    
```

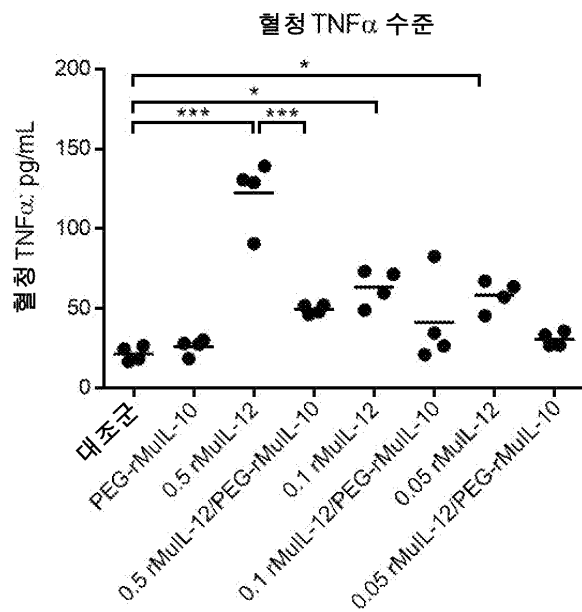
도면2



도면3a



도면3b



서열 목록

- <110> Mumm, John B.
Chan, Ivan H.
- <120> METHODS OF USING INTERLEUKIN-10 FOR TREATING DISEASES AND DISORDERS
- <130> ARMO-022WO
- <150> US 62/275,127
- <151> 2016-01-05
- <160> 24

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 306

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr

1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu

20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly

35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly

50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu

65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys

85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys

100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr

115 120 125

Asp Leu Thr Phe Ser Val Lys Ser Ser Arg Gly Ser Ser Asp Pro Gln

130 135 140

Gly Val Thr Cys Gly Ala Ala Thr Leu Ser Ala Glu Arg Val Arg Gly

145 150 155 160

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala

165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala

180 185 190

Val His Lys Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Thr Ser Ser Phe Phe Ile Arg

195 200 205

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
 210 215 220
 Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
 225 230 235 240

 Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
 245 250 255
 Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
 260 265 270
 Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
 275 280 285
 Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
 290 295 300
 Cys Ser
 305
 <210>
 2
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

 Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys Leu
 1 5 10 15
 His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln Lys
 20 25 30
 Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile Asp
 35 40 45
 His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys Leu

 50 55 60
 Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu Thr
 65 70 75 80
 Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser Phe
 85 90 95
 Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met Tyr

100 105 110
Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro Lys
115 120 125
Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu Leu
130 135 140
Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser Ser
145 150 155 160
Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile Leu
165 170 175
Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met Ser
180 185 190
Tyr Leu Asn Ala Ser

195
<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 3
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 4
Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
1 5 10
<210> 5
<211> 27
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

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> 6

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5
 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 9

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg

1 5
 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 10

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala

1 5 10
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 11

Thr His Arg Leu Pro Arg Arg Arg Arg Arg Arg

1 5 10
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 12

Gly Gly Arg Arg Ala Arg Arg Arg Arg Arg

1	5	10
---	---	----

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> This stretch of residues may be repeated up to 50 times.

<400> 13

Gly Ser Gly Gly Ser

1	5
---	---

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> This stretch of residues may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (2)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<400> 14

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> This stretch of residues may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<400> 15

Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> This stretch of residues may be repeated up to 20 times.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)

<223> This residue may be repeated up to 20 times.

<400> 16

Gly Ser Gly Ser Gly

1 5

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(4)
 <223> This stretch of residues may be repeated up to 20 times.
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)
 <223> This residue may be repeated up to 20 times.
 <400> 17

Gly Gly Gly Ser

1
 <210> 18
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Synthetic polypeptide
 <400> 18

Gly Gly Ser Gly

1
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 19

Gly Gly Ser Gly Gly

1 5
 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 21

Gly Gly Gly Ser Gly

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 22

Gly Ser Ser Ser Gly

1 5

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(4)

<223> This stretch of residues may be repeated up to 50 times.

<400> 23

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 24

<211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(5)
 <223> This stretch of residues may be repeated up to 50 times.
 <400> 24
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5