

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202293268** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.03.09**

(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.05.10**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ СЛИТОГО ПОЛИПЕПТИДА IL-2, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **63/022,853**

(32) **2020.05.11**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/031611**

(87) **WO 2021/231316 2021.11.18**

(71) Заявитель:

**АЛКЕРМЕС ФАРМА АЙЭЛЕНД  
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:

**Зейдан Тарек А., Калария Маюр,  
Гбормитгах Франциска О. (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении представлены композиции, содержащие полипептиды, содержащие циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ , и способы получения и применения таких композиций.

**A1**

**202293268**

**202293268**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576439EA/026

### КОМПОЗИЦИИ СЛИТОГО ПОЛИПЕПТИДА IL-2, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/022853, поданной 11 мая 2020 г., полное описание которой включено в данный документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Это изобретение относится к композициям, содержащим полипептиды, содержащие циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ , и к способам получения и применения таких композиций.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Полипептиды, содержащие циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ , интерлейкин-2 (IL-2), рецептор интерлейкина-2 альфа (IL-2R $\alpha$ ), имеют большие перспективы в качестве противораковых агентов. Эти полипептиды сохраняют полную способность передавать сигнал через среднеаффинный комплекс IL-2R, который экспрессируется на CD8<sup>+</sup> Т-клетках памяти и естественных клетках-киллерах (NK), но стерически предотвращают связывание с высокоаффинным комплексом IL-2R, который преимущественно экспрессируется на регуляторных CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> Т-клетках (CD4<sup>+</sup> Treg) и эндотелиальных клетках. В результате этого селективного связывания IL-2R полипептиды избирательно активируют CD8<sup>+</sup> Т-клетки и NK-клетки, тем самым способствуя уничтожению опухолевых клеток. Неспособность активировать высокоаффинный IL-2R на эндотелиальных клетках может также снизить риск токсичности из-за синдрома капиллярной утечки, известного риска терапии IL-2.

[004] При использовании для лечения людей вышеупомянутые полипептиды должны храниться до использования и транспортироваться к месту применения. Воспроизводимое достижение желаемого уровня полипептида у субъекта требует, чтобы полипептид хранился в составе, сохраняющем биоактивность полипептида. Соответственно, в данной области техники существует потребность в стабильных композициях полипептидов. Предпочтительно, чтобы такие композиции имели длительный срок хранения и были стабильными при хранении и транспортировке.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] В настоящем изобретении предложены композиции, содержащие полипептиды, содержащие циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ , и способы получения и применения таких композиций. Эти композиции специально разработаны для улучшения стабильности и срока годности содержащихся в них полипептидов.

[006] В одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей:

а) от около 1 мг до около 50 мг полипептида, содержащего циклически пермутированный  $\Pi$ -2, слитый с внеклеточной частью цепи  $\Pi$ -2R $\alpha$ ;

б) сахарозу;

с) цитратный буфер; и

д) полисорбат 20.

[007] В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления полипептид состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

[008] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 100 мг до около 120 мг сахарозы. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 110 мг сахарозы.

[009] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 4,0 мг до около 6,0 мг цитрата. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 5,0 мг цитрата. В определенных вариантах осуществления цитратный буфер получают сочетанием 2,03 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,97 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе. В определенных вариантах осуществления цитратный буфер получают сочетанием 2,91 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,34 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе.

[010] В определенных вариантах осуществления композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота: дигидрат трехосновного цитрата натрия от около 1:10 до около 1:2 (т.е. около 1:10, около 1:9, около 1:8, около 1:7, около 1:6, около 1:5, около 1:4, около 1:3 и около 1:2). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота: дигидрат трехосновного цитрата натрия около 1:9. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота: дигидрат трехосновного цитрата натрия около 1:2.

[011] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 0,20 мг до около 0,24 мг полисорбата 20. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 0,22 мг полисорбата 20.

[012] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 2,2 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 11 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 33 мг полипептида.

[013] В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой лиофилизированную массу. В определенных вариантах осуществления растворение

лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с рН от около 5,5 до около 6,5. В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с рН около 6,1.

[014] В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с осмоляльностью от около 160 до около 230 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с осмоляльностью около 179 мОсм/кг.

[015] В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в растворе хлорида натрия приводит к получению водного раствора с осмоляльностью от около 240 до около 340 мОсм/кг.

[016] В определенных вариантах осуществления водный раствор дополнительно разбавляют водой или раствором хлорида натрия.

[017] В определенных вариантах осуществления водный раствор содержит от около 0,03 мг/мл полипептида до около 0,2 мг/мл полипептида.

[018] В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой водный раствор.

[019] В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего 2,2 мг полипептида. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего 11 мг полипептида. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего 33 мг полипептида. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего 44 мг полипептида.

[020] В определенных вариантах осуществления рН раствора составляет около 6,1.

[021] В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой единичную стандартную дозу полипептида.

[022] В одном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей:

от около 1 мг до около 50 мг (например, около 2, 11 или 33 мг) полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ ;

от около 100 мг до около 120 мг сахарозы;

от около 4,0 мг до около 6,0 мг цитрат-аниона; и

от около 0,20 мг до около 0,24 мг полисорбата 20.

[023] В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[024] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 110 мг сахарозы. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 5,0 мг цитрат-аниона. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 0,22

мг полисорбата 20.

[025] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 2,2 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 11 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 33 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 44 мг полипептида.

[026] В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой лиофилизированную массу. В определенных вариантах осуществления лиофилизированная масса содержит:

около 2,2 мг полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

около 110 мг сахарозы;

около 5,0 мг цитрат-аниона; и

около 0,22 мг полисорбата 20.

В определенных вариантах осуществления лиофилизированная масса содержит:

около 11 мг полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

около 110 мг сахарозы;

около 5,0 мг цитрат-аниона; и

около 0,22 мг полисорбата 20.

В определенных вариантах осуществления лиофилизированная масса содержит:

около 33 мг полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

около 110 мг сахарозы;

около 5,0 мг цитрат-аниона; и

около 0,22 мг полисорбата 20.

[027] В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой водный раствор. В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего:

около 2,2 мг полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

около 110 мг сахарозы;

около 5,0 мг цитрат-аниона; и

около 0,22 мг полисорбата 20.

В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего:

около 11 мг полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

около 110 мг сахарозы;

около 5,0 мг цитрат-аниона; и

около 0,22 мг полисорбата 20.

В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего:

около 33 мг полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

около 110 мг сахарозы;

около 5,0 мг цитрат-аниона; и

около 0,22 мг полисорбата 20.

В определенных вариантах осуществления pH водного раствора составляет около 6,1.

[028] В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой единичную стандартную дозу полипептида.

[029] В еще одном аспекте изобретение относится к водной композиции, содержащей:

от около 1 мг/мл до около 20 мг/мл полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ ;

от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл сахарозы;

от около 10 мМ до около 20 мМ (например, от около 10 мМ до около 13 мМ) цитрата;

и

от около 0,09 мг/мл до около 1,1 мг/мл полисорбата 20,

где pH раствора составляет от около 5,5 до около 6,5.

[030] В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1. В определенных вариантах осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

[031] В определенных вариантах осуществления водная композиция содержит около 50 мг/мл сахарозы. В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит около 12 мМ цитрата.

[032] В некоторых вариантах осуществления водная композиция содержит около 0,1 мг/мл полисорбата 20. В некоторых вариантах осуществления водная композиция имеет pH около 6,1.

[033] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 1 мг/мл полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 5 мг/мл полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 15 мг/мл полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 20 мг/мл полипептида.

[034] В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает водную композицию, содержащую:

а) около 1, 5 или 15 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

b) от около 50 мг/мл до около 55 мг/мл сахарозы;

c) около 12 мМ цитратного буфера; и

d) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

[035] В определенных вариантах осуществления водная композиция содержит:

около 1 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 1;

около 50 мг/мл сахарозы;

около 12 мМ (например, 11,95 мМ) цитрата; и

около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН раствора составляет около 6,1.

В определенных вариантах осуществления водная композиция содержит:

около 5 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 1;

около 50 мг/мл сахарозы;

около 12 мМ (например, 11,95 мМ) цитрата; и

около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН раствора составляет около 6,1.

В определенных вариантах осуществления водная композиция содержит:

около 15 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 1;

около 50 мг/мл сахарозы;

около 12 мМ (например, 11,95 мМ) цитрата; и

около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН раствора составляет около 6,1.

[036] В еще одном аспекте изобретение относится к промышленному изделию, содержащему любую из вышеуказанных композиций. В определенных вариантах осуществления промышленное изделие представляет собой флакон из стекла.

[037] В еще одном аспекте изобретение относится к лиофилизированной композиции, полученной путем лиофилизации любого из вышеупомянутых водных растворов.

[038] В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения лиофилизированной композиции, включающему лиофилизацию любого из вышеупомянутых водных растворов.

[039] В другом аспекте изобретение относится к способу получения водной композиции, включающему растворение любой из вышеуказанных лиофилизированных композиций в водном растворителе.

[040] В определенных вариантах осуществления водный растворитель представляет собой воду для инъекций. В определенных вариантах осуществления водный растворитель представляет собой раствор хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления

раствор хлорида натрия содержит от около 0,1% NaCl до около 0,5% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит от около 0,12% NaCl до около 0,41% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит от около 0,02 М NaCl до около 0,07 М NaCl. В определенных вариантах осуществления осмоляльность водной композиции составляет от около 240 до около 340 мОсм/кг.

[041] В определенных вариантах осуществления рН водной композиции составляет около 6,1. В определенных вариантах осуществления рН водной композиции доводят до около 6,1 с помощью основания. В определенных вариантах осуществления основание представляет собой гидроксид натрия.

[042] В определенных вариантах осуществления водную композицию дополнительно разбавляют водным раствором, содержащим около 1% (мас./мас.) поверхностно-активного вещества. В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В определенных вариантах осуществления водный раствор дополнительно содержит около 0,1% (масс./масс.) моногидрата лимонной кислоты, 0,2% (масс./масс.) трехосновного цитрата натрия и 98,7% (масс./масс.) воды для инъекций.

[043] В определенных вариантах осуществления композиция содержит фармацевтическую композицию.

[044] В еще одном аспекте изобретение относится к способу активации естественных клеток-киллеров (NK) у субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества любой из вышеуказанных композиций.

[045] В еще одном аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту эффективного количества любой из вышеуказанных композиций. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой почечно-клеточную карциному, меланому, рак яичников или рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рефрактерную солидную опухоль.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[046] Вышеупомянутые и другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут более понятными из следующего подробного описания иллюстративных вариантов осуществления в сочетании с прилагаемыми графическими материалами. Патент или файл заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации заявки на патент с цветным графическим материалом(-ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

[047] На *Фиг. 1* показана активность полипептида А в нескольких составах в виде восстановленного продукта или лиофилизированного продукта. Активность измеряли в анализе ELISA pSTAT5.

[048] На *Фиг. 2* представлены результаты эксклюзионной хроматографии полипептида А в нескольких составах в виде лиофилизированного продукта.

[049] На *Фиг. 3* представлены результаты эксклюзионной хроматографии полипептида А в нескольких составах в виде восстановленного продукта.

[050] На *Фиг. 4* показаны данные дифференциальной сканирующей калориметрии для полипептида А в зависимости от состава буфера. Показаны результаты по  $T_m$  для разворачивания. Все планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение по результатам трех экспериментов.

[051] На *Фиг. 5* показаны данные по ОП350 полипептида А при 72°C в зависимости от времени в составе буфера. Показана средняя ОП350 через 8 часов при 72 °С. Все планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение по результатам трех экспериментов.

[052] На *Фиг. 6* представлены исследования полипептида А методом визуализации микропотоков в зависимости от состава буфера после 3 дней встряхивания при 300 об/мин. Показана общая концентрация невидимых невооруженным глазом частиц, а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение по результатам трех экспериментов.

[053] На *Фиг. 7* показаны исследования полипептида А методом визуализации микропотоков в зависимости от стресса при встряхивании и состава буфера. Показана общая концентрация невидимых невооруженным глазом частиц а планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение по результатам трех экспериментов.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[054] В данном документе представлены композиции, содержащие полипептиды, содержащие циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ , и способы получения и применения таких композиций.

[055] Описанные в данном документе составы обеспечивают улучшенную стабильность и срок хранения содержащихся в них полипептидов. В частности, полипептидный продукт сохраняет биологическую активность, в том числе после лиофилизации в указанных составах и восстановления в воде для инъекций (ВДИ) или аналогично приемлемом разбавителе. Важно отметить, что составы, описанные в данном документе, были разработаны для обеспечения возможности восстановления лиофилизированного продукта в воде для инъекций, которая является свободно доступной для пациента или поставщика медицинских услуг.

[056] Составы, представленные в данном документе, также обеспечивают получение лиофилизированной массы, которая имеет предпочтительный внешний вид. В частности, масса является цельной (не фрагментированной), практически не имеет усадки от контейнера (например, флакона из стекла) и имеет ровную вогнутую поверхность.

#### **Выбранные определения**

[057] Если в данном документе не определено иное, используемые в данном документе научные и технические термины имеют значения, которые обычно понимаются средними специалистами в данной области техники. В случае любой скрытой двусмысленности определения, приведенные в данном документе, имеют приоритет над

любыми словарными или другими определениями. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе включают множественное число, а термины во множественном числе включают единственное число. Использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Применение термина «в том числе», а также других форм, например, «включает» и «включительно», является неограничивающим.

[058] Используемые в данном документе термины «содержащий», «включающий», «имеющий» и их грамматические варианты следует понимать как определяющие указанные признаки, целые числа, стадии или компоненты, но не исключающие добавления одного или более дополнительных признаков, целых чисел, стадий, компонентов или их групп. Эти термины охватывают термины «состоящий из» и «состоящий в основном из».

[059] Используемые в данном документе термины «циклическая пермутация» и «циклически пермутированный» относятся к процессу взятия линейного белка или родственной ему последовательности нуклеиновой кислоты и слияния нативных N- и C-концов (непосредственно или через линкер, с использованием протеомных методик или методик рекомбинантной ДНК) с образованием кольцевой молекулы, а затем разрезания (разрыва) кольцевой молекулы в другом месте с образованием нового линейного белка или родственной молекулы нуклеиновой кислоты с концами, отличными от концов исходной молекулы. Таким образом, циркулярная пермутация сохраняет последовательность, структуру и функцию белка, создавая новые C-и N-концы в разных местах, что приводит к улучшенной ориентации для слияния желаемого партнера по слиянию полипептидов по сравнению с исходной молекулой.

[060] Используемый в данном документе термин «около» будет понятен специалистам в данной области техники и будет варьироваться в некоторой степени в зависимости от контекста, в котором он используется. Используемый в данном документе термин «около» применительно к измеримому значению, такому как количество, временная продолжительность и т.п., охватывает вариации до  $\pm 5\%$ , включая  $\pm 5\%$ ,  $\pm 1\%$  и  $\pm 0,1\%$  от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для выполнения описанных способов.

[061] Используемые в данном документе термины «лечить», «леченый», «процесс лечения» или «лечение» включают ослабление или облегчение по меньшей мере одного симптома, связанного или вызванного состоянием, нарушением или заболеванием, подвергаемым лечению.

[062] Используемый в данном документе термин «эффективное количество» в контексте введения препарата субъекту относится к количеству препарата, которое обеспечивает желаемый профилактический или терапевтический эффект.

[063] Используемый в данном документе термин «пациент», «индивид» или «субъект» относится к человеку или млекопитающему, отличному от человека. Отличающиеся от человека млекопитающие включают, например, домашний скот и домашних животных, таких как овцы, быки, свиньи, псовые, кошачьи и мышинные. В определенных вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

### Слитые полипептиды IL-2

[064] В одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ . Полипептиды, используемые в описанных в данном документе композициях, демонстрируют предпочтительное связывание с среднеаффинным комплексом IL-2R, содержащим IL-2R $\beta$  и общую гамма-цепь, IL-2R $\gamma$ ), по сравнению с высокоаффинным комплексом IL-2R (содержащим IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  и IL-2R $\gamma$ ) и ведут себя как селективные агонисты среднеаффинного комплекса IL-2R. Дизайн и получение таких полипептидов описаны в патенте США № 9359415, который полностью включен в данный документ посредством ссылки.

[065] Иллюстративный полипептид, пригодный для включения в описанные в данном документе композиции, представлен ниже в SEQ ID. NO:1:

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL  
TGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK FYMPKKATELKH LQCL  
EEELKPLEEVLNLAQSGGGSELCDPPPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIK  
SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQSPMQPVD  
QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK  
TRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 1)

[066] Соответственно, в определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида содержит аминокислотную последовательность SEQ ID. NO: 1. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID. NO: 1.

[067] Специалисту в данной области техники будет понятно, что варианты аминокислотной последовательности SEQ ID. NO: 1 также могут использоваться в описанных в данном документе композициях. Например, в определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 80% (например, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID. NO:1. В определенных вариантах осуществления аминокислотная последовательность полипептида содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая имеет по меньшей мере 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID. NO:1.

[068] Специалисту в данной области техники также будет понятно, что аминокислотная последовательность полипептидов, используемых в композициях, описанных в данном документе, может быть дериватизирована или модифицирована, например, пегилирована, амидирована и т. д.

[069] В определенных вариантах осуществления количество полипептида в составе составляет от около 1 мг до около 50 мг (например, около 1 мг, около 2 мг, около 3 мг, около 4 мг, около 5 мг, около 6 мг, около 7 мг, около 8 мг, около 9 мг, около 10 мг, около 11 мг, около 12 мг, около 13 мг, около 14 мг, около 15 мг, около 16 мг, около 17 мг, около 18 мг,

около 19 мг, около 20 мг, около 25 мг, около 30 мг, около 33 мг, около 40 мг, около 44 мг, около 45 мг или около 50 мг). В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 2,2 мг. В некоторых вариантах осуществления количество полипептида составляет около 11 мг. В некоторых вариантах осуществления количество полипептида составляет около 33 мг. В некоторых вариантах осуществления количество полипептида составляет около 44 мг.

[070] В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида в водном составе составляет от около 1 мг/мл до около 50 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет от около 1 мг/мл до около 20 мг/мл (например, около 1 мг/мл, около 2 мг/мл, около 3 мг/мл, около 4 мг/мл, около 5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 7 мг/мл, около 8 мг/мл, около 9 мг/мл, около 10 мг/мл, около 11 мг/мл, около 12 мг/мл, около 13 мг/мл, около 14 мг/мл, около 15 мг/мл, около 16 мг/мл, около 17 мг/мл, около 18 мг/мл, около 19 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл или около 50 мг/мл). В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет около 1 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет около 5 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет около 15 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет около 20 мг/мл.

[071] В определенных вариантах осуществления водный состав дополнительно разбавляют водой или раствором хлорида натрия, тем самым снижая концентрацию полипептида в составе. В некоторых вариантах осуществления водный раствор содержит от около 0,03 мг/мл полипептида до около 0,2 мг/мл полипептида (например, около 0,03 мг/мл, около 0,04 мг/мл, около 0,05 мг/мл, около 0,06 мг/мл, около 0,07 мг/мл, около 0,08 мг/мл, около 0,09 мг/мл, около 0,10 мг/мл, около 0,11 мг/мл, около 0,12 мг/мл, около 0,13 мг/мл, около 0,14 мг/мл, около 0,15 мг/мл, около 0,16 мг/мл, около 0,17 мг/мл, около 0,18 мг/мл, около 0,19 мг/мл или около 0,2 мг/мл).

[072] В определенных вариантах осуществления водный состав дополнительно разбавляют водным раствором, содержащим около 1% (мас./мас.) поверхностно-активного вещества. В определенных вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20. В определенных вариантах осуществления водный раствор дополнительно содержит около 0,1% (масс./масс.) моногидрата лимонной кислоты, 0,2% (масс./масс.) трехосновного цитрата натрия и 98,7% (масс./масс.) воды для инъекций.

### **Экципиенты и буферы**

[073] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, содержат один или более эксципиентов и/или буферов.

[074] Используемый в данном документе термин «эксципиент» относится к любому нетерапевтическому агенту, добавляемому к композиции или составу для обеспечения желаемой консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта. Подходящие эксципиенты для использования в описанных в данном документе композициях могут

действовать, например, как агенты, повышающие вязкость, стабилизаторы, солюбилизующие агенты и т. д. Эксципиент может быть ионогенным или неионогенным. Подходящие ионные эксципиенты включают соли, такие как NaCl, или аминокислотные компоненты, такие как аргинин-HCl. Подходящие неионогенные эксципиенты включают сахара, например, моносахариды (например, фруктозу, мальтозу, галактозу, глюкозу, D-маннозу, сорбозу и т.д.); дисахариды (например, лактозу, сахарозу, трегалозу, целлобиозу и т.д.); полисахариды (например, раффинозу, мелецитозу, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.д.); и сахароспирты (например, маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцитол) и т.д.). Например, сахар может представлять собой сахарозу, трегалозу, раффинозу, мальтозу, сорбит или маннит. Дополнительно или альтернативно сахар может представлять собой сахароспирт или аminosахар. В определенных вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу.

[075] В определенных вариантах осуществления количество эксципиента (например, сахарозы) в составе составляет от около 1 мг до около 150 мг (например, около 1 мг, около 10 мг, около 20 мг, около 30 мг, около 40 мг, около 50 мг, около 60 мг, около 70 мг, около 80 мг, около 90 мг, около 100 мг, около 110 мг, около 120 мг, около 130 мг, около 140 мг или около 150 мг). В определенных вариантах осуществления количество эксципиента (например, сахарозы) в составе составляет от около 90 мг до около 130 мг. В некоторых вариантах осуществления количество эксципиента (например, сахарозы) в составе составляет от около 99 мг до около 121 мг. В некоторых вариантах осуществления количество эксципиента (например, сахарозы) в составе составляет около 110 мг.

[076] В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы) в водном составе составляет от около 1 мг/мл до около 100 мг/мл (например, около 1 мг/мл, около 10 мг/мл, около 20 мг /мл, около 30 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 70 мг/мл, около 80 мг/мл, около 90 мг/мл или около 100 мг/мл). В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы) составляет от около 30 мг/мл до около 70 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы) составляет от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы) составляет около 50 мг/мл.

[077] Подходящие буферные агенты для использования в описанных в данном документе композициях включают органическую кислоту и соли, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; Трис, гидроклорид трометамин или фосфатный буфер. Кроме того, аминокислотные компоненты также могут быть использованы в качестве буферных агентов. Такой аминокислотный компонент включает глицин, гистидин и метионин. В определенных вариантах осуществления буфер представляет собой цитратный буфер. Используемый в данном документе термин «цитратный буфер» относится к pH-буферной системе (в водной или лиофилизированной

форме), в которой используются цитрат-ионы. Цитратный буфер можно приготовить с использованием любых известных в данной области техники способов, в том числе путем сочетания: (i) лимонной кислоты, дигидрата тринатрия цитрата и моногидрата лимонной кислоты; или (ii) моногидрата лимонной кислоты, двухосновного фосфата натрия и лимонной кислоты. В определенных вариантах осуществления цитратный буфер получают с использованием дигидрата цитрата натрия и лимонной кислоты.

[078] В определенных вариантах осуществления количество буферного агента (например, цитрата) в составе составляет от около 1 мг до около 10 мг (например, около 1 мг, около 2 мг, около 3 мг, около 4 мг, около 5 мг, около 6 мг, около 7 мг, около 8 мг, около 9 мг, около 10 мг). В определенных вариантах осуществления количество буферного агента (например, цитрат) составляет от около 5,9 мг до около 7,2 мг (например, около 5,9 мг, около 6,0 мг, около 6,1 мг, около 6,2 мг, около 6,3 мг, около 6,4 мг, около 6,5 мг, около 6,6 мг, около 6,7 мг, около 6,8 мг, около 6,9 мг, около 7,0 мг, около 7,1 мг или около 7,2 мг). В определенных вариантах осуществления количество буферного агента (например, цитрата) составляет около 6,6 мг. В определенных вариантах осуществления количество цитрат-аниона в буферном агенте (например, цитрате) составляет от около 4,0 мг до около 6,0 мг. В определенных вариантах осуществления количество цитрат-аниона в буферном агенте (например, цитрате) составляет около 5,0 мг.

[079] В определенных вариантах осуществления концентрация буферного агента (например, цитрата) в водном составе, описанном в данном документе, составляет от около 1 мМ до около 50 мМ (например, около 1 мМ, около 2 мМ, около 3 мМ, около 4 мМ, около 5 мМ, около 6 мМ, около 7 мМ, около 8 мМ, около 9 мМ, около 10 мМ, около 11 мМ, около 12 мМ, около 13 мМ, около 14 мМ, около 15 мМ, около 16 мМ, около 17 мМ, около 18 мМ, около 19 мМ, около 20 мМ, примерно 25 мМ, около 30 мМ, около 35 мМ, около 40 мМ, около 45 мМ или около 50 мМ). В определенных вариантах осуществления концентрация буферного агента (например, цитрат) составляет от около 11 мМ до около 13 мМ (например, около 11,1 мМ, 11,2 мМ, 11,3 мМ, 11,4 мМ, 11,5 мМ, 11,6 мМ, 11,7 мМ, 11,8 мМ, 11,9 мМ, 12,1 мМ, 12,2 мМ, 12,3 мМ, 12,4 мМ, 12,5 мМ, 12,6 мМ, 12,7 мМ, 12,8 мМ или 12,9 мМ). В определенных вариантах осуществления концентрация буферного агента (например, цитрата) составляет около 12 мМ. В определенных вариантах осуществления концентрация буферного агента (например, цитрата) составляет около 11,95 мМ. В определенных вариантах осуществления цитратный буфер содержит 2,03 мг/мл (6,90 мМ) дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,97 мг/мл (5,05 мМ) лимонной кислоты.

[080] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, имеют рН от около 5,0 до около 8,0, от около 5,5 до около 7,5, от около 5,0 до около 7,0, от около 6,0 до около 8,0 или от около 6,0 до около 7,0. В определенных вариантах осуществления композиции имеют рН от около 5,5 до около 6,5. В определенных вариантах осуществления композиции имеют рН от около 5,8 до около 6,4. В определенных вариантах осуществления композиции имеют рН около 6,1. В определенных вариантах осуществления рН композиции доводят до рН около 6,1. В определенных вариантах осуществления рН

регулируют с помощью основания. В определенных вариантах осуществления основание представляет собой гидроксид, например, гидроксид натрия (NaOH) или гидроксид калия (KOH). В определенных вариантах осуществления композиция представляет собой водную композицию, и рН водной композиции доводят до рН около 6,1.

[081] Используемый в данном документе термин «поверхностно-активное вещество» относится к органическим веществам, имеющим амфипатическую структуру; т. е. они состоят из групп с противоположной склонностью к растворимости, как правило, из маслорастворимой углеводородной цепи и водорастворимой ионной группы. В зависимости от заряда поверхностно-активного фрагмента поверхностно-активные вещества можно разделить на анионные, катионные и диспергирующие агенты для различных фармацевтических композиций и препаратов биологических материалов. Подходящие поверхностно-активные вещества для применения в описанных в данном документе композициях включают неионогенные поверхностно-активные вещества, ионные поверхностно-активные вещества и цвиттер-ионные поверхностно-активные вещества. Типичные поверхностно-активные вещества для применения в изобретении включают сложные эфиры сорбитана и жирных кислот (например, монокаприлат сорбитана, монолаурат сорбитана, монопальмитат сорбитана), триолеат сорбитана, сложные эфиры глицерина и жирных кислот (например, монокаприлат глицерина, мономирилат глицерина, моностеарат глицерина), сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот (например, декаглицерилмоностеарат, декаглицерилдистеарат, декаглицерилмоноолеат), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот (например, полиоксиэтиленсорбитанмонолаурат, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат, моностеарат полиоксиэтиленсорбитана, монопальмитат полиоксиэтиленсорбитана, триолеат полиоксиэтиленсорбитана, тристеарат полиоксиэтиленсорбита), сложные эфиры полиоксиэтиленсорбита и жирных кислот (например, тетрастеарат полиоксиэтиленсорбита, тетраолеат полиоксиэтиленсорбита), сложные эфиры полиоксиэтиленглицерина и жирных кислот (например, полиоксиэтиленглицерилмоностеарат), сложные эфиры полиэтиленгликоля и жирных кислот (например, дистеарат полиэтиленгликоля), алкиловые эфиры полиоксиэтилена (например, лауриловый эфир полиоксиэтилена), алкиловые эфиры полиоксиэтиленполиоксипропилена (например, полиоксиэтиленполиоксипропиленгликоль, пропиловый эфир полиоксиэтиленполиоксипропилена, цетиловый эфир полиоксиэтиленполиоксипропилена), полиоксиэтиленалкилфениловые эфиры (например, полиоксиэтиленнонилфениловый эфир), полиоксиэтиленовые гидрогенизированные касторовые масла (например, полиоксиэтиленовое касторовое масло, полиоксиэтиленовое гидрогенизированное касторовое масло), производные полиоксиэтиленового пчелиного воска (например, полиоксиэтиленсорбитовый пчелиный воск), производные полиоксиэтиленланолина (например, полиоксиэтиленланолин) и амиды полиоксиэтилена жирной кислоты (например, амид полиоксиэтиленстеариновой кислоты); C 10-C 18 алкилсульфаты (например, цетилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия, олеилсульфат

натрия), сульфат полиоксиэтилена С 10-С 18 алкилового эфира, содержащие в среднем от 2 до 4 молей этиленоксидных звеньев (например, полиоксиэтиленлаурилсульфат натрия), и соли сложного эфира С1-С 18 алкилсульфосукцината (например, сложный эфир лаурилсульфосукцината натрия); и природные поверхностно-активные вещества, такие как лецитин, глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды (например, сфингомиелин) и эфиры сахарозы С 12-С 18 жирных кислот. Композиция может содержать одно или более из таких поверхностно-активных веществ. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, содержат сложные эфиры полиоксиэтиленсорбитана и жирной кислоты, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80. В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, содержат полисорбат 20.

[082] В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) в составе составляет от около 0,1 мг до около 1 мг (например, около 0,1 мг, около 0,15 мг, около 0,2 мг, около 0,25 мг, около 0,3 мг, около 0,35 мг, около 0,4 мг, около 0,45 мг, около 0,5 мг, около 0,55 мг, около 0,6 мг, около 0,65 мг, около 0,7 мг, около 0,75 мг, около 0,8 мг, около 0,85 мг, около 0,9 мг, около 0,95 мг или около 1 мг). В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) составляет от около 0,15 мг до около 0,3 мг (например, около 0,16 мг, около 0,17 мг, около 0,18 мг, около 0,19 мг, около 0,21 мг, около 0,22 мг, около 0,23 мг, около 0,24 мг, около 0,26 мг, около 0,27 мг, около 0,28 мг или около 0,29 мг). В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) составляет от около 0,20 мг до около 0,24 мг. В некоторых вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) в водном составе составляет около 0,22 мг.

[083] В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) в водном составе составляет от около 0,01 мг/мл до около 1 мг/мл (например, около 0,01 мг/мл, около 0,1 мг/мл, около 0,2 мг/мл, около 0,3 мг/мл, около 0,4 мг/мл, около 0,5 мг/мл, около 0,6 мг/мл, около 0,7 мг/мл, около 0,8 мг/мл, около 0,9 мг/мл или около 1 мг/мл). В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) составляет от около 0,05 мг/мл до около 0,15 мг/мл (например, около 0,05 мг/мл, около 0,06 мг/мл, около 0,07 мг/мл или около 0,08 мг/мл, около 0,09 мг/мл, около 0,1 мг/мл, около 0,11 мг/мл, около 0,12 мг/мл, около 0,13 мг/мл, около 0,14 мг/мл или около 0,15 мг/мл). В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) составляет от около 0,09 мг/мл до около 0,11 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) в водном составе составляет около 0,1 мг/мл.

[084] Специалистам в данной области техники будет понятно, что компоненты композиций и композиции по настоящему изобретению могут быть описаны в единицах, отличных от мг/мл. Например, компоненты композиций и композиции по настоящему изобретению могут быть описаны в единицах молярной концентрации. Компоненты

композиций и композиции по настоящему изобретению могут быть дополнительно описаны в единицах массы или массовых процентах.

### **Лиофилизация**

[085] В одном аспекте настоящее изобретение относится к лиофилизированным композициям (например, лиофилизированной массе) полипептидов, описанных в данном документе, и способам их получения.

[086] Лиофилизация, как правило, включает три основные стадии: замораживание, первичную сушку и вторичную сушку. Замораживание необходимо для превращения воды в лед или некоторых аморфных компонентов состава в кристаллическую форму. Первичная сушка представляет собой стадию процесса, при которой лед из замороженного продукта удаляют путем прямой сублимации при низком давлении и температуре. Вторичная сушка представляет собой стадию процесса, при которой связанная вода удаляется из матрицы продукта за счет диффузии остаточной воды к поверхности испарения. Температура продукта при вторичной сушке обычно выше, чем при первичной сушке. См., Tang X. et al. (2004) "Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice," Pharm. Res., 21:191-200; Nail S.L. et al. (2002) "Fundamentals of freeze-drying," в Development and manufacture of protein pharmaceuticals. Nail SL editors. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 281-353; Wang et al. (2000) "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals," M J Pharm., 203:1-60; Williams NA et al. (1984) "The lyophilization of pharmaceuticals; A literature review." J. Parenteral Sci. Technol, 38:48-59; и WO 2010/148337 A1.

[087] Из-за колебаний температуры и давления в процессе лиофилизации необходим соответствующий подбор эксципиентов или других компонентов, таких как стабилизаторы, буферные агенты, наполнители и поверхностно-активные вещества, для предотвращения деградации описанных в данном документе полипептидов (например, путем агрегации белка, дезамидирования, и/или окисления) во время сушки вымораживанием и хранения. Лиофилизированные композиции, описанные в данном документе, содержат особую комбинацию компонентов, обеспечивающую стабильное длительное хранение полипептидов, описанных в данном документе, которые содержат циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ .

[088] В еще одном аспекте изобретение относится к лиофилизированной композиции, полученной путем лиофилизации любой из описанных в данном документе водных композиций, которые содержат циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ . В определенных вариантах осуществления лиофилизированная композиция представляет собой лиофилизированную массу. В определенных вариантах осуществления лиофилизированную композицию получают путем лиофилизации любой из водных композиций, описанных в данном документе, в соответствии с протоколом лиофилизации, приведенным в таблице 2, таблице 3 или таблице 4.

[089] В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения

лиофилизированной композиции, включающему лиофилизацию любой из описанных в данном документе водных композиций, которые содержат циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ . В определенных вариантах осуществления способ получения лиофилизированной композиции включает соблюдение протокола лиофилизации, указанного в таблице 2, таблице 3 или таблице 4.

[090] В еще одном аспекте изобретение относится к способу получения водной композиции, включающему растворение в водном растворителе любой из описанных в данном документе лиофилизированных композиций, которые содержат циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ . В определенных вариантах осуществления лиофилизированная композиция представляет собой лиофилизированную массу. В определенных вариантах лиофилизированную композицию растворяют в 2,2 мл воды. В определенных вариантах осуществления лиофилизированную композицию растворяют в растворе хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит от около 0,1% NaCl до около 0,5% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит от около 0,12% NaCl до около 0,41% NaCl. В некоторых вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит около 0,10%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, 0,14%, 0,15%, 0,16%, 0,17%, 0,18%, 0,19%, 0,20%, 0,21%, 0,22%, 0,23%, 0,24%, 0,25%, 0,26%, 0,27%, 0,28%, 0,29%, 0,30%, 0,31%, 0,32%, 0,33%, 0,34%, 0,35%, 0,36%, 0,37%, 0,38%, 0,39%, 0,40%, 0,41%, 0,42%, 0,43%, 0,44%, 0,45%, 0,46%, 0,47%, 0,48%, 0,49% или 0,50% NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит от около 0,02 М NaCl до около 0,07 М NaCl. В определенных вариантах осуществления раствор хлорида натрия содержит около 0,02 М, 0,03 М, 0,04 М, 0,05 М, 0,06 М или 0,07 М NaCl. В определенных вариантах осмоляльность водной композиции составляет от около 240 до около 340 мОсм/кг при растворении в растворе хлорида натрия. В определенных вариантах осуществления водную композицию, растворенную в растворе хлорида натрия, можно вводить пациенту посредством подкожного введения.

### **Применение полипептидных композиций**

[091] Композиции, описанные в данном документе, особенно полезны для лечения, предотвращения или облегчения любого заболевания или нарушения, связанного с сигналингом рецептора интерлейкина-2.

[092] В одном аспекте предложен способ активации естественных клеток-киллеров (NK) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе, которые содержат циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$

[093] В еще одном аспекте предложен способ лечения злокачественного новообразования у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества любой из композиций, описанных в данном документе, которые содержат циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ . Злокачественные новообразования, подходящие для лечения с использованием описанной

в данном документе композиции, включают почечно-клеточную карциному, меланому, рак яичников и рак легкого. В определенных вариантах осуществления рак представляет собой рефрактерную солидную опухоль.

[094] В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно.

[095] В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно в дозе от около 1 мкг/кг до около 15 мкг/кг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно в дозе около 1 мкг/кг, около 2 мкг/кг, около 3 мкг/кг, около 4 мкг/кг, около 5 мкг/кг, около 6 мкг/кг, около 7 мкг/кг, около 8 мкг/кг, около 9 мкг/кг, около 10 мкг/кг, около 11 мкг/кг, около 12 мкг/кг, около 13 мкг/кг, около 14 мкг/кг или около 15 мкг/кг.

[096] В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно каждый день в течение пяти дней подряд.

[097] В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно каждый день в течение пяти дней подряд, после чего в течение девяти дней подряд композицию не вводят внутривенно.

[098] В определенных вариантах осуществления композицию вводят внутривенно каждый день в течение пяти дней подряд, после чего в шестнадцать дней подряд композицию не вводят внутривенно.

[099] В некоторых вариантах осуществления композицию вводят: 1) первый цикл, включающий внутривенное введение композиции каждый день в течение пяти последовательных дней, затем девять последовательных дней без внутривенного введения композиции; и 2) второй цикл, включающий внутривенное введение композиции каждый день в течение пяти последовательных дней, затем шестнадцать последовательных дней без внутривенного введения композиции.

[0100] В определенных вариантах осуществления способ включает по меньшей мере один дополнительный цикл введения, где каждый дополнительный цикл включает внутривенное введение композиции каждый день в течение пяти последовательных дней, после чего шестнадцать последовательных дней без внутривенного введения композиции.

[0101] В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно.

[0102] В некоторых вариантах осуществления способ включает подкожное введение описанной выше водной композиции с осмоляльностью от около 240 до около 340 мОсм/кг.

[0103] В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе от около 1 мг до около 15 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 1 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 2 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 3 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 4 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 5 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 6 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 7 мг. В определенных вариантах осуществления композицию

вводят подкожно в дозе около 8 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 9 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 10 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 11 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 12 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 13 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 14 мг. В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 15 мг.

[0104] В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно один раз в неделю (1 раз/нед.), один раз в две недели (1 раз/2 нед.) или один раз в три недели (1 раз/3 нед.).

[0105] В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе от около 1 мг до около 15 мг один раз в неделю (1 раз/нед.), один раз в две недели (1 раз/2 нед.) или один раз в три недели (1 раз/3 нед.).

[0106] В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 3 мг один раз в неделю (1 раз/нед.). В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно в дозе около 6 мг один раз в три недели (1 раз/3 нед.).

[0107] В определенных вариантах осуществления меланомы представляет собой одну или обе из меланомы слизистой оболочки или прогрессирующей кожной меланомы.

[0108] Для специалистов в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации описанных в данном документе способов могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки описанных в данном документе вариантов осуществления изобретения. После подробного описания некоторых вариантов осуществления изобретения, они будут более понятны со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

## **ПРИМЕРЫ**

[0109] Данное изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительное ограничение. В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы органического синтеза, клеточной биологии, культуры клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники.

### **Пример 1 - Разработка и тестирование композиций полипептидов**

[0110] В поисках оптимального состава для полипептида А (циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ , содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1), несколько составов полипептида А были протестированы на предмет их влияния на стабильность белка, стабильность pH, физико-химическое поведение, однородность лиофилизированной массы и устойчивость к

прилипанию к флакону для хранения после лиофилизации. В приведенной ниже таблице 1 указаны конкретные компоненты и их концентрации для каждого тестируемого состава. Различные композиции подвергали одному из протоколов цикла лиофилизации, приведенных в таблицах 2-4 ниже.

Таблица 1: Компоненты составов полипептида А

<b>Компонент</b>	<b>Состав 1</b>	<b>Состав 2</b>	<b>Состав 3</b>
Объемообразующий эксципиент (конц.)	Сахароза (50 мг/мл)	Маннит (50 мг/мл)	Сахароза (50 мг/мл)
Буфер (конц.)	Глицин (10 мг/мл)	Глицин (10 мг/мл)	Гистидин (10 мг/мл)
Поверхностно-активное вещество (Конц.)	Полисорбат 20 (0,1 мг/мл)	Полисорбат 20 (0,1 мг/мл)	Полисорбат 20 (0,1 мг/мл)
Буфер pH	5,9	5,7	6,5
Плотность	1,020 г/мл	1,021 г/мл	1,018 г/мл
pH после фильтрации	6,6	6,6	6,5
Конц. полипептида А после фильтрации	0,75 мг/мл	0,96 мг/мл	0,79 мг/мл
<b>Компонент</b>	<b>Состав 4</b>	<b>Состав 5</b>	<b>Состав 6</b>
Объемообразующий эксципиент (конц.)	Сахароза (50 мг/мл)	Отсутствует	Сахароза (50 мг/мл)
Буфер (конц.)	Цитрат натрия (3 мг/мл)	Янтарная кислота (40 мг/мл)	Метионин (10 мг/мл)
Поверхностно-активное вещество (Конц.)	Полисорбат 20 (0,1 мг/мл)	Полисорбат 20 (0,1 мг/мл)	Полисорбат 20 (0,1 мг/мл)
Буфер pH	6,3	5,5	5,9
Плотность	1,015 г/мл	1,021 г/мл	1,011 г/мл
pH после фильтрации	6,1	5,4	6,3
Конц. полипептида А после фильтрации	1,03 мг/мл	1,00 мг/мл	0,85 мг/мл

Таблица 2: Цикл лиофилизации - флакон 2 мг

Сегмент	Тип	Уставка температуры (°C) (±5°C)	Уставка времени (часы) (±0,5 часа)	Уставка давления в камере (мкм)

				рт.ст.) ( $\pm 20$ мкм рт.ст.)
1	Выдерживание	5	4,0	$\leq 14,7$ фунтов на кв. дюйм
2	Скорость изменения температуры	-50	3,7	$\leq 14,7$ фунтов на кв. дюйм
3	Выдерживание	-50	7,0	$\leq 14,7$ фунтов на кв. дюйм
4	Откачивание	-50		40
5	Скорость изменения температуры	-28	0,7	40
6	Выдерживание	-28	60	40
7	Скорость изменения температуры	25	3,5	40
8	Выдерживание	25	9	40
9	Укупорка	25		14,7 фунтов на кв. дюйм $\pm 0,7$ фунтов на кв. дюйм

Таблица 3: Цикл лиофилизации - флакон 10 мг

Сегмент	Тип	Уставка температуры ( $^{\circ}\text{C}$ ) ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )	Уставка времени (часы) ( $\pm 0,5$ часа)	Уставка давления в камере (мкм рт.ст.) ( $\pm 20$ мкм рт.ст.)
1	Выдерживание	5	4,0	$\leq 14,7$ фунтов на кв. дюйм
2	Скорость изменения температуры	-50	1,8	$\leq 14,7$ фунтов на кв. дюйм
3	Выдерживание	-50	4,0	$\leq 14,7$ фунтов на кв. дюйм

4	Откачивание	-50		30
5	Скорость изменения температуры	-28	0,7	30
6	Выдерживание	-28	66	30
7	Скорость изменения температуры	25	3,5	30
8	Выдерживание	25	9	30
9	Укупорка	25		14,7 ± 0,7 фунтов на кв. дюйм

Таблица 4: Цикл лиофилизации - флакон 30 мг

Сегмент	Тип	Уставка температуры (°C) (±5°C)	Уставка времени (часы) (±0,5 часа)	Уставка давления в камере (мкм рт.ст.) (± 20 мкм рт.ст.)
1	Выдерживание	5	4,0	≤ 14,7 фунтов на кв. дюйм
2	Скорость изменения температуры	-45	2,8	≤ 14,7 фунтов на кв. дюйм
3	Выдерживание	-45	4,0	≤ 14,7 фунтов на кв. дюйм
4	Откачивание	-45		50
5	Скорость изменения температуры	-25	0,8	50
6	Выдерживание	-25	66	50
7	Скорость изменения температуры	30	3,1	50
8	Выдерживание	30	8	50
9	Укупорка	30		14,7 ± 0,7 фунтов на кв. дюйм

[0111] Физико-химическое поведение полипептида А в составах 1-6 характеризовали при низких температурах путем измерения электрического сопротивления, выполнения микроскопии с сушкой вымораживанием и проведения дифференциальной сканирующей калориметрии.

#### Электрическое сопротивление

[0112] Сопротивление измеряли примерно на 1,8 мл образца в стеклянной пробирке диаметром 20 мм с использованием прибора для определения сопротивления от 0 до 20 МОм и керамического датчика сопротивления, состоящего из двух параллельных золотых полосок на керамической пластине. Температуру измеряли с помощью термопары типа Т 32-го калибра, расположенной на керамическом зонде на противоположной стороне золотых пластин. Приборы для измерения и регистрации были откалиброваны в диапазоне температур, используемом для анализа, с использованием прослеживаемых эталонных стандартов Национального института стандартов и технологий (NIST). Точность системы проверяли с использованием стандартного эталонного раствора.

[0113] При использовании стандартного метода материал охлаждали и нагревали со средней контролируемой скоростью  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту, чтобы оценить его тепловые характеристики и установить характерный для конкретного материала фазовый переход. Исследование образца для определения сопротивления проводили при атмосферных условиях. По отклонению сопротивления определяли начало фазового перехода при нагревании. Температуру регистрировали каждые десять секунд в течение всего анализа с помощью прибора Kaye Validator с программой Collect.

#### Микроскопия с сушкой вымораживанием

[0114] Приблизительно 0,15 мл раствора помещали в стеклянную кювету. Затем кювету переносили на столик микроскопа для сушки вымораживанием с регулируемой температурой. Кювета для образцов была снабжена двумя термопарами типа Т 32-го калибра, помещенными непосредственно в материал внизу и в центре кюветы для контроля температуры образцов. Жидкий образец охлаждали со средней регулируемой скоростью  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту до заданной температуры  $-50^{\circ}\text{C}$  или ниже. После завершения замораживания воздух из камеры со столика микроскопа откачивали, чтобы инициировать сублимацию льда. Затем столик микроскопа нагревали со средней контролируемой скоростью  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту во время сублимации и сушки. За поведением образца во время замораживания и сушки наблюдали с помощью микроскопа Infinivar с увеличением от 16 до 330 X, соединенного с ПЗС-камерой Super WDR. Наблюдаемые изменения в замороженных и высушенных частях образца, отражающие материал, достигший фазового перехода, были соотнесены с температурой образца. Температуру регистрировали каждые десять секунд в течение всего анализа с помощью прибора Kaye Validator с программой Collect.

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия

[0115] Низкотемпературную дифференциальную сканирующую калориметрию (НТ-ДСК) использовали в сочетании с анализами, описанными выше, как средство оценки

физико-химического поведения при замораживании и нагревании для определения фазовых переходов. Анализ методом НТ-ДСК соответствовал действующему стандарту USP<891> и проводился с использованием прибора TA Instruments Q200 DSC. TA Instruments Q200 DSC работал с охлаждаемой системой охлаждения. Параметры теста были реализованы с использованием программного обеспечения TA Advantage (v5.0.4). Данные сканирования регистрировали и графически отображали с помощью программного обеспечения TA Universal Analysis (v4.5A). Образец объемом 19,4 мг раствора помещали в алюминиевую кювету для образцов с крышкой, которая обжимается на месте. Азот, NF, использовали для непрерывной продувки образца со скоростью потока 50 мл/мин. Прибор был откалиброван в соответствии с программой калибровки компании Lyophilization Technology, Inc. При охлаждении и нагревании выделение или поглощение тепла для образца отражает разницу в энергии, когда образец подвергается тепловому воздействию. Эта разница в тепловой энергии регистрируется для анализа результатов.

#### Результаты характеристики физико-химического поведения

[0116] Результаты характеристики физико-химических свойств показали, что состав 4 приводил к получению лиофилизированной массы с однородным внешним видом, которая оставалась цельной при переворачивании и встряхивании, минимальным остаточным материалом, прилипшим к стенкам и дну флакона после лиофилизации, и обладал самым высоким значением температуры стеклования. Результаты для состава 4 были лучше, чем для всех других протестированных составов. Кроме того, другие протестированные составы не смогли обеспечить стабильный цикл лиофилизации для получения лиофилизированной композиции полипептида А.

#### Испытания стабильности

[0117] Стабильность полипептида А в составах 1-6 характеризовали с использованием капиллярного изоэлектрического фокусирования (сIEF), эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), ДСН-ПААГ-электрофореза и анализов активности.

#### Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (сIEF)

[0118] сIEF использовали для определения наличия зарядовых вариантов в тестируемых составах. Образец лекарственного препарата готовили путем восстановления образца в 2,2 мл воды для инъекций (ВДИ). Образец был подвергнут визуальному осмотру, чтобы убедиться, что содержимое не содержит видимых частиц. Эталонные стандарты, образцы и холостые пробы были подготовлены для анализа путем приготовления мастер-микса путем расчета объема каждого требуемого реагента из приведенной ниже таблицы с использованием следующего уравнения: «объем реагента»=[("n+2")× «V» ], где: n=количество образцов; V=объем (мкл) реагента на образец (см. таблицу 5 ниже).

Таблица 5: Смесь реагентов для анализа методом сIEF

Реагент (общий объем 200 мкл)	V (мкл/образец)
1% метилцеллюлоза (0,35% конечная концентрация)	70

Фармалиты 5-8 (конечная концентрация 3%)	6
Фармалиты 3-10 (конечная концентрация 1%)	2
маркер pI 5,12	0,5
маркер pI 7,90	0,5

[0119] Рассчитанный объем реагентов добавляли в пробирку подходящего размера и встряхивали для перемешивания. Холостую пробу готовили путем переноса 158 мкл мастер-микса в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, в пробирку добавляли 242 мкл воды для инъекций и осторожно встряхивали для перемешивания. Эталонный стандарт полипептида А готовили таким же образом, как и контрольный образец. Образец готовили путем переноса 79 мкл мастер-микса в пробирку на 1,5 мл для каждого образца, затем в пробирку добавляли 121 мкл образца и осторожно встряхивали для перемешивания. Последовательность введения и используемые аналитические условия приведены в таблицах 6 и 7, соответственно. Для анализа все пики между маркерами pI интегрируют. Результаты рассчитывали, учитывая pI и % площади всех пиков  $\geq 0,05\%$ .

Таблица 6: Последовательность введения, используемая для анализа cIEF

Идентификатор образца	Количество инъекций
Холостая проба	1
Эталонный стандарт для полипептида А	1
Образцы	каждый по 1
Эталонный стандарт для полипептида А	1
Холостая проба	1

Таблица 7: Аналитические условия, используемые для анализа методом cIEF

Тип планшета:	Планшет на 48 флаконов с 4 флаконами для промывки
Температура планшета:	5,0 °C
Период фокусирования 1:	1500 В в течение 1,00 мин.
Период фокусирования 2:	3000 В в течение 7,00 мин.

#### Эксклюзионная ВЭЖХ

[0120] Эксклюзионную ВЭЖХ использовали для определения чистоты тестируемых составов. Образец лекарственного средства готовили путем восстановления образца в 2,2 мл воды для инъекций. Образец был подвергнут визуальному осмотру, чтобы убедиться, что содержимое не содержит видимых частиц. Эталонные стандарты, образцы и холостые пробы подвергали анализу с использованием следующих аналитических условий и последовательности введения, указанных в таблицах 8 и 9, соответственно.

Таблица 8: Аналитические условия, используемые для анализа методом ВЭЖХ

Подвижная фаза	50 mM фосфата натрия, 200 mM NaCl, pH 7,2
Время прогона	15 минут

Скорость потока	1,0 мл/мин
Колонка	TSKgel G2000SW <sub>XL</sub> , внутренний диаметр 7,8 мм x 30 см, 5 мкм
Температура колонки	25°C ± 5°C
Температура образца	5°C ± 3°C
Детекция	УФ-поглощение при 280 нм
Объем инъекции	100 мкл

Таблица 9: Последовательность введения, используемая для анализа методом ВЭЖХ

Идентификатор образца	Количество инъекций
Подвижная фаза	1+
Холостая проба буфера для состава	1
Стандарт для гель-фильтрации (GFS)	1
Эталонный стандарт для полипептида А	1
Образцы	1
Эталонный стандарт для полипептида А	1
Стандарт для гель-фильтрации (GFS)	1

[0121] Результаты представляли в виде % площади и времени элюирования всех интегрированных пиков с площадью более 0,05%. На Фиг. 2 и Фиг. 3 показаны пики ЭХ для каждого тестируемого состава.

#### Клеточный анализ активности

[0122] Активность полипептида А в каждой композиции оценивали путем измерения связывания композиций с клетками НН (линия клеток Т-лимфоцитов человека, на поверхности которых присутствует изоформа рецептора  $\beta\gamma$ IL2). Связывание полипептида А измеряли путем определения количества фосфорилированного STAT5 (фосфо-STAT5 или pSTAT5), присутствующего в клетках НН после приведения в контакт с каждым составом, с использованием анализа ELISA. Набор Invitrogen InstantOne ELISA Phosphor-STAT5 Alpha/Beta (pTyr694/pTyr699) использовали для проведения анализа ELISA.

[0123] Образец лекарственного средства готовили путем восстановления образца в 2,2 мл воды для инъекций. Образец был подвергнут визуальному осмотру, чтобы убедиться, что содержимое не содержит видимых частиц.

[0124] Разбавитель образца готовили путем добавления 25 мл эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) к 500 мл сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) до конечной концентрации 5% FBS и подогревали до 37°C. Использовали промывочный буфер, содержащий фосфатно-солевой буфер (PBS) с 0,05% Твин 20.

[0125] Образцы и стандарты разводили до конечных концентраций белка при анализе 750 нг/мл, 250 нг/мл, 83 нг/мл, 28 нг/мл, 9,3 нг/мл, 3,1 нг/мл, 1,0 нг/мл и 0,3 нг/мл. Готовили исходный раствор клеток НН с плотностью приблизительно  $1,2 \times 10^6$  клеток/мл, и

50 мкл исходного раствора клеток добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета, содержащего разведенный образец или стандарт. Клетки инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После инкубации клетки лизировали в буфере для лизиса клеток в течение 10 минут. После лизиса 50 мкл смеси лизированных клеток переносили на планшет для ELISA, а затем 50 мкл смеси антител к фосфо-STAT5 A/B. Затем смесь инкубировали в течение 1 часа, затем промывали 3 раза промывочным буфером. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл детектирующего реагента и планшет инкубировали в течение 15 минут. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл стоп-раствора и планшет считывали при 450 нм на ридере для микропланшетов.

[0126] Измеряли отдельные значения EC50 и рассчитывали % относительного стандартного отклонения (СОС) для значений EC50 эталонного стандарта и для значений EC50 для контроля.

[0127] Рассчитывали среднее геометрическое трех значений EC50 для эталонного стандарта (геом. среднее EC50 эталон. станд.) и среднее геометрическое трех значений EC50 для контроля (EC50 контроля). Относительную активность для контроля рассчитывали, используя следующее уравнение: Относительная активность=(геом. средн. EC50 эталон. станд.)/(EC50 контроля)×100%.

[0128] Образцы были рассчитаны таким же образом. Результаты анализа определяли по следующему уравнению: Относительная активность=(геом. средн. EC50 эталон. станд.)/(EC50 тестируемого образца)×100%.

[0129] Результаты анализа активности на основе клеточной линии НН продемонстрировали, что полипептид А сохраняет активность в различных протестированных составах (Фиг. 1).

#### Результаты испытаний стабильности

[0130] Результаты приведенной выше характеристики стабильности показали, что состав 4 превосходил другие протестированные составы в поддержании рН и стабильности полипептида А.

#### **Пример 2. Анализ различных компонентов буфера и их влияние на стабильность**

[0131] Несколько буферов, подходящих для применения в фармацевтических целях в диапазоне рН 6,0-7,0, были проверены на стабилизирующее действие на полипептид А с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии и анализа зависимости ОП350 от времени для скрининга на основе теплового стресса и визуализации микропотоков для скрининга на основе стресса при встряхивании.

[0132] Полипептид А (первоначально в концентрации 11,6 мг/мл в буфере PBS) подвергали диализу в одном из пяти буферов с рН 6,0, 10 мМ гистидина, 10 мМ цитрата, 100 мМ цитрата, 10 мМ фосфата или 10 мМ сукцината. Диализ проводили в кассетах Slide-A-Lyzer с порогом молекулярной массы 10000 Да и емкостью 3 мл при 4°C и соотношении объема диализата 1:500+ к объему буфера с 2 заменами буфера с интервалом 4+ часа и инкубацией в течение ночи перед восстановлением диализата. Диализат разбавляли до 1,0

мг/мл полипептида А отфильтрованным (0,2 мкм) буфером для диализа. Затем на этих образцах были проведены анализы в трех повторностях. Для визуализации микропотоков по 3 мл каждого образца в двух экземплярах добавляли в пробирки емкостью 5 мл и пробирки встряхивали в течение 3 дней при 300 об/мин, затем эти повторы объединяли. Три мл буфера также встряхивали в тех же условиях для вычитания буфера и проведения холостого опыта.

#### Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

[0133] Эксперименты ДСК проводились в трех экземплярах для всех образцов при концентрации полипептида А 1 мг/мл с использованием капиллярного дифференциального сканирующего калориметра MicroCal, оснащенного автоматическим пробоотборником. Образцы нагревали от 10 до 90 °С со скоростью 60 °С/час и записывали термограммы. Кюветы с образцом и контрольные кюветы промывали между каждой инъекцией. Данные были проанализированы с использованием надстройки пакета анализа MicroCal в Origin 7 и интерполированы до тех же значений по оси X, чтобы можно было выполнить усреднение.

[0134] На Фиг. 4 показаны значения  $T_m$  термограмм в зависимости от состава буфера. Значение  $T_m$  10 мМ цитрата было самым высоким из всех образцов, а 10 мМ гистидиноый буфер имел относительно более низкое значение  $T_m$ .

#### Анализ ОП350 в зависимости от времени (кинетический)

[0135] Анализы ОП350 в зависимости от времени (кинетические) проводили в трех повторностях на спектрофотометре Cary 100 UV-Visible с использованием объема 260 мкл раствора белка на кювету. Оптическую плотность при 350 нм измеряли каждые пять минут со временем усреднения две секунды, при этом температуру поддерживали на постоянном уровне 72 °С. Все данные были импортированы в Originlab и интерполированы до тех же значений по оси X, чтобы можно было выполнить усреднение

[0136] Значения ОП350 собирали в трех повторностях для образцов полипептида А каждые пять минут в течение восьми часов при постоянной температуре 72 °С. На Фиг. 5 показаны средние значения ОП350 через 8 часов. Через 8 часов при 72°С образцы, содержащие цитратные буферы, имели самое низкое значение ОП350.

#### Визуализация микропотоков

[0137] Невидимые невооруженным глазом частицы в диапазоне от 2 до 70 мкм исследовали с использованием системы MFI DPA-4200 (Protein Simple, Санта-Клара, штат Калифорния) с покрытой силаном проточной ячейкой размером 100 мкм. Перед измерениями прибор был откалиброван с использованием стандартов частиц полистирола размером 10 мкм (Duke). Измерения проводили трижды при температуре окружающей среды для всех образцов. Ячейку промывали водой, не содержащей частиц, а освещение оптимизировали с использованием воды, не содержащей частиц, перед всеми измерениями. Образцы тщательно набирали в пипетку с фильтрующим наконечником с низким уровнем связывания белка (Neptune Scientific) и анализировали при скорости потока 0,2 мл/мин. Объем промывки для каждого измерения составлял 0,4 мл, а анализировали 0,6 мл образца.

[0138] Визуализацию микропотоков выполняли для всех образцов полипептида А в трех повторностях после 3 дней встряхивания при 300 об/мин, а результаты приведены на Фиг. 6. Образцы в 10 мМ гистидина имели самую высокую общую концентрацию невидимых невооруженным взглядом частиц после 3 дней встряхивания, а образцы в 10 мМ цитрата имели самую низкую общую концентрацию невидимых невооруженным взглядом частиц.

#### Выводы по скринингу буфера

[0139] Образцы полипептида А в 10 мМ гистидина имели самую низкую термическую стабильность, самую высокую начальную ОПЗ50 в зависимости от времени при 72°C и самую высокую общую концентрацию невидимых невооруженным взглядом частиц после 3 дней встряхивания. Образцы в цитратном буфере имели самую низкую ОПЗ50 в зависимости от времени при 72 °С, самую низкую общую концентрацию частиц после 3 дней встряхивания и одну из самых высоких термическую стабильность для образцов по данным ДСК.

#### **Пример 3. Сравнение гистидинового буфера с цитратом с сахарозой и цитратом с сахарозой и полисорбатом 20**

[0140] Чтобы определить влияние присутствия полисорбата 20 в 3 мг/мл цитрата, 50 мг/мл сахарозы, рН 6,1, на общую концентрацию невидимых невооруженным взглядом частиц в зависимости от стресса при встряхивании, была выполнена визуализация микропотоков. Тестируемые буферы представляли собой 10 мМ гистидина, 3 мг/мл цитрата с 50 мг/мл сахарозы и 3 мг/мл цитрата с 50 мг/мл сахарозы и 0,01% полисорбата 20. Общую концентрацию невидимых невооруженным взглядом частиц измеряли в трех повторностях для всех образцов полипептида А с помощью визуализации микропотоков после 3 дней встряхивания при 300 об/мин; и результаты показаны на Фиг. 7. Общая концентрация невидимых невооруженным взглядом частиц была самой низкой в образцах с полисорбатом 20.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Композиция, содержащая:  
от около 1 мг до около 50 мг полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R $\alpha$ ;  
сахароза;  
цитратный буфер; и  
полисорбат 20.
2. Композиция по п.1, в которой полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 1.
3. Композиция по п. 1, в которой полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.
4. Композиция по любому из пп. 1-3, причем композиция содержит около 2,2 мг полипептида.
5. Композиция по любому из пп. 1-3, причем композиция содержит около 11 мг полипептида.
6. Композиция по любому из пп. 1-3, причем композиция содержит около 33 мг полипептида.
7. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит от около 100 мг до около 120 мг сахарозы.
8. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит около 110 мг сахарозы.
9. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит от около 4,0 мг до около 6,0 мг цитрат-аниона.
10. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит около 5,0 мг цитрат-аниона.
11. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота:дигидрат трехосновного цитрата натрия от около 1:10 до около 1:2.
12. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота:дигидрат трехосновного цитрата натрия около 1:9.
13. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота:дигидрат трехосновного цитрата натрия около 1:2.
14. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит от около 0,20 мг до около 0,24 мг полисорбата 20.
15. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит около 0,22 мг полисорбата 20.
16. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция представляет собой лиофилизированную массу.

17. Композиция по п. 16, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с рН от около 5,5 до около 6,5.

18. Композиция по п. 17, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с рН около 6,1.

19. Композиция по любому из пп. 16-18, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с осмоляльностью от около 160 до около 230 мОсм/кг.

20. Композиция по п. 19, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с осмоляльностью около 179 мОсм/кг.

21. Композиция по любому из пп. 16-18, отличающаяся тем, что растворение лиофилизированной массы в растворе хлорида натрия приводит к получению водного раствора с осмоляльностью от около 240 до около 340 мОсм/кг.

22. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что раствор хлорида натрия содержит от около 0,1% NaCl до около 0,5% NaCl.

23. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что раствор хлорида натрия содержит от около 0,12% NaCl до около 0,41% NaCl.

24. Композиция по п. 21, отличающаяся тем, что раствор хлорида натрия содержит от около 0,02 М NaCl до около 0,07 М NaCl.

25. Композиция по любому из пп. 1-15, причем композиция представляет собой водный раствор.

26. Композиция по п. 25, причем композиция содержит около 1 мг/мл полипептида.

27. Композиция по п. 26, причем композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего около 2,2 мг полипептида.

28. Композиция по п. 25, причем композиция содержит около 5 мг/мл полипептида.

29. Композиция по п. 28, причем композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего около 11 мг полипептида.

30. Композиция по п. 25, причем композиция содержит около 15 мг/мл полипептида.

31. Композиция по п. 30, причем композиция представляет собой 2,2 мл водного раствора, содержащего около 33 мг полипептида.

32. Композиция по любому из пп. 25-31, причем композиция содержит от около 45 мг/мл до около 55 мг/мл сахарозы.

33. Композиция по п. 32, причем композиция содержит около 50 мг/мл сахарозы.

34. Композиция по любому из пп. 25-33, причем композиция содержит от около 10 мМ до около 20 мМ цитратного буфера.

35. Композиция по п. 34, причем композиция содержит около 12 мМ цитратного буфера.

36. Композиция по любому из пп. 25-35, в которой цитратный буфер получают сочетанием 2,03 мг/мл трехосновного цитрата натрия и 0,97 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе.

37. Композиция по любому из пп. 25-36, причем композиция содержит от около 0,09

мг/мл до около 0,11 мг/мл полисорбата 20.

38. Композиция по п. 37, причем композиция содержит около 0,1 мг/мл полисорбата 20.

39. Композиция по любому из пп. 25-38, причем рН композиции составляет от около 5,5 до около 6,5.

40. Композиция по п. 36, причем рН композиции составляет около 6,1.

41. Композиция по любому из пп. 25-40, причем осмоляльность композиции составляет от около 160 до около 230 мОсм/кг.

42. Композиция по п. 41, причем осмоляльность композиции составляет около 179 мОсм/кг.

43. Композиция по любому из пп. 25-42, причем водный раствор содержит от около 0,03 мг/мл полипептида до около 0,2 мг/мл полипептида.

44. Лиофилизированная композиция, полученная путем лиофилизации композиции по любому из пп. 25-44.

45. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция представляет собой единичную стандартную дозу полипептида.

46. Промышленное изделие, содержащее композицию по любому из предыдущих пунктов.

47. Промышленное изделие по п. 46, которое представляет собой стеклянный флакон.

48. Способ получения лиофилизированной композиции, включающий лиофилизацию водного раствора по любому из пп. 25-43.

49. Способ получения водной композиции, включающий растворение композиции по п. 16 или п. 44 в водном растворителе.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что водный растворитель включает воду для инъекций.

51. Способ по п. 49, отличающийся тем, что водный растворитель представляет собой раствор хлорида натрия.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что раствор хлорида натрия содержит от около 0,1% NaCl до около 0,5% NaCl.

53. Способ по п. 51, отличающийся тем, что раствор хлорида натрия содержит от около 0,12% NaCl до около 0,41% NaCl.

54. Способ по п. 51, отличающийся тем, что раствор хлорида натрия содержит от около 0,02 М NaCl до около 0,07 М NaCl.

55. Способ по любому из пп. 51-54, отличающийся тем, что водная композиция имеет осмоляльность от около 240 до около 340 мОсм/кг.

56. Способ по любому из пп. 49-55, отличающийся тем, что рН водной композиции доводят до около 6,1.

57. Способ по любому из пп. 49-56, отличающийся тем, что рН водной композиции доводят до около 6,1 с помощью основания.

58. Способ по п. 57, в котором основание представляет собой гидроксид натрия.

59. Способ по любому из пп. 49-58, в котором водную композицию дополнительно разбавляют водным раствором, содержащим около 1% (масс./масс.) поверхностно-активного вещества.

60. Способ по п. 59, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

61. Способ по п. 59, в котором водный раствор дополнительно содержит около 0,1% (масс./масс.) моногидрата лимонной кислоты, 0,2% (масс./масс.) трехосновного цитрата натрия и 98,7% (масс./масс.) воды для инъекций.

62. Способ активации естественных клеток-киллеров (NK) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 25-43.

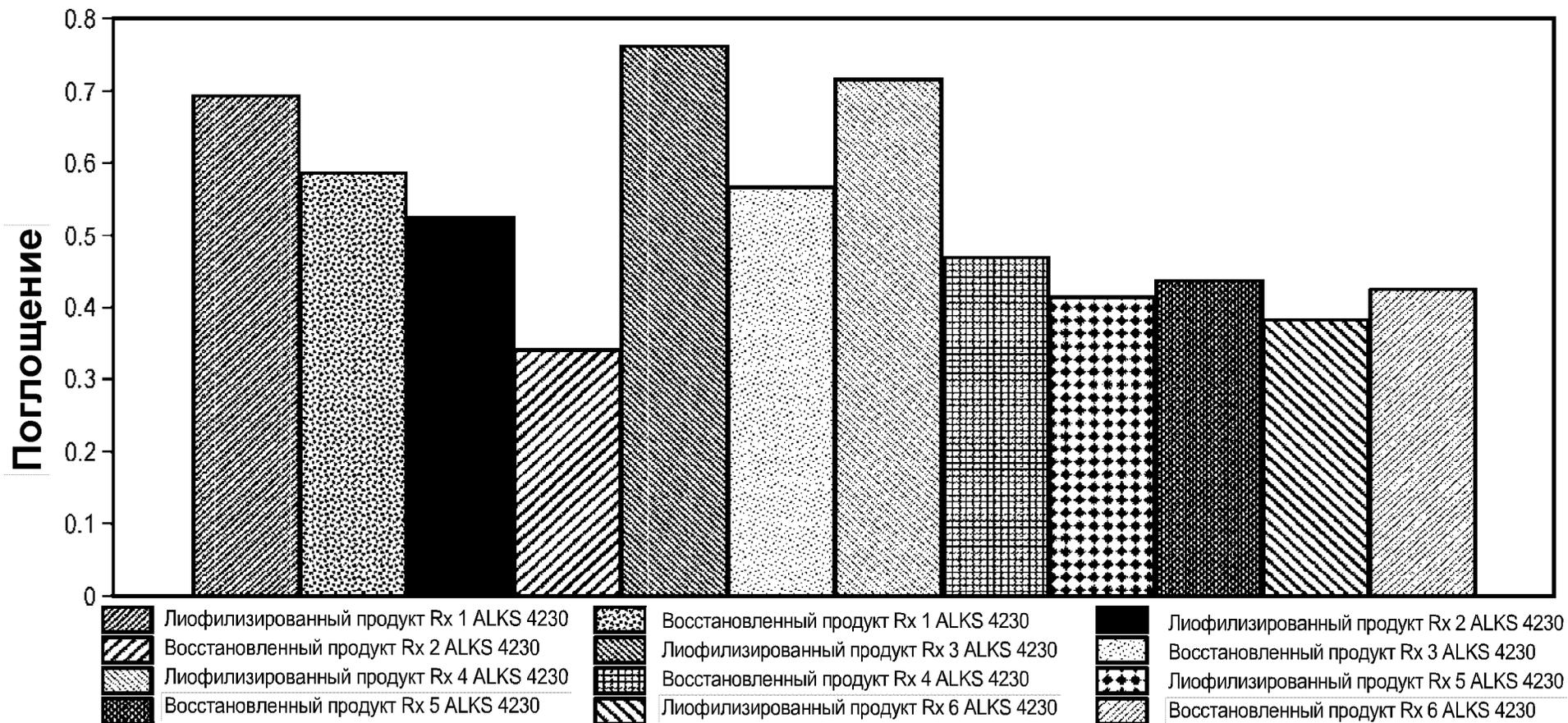
63. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 25-43.

64. Способ по п. 63, в котором рак представляет собой почечно-клеточную карциному, меланому, рак яичников или рак легкого.

65. Способ по п. 63 или п. 64, в котором рак представляет собой рефрактерную солидную опухоль.

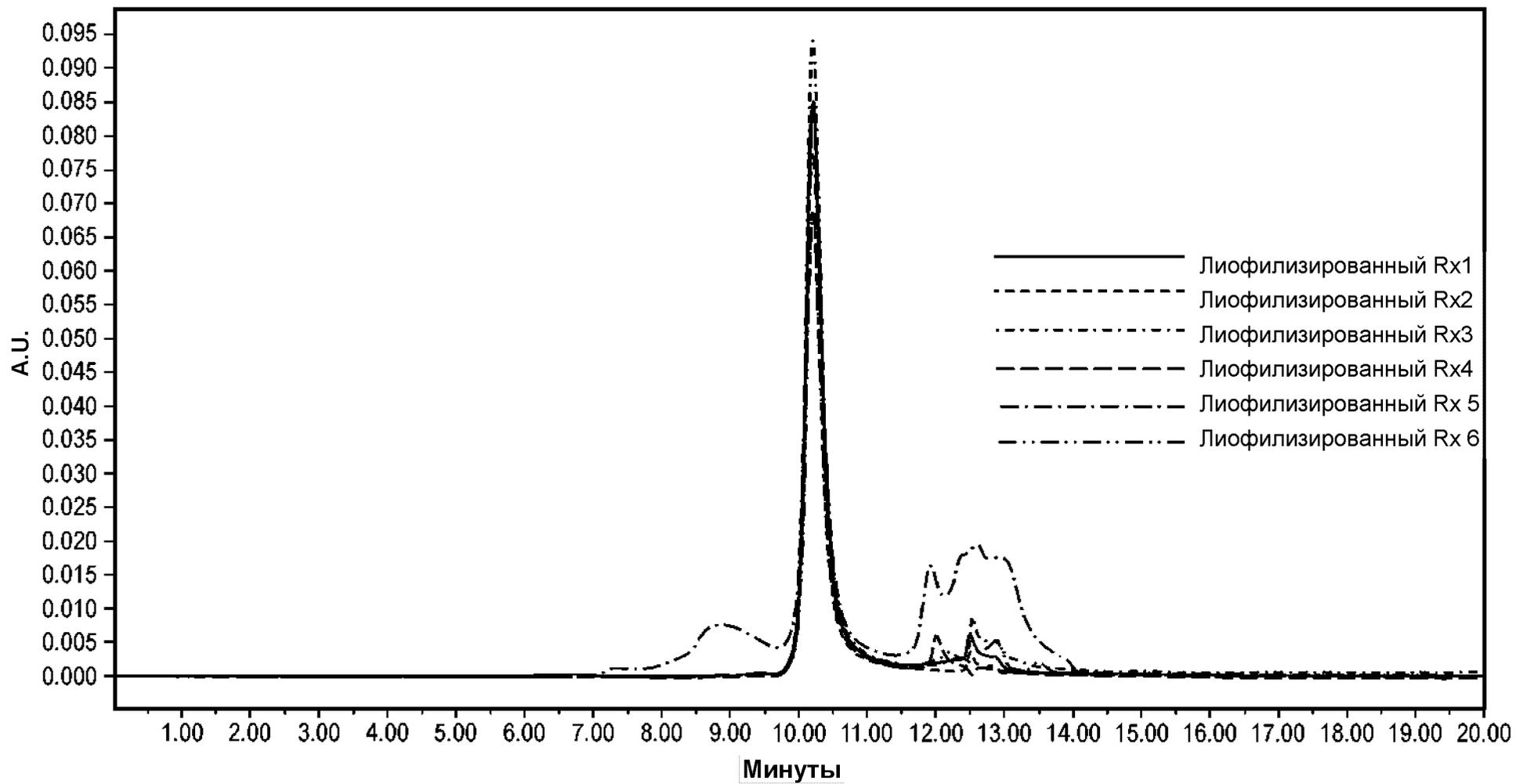
По доверенности

## Результаты ELISA рSTAT 5 для буферных составов LTI ALKS 4230



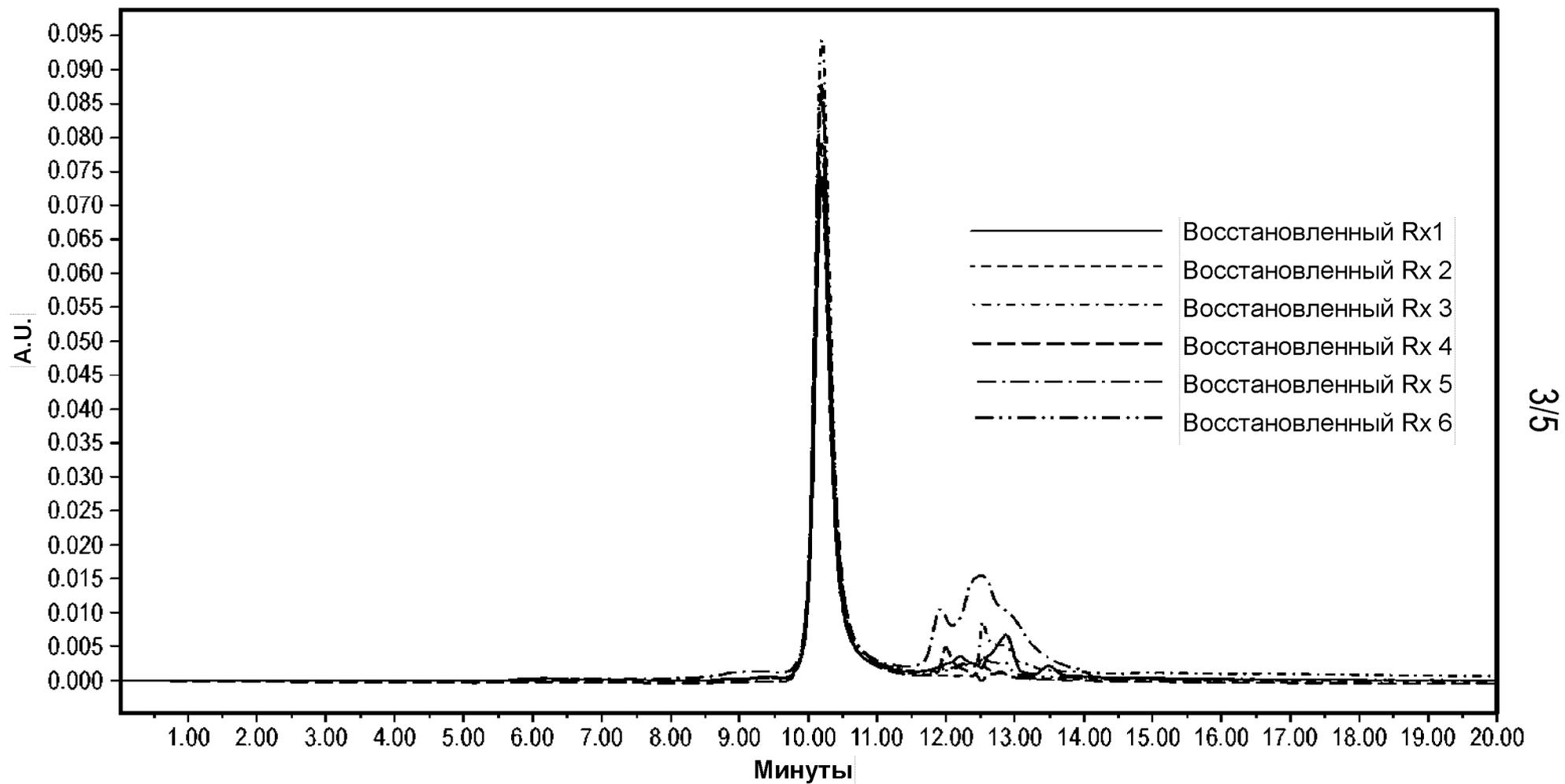
1/5

Фиг. 1



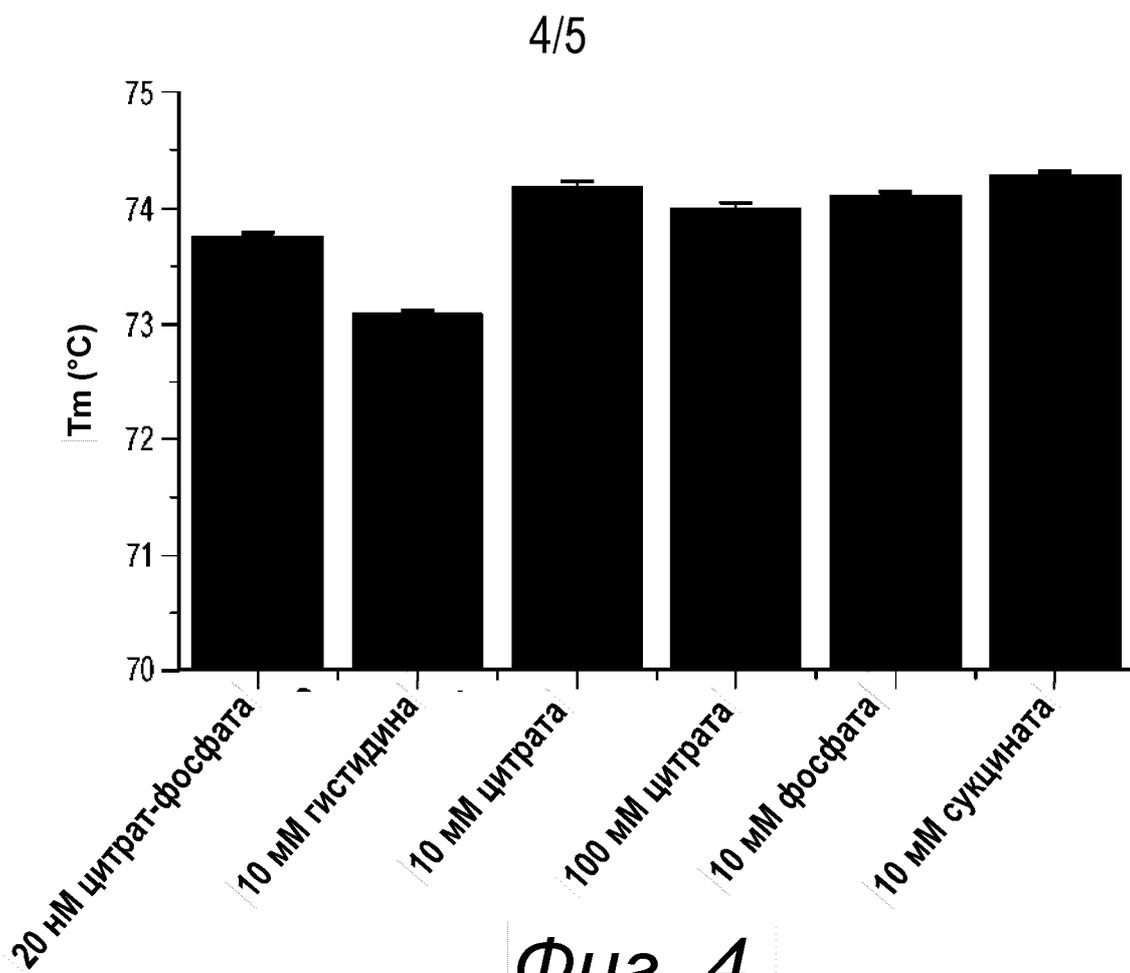
2/5

Фиг. 2

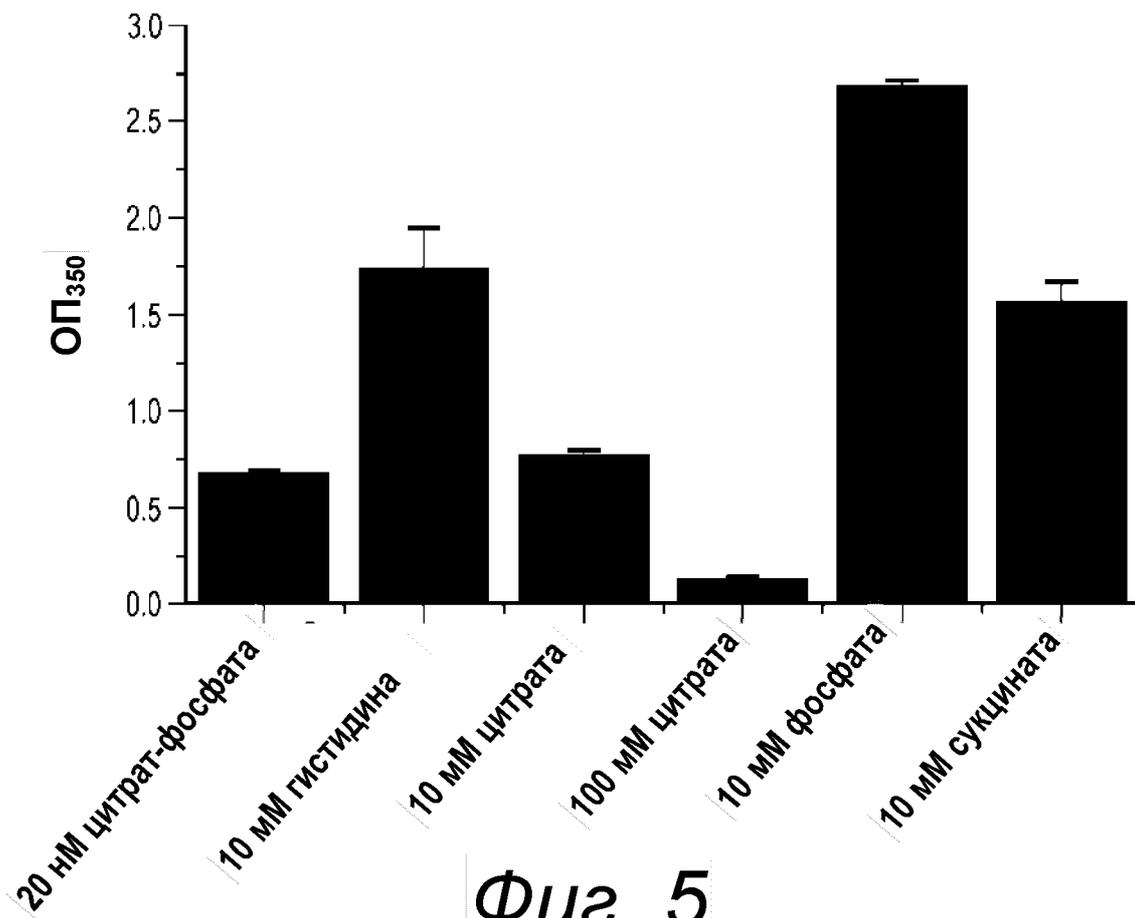


3/5

Фиг.3

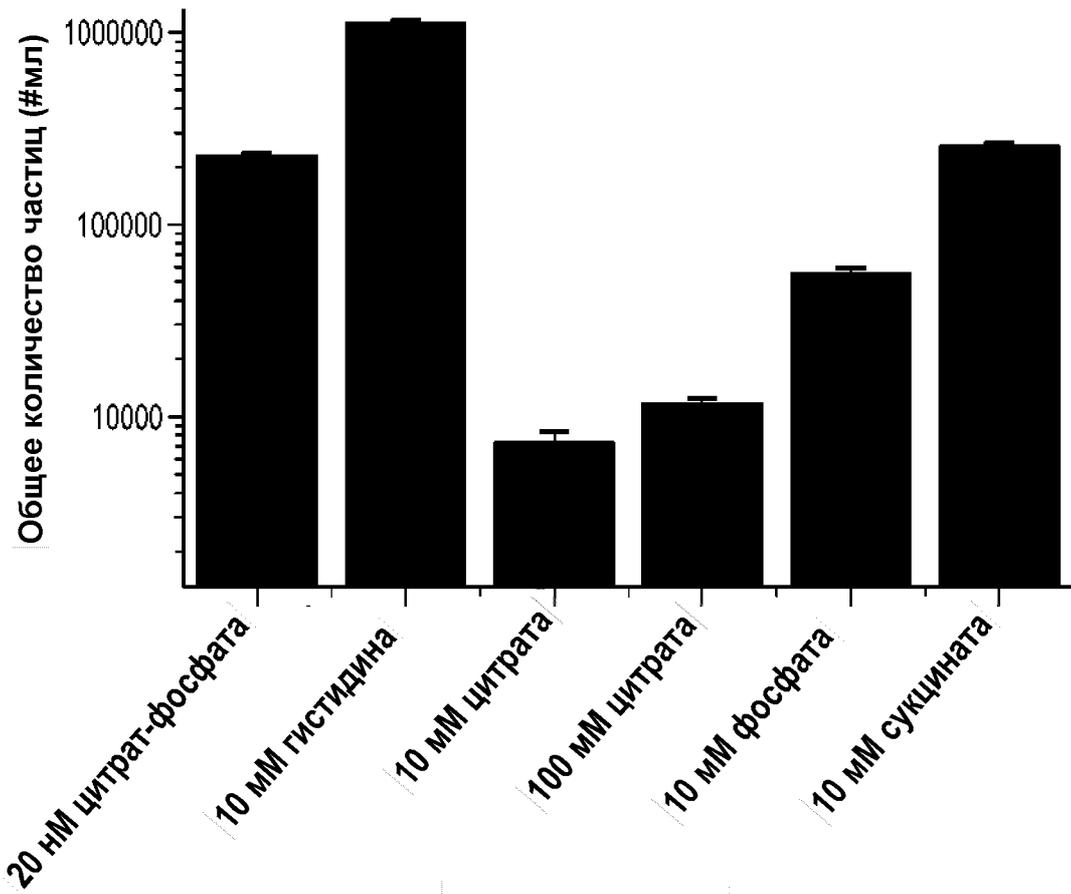


Фиг. 4.

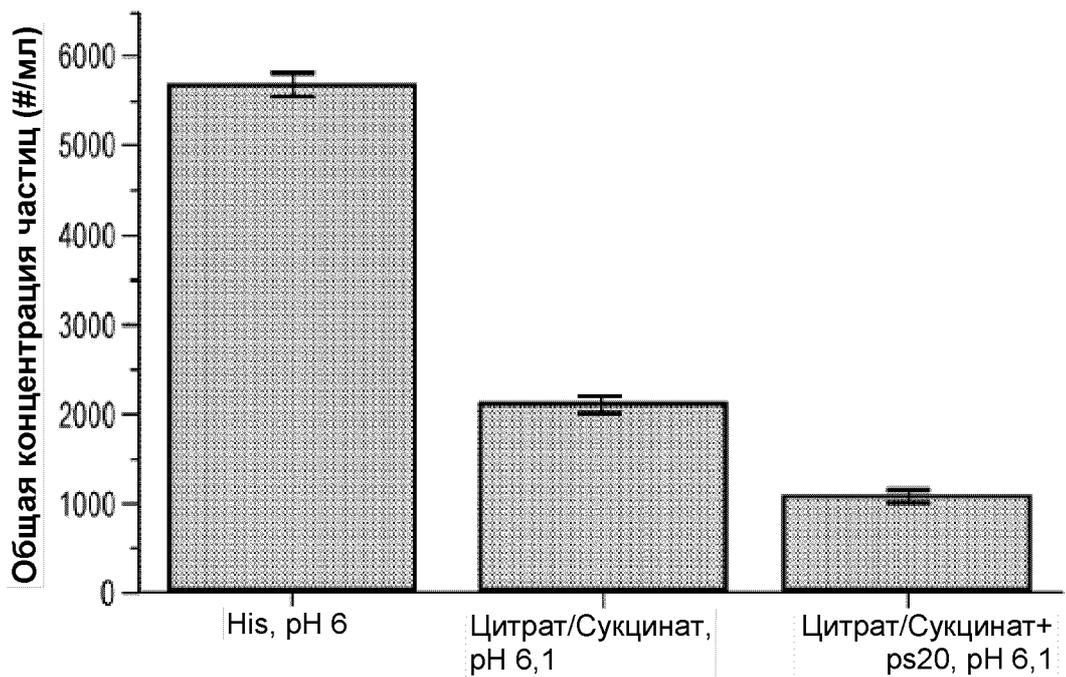


Фиг. 5

5/5



Фиг. 6.



Фиг. 7.