

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) **202293269** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.09

(51) Int. Cl. *A61K 38/20* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.05.10

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

(31) **63/022,860**

(32) **2020.05.11**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/031616**

(87) **WO 2021/231319 2021.11.18**

(71) Заявитель:
**АЛКЕРМЕС ФАРМА АЙЭЛЕНД
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:
**Гбормитгах Франциска О., Зейдан
Тарек А. (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 α , и способы получения и применения таких композиций.

202293269

A1

A1

202293269

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576440ЕА/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 № 63/022860, 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 α , 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 α , интерлейкин-2 (IL-2), рецептор интерлейкина-2 альфа (IL-2R α), имеют большие перспективы в качестве противораковых агентов. Эти полипептиды сохраняют полную способность передавать сигнал через среднеаффинный комплекс IL-2R, который экспрессируется на CD8⁺ Т-клетках памяти и естественных клетках-киллерах (NK), но стерически предотвращают связывание с высокоаффинным комплексом IL-2R, который преимущественно экспрессируется на регуляторных CD4⁺ FOXP3⁺ Т-клетках (CD4⁺ Тreg) и эндотелиальных клетках. В результате этого селективного связывания IL-2R полипептиды избирательно активируют CD8⁺ 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 α , 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:

a) от около 1 мг до около 50 мг полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R α ;

b) сахарозу;

c) маннит;

c) цитратный буфер; и

d) эмульгатор.

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

[008] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 1 мг до около 15 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 1 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 5 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 15 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 20 мг полипептида. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг полипептида.

[009] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 60 мг до около 72 мг сахарозы. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 66 мг сахарозы.

[010] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 60 мг до около 72 мг маннита. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 66 мг маннита.

[011] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 4,0 мг до около 6,0 мг цитрат-аниона. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 5,0 мг цитрат-аниона.

[012] 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).

[013] В определенных вариантах осуществления композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота: дигидрат трехосновного цитрата натрия около 1:9. В определенных вариантах осуществления композиция содержит лимонную кислоту и дигидрат трехосновного цитрата натрия при массовом соотношении лимонная кислота: дигидрат трехосновного цитрата натрия около 1:2.

[014] В определенных вариантах осуществления эмульгатор включает полисорбат 20. 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.

[015] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 0,10 мг до около 0,12 мг полисорбата 20. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 0,11 мг полисорбата 20.

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

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

[018] В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с изотонической осмоляльностью. В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с осмоляльностью от около 240 до около 340 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с осмоляльностью от около 280 до около 320 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с осмоляльностью около 285 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления растворение лиофилизированной массы в воде приводит к водному раствору с осмоляльностью около 300 мОсм/кг.

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

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

[021] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 0,5 мг/мл до около 30 мг/мл полипептида.

[022] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 1 мг/мл полипептида.

[023] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 5 мг/мл полипептида.

[024] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 15 мг/мл полипептида.

[025] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 20 мг/мл полипептида.

В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг/мл полипептида.

[026] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг/мл сахарозы.

[027] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл маннита. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг/мл маннита.

[028] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 10 мМ до около 20 мМ цитратного буфера. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 12 мМ цитратного буфера. 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. В определенных вариантах осуществления цитратный буфер получают сочетанием 2,96 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,30 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе.

[029] В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 0,09 мг/мл до около 0,11 мг/мл полисорбата 20. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 0,1 мг /мл полисорбата 20.

[030] В определенных вариантах осуществления pH композиции составляет от около 5,5 до около 6,5. В определенных вариантах осуществления pH композиции составляет около 6,1.

[031] В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет от около 240 до около 340 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет от около 280 до около 320 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет около 285 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет около 300 мОсм/кг.

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

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

а) от около 1 мг/мл до около 30 мг/мл полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R α ;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл маннита;

д) от около 10 мМ до около 20 мМ цитратного буфера; и

е) от около 0,09 мг/мл до около 0,11 мг/мл полисорбата 20,

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

[034] 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.

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

а) от около 1 мг/мл до около 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл маннита;

д) от около 10 мМ до около 20 мМ цитратного буфера; и

е) от около 0,09 мг/мл до около 0,11 мг/мл полисорбата 20, где рН раствора составляет от около 5,5 до около 6,5.

[036] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг/мл сахарозы.

[037] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг/мл маннита.

[038] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 12 мМ цитратного буфера.

[039] В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 0,11 мг/мл полисорбата 20.

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

[041] 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. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 30 мг/мл полипептида.

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

а) около 1, 5, 15 или 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

д) от около 8 мМ цитратного буфера до около 14 мМ цитратного буфера (например, 8 мМ, 9 мМ, 10 мМ, 11 мМ, 12 мМ, 13 мМ или 14 мМ); и

е) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

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

а) около 1, 5, 15 или 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

д) около 12 мМ цитратного буфера; и

е) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

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

а) около 1, 5, 15 или 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

д) около 2 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия;

е) около 1 мг/мл моногидрата лимонной кислоты; и

ф) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

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

а) около 1, 5, 15 или 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

д) около 2,03 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия;

е) около 0,97 мг/мл моногидрата лимонной кислоты; и

ф) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

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

а) около 1, 5, 15 или 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

д) около 3 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия;

е) около 0,3 мг/мл моногидрата лимонной кислоты; и

ф) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

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

а) около 1, 5, 15 или 30 мг/мл полипептида, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

б) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

с) от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы;

д) около 2,91 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия;

е) около 0,34 мг/мл моногидрата лимонной кислоты; и

ф) около 0,1 мг/мл полисорбата 20,

где рН композиции составляет около 6,1.

[048] 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.

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

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

[051] В другом аспекте изобретение относится к способу получения водной композиции, включающему растворение любой из вышеуказанных лиофилизированных композиций в водном растворителе. В определенных вариантах осуществления водный растворитель представляет собой воду для инъекций. В определенных вариантах осуществления водный растворитель представляет собой раствор хлорида натрия.

[052] 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.

[053] 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.

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

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

[056] 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.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[057] В данном документе представлены композиции, содержащие полипептиды, содержащие циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-

2Rα, и способы получения и применения таких композиций.

[058] 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. При восстановлении в воде для инъекций описанные в данном документе составы обладают физиологически приемлемой осмоляльностью, что позволяет вводить восстановленный продукт подкожно. Это устраняет необходимость в специальном разбавителе для восстановления лиофилизированного продукта с соответствующей осмоляльностью, что упрощает использование лекарственного средства пациентом или медицинским работником и, следовательно, улучшает соблюдение режима применения лекарственных средств.

[059] Подкожное введение также имеет преимущества для доставки лекарственных средств. При подкожном введении лекарственного средства может быть доставлено быстрее по сравнению с другими путями (например, внутривенным). Подкожная доставка также может быть выполнена пациентом дома, а не врачом в медицинском учреждении. Такая доставка, ориентированная на пациента, может также улучшить соблюдение режима применения лекарственных средств.

[060] 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

[061] Если иное не определено в данном документе, научные и технические термины, используемые в данном документе, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. В случае какой-либо скрытой двусмысленности приведенные в данном документе определения имеют приоритет над любым словарным или внешним определением. 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.

[062] 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».

[063] 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.

[064] 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 $0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения подходят для выполнения описанных способов.

[065] 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.

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

[067] Используемый в данном документе термин «пациент», «индивид» или «субъект» относится к человеку или отличному от человека млекопитающему. Отличные 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

[068] В одном аспекте настоящее изобретение относится к композициям полипептидов, содержащих циклически пермутированный интерлейкин-2 (IL-2), слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R α . Полипептиды, используемые в описанных в данном документе композициях, демонстрируют предпочтительное связывание с среднеаффинным комплексом IL-2R, содержащим IL-2R β и общую гамма-цепь, IL-2R γ , по сравнению с высокоаффинным комплексом IL-2R (содержащим IL-2R α , IL-2R β и IL-2R γ) 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.

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

SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTL
TGGSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCL
EEELKPLEEVLNLAQSGGGSELCCCCPPEIPHATFKAMAYKEGTMNCECKRGFRRIK
SGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKERKTTEMQSPMQPVD
QASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGK
TRWTQPQLICTG (SEQ ID NO: 1)

[070] 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.

[071] 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.

[072] 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.

[073] 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 40 мг, около 44 мг, около 45 мг или около 50 мг). В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет от около 1 мг до около 30 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет от около 1 мг до около 15 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 1 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 2,2 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 5 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 11 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 15 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 20 мг.

В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 30 мг. В определенных вариантах осуществления количество полипептида составляет около 44 мг.

[074] В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида в водном составе составляет от около 0,5 мг/мл до около 50 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет от около 0,5 мг/мл до около 20 мг/мл (например, около 0,5 мг/мл, 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. В определенных вариантах осуществления концентрация полипептида составляет около 30 мг/мл.

Экспципенты и буферы

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

[076] Используемый в данном документе термин «экспципент» относится к любому нетерапевтическому агенту, добавляемому к композиции или составу для обеспечения желаемой консистенции, вязкости или стабилизирующего эффекта. Подходящие экспципенты для использования в описанных в данном документе композициях могут действовать, например, как агенты, повышающие вязкость, стабилизаторы, солюбилизующие агенты и т. д. Экспципент может быть ионогенным или неионогенным. Подходящие ионные экспципенты включают соли, такие как NaCl, или аминокислотные компоненты, такие как аргинин-HCl. Подходящие неионогенные экспципенты 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 аминсахар. В определенных вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу и маннит.

[077] В определенных вариантах осуществления количество экспципента (например, сахарозы и маннита) 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 и маннита) в составе составляет от около 30 мг до около 90 мг. В определенных вариантах осуществления количество эксципиента (например, сахарозы и маннита) в составе составляет от около 60 мг до около 72 мг. В определенных вариантах осуществления количество эксципиента (например, сахарозы и маннита) в составе составляет около 66 мг.

[078] В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы и маннита) 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 и маннита) составляет от около 10 мг/мл до около 50 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы и маннита) составляет от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл. В определенных вариантах осуществления концентрация эксципиента (например, сахарозы и маннита) составляет около 30 мг/мл.

[079] 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, гидрохлорид 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 комбинирования: (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.

[080] 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, цитрата натрия) 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, 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.

[081] 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, цитрата натрия) 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 концентрация буферного агента (например, цитрата) составляет около 11,67 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. В определенных вариантах осуществления цитратный буфер содержит 2,91 мг/мл (9,90 мМ) дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,34 мг/мл (1,77 мМ) лимонной кислоты.

[082] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, имеют pH 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 pH от около 5,4 до около 6,5. В определенных вариантах осуществления композиции имеют pH от около 5,8 до около 6,4. В определенных вариантах осуществления композиции имеют pH около 6,1. В определенных вариантах осуществления pH композиции доводят до pH около 6,1. В определенных вариантах осуществления pH 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 pH водной композиции доводят до pH около 6,1.

[083] В определенных вариантах осуществления композиции, описанные в данном документе, имеют изотоническую осмоляльность. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет от около 240 до около 340 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет от около 280 до около 320 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет около 285 мОсм/кг. В определенных вариантах осуществления осмоляльность композиции составляет около 300 мОсм/кг.

[084] 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, декаглицерилмонолинолеат), 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); С 10-С 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.

[085] В определенных вариантах осуществления количество 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 количество 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 количество поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) составляет от около 0,20 мг до около 0,24 мг. В определенных вариантах осуществления количество поверхностно-активного вещества (например, полисорбата 20) в водном составе составляет около 0,22 мг. В определенных вариантах осуществления композиция содержит от около 0,10 мг до около 0,12 мг полисорбата 20. В определенных вариантах осуществления композиция содержит около 0,11 мг полисорбата 20.

[086] 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.

[087] 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

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

[089] 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.

[090] 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 α .

[091] 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 α . 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 11A или таблице 11B.

[092] 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 α . В определенных

вариантах осуществления способ получения лиофилизированной композиции включает соблюдение протокола лиофилизации, указанного в таблице 11А или таблице 11В.

[093] 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 α . В определенных вариантах осуществления лиофилизированная композиция представляет собой лиофилизированную массу. В определенных вариантах лиофилизированную композицию растворяют в 1,1 мл воды. В определенных вариантах лиофилизированную композицию растворяют в 2,2 мл воды.

Применение полипептидных композиций

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

[095] 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 α .

[096] 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 α . 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.

[097] В определенных вариантах осуществления композицию вводят подкожно.

[098] 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.

[009] 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.).

[0100] 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.).

[0101] 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.).

[0102] В определенных вариантах осуществления меланомы представляет собой одну или обе из меланомы слизистой оболочки или прогрессирующей кожной меланомы.

[0103] 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

[0104] 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

[0105] В попытке определить оптимальный состав для подкожного введения полипептида А (циркулярно пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R α , содержащий аминокислоту 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 данном исследовании были поставлены две основные цели. Первая цель заключалась в получении лиофилизированной массы, которая при восстановлении со стандартным разбавителем (т.е. водой для инъекций) дает изотонический раствор, готовый к введению. Состав, который дает неизотонический

раствор при восстановлении с помощью воды для инъекций, не подходит для подкожного введения. Второй задачей было получение лиофилизированной массы с оптимальным внешним видом и минимальной усадкой массы. Улучшенный внешний вид массы может сделать лекарственный препарат более привлекательным для пациента или поставщика медицинских услуг, тем самым потенциально улучшая соблюдение режима применения лекарственных средств. В приведенной ниже таблице 1 перечислены конкретные компоненты и их концентрации для композиции полипептида А, которая изначально была разработана для внутривенного введения.

Таблица 1: Состав для внутривенного введения полипептида А

Компонент	Функция	Концентрация (мг/мл)
Полипептид А	Белок	1, 5 и 15
Сахароза	Белковый стабилизатор	50
Дигидрат цитрата натрия	Буфер	2,03
Моногидрат лимонной кислоты	Буфер	0,97
Полисорбат 20	Поверхностно-активное вещество	0,1
Буфер pH		6,1
Осмолярность ВДИ (мОсм/кг)		~ 125 мОсм/кг

Используемые аналитические методы

Инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье (Фурье-ИКС)

[0106] Анализ методом Фурье-ИКС проводили с использованием анализатора белков PROTA FTIR, оснащенного CaF₂ Biocell и ячейкой ATR для анализа твердых образцов. Для анализа загружали примерно 10 мкл жидкого образца или 10 мг образца лиофилизированного порошка. Сигналы поглощения обрабатывали путем вычитания интерферирующих сигналов из фонового сигнала лиофилизированного плацебо и буфера, когда это было необходимо. Обработанные данные были наконец преобразованы в сигналы второй производной для улучшения разрешения с параметрами, которые были установлены как 100 сканирований с разрешением 4 см⁻¹. Для определения процентного содержания различных структурных элементов нативного белка полипептида А вычитаемый спектр обрабатывали с помощью базы данных вторичных структур белков. Процент сходства между нативным состоянием и высушенным состоянием рассчитывали на основе площади перекрытия от 1700 до 1600 см⁻¹ или от 1800 до 1400 см⁻¹.

Анализ осмоляльности

[0107] Осмоляльность приготовленных составов определяли с помощью прибора измерения давления пара Wescor Vapro. Для каждого анализа использовали около 10 мкл жидкого образца.

Визуальная оценка

[0108] Все флаконы проверялись на фоне, обеспечивающем четкое изображение при захвате цифровых фотографий.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) сухого порошка при температуре ниже комнатной

[0109] Анализ методом ДСК проводили с использованием ТА Q20 с системой охлаждения I. Для ДСК при температуре ниже комнатной (в замороженном состоянии) приблизительно 15 мкл лекарственной субстанции в сформированной смеси загружали в поддон для ДСК и герметично закрывали. Затем образец охлаждали до -90°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{минута}$. Чашки выдерживали в камере для образцов в течение 2 минут перед нагреванием до 30°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{минута}$. Во время отжига образец нагревали до -10°C после выдержки при -90°C в течение 2 минут, затем снова охлаждали до -90°C перед нагревом до 30°C со скоростью $10^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

[0110] Для высокотемпературной ДСК сухого порошка флаконы помещали в сухой бокс, который продували сухим воздухом до относительной влажности ниже 8%. Аликвоты лиофилизированных образцов отбирали и герметично закрывали в чашках для ДСК. Термическое сканирование проводили от 20°C до 180°C со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{минута}$, используя программу модуляции $\pm 1^{\circ}\text{C}$ каждые 120 секунд, и измеряли результирующий реверсивный и нереверсивный тепловой поток.

Скрининговое исследование 1

[0111] Первый скрининг включал различные составы, чтобы понять, как различные комбинации стабилизаторов, наполнителей и т. д. повлияют на температуру стеклования или разрушения (T_g') и изотоничность. Все составы содержали 12 мМ буфера на основе цитрата натрия с pH 6,11 в качестве основного состава перед добавлением эксципиентов для скрининга. Твин 21 использовали в качестве стабилизатора поверхности. Составы, оцененные в этом исследовании с помощью анализов методом ДСК и осмоляльности при температуре ниже комнатной, приведены в таблице 2.

Таблица 2: Составы для скринингового исследования 1

№ состава	Полипептид А (мг/мл)	Сахароза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	Осмоляльность (мОсм/кг)	T_g' $^{\circ}\text{C}$
1	5	5	15	123	-28,81
2	5	5	10	Не измерено	-27,91
3	5	10	10	66	-28,00
4	5	5	-	59	-25,70

[0112] Значения осмоляльности для составов 1-4 были слишком низкими, желательно значение, близкое к физиологическому (280-320 мОсм/кг). Состав 1 продемонстрировал признаки метастабильности в замороженной фазе; поэтому в цикле лиофилизации его подвергали отжигу при -10°C , что успешно преобразовало это метастабильное состояние в стабильную эвтектическую фазу. В попытке увеличить осмоляльность этих составов к составу 4 добавляли глицин в концентрации 30 мг/мл. Это

привело к осмоляльности 413 мОсм/кг. На основании этого результата были приготовлены составы с глицином для замены составов 1 и 2 с заданной осмоляльностью 290 мОсм/кг с соответствующей температурой стеклования $-28,23^{\circ}\text{C}$ по данным ДСК. Кроме того, концентрации эксципиентов сахарозы и маннита в составах 3 и 4 корректировали для увеличения значений осмоляльности. Четыре новых состава были лиофилизированы и проанализированы в скрининговом исследовании 2.

Скрининговое исследование 2

[0113] Составы, протестированные в скрининговом исследовании 2, и соответствующие им значения осмоляльности показаны ниже в таблице 3. Все составы содержали 12 мМ буфера на основе цитрата натрия с pH 6,11 в качестве основного состава перед добавлением эксципиентов для скрининга. Твин 21 использовали в качестве стабилизатора поверхности. Обратите внимание, что плацебо были приготовлены для каждого состава, который будет использоваться для анализа вторичной структуры после лиофилизации в лиофилизаторе VirTis Genesis SQ Super XL-70.

Таблица 3: Составы для скринингового исследования 2 с осмоляльностью и процентным сходством вторичной структуры по данным Фурье-ИКС

№ состава	Полипептид А (мг/мл)	Сахароза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	Глицин (мг/мл)	Осмоляльность (мОсм/кг)	% сходство с нативным
5	5	5	-	15	268	52,6
6	5	10	-	15	248	65,3
7	5	5	30	-	206	51,9
8	5	10	30	-	224	80,6

[0114] Все образцы подвергали стерильной фильтрации в асептических условиях с последующим розливом в стерилизованные флаконы объемом 2 куб. см при объеме заполнения 0,5 мл. В таблице 4 подробно описаны параметры цикла лиофилизации, использованные для скринингового исследования 2.

Таблица 4: Параметры цикла лиофилизации для скринингового исследования 2

Стадия	Температура ($^{\circ}\text{C}$)	Время (минуты)	Скорость линейного изменения температуры ($^{\circ}\text{C}$ /мин.)	Давление в камере (мТорр)
Загрузка	5	-	-	-
Замораживание и отжиг	от 5 до -40	100	0,5	-
	Выдерживание при -40	30	-	-

	от -40 до -10	60	0,5	-
	Выдерживание при -10	60	-	-
	от -10 до -40	60	0,5	-
	Выдерживание при -40	60	-	100
Первичная сушка	от -40 до -25	30	0,5	100
	Выдерживание при -25	600	-	100
Вторичная сушка	от -25 до 10	100	0,5	100
	Выдерживание при 10	60	-	100
Укупорка	10	Герметизация в условиях частичного вакуума (обратное заполнение азотом)		

[0115] После лиофилизации вся лиофилизированная масса не проявляла признаков обратного плавления или разрушения (фотографии не делались). Образцы тестировали на вторичную структуру и сравнивали со структурой в нативном состоянии, собранной в кювете для жидких образцов. Спектры Фурье-ИКС (вторая производная) нативного полипептида А были наложены на составы для скринингового исследования 2. Процент сходства между нативным и высушенным состояниями, приведенный в таблице 3, был рассчитан на основе площади перекрытия второй производной от 1800 до 1400 см⁻¹. Состав 8 показал лучшее сохранение вторичной структуры после сушки, однако тоничность была низкой.

Скрининговое исследование 3

[0116] На основании приведенных выше результатов было проведено третье скрининговое исследование для изучения различных соотношений стабилизатора и наполнителя. Кроме того, были введены трегалоза, невосстанавливающий дисахарид, и поливинилпирролидон (ПВП), полимер, для оценки их влияния в качестве стабилизаторов, а также для оценки их эффективности для улучшения Tg'. Для скринингового исследования 3 было приготовлено восемь составов, которые были подвергнуты лиофилизации с использованием параметров цикла лиофилизации, описанных в таблице 4. Матрица составов для этого исследования подробно описана в таблице 5 ниже. В этом исследовании использовали Твин 20 (PS20) в концентрации 0,1 мг/мл для составов 9-16.

Таблица 5: Составы для скринингового исследования 3 с процентным сходством вторичной структуры по данным Фурье-ИКС

№ состава	Полипептид А (мг/мл)	Сахароза (мг/мл)	Трегалоза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	PVP (мг/мл)	% сходство с
-----------	----------------------	------------------	-------------------	----------------	-------------	--------------

						нативным
9	5	5	-	30	-	40,3
10	5	10	-	30	-	73,7
11	5	15	-	20	-	61,5
12	5	15	-	20	10	45,4
13	5	20	-	20	-	58,4
14	5	-	15	15	-	81,2
15	5	-	15	15	10	76,0
16	5	-	20	15	-	71,8

[0117] Спектры Фурье-ИКС измеряли, как описано выше, для определения процентного сходства с нативным полипептидом А. Помимо состава 8, составы, демонстрирующие наиболее перспективные результаты со сходством >70%, представляли собой составы 10, 14, 15 и 16. На основании этого наблюдения было разработано скрининговое исследование 4 с пятью составами, приготовленными с меньшим количеством маннита и большим количеством дисахарида. Эта комбинация, по-видимому, способствовала более высокому сохранению вторичной структуры.

Скрининговое исследование 4

[0118] В таблице 6 представлены 5 составов, которые были приготовлены, как описано выше, для скринингового исследования 3 и лиофилизированы с использованием параметров цикла лиофилизации, описанных в таблице 4. Измерения осмоляльности не проводили. В этом исследовании использовали Твин 20 (PS20) в концентрации 0,1 мг/мл для составов 17-21.

Таблица 6: Составы для скринингового исследования 4 с процентным сходством вторичной структуры по данным Фурье-ИКС

№ состава	Полипептид А (мг/мл)	Сахароза (мг/мл)	Трегалоза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	% сходство с нативным
17	5	15	-	10	78,4
18	5	15	-	5	84,5
19	5	-	15	10	64,5
20	5	-	15	5	67,5
21	5	-	25	-	95,2

[0119] Спектры Фурье-ИКС измеряли, как описано выше, для определения процентного сходства с нативным полипептидом А. На основании приведенных выше результатов было подтверждено, что более высокое количество дисахарида оказывает большее влияние на сохранение вторичной структуры. Следующее скрининговое исследование было разработано для изучения более высоких концентраций дисахаридов в сочетании с наполнителями.

Тонкая регулировка тоничности

[0120] Перед началом очередного скрининга производилась тонкая регулировка изотоничности различных составов. Ряд составов, содержащих комбинации эксципиентов, готовили в 12 мМ буфере на основе цитрата натрия при pH 6,1 с более высокими количествами дисахаридов и различными количествами наполнителей с последующим измерением осмоляльности. Различные составы и полученные значения осмоляльности показаны в таблице 7. Все составы содержат полипептид А в концентрации 5 мг/мл.

Таблица 7: Скрининг осмоляльности

№ состава	Сахароза (мг/мл)	Трегалоза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	Глицин (мг/мл)	Осмоляльность (мОсм/кг)
22	20	-	-	40	612
23	25	-	-	15	303
24	30	-	-	10	258
25	-	25	10	-	164
26	-	25	20	-	209
27	-	30	30	-	289
28	-	30	-	20	372
29	-	20	-	20	293
30	-	25	-	15	303

Скрининговое исследование 5

[0121] В таблице 8 представлены 5 составов, которые были приготовлены, как описано выше, для скринингового исследования 3. В этом исследовании использовали Твин 20 (PS20) в концентрации 0,1 мг/мл для составов 31-35. Глицин в составах 33 и 34 мешал проведению анализа Фурье-ИКС, поэтому данные о процентном сходстве не представлены. Кроме того, создать эффективный цикл лиофилизации с глицином было сложнее, чем с маннитом. Поэтому в дальнейшем продолжалась работа над составами, содержащими маннитол.

Таблица 8: Составы для скринингового исследования 5 с осмоляльностью и процентным сходством вторичной структуры по данным Фурье-ИКС

№ состава	Сахароза (мг/мл)	Трегалоза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	Глицин (мг/мл)	Осмоляльность (мОсм/кг)	% сходство с нативным
31	-	30	30	-	299	80,8
32	30	-	30	-	300	77,9
33	-	30	-	10	252	-
34	-	20	-	15	292	-

35	-	20	35	-	282	89,0
----	---	----	----	---	-----	------

[0122] Все образцы подвергали стерильной фильтрации в асептических условиях с последующим розливом в стерилизованные флаконы объемом 2 куб. см при объеме заполнения 0,5 мл. В таблице 9 подробно описаны параметры цикла лиофилизации, использованные для скринингового исследования 5.

Таблица 9: Параметры цикла лиофилизации для скринингового исследования 5

Стадия	Температура (°C)	Время (минуты)	Скорость линейного изменения температуры (°C /мин.)	Давление в камере (мТорр)
Загрузка	5	-	-	-
Замораживание и отжиг	от 5 до -45	100	0,5	-
	Выдерживание при -45	30	-	-
	от -45 до -10	70	0,5	-
	Выдерживание при -10	40	-	-
	от -10 до -45	70	0,5	-
	Выдерживание при -45	30	-	90
Первичная сушка	от -45 до -30	30	0,5	90
	Выдерживание при -30	1260	-	90
Вторичная сушка	от -30 до 10	100	0,5	90
	Выдерживание при 10	60	-	90
Укупорка	10	Герметизация в условиях частичного вакуума (обратное заполнение азотом)		

[0123] После сушки вымораживанием определяли вторичную структуру и сравнивали ее с нативным состоянием, как описано выше, и рассчитывали их процентное сходство.

Перспективные составы-кандидаты

[0124] Частично на основании результатов Фурье-ИКС и осмоляльности составы 31 и 32 были исследованы на внешний вид, температуру стеклования в замороженном состоянии (T_g') и температуру стеклования в высушенном состоянии (T_g). Состав для

внутривенного введения полипептида А использовали в качестве компаратора. Композиции трех составов, оцененных в этом скрининге, описаны в таблице 10.

Таблица 10: Составы с температурой стеклования ниже комнатной

№ состава	Полипептид А (мг/мл)	Полисорбат 20 (мг/мл)	Сахароза (мг/мл)	Трегалоза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	Tg' (°C)
36	5	0,1	50	-	-	-29,42
37 (31 в таблице 8)	5	0,1	30	-	30	-38,39
38 (32 в таблице 8)	5	0,1	-	30	30	-37,83

[0125] Все составы (плацебо и активный) были приготовлены и подвергнуты стерильной фильтрации в асептических условиях с последующим розливом в стерилизованные флаконы объемом 5 куб. см при объеме заполнения 2,28 мл. Аликвоту (15 мкл) каждого состава-кандидата анализировали с помощью ДСК при температуре ниже комнатной для оценки их профилей в замороженном состоянии. На основании результатов Tg' составы лиофилизировали с использованием параметров цикла, перечисленных в таблице 11А. Стадия отжига используется для обеспечения полной кристаллизации наполнителя, маннита. Альтернативный цикл лиофилизации, который был так же эффективен при лиофилизации составов, приведен ниже в таблице 11В.

Таблица 11А: Параметры цикла лиофилизации для перспективных составов-кандидатов

Стадия	Температура (°C)	Время (минуты)	Скорость линейного изменения температуры (°C /мин.)	Давление в камере (мТорр)
Загрузка	5	-	-	-
Замораживание и отжиг	от 5 до -42	94	0,5	-
	Выдерживание при - 42	30	-	-
	от -42 до -10	64	0,5	-
	Выдерживание при - 10	60	-	-
	от -10 до -40	20	0,5	-
	Выдерживание при -	60	-	100

	40			
Первичная сушка	от -45 до -30	20	0,5	100
	Выдерживание при -30	2580	-	100
Вторичная сушка	от -30 до 25	110	0,5	100
	Выдерживание при 25	540	-	100
Укупорка	25	Герметизация в условиях частичного вакуума (обратное заполнение азотом)		

Таблица 11В: Альтернативные параметры цикла лиофилизации

Стадия	Температура (°C)	Время (минуты)	Давление в камере (Торр)
Загрузка	5	-	760
Загрузка	5	30	550
Замораживание и отжиг	от 5 до -45	150	550
	Выдерживание при -45	120	550
	от -45 до -10	105	550
	Выдерживание при -10	180	550
	от -10 до -45	105	550
	Выдерживание при -45	120	550
Первичная сушка	Выдерживание при -45	30	0,1
	от -45 до -25	40	0,1
	Выдерживание при -25	3000	0,1
Вторичная сушка	от -25 до 30	220	0,1
	Выдерживание при 30	1440	0,1
Укупорка	30	-	600

[0126] После лиофилизации все образцы оценивали по внешнему виду массы, температуре стеклования в высушенном состоянии (T_g), pH, времени восстановления, осмоляльности, концентрации, содержанию влаги, ЭХ, ОФ и анализу активности.

Внешний вид лиофилизированной массы

[0127] Флаконы содержали белую цельную массу. Состав, содержащий 50 мг/мл сахарозы (состав 36), показал небольшую усадку массы. Все остальные составы были совершенно не изменены и не имели признаков усадки.

Высокотемпературная ДСК лиофилизированной массы

[0128] В таблице 12 обобщены результаты анализа на основе высокотемпературного ДСК. Значения температуры стеклования (T_g) для составов 36 и 37 были определены при

~82°C, что объяснялось присутствием сахарозы. Стеклование состава, содержащего трегалозу (состав 38), в этих условиях обнаружить не удалось. Пик плавления, определенный для состава 36 при 158°C, был связан с плавлением сахарозы. Пики плавления, определенные для составов 37 и 38 при 120-121°C, были связаны с плавлением маннита.

Таблица 12: Сводная информация о Tg и температуре плавления

№ состава	Масса образца (мг)	Температура стеклования, Tg (°C)	Температура плавления, Tm (°C)
36	4,5	81,86	157,86
37 (31 в таблице 8)	5,2	81,86	119,69
38 (32 в таблице 8)	4,9	-	120,80

pH, время восстановления, осмоляльность, концентрация и содержание влаги для перспективных составов-кандидатов

[0129] ВДИ использовали для восстановления лиофилизированной массы. В таблице 13 обобщены результаты по pH, времени восстановления, осмоляльности, концентрации и содержание влаги.

Таблица 13: Сводная информация о Tg и температуре плавления

№ состава	pH	Осмоляльность (мОсм/кг)	Восст. Время при перемешивании и взбалтывании (секунды)	Содержание влаги (%)	Концентрация (мг/мл)
36	6,18	188	20	1,55	5,127
37 (31 в таблице 8)	6,20	296	22	1,74	5,058
38 (32 в таблице 8)	6,17	289	16	1,79	4,566

Эксклюзионная (ЭХ) ВЭЖХ и обращенно-фазовая (ОФ) ВЭЖХ для перспективных составов-кандидатов

[0130] Проводили анализ методом ЭХ-ВЭЖХ и ОФ-ВЭЖХ составов 36, 37 и 38. Объединенные результаты анализа методом ЭХ-ВЭЖХ показали наибольший пик, имеющий площадь пика >98% для каждого состава. Объединенные результаты анализа методом ОФ-ВЭЖХ показали наибольший пик, имеющий площадь пика >85% для каждого состава.

Анализ активности для перспективных составов-кандидатов

[0131] Чтобы гарантировать, что эксципиенты не будут влиять на биоактивность, составы 36-38 сравнивали с использованием анализа активности pSTAT5. Кривые доза-ответ были аналогичны и сопоставимы с кривыми для эталонного стандарта полипептида А. Анализ данных в таблице 14 показал, что значения EC50 превышают 75% активности по отношению к эталонному стандарту RT, что является приемлемым.

Таблица 14: Результаты анализа активности pSTAT5

Параметр	Состав 36	Состав 37	Состав 38
Нижняя асимптота	0,116	0,109	0,072
Верхняя асимптота	0,757	0,786	0,755
Угловой коэффициент Хилла	1,29	1,24	1,34
EC50	11,59	12,49	16,07
Относительная активность	84%	78%	78%

[0132] Анализ активности pSTAT5 проводили путем измерения связывания составов с клетками HH (линия клеток Т-лимфоцитов человека, на поверхности которых присутствует изоформа рецептора $\beta\gamma\text{IL}2$). Связывание полипептида А измеряли путем определения количества фосфорилированного STAT5 (фосфо-STAT5 или pSTAT5), присутствующего в клетках HH 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.

[0133] 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.

[0134] 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.

[0135] 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 HH 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 А/В. 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

микропланшетном ридере.

[0136] Измеряли отдельные значения EC50 и рассчитывали % относительного стандартного отклонения (ОСО) для значений EC50 эталонного стандарта и для значений EC50 для контроля.

[0137] 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 по следующему уравнению: Относительная активность=(геом. среднее EC50 эталон. станд.)/(EC50 контроля)×100%.

[0138] Образцы были рассчитаны таким же образом. Результаты анализа определяли по следующему уравнению: Относительная активность=(геом. среднее EC50 эталон. станд.)/(EC50 тестируемого образца)×100%.

Первоначальные выводы

[0139] На основании всех полученных результатов и его сходства с составом полипептида А для внутривенного введения, который также содержит сахарозу в качестве стабилизирующего агента, был выбран состав 37. Композиция состава показана в таблице 15. Выбранный состав дает изотонический раствор при восстановлении с использованием воды для инъекций, что повысит его пригодность для прямой подкожной доставки лекарственных средств.

[0140] Скрининговые исследования показали, что сохранение вторичной структуры полипептида А значительно улучшается, когда в составе присутствует большое количество дисахаридов, таких как сахароза или трегалоза. Кроме того, было установлено, что маннит является лучшим наполнителем и модификатором тоничности по сравнению с глицином.

Таблица 15: Состав полипептида А 37

Компонент	Функция	Концентрация (мг/мл)
Полипептид А	Белок	1 и 5
Сахароза	Белковый стабилизатор	30
Маннит	Объемообразующий агент	30
Дигидрат трехосновного цитрата натрия	Буфер	2,03
Моногидрат лимонной кислоты	Буфер	0,97
Полисорбат 20	Поверхностно-активное вещество	0,1

[0141] После идентификации состава 37, указанного выше, концентрации дигидрата трехосновного цитрата натрия и моногидрата лимонной кислоты оптимизировали, чтобы избежать стадии титрования pH для достижения pH 6,1. В таблице 16 ниже описан

измененный состав 37-2.

Таблица 16: Состав полипептида А 37-2

Компонент	Функция	Концентрация (мг/мл)
Полипептид А	Белок	1 и 5
Сахароза	Белковый стабилизатор	30
Маннит	Объемообразующий агент	30
Дигидрат трехосновного цитрата натрия	Буфер	2,91
Моногидрат лимонной кислоты	Буфер	0,34
Полисорбат 20	Поверхностно-активное вещество	0,1

Дальнейшее тестирование уровней маннита/сахарозы

[0142] Количества сахарозы и маннита были изменены по сравнению с составом 37, как показано в таблице 17, для проверки осмоляльности и контроля внешнего вида лиофилизированной массы. Каждая композиция, приведенная ниже в таблице 17, содержала буфер на основе цитрата натрия с концентрацией 12 мМ и рН 6,1. После лиофилизации состав 37 имел наилучший внешний вид лиофилизированной массы, демонстрируя более вогнутый вид верхней части и отсутствие усадки на стенках по сравнению с другими составами. Улучшенный внешний вид массы может сделать лекарственный продукт более привлекательным для пациента или поставщика медицинских услуг, тем самым потенциально улучшая соблюдение режима применения лекарственных средств.

Таблица 17: Составы с измененными уровнями маннита и сахарозы

№ образца	№ состава	Полипептид А (мг/мл)	Полисорбат 20 (мг/мл)	Сахароза (мг/мл)	Маннит (мг/мл)	Осмоляльность (мОсм/кг)
1	37	5	0,1	30	30	285
2	39	5	0,1	20	40	311
3	40	5	0,1	13,5	40	292
4	41	5	0,1	10	40	281
5	42	5	0,1	90	-	296
6	36	5	0,1	50	-	179

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:
 - a) от около 1 мг до около 50 мг полипептида, содержащего циклически пермутированный IL-2, слитый с внеклеточной частью цепи IL-2R α ;
 - b) сахарозу;
 - c) маннит;
 - c) цитратный буфер; и
 - d) эмульгатор.
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 от около 1 мг до около 15 мг полипептида.
5. Композиция по любому из пп. 1-4, причем композиция содержит около 1 мг полипептида.
6. Композиция по любому из пп. 1-4, причем композиция содержит около 5 мг полипептида.
7. Композиция по любому из пп. 1-4, причем композиция содержит около 15 мг полипептида.
8. Композиция по любому из пп. 1-4, причем композиция содержит около 20 мг полипептида.
9. Композиция по любому из пп. 1-4, причем композиция содержит около 30 мг полипептида
10. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит от около 60 мг до около 72 мг сахарозы.
11. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит около 66 мг сахарозы.
12. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит от около 60 мг до около 72 мг маннита.
13. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит около 66 мг маннита.
14. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит от около 4,0 мг до около 6,0 мг цитрат-аниона.
15. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция содержит около 5,0 мг цитрат-аниона.
16. 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.
17. 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.

18. 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.

19. Композиция по любому из предыдущих пунктов, в которой эмульгатор включает полисорбат 20.

20. Композиция по п. 19, причем композиция содержит от около 0,10 мг до около 0,12 мг полисорбата 20.

21. Композиция по п. 19, причем композиция содержит около 0,11 мг полисорбата 20.

22. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция представляет собой лиофилизированную массу.

23. Композиция по п. 22, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с pH от около 5,5 до около 6,5.

24. Композиция по п. 23, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к получению водного раствора с pH около 6,1.

25. Композиция по любому из пп. 22-24, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с изотонической осмоляльностью.

26. Композиция по любому из пп. 22-25, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с осмоляльностью от около 240 до около 340 мОсм/кг.

27. Композиция по любому из пп. 22-26, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с осмоляльностью от около 280 до около 320 мОсм/кг.

28. Композиция по п. 26, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с осмоляльностью около 285 мОсм/кг.

29. Композиция по п. 26, причем растворение лиофилизированной массы в воде приводит к образованию водного раствора с осмоляльностью около 300 мОсм/кг.

30. Композиция по любому из пп. 1-29, причем композиция представляет собой водный раствор.

31. Композиция по п. 30, причем композиция содержит от около 0,5 мг/мл до около 30 мг/мл полипептида.

32. Композиция по п. 31, причем композиция содержит около 1 мг/мл полипептида.

33. Композиция по п. 32, причем композиция представляет собой 1,1 мл водного раствора, содержащего около 1,1 мг полипептида.

34. Композиция по п. 31, причем композиция содержит около 5 мг/мл полипептида.

35. Композиция по п. 34, причем композиция представляет собой 1,1 мл водного раствора, содержащего около 15 мг полипептида.

36. Композиция по п. 31, причем композиция содержит около 20 мг/мл полипептида.

37. Композиция по п. 31, причем композиция содержит около 30 мг/мл полипептида.
38. Композиция по любому из пп. 30-37, причем композиция содержит от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл сахарозы.
39. Композиция по п. 38, причем композиция содержит около 30 мг/мл сахарозы.
40. Композиция по любому из пп. 30-37, причем композиция содержит от около 25 мг/мл до около 35 мг/мл маннита.
41. Композиция по п. 40, причем композиция содержит около 30 мг/мл маннита.
42. Композиция по любому из пп. 30-41, причем композиция содержит от около 10 мМ до около 20 мМ цитратного буфера.
43. Композиция по п. 42, причем композиция содержит около 12 мМ цитратного буфера.
44. Композиция по любому из пп. 30-43, в которой цитратный буфер получают сочетанием 2,03 мг/мл трехосновного цитрата натрия и 0,97 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе.
45. Композиция по любому из пп. 30-43, в которой цитратный буфер получают сочетанием 2,91 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,34 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе.
46. Композиция по любому из пп. 30-43, в которой цитратный буфер получают сочетанием 2,96 мг/мл дигидрата трехосновного цитрата натрия и 0,30 мг/мл моногидрата лимонной кислоты в водном растворе.
47. Композиция по любому из пп. 30-46, причем композиция содержит от около 0,09 мг/мл до около 0,11 мг/мл полисорбата 20.
48. Композиция по п. 47, причем композиция содержит около 0,1 мг/мл полисорбата 20.
49. Композиция по любому из пп. 30-48, причем рН композиции составляет от около 5,5 до около 6,5.
50. Композиция по п. 49, причем рН композиции составляет около 6,1.
51. Композиция по любому из пп. 30-50, причем осмоляльность композиции составляет от около 240 до около 340 мОсм/кг.
52. Композиция по любому из пп. 30-50, причем осмоляльность композиции составляет от около 280 до около 320 мОсм/кг.
53. Композиция по п. 51, причем осмоляльность композиции составляет около 285 мОсм/кг.
54. Композиция по п. 51, причем осмоляльность композиции составляет около 300 мОсм/кг.
55. Композиция по любому из пп. 30-54, причем водный раствор содержит от около 0,03 мг/мл полипептида до около 0,2 мг/мл полипептида.
56. Лиофилизированная композиция, полученная путем лиофилизации композиции по любому из пп. 30-55.
57. Композиция по любому из предыдущих пунктов, причем композиция

представляет собой единичную стандартную дозу полипептида.

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

59. Изделие по п. 58, представляющее собой флакон из стекла.

60. Способ получения лиофилизированной композиции, включающий лиофилизацию водного раствора по любому из пп. 30-55.

61. Способ получения водной композиции, включающий растворение композиции по п. 22 или п. 56 в водном растворителе.

62. Способ по п. 61, в котором pH водной композиции доводят до около 6,1.

63. Способ по п. 61 или п. 62, в котором pH водной композиции доводят до около 6,1 с помощью основания.

64. Способ по п. 63, в котором основание представляет собой гидроксид натрия.

65. Способ по любому из пп. 61-64, в котором водную композицию дополнительно разбавляют водным раствором, содержащим около 1% (масс./масс.) поверхностно-активного вещества.

66. Способ по п. 65, в котором поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20.

67. Способ по п. 65, 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.

68. Способ активации естественных клеток-киллеров (NK) у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 30-55.

69. Способ лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества композиции по любому из пп. 30-55.

70. Способ по п. 69, в котором рак представляет собой почечно-клеточную карциному, меланому, рак яичников или рак легкого.

71. Способ по п. 69 или п. 70, в котором рак представляет собой рефрактерную солидную опухоль.

72. Способ по любому из пп. 69-71, в котором композицию вводят подкожно.

73. Способ по любому из пп. 69-72, в котором композицию вводят подкожно в дозе от около 1 мг до около 15 мг.

74. Способ по любому из пп. 69-73, в котором 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.).

75. Способ по любому из пп. 69-73, в котором меланома представляет собой одну или обе из меланомы слизистой оболочки или прогрессирующей кожной меланомы.

По доверенности