

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 570**

51 Int. Cl.:

A61K 38/20 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2018** **PCT/CN2018/096775**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.01.2019** **WO19019998**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2018** **E 18838766 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2023** **EP 3639845**

54 Título: **Composición farmacéutica del complejo de proteína il-15 y usos de la misma**

30 Prioridad:

25.07.2017 CN 201710611317

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.10.2023

73 Titular/es:

JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. (50.0%)
No. 7 Kunlunshan Road, Economic and
Technological Development Zone, Lianyungang
Jiangsu 222047, CN y
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO.,
LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

WU, TINGTING;
LI, HAO y
LIU, XUN

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes

ES 2 950 570 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica del complejo de proteína il-15 y usos de la misma

5 **Campo técnico**

La invención pertenece al campo de las preparaciones farmacéuticas, en particular, se refiere a una composición farmacéutica que comprende un complejo de proteína IL-15 y su uso como un medicamento.

10 **Antecedentes**

La interleucina-15 (IL-15) es una citocina con aproximadamente 12-14 kD, descubierta por Gabstein y col., en 1994. Puede desempeñar un papel en la respuesta inmunitaria normal *in vivo*, tal como promover la proliferación de células T, células B y células asesinas naturales (NK).

15 La IL-15 es un miembro de la pequeña familia de las citocinas de cuatro α -Hélices. La IL-15 ejerce actividad biológica mediante la unión a su receptor. El receptor IL-15 consiste en tres subunidades de receptor: Receptor de IL-15 alfa (IL-15R α), receptor de IL-2 beta (IL-2R β , también conocido como IL-15R β o CD122) y γ c (también conocido como CD132). IL-15R α contiene un dominio Sushi, que es capaz de unirse a IL-15 y es esencial para la función biológica de la IL-15 unida.

En los últimos años, se ha descubierto que la actividad biológica de la IL-15 mejora significativamente, una vez que la IL-15 se une a su receptor IL-15R α para formar un complejo. Los estudios han demostrado que el complejo formado por IL-15 y su receptor soluble IL-15R α es significativamente superior a la IL-15 sola para estimular la proliferación de células T de memoria CD8 $^{+}$ y células NT/NKT. El complejo IL-15/IL-15R α amplifica significativamente e induce la proliferación de células CD122 alto , incluyendo células T de memoria CD44 alto CD8 $^{+}$ que han sido estimuladas por antígenos. La capacidad del complejo IL-15/IL-15R α para estimular la proliferación y mantener la supervivencia de las células T de memoria CD8 $^{+}$ es 10 veces más alta que la de la IL-15 sola, y el mecanismo puede asociarse con el efecto de la presentación trans.

Debido a las altas expectativas para la IL-15 en el campo de la inmunoterapia tumoral, el NIH se realizó primero en estudios sobre el tratamiento de tumores con IL-15 e intentó avanzar el estudio hacia el estudio de fase I clínica. Sin embargo, existen algunos problemas con la IL-15. Por ejemplo, debido al pequeño peso molecular y a la semivida corta *in vivo*, es difícil controlar la dosis de administración repetida de IL-15, y fácil de causar efectos secundarios sistémicamente inmunológicos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de mejorar la vida media de la IL-15 *in vivo*, para promover o mejorar la actividad biológica de la misma *in vivo*. Muchas compañías o institutos de investigación domésticas o extranjeras se ocuparon en estudios sobre la inmunoterapia de IL-15. Por ejemplo, la patente CN100334112C (Shanghai Haixina Biotechnology Co., Ltd.) se refiere a una proteína de IL-15-hlgG4Fc homodimérica para su uso en el tratamiento de infecciones microbianas. La introducción de un enlace disulfuro entre IL-15 e IL-15R α en las moléculas complejas de la presente solicitud puede mejorar la estabilidad molecular y la actividad biológica, y también puede simplificar el proceso de preparación.

Sin embargo, los fármacos proteicos macromoleculares no son estables, tales como ser susceptibles a la degradación, polimerización o modificación química no deseada, debido a su alto peso molecular y estructura compleja. Para hacer que el fármaco proteico sea adecuado para la administración, para mantener la estabilidad durante el almacenamiento, el transporte y el uso posterior, y también para ejercer mejores efectos, los estudios sobre la formulación estable de fármacos proteicos son particularmente importantes.

El documento WO 2016/095642 describe un complejo IL-15/IL-15R α que puede estar presente en una composición farmacéutica, sin especificar este último con respecto a sus ingredientes. Actualmente, varias compañías han desarrollado complejos de proteína IL-15, por ejemplo, CN103370339A, CN100334112, CN101735982, WO2007001677 y US-20070160578. Sin embargo, para los complejos de proteína IL-15 con una nueva estructura, todavía existe la necesidad de desarrollar una composición farmacéutica (formulación) que comprenda el complejo de proteína IL-15 que sea más adecuado para la administración.

55 **Resumen de la invención**

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- 60 (a) 1 mg/ml a 10 mg/ml de complejo de proteína IL-15
- (b) tampón de citrato 5 mM a 30 mM, pH 5,0 a 6,0;
- (c) 60 mg/ml a 90 mg/ml de trehalosa; y
- 65 (d) 0,1 mg/ml a 0,6 mg/ml de polisorbato 20;

en donde el complejo de proteína IL-15 consiste en IL-15 que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de ID DE SEC. N.º:1 y una proteína de fusión del receptor IL-15 que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de ID DE SEC. N.º:2.

5 El tampón de citrato es preferiblemente tampón de citrato, y más preferiblemente tampón de citrato de sodio-ácido cítrico.

10 En una realización, la concentración del complejo de proteína IL-15 es 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml o 10 mg/ml.

15 En otra realización, la concentración del tampón de citrato es de 10 mM a 20 mM, y puede ser 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, más preferiblemente 10 mM $\pm$ 2 mM y con la máxima preferencia 10 mM.

En otra realización, el valor de pH del tampón de citrato en la composición farmacéutica es de 5,0 a 5,5, y puede ser de 5,0, 5,1, 5,15, 5,2, 5,25, 5,3, 5,35, 5,4, 5,45 o 5,5, más preferiblemente de 5,15 a 5,25, y lo más preferiblemente 5,2.

20 La composición farmacéutica comprende trehalosa que es preferiblemente α , α -trehalosa dihidrato. En una realización, la concentración de trehalosa en la composición farmacéutica es de 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml, y puede ser 70 mg/ml, 71 mg/ml, 72 mg/ml, 73 mg/ml, 74 mg/ml, 75 mg/ml, 76 mg/ml, 77 mg/ml, 78 mg/ml, 79 mg/ml u 80 mg/ml, con máxima preferencia 75 mg/ml.

25 La composición farmacéutica comprende un tensioactivo que es polisorbato 20. En una realización, la concentración de polisorbato 20 en la composición farmacéutica es de 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml, y puede ser 0,4 mg/ml, 0,42 mg/ml, 0,44 mg/ml, 0,46 mg/ml, 0,48 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,52 mg/ml, 0,54 mg/ml, 0,56 mg/ml, 0,58 mg/ml o 0,6 mg/ml, lo más preferiblemente 0,5 mg/ml.

30 En una realización, la composición farmacéutica comprende: (a) 1 mg/ml a 5 mg/ml de complejo de proteína IL-15, (b) tampón de citrato de 10 a 20 mM, (c) 60 mg/ml a 90 mg/ml de trehalosa, y (d) 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml de polisorbato 20, el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 5,0 a 5,5.

En otra realización, la composición farmacéutica comprende:

- 35 (a) complejo de proteína IL-15 1 mg/ml,
 (b) tampón de citrato 10 mM $\pm$ 2 mM,
 40 (c) 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml de trehalosa, y
 (d) 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml de polisorbato 20, el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 5,15 a 5,25.

45 En otra realización, la composición farmacéutica comprende:

- (a) complejo de proteína IL-15 1 mg/ml,
 (b) tampón de citrato 10 mM,
 50 (c) 75 mg/ml de trehalosa, y
 (d) 0,5 mg/ml de polisorbato 20, el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 5,15 a 5,25, preferiblemente pH 5,2.

55 En otra realización, la composición farmacéutica comprende: (a) 1 mg/ml de complejo de proteína IL-15, (b) tampón de ácido cítrico 10 mM $\pm$ 2 mM-citrato de sodio, (c) 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml de trehalosa, y (d) 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml de polisorbato 20, el pH de la composición farmacéutica es de aproximadamente 5,15 a 5,25.

60 En otra realización, la composición farmacéutica comprende: (a) 1 mg/ml de complejo de proteína IL-15, (b) tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 10 mM, (c) trehalosa 75 mg/ml, y (d) 0,5 mg/ml de polisorbato 20, el pH de la composición farmacéutica es aproximadamente 5,2.

65 En otra realización, el complejo de proteína IL-15 comprendido en la composición farmacéutica consiste en IL-15 que tiene una identidad de secuencia del 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % con el polipéptido de ID DE SEC. N.º: 1 y una

proteína de fusión del receptor IL-15 que tiene un 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con el polipéptido de ID DE SEC. N.º: 2.

En una realización preferida, el complejo de proteína IL-15 consiste en IL-15 de ID DE SEC. N.º: 1 y una proteína de fusión del receptor IL-15 de ID DE SEC. N.º: 2.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es estable a 2-8 °C durante al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses o al menos 24 meses. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es estable a 40 °C durante al menos 7 días, al menos 14 días o al menos 28 días.

La presente invención también proporciona un método para preparar la composición farmacéutica descrita anteriormente, que comprende una etapa de mezclar el complejo de proteína IL-15 con el tampón de citrato, y particularmente comprende además una etapa de adición de trehalosa y polisorbato 20. El pH del tampón de citrato con el que se prepara la composición farmacéutica en la presente descripción es sustancialmente el mismo que el pH final de la composición farmacéutica.

La presente invención también proporciona un método para preparar una formulación liofilizada que comprende el complejo de proteínas IL-15, que comprende la etapa de liofilizar la composición farmacéutica descrita anteriormente en la presente descripción.

En una realización, la etapa de liofilización incluida en el método de preparación de una formulación liofilizada que comprende el complejo de proteína IL-15 comprende las etapas de pre-congelación, secado primario y secado secundario, sucesivamente. La etapa de liofilización se lleva a cabo congelando la formulación y posteriormente sublimando el agua a una temperatura adecuada para el secado primario. En tales condiciones, la temperatura del producto es menor que el punto eutéctico o la temperatura de descomposición de la formulación. Bajo una presión adecuada, normalmente en el intervalo de aproximadamente 50-250 mTorr, el intervalo de temperatura para el secado primario es típicamente de aproximadamente -30 a 25 °C (suponiendo que el producto permanece congelado durante el secado primario). El tiempo requerido para el secado depende del tamaño y tipo de formulación, recipiente (por ejemplo, vial de vidrio) que contiene la muestra y el volumen del líquido. El tiempo puede variar de unas pocas horas a unos pocos días (p. ej., 40-60 horas). El secado secundario puede llevarse a cabo a aproximadamente 0-40 °C, que depende principalmente del tipo y tamaño del recipiente y del tipo de proteína empleada. El tiempo para el secado secundario se determina mediante el nivel de humedad residual deseado en el producto y típicamente al menos aproximadamente 5 horas. Típicamente, la formulación liofilizada bajo baja presión tiene un contenido de agua de menos de aproximadamente 5 %, preferiblemente menos de aproximadamente 3 %. La presión puede ser la misma que la presión aplicada en la etapa de secado primario. Preferiblemente, la presión aplicada durante el secado secundario es menor que la del secado primario. Las condiciones para la liofilización pueden variar con los tamaños de la formulación y el vial. La pre congelación de la presente descripción significa congelar de 5 °C a -40 °C o -50 °C, y preferiblemente de -45 °C, independientemente del grado de vacío. La temperatura para el secado primario es preferiblemente de -25 °C; el grado de vacío es de 0,01 mBar a 0,2 mBar, y lo más preferiblemente de 0,08 mBar. La temperatura para el secado secundario es de 20 °C a 30 °C, y lo más preferiblemente 25 °C, y el grado de vacío es de 0,01 mBar a 0,2 mBar, y con la máxima preferencia 0,08 mBar, reducido a 0,005 mBar-0,02 mBar y con la máxima preferencia 0,01 mBar.

La presente descripción también proporciona una formulación liofilizada que comprende el complejo de proteína IL-15 preparado mediante el método de preparación de una formulación liofilizada que comprende el complejo de proteína IL-15 descrito anteriormente en la presente descripción.

La presente descripción también proporciona un método para preparar una solución reconstituida de la formulación liofilizada que comprende la composición farmacéutica descrita anteriormente en la presente descripción, que incluye una etapa de reconstituir la formulación liofilizada descrita anteriormente en la presente descripción, en donde el solvente usado para la reconstitución es preferiblemente agua para inyección.

La presente invención también proporciona una solución reconstituida que comprende el complejo de proteína IL-15 preparado mediante el método de preparación de una solución reconstituida descrita anteriormente en el presente documento.

En una realización, en la solución reconstituida, la concentración del complejo de proteína IL-15 es de 1,0 mg/ml a 1,1 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/ml.

En otra realización, en la solución reconstituida, la composición farmacéutica tiene un pH de 5,0 a 6,0, preferiblemente de 5,0 a 5,5, con mayor preferencia de 5,15 a 5,25 y con la máxima preferencia 5,2.

La formulación liofilizada que comprende el complejo de proteína IL-15 descrito anteriormente en el presente documento también puede reconstituirse para formar la composición farmacéutica descrita anteriormente.

La composición farmacéutica descrita anteriormente en la presente memoria puede proporcionarse en un recipiente, tal como un vial de vidrio para inyección hecha de vidrio de borosilicato neutro.

5 La presente invención proporciona además la composición farmacéutica o formulación liofilizada o solución reconstituida de la formulación liofilizada descrita anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la IL-15.

10 En una realización, las enfermedades o afecciones relacionadas con la IL-15 se seleccionan del grupo que consiste en enfermedad infecciosa, cáncer, enfermedad sanguínea, enfermedad inflamatoria y enfermedad autoinmune. El cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de piel, linfoma, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de mama. La enfermedad infecciosa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en infección por el virus variólico, infección por VIH, infección bacteriana, infección fúngica e infección por VHB. La enfermedad sanguínea se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en anemia, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico y leucemia linfocítica granular grande de células T. La enfermedad autoinmune se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, gastritis y mucositis.

20 En otra realización, el uso anterior comprende la administración de la composición farmacéutica o la formulación liofilizada o la solución reconstituida de la formulación liofilizada junto con un inhibidor de molécula pequeña o un fármaco de anticuerpo, en donde el inhibidor de molécula pequeña es preferiblemente un fármaco quimioterapéutico dirigido o un fármaco radioterapéutico, y más preferiblemente un agente alquilante y en donde; el fármaco de anticuerpo es preferiblemente un fármaco de anticuerpo monoclonal, y más preferiblemente anti-CD20, anti-PD1, anti-PDL1, anti-Her2, anti-EGFR, anticuerpo anti-c-MET.

25 La presente invención también proporciona la composición farmacéutica o formulación liofilizada o solución reconstituida de la formulación liofilizada descrita anteriormente en el presente documento para su uso en la inmunoterapia celular. En particular, la inmunoterapia celular es la inmunoterapia para células tumorales, tales como DC (inmunoterapia de células dendríticas), CIK (inmunoterapia de células asesinas inducidas por citocinas), DC-CIK (inmunoterapia de células asesinas inducidas por células dendríticas), ECIK (inmunoterapia de células asesinas inducidas por citocinas mejoradas), NK (inmunoterapia de células asesinas naturales), CAS-T (inmunoterapia de células T estimuladas con antígeno combinado), BiAb-T (inmunoterapia de células T de unión a antígeno biespecífico), CAR-T (inmunoterapia de células T modificadas por el receptor de células T), CAR-T (inmunoterapia de células T del receptor de antígeno quimérico).

35 Estas y otras realizaciones de la divulgación se describen adicionalmente mediante la siguiente descripción detallada.

Descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es un diagrama de curva de ajuste que indica la diferencia en los valores de pureza de SEC después de agitar cuando se compara con el de D0.

La Figura 2 es un diagrama de curva de ajuste que indica la diferencia en los valores de pureza después de agitar cuando se compara con el de D0, usando CE-SDS no reductor.

45 La Figura 3 es un mapa de contorno que muestra la diferencia en valores para la SEC y el CE-SDS no reductor después de agitar.

Descripción detallada

50 I. Términos

A fin de comprender más fácilmente la presente divulgación, a continuación se definen específicamente ciertos términos técnicos y científicos. Todos los demás términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación, a menos que se defina explícitamente lo contrario en el presente documento.

60 “Tampón” se refiere a un tampón que es resistente a cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de ácido base. Los ejemplos del tampón que controla el pH dentro de un intervalo apropiado incluyen acetato, succinato, gluconato, histidina, oxalato, lactato, fosfato, citrato, tartrato, fumarato, glicilglicina y otros tampones de ácido orgánico.

65 “Tampón de histidina” es un tampón que contiene iones de histidina. Los ejemplos del tampón de histidina incluyen clorhidrato de histidina, acetato de histidina, histidina-fosfato, tampón de histidina-sulfato y similares, y se prefiere el tampón de clorhidrato de histidina. El tampón de clorhidrato de histidina se prepara por histidina y ácido clorhídrico, o por histidina y clorhidrato de histidina. “Tampón de citrato” es un tampón que incluye iones de citrato. Los ejemplos del tampón de citrato incluyen citrato de sodio-ácido cítrico, ácido cítrico-histidina, ácido cítrico-citrato de potasio, ácido

cítrico-citrato de calcio, ácido cítrico-citrato de magnesio y similares. Un tampón de citrato preferido es el tampón de ácido cítrico-citrato de sodio.

“Tampón de Succinato” es un tampón que comprende iones succinato. Los ejemplos del tampón succinato incluyen ácido succínico-succinato de sodio, succinato de histidina, ácido succínico-succinato de potasio, ácido succínico-succinato de calcio y similares. Un tampón succinato preferido es el tampón de ácido succínico-succinato de sodio.

El “tampón fosfato” es un tampón que comprende iones fosfato. Los ejemplos del tampón fosfato incluyen hidrógeno fosfato disódico-dihidrogeno fosfato sódico, hidrogenofosfato disódico-dihidrogeno fosfato potásico y similares. Un tampón de fosfato preferido es el tampón de hidrógeno fosfato disódico-dihidrogeno fosfato de sodio.

“Tampón de acetato” es un tampón que comprende iones de acetato. Los ejemplos del tampón acetato incluyen ácido acético-acetato de sodio, acetato de histidina, ácido acético-acetato de potasio, ácido acético-acetato de calcio, ácido acético-acetato de magnesio y similares. Un tampón de acetato preferido es el tampón de ácido acético-acetato de sodio.

“Trehalosa” también se conoce como “ α , α -trehalosa dihidrato”.

“Composición farmacéutica” significa una mezcla que comprende uno o más de los complejos de proteína IL-15 descritos en el presente documento y otros componentes químicos como se especifica en las reivindicaciones, tales como vehículos y excipientes fisiológicos/farmacéuticamente aceptables. El propósito de la composición farmacéutica es facilitar el almacenamiento, transporte y promover la administración estable al organismo, para facilitar la absorción y la actividad biológica del ingrediente activo. Como se usa en el presente documento, “composición farmacéutica” y “formulación” no son mutuamente excluyentes.

Según la presente descripción, el disolvente de la forma de solución de la composición farmacéutica es agua, a menos que se especifique lo contrario.

“Formulación liofilizada” significa una formulación o una composición farmacéutica obtenida por liofilización al vacío de la composición farmacéutica o una formulación en forma líquida o de solución.

La composición farmacéutica de la presente descripción es capaz de lograr un efecto estable: el complejo de proteínas incluido en la composición farmacéutica conserva sustancialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el almacenamiento. Preferiblemente, la composición farmacéutica conserva sustancialmente su estabilidad física y estabilidad química, así como la actividad biológica durante el almacenamiento. La longitud para el almacenamiento generalmente se selecciona en función de la vida útil predeterminada de la composición farmacéutica. Actualmente hay una serie de técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína, que se pueden usar para medir la estabilidad después de almacenarse durante un período de tiempo seleccionado a una temperatura seleccionada.

Una formulación farmacéutica de proteína estable es una formulación en la que no se observa ningún cambio significativo en las siguientes condiciones: se almacena a una temperatura fría (2-8 °C) durante al menos 3 meses, preferiblemente 6 meses, más preferiblemente 1 año, e incluso más preferiblemente hasta 2 años. Además, las formulaciones líquidas estables incluyen las que presentan características deseables después de almacenarse a una temperatura de 25 °C a 40 °C durante 1 mes, 3 meses o 6 meses. Típicamente, los criterios aceptables para la estabilidad son los siguientes: típicamente no más de aproximadamente el 10 %, preferiblemente no más de aproximadamente el 5 % de los monómeros complejos de proteínas se degradan, medido por SEC-HPLC; Por inspección visual, la formulación farmacéutica es incolora o de clara a ligeramente lechosa, No se produce más de ± 10 % de variación en la concentración, el pH y la osmolalidad de la formulación; Generalmente no más de aproximadamente el 10 %, preferiblemente no se observa más de aproximadamente el 5 % de truncado; Generalmente no más de aproximadamente 10 %, preferiblemente no se forman más de aproximadamente 5 % de agregados.

Se considera que un complejo de proteínas “conserva su estabilidad física” en la formulación farmacéutica, cuando dicho complejo de proteínas no muestra un aumento significativo en la agregación, precipitación y/o desnaturalización, mediante inspección visual del color y/o claridad, o se mide mediante dispersión de luz UV, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión dinámica de luz (DLS). Los cambios en la conformación de proteínas pueden evaluarse mediante espectroscopía de fluorescencia, que determina la estructura terciaria de la proteína y mediante espectroscopía FTIR, que determina la estructura secundaria de la proteína.

Se considera que un complejo de proteínas “conserva su estabilidad química” en la formulación farmacéutica, cuando dicho complejo de proteínas no muestra una modificación química significativa. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. Los procesos de degradación que con frecuencia alteran la estructura química de una proteína incluyen hidrólisis o truncamiento (evaluado por métodos tales como cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE), oxidación (evaluada por métodos tales como espectroscopía de péptidos junto con espectrometría de masas o MALDI/TOF/MS), desamidación (evaluada por

métodos tales como cromatografía de intercambio iónico, enfoque isoeléctrico capilar, espectroscopía de péptidos, medición de ácido isoaspártico) e isomerización (evaluada midiendo, por ejemplo, el contenido de ácido isoaspártico, espectroscopía de péptidos).

5 Se considera que un complejo de proteínas “conserva su actividad biológica” en la formulación farmacéutica, cuando la actividad biológica del complejo de proteínas en un momento dado todavía está dentro del intervalo predeterminado de actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó inicialmente la formulación farmacéutica. La actividad biológica del complejo de proteínas puede determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de unión a antígeno.

10 El código de tres letras y el código de una letra para los aminoácidos utilizados en la presente divulgación se describen en J. Biol. Chem. 243, p3558 (1968).

“Complejo de proteína IL-15” es un complejo de proteínas formado por la proteína IL-15 y el receptor IL-15 (y la proteína que contiene el fragmento funcional del receptor IL-15) como se especifica en las reivindicaciones, en donde el fragmento funcional del receptor IL-15 incluye un fragmento que contiene la región extracelular del receptor IL-15 o una proteína de fusión que contiene la región extracelular del receptor IL-15. “Complejo de proteína IL-15 3” se refiere al complejo de proteínas 3 descrito en el documento WO 2016/095642, que es un complejo de proteínas formado por IL-15 mutada (L52C) unido a IL-15R α -Sushi+(S40C)-Fc, en donde IL-15 tiene mutación L52C, región extracelular IL-15R α tiene mutación S40C (IL-15R α -Sushi) e IL-15R α -Sushi+ (S40C) se fusiona con Fc.

20 IL-15(L52C) (ID DE SEC. N.º: 1);

25 **NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISC
ESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECELEEKNKEFLQSFVHIVQ
MFINTS**

IL-15R α -Sushi+(S40C)-Fc (ID DE SEC. N.º: 2):

30 **ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTCSLTECVLNKATN
VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP
35 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
40 DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

45 Los métodos para producir y purificar proteínas son bien conocidos en la técnica, tales como Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Capítulos 5-8 y 15. El complejo de proteínas de la divulgación se produce mediante métodos de ingeniería genética convencionales.

El complejo de proteínas genomanipuladas de la presente divulgación se puede preparar y purificar por métodos convencionales. Por ejemplo, la secuencia de ADNc que codifica la IL-15 y el receptor de la IL-15 se puede clonar y recombinar en el vector de expresión de GS. El vector de expresión de proteína recombinante se puede transfectar de forma estable en células CHO. Como una técnica anterior recomendada, los sistemas de expresión de mamíferos pueden dar como resultado la glicosilación de proteínas, particularmente en el sitio N-terminal altamente conservado de la región Fc. Los clones estables pueden obtenerse mediante la expresión de proteínas que se unen específicamente a la IL-15 humana. Los clones positivos se expanden en medio libre de suero en un biorreactor para producir un complejo de proteínas. El medio de cultivo en el que se secreta la proteína puede purificarse mediante una técnica convencional. Por ejemplo, la purificación se lleva a cabo usando una columna de A o G Sepfrosa FF que contiene tampón ajustado. Los componentes no unidos específicamente se lavan. El complejo proteico unido se eluye por un gradiente de pH, y la fracción de proteínas se detecta mediante SDS-PAGE y se recoge. El complejo de proteínas puede concentrarse por filtración con un método convencional. Las mezclas y multímeros solubles también pueden eliminarse mediante métodos convencionales tales como tamices moleculares, intercambio iónico. El producto resultante debe congelarse inmediatamente, tal como a -70 °C, o liofilizado.

60 La “identidad” de la secuencia de aminoácidos se refiere a la similitud de secuencia entre dos proteínas o polipéptidos. Cuando las posiciones en dos secuencias a comparar están ocupadas por el mismo residuo de aminoácido, por ejemplo, si las posiciones en dos polipéptidos están ocupadas por el mismo residuo de aminoácido, las moléculas se consideran idénticas en esa posición. Los ejemplos de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y el porcentaje de similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se

describen en Altschul y col. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 y Altschul y col. (1977) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, respectivamente. El Software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

“Administración” y “tratamiento”, cuando se aplican a animales, seres humanos, sujetos experimentales, células, tejidos, órganos o fluidos biológicos, se refieren al contacto de un fármaco exógeno, agente terapéutico, agente de diagnóstico o composición con el animal, ser humano, sujeto, célula, tejido, órgano o fluido biológico. “Administración” y “tratamiento” pueden referirse, por ejemplo, a métodos terapéuticos, farmacocinéticos, de diagnóstico, de investigación y experimentales. El tratamiento de células incluye poner en contacto los reactivos con las células y poner en contacto los reactivos con el fluido, en el que los fluidos están en contacto con las células. La “administración” y el “tratamiento” también significan tratar, por ejemplo, células *in vitro* y *ex vivo* con reactivos, diagnósticos, composiciones de unión o con otra célula. “Tratamiento”, cuando se aplica a sujetos humanos, veterinarios o de investigación, se refiere a tratamientos terapéuticos, medidas profilácticas o preventivas, aplicaciones de investigación y diagnóstico.

“Tratamiento” significa la administración de un agente terapéutico a un paciente para uso interno o externo, por ejemplo, una composición que comprende cualquiera de los compuestos de unión de la presente divulgación, el paciente tiene uno o más síntomas de la enfermedad, y se sabe que el agente terapéutico tiene efecto terapéutico sobre estos síntomas. Generalmente, un agente terapéutico se administra a un sujeto o población a tratar en una cantidad para aliviar eficazmente uno o más síntomas de la enfermedad, para inducir la degeneración de los síntomas o inhibir la progresión de dichos síntomas en cualquier grado clínicamente medible. La cantidad de agente terapéutico para aliviar eficazmente el síntoma de cualquier enfermedad particular (también denominada “cantidad terapéuticamente eficaz”) puede variar dependiendo de una variedad de factores, tales como el estado de enfermedad del paciente, la edad y el peso, y la capacidad del fármaco para producir un efecto deseado en el paciente. Cualquier método de prueba clínica usado comúnmente por un médico u otro proveedor profesional de atención médica para evaluar la gravedad o progresión de las afecciones puede usarse para evaluar si se han aliviado los síntomas de una enfermedad. Si bien los métodos de tratamiento o producto pueden ser ineficaces para mejorar los síntomas de la enfermedad diana única, deben aliviar los síntomas de la enfermedad diana en un número estadísticamente significativo de pacientes según con cualquier prueba estadística conocida en la técnica, tal como la prueba t de Student, prueba de chi-cuadrado, prueba U de Mann y Whitney, prueba de Kruskal-Wallis (prueba H), prueba de Jonckheere-Terpstra y prueba de Wilcoxon.

Una “cantidad eficaz” incluye una cantidad suficiente para mejorar o prevenir síntomas o condiciones de una enfermedad médica. Una cantidad eficaz también significa una cantidad suficiente para permitir o facilitar el diagnóstico. La cantidad efectiva para un paciente o sujeto veterinario en particular puede variar dependiendo de factores tales como la condición a tratar, la salud general del paciente, el método, vía y dosificación de la administración, y la gravedad de los efectos secundarios. Una cantidad eficaz puede ser la dosis máxima o el régimen de dosificación que evita efectos secundarios o efectos tóxicos significativos.

II. Ejemplos y ejemplos de prueba

La descripción se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los métodos experimentales, para los cuales las condiciones específicas no se indican específicamente en los siguientes ejemplos o ejemplos de prueba, se realizaron generalmente según condiciones convencionales o según las condiciones recomendadas por los fabricantes. Véase J. Sambrook y col., *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Frederick M. Ausubel, *The Modern Molecular Biology Method*, Greene Press Association. Los reactivos, para los cuales la fuente no se indica específicamente, se adquirieron de forma rutinaria del mercado.

Procedimiento para preparar una composición farmacéutica (formulación) que comprende el complejo de proteína IL-15

Ejemplos

El proceso para preparar una composición farmacéutica (formulación) que comprende el complejo de proteína IL-15 es el siguiente (los componentes y composiciones de cada formulación pueden seleccionarse y ajustarse en base a la estabilidad del complejo de proteínas):

La primera etapa: preparar una solución madre que comprende el complejo de proteína IL-15 3 (para la preparación, expresión y purificación del complejo de proteína IL-15 3, véase el documento WO 2016/095642 depositada el 17 de noviembre de 2015, con el número de solicitud de PCT/CN 2015/094780) y componentes estabilizadores, filtrado y luego muestreo de la solución para la prueba de esterilidad. La solución madre se pasó a través de un filtro de PVDF de 0,22 µm y el filtrado se recogió.

El complejo 3 de proteína IL-15 consiste en los siguientes polipéptidos:

IL-15(L52C) (ID DE SEC. N.º: 1):

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISC
ESGDASIHTVENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEEKNIKEFLQSFVHIVQ
MFINTS

IL-15R α -Sushi+(S40C)-Fc (ID DE SEC. N.º: 2):

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTCSLTECVLNKATN
VAHWTTPSLKCIRDPAHVHQRGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

La segunda etapa: ajustar el volumen de carga a 1,1 ml, el filtrado se llenó en un vial de 2 ml, con un tapón tapado completamente. Los ejemplos se realizan al comienzo, el medio y el final del llenado, respectivamente, para controlar la diferencia de carga.

La tercera etapa: la solución líquida con un tapón se llenó en una cámara de liofilización y se liofilizó. La liofilización incluye etapas de pre-congelación, secado primario y secado secundario, sucesivamente. Cuando termina el procedimiento de liofilización, el tapón se conecta completamente al vacío.

La cuarta etapa: tapar con un tapón de aluminio mediante el uso de una máquina de sellado.

La quinta etapa: Se realizó una inspección visual para confirmar la ausencia del producto de colapso, preciso del volumen de carga y otros defectos. La etiqueta del vial se imprimió y se pegó sobre el vial. Los viales se colocaron en una bandeja de papel, imprimiendo y pegando una etiqueta sobre la bandeja de papel.

Ejemplo 1

Las formulaciones del complejo 3 de proteína IL-15, a una concentración de 1 mg/ml, se prepararon en una serie de tampones de pH 5,0-8,5. Cada formulación se filtró y se cargó en un vial de 2 ml a 1 ml/vial, se tapó con un tapón, se cubrió y se selló. Las muestras se sometieron a pruebas de degradación forzada, tal como mediante la colocación a 40 °C de alta temperatura, congelación-descongelación repetida y agitación. Se usaron aspecto y SEC como índices de evaluación. Los resultados mostraron que la pureza del monómero SEC en cada sistema tampón disminuyó significativamente después de la prueba de degradación forzada a 40 °C. Sin embargo, la disminución del sistema de citrato fue la menor. Después de agitar, congelar-descongelar, la SEC en cada sistema tampón (excepto el sistema de fosfato) no mostró ningún cambio significativo en comparación con la del D0. Por lo tanto, se seleccionó citrato como sistema tampón. Para el sistema de citrato, a pH 6,0, la apariencia después de la congelación-descongelación y SEC a 40 °C fue ligeramente peor. Por lo tanto, las condiciones a pH 5,0 a 5,5 fueron mejores.

Tabla 1. Resultados del sistema tampón de selección del pH para el complejo de proteína IL-15 3 Nota: N/A significa ninguna operación especial.

Número de lote, tipo y pH del tampón	Condiciones	Tiempos	Aspecto	SEC (%)		
				Polímero	Monómero	Fragmento
1 Tampón 10 mM pH 5,0	N/A	0	transparente	0,3	96,7	3,0
	40 °C	17 días	transparente	0,2	90,1	9,7
	congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,4	96,7	2,9
	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,2	96,7	3,1
2 10 mM	N/A	0	transparente	0,5	96,7	2,8
	40 °C	17 días	transparente	0,4	88,0	11,6
		5 veces		0,5	96,6	2,9

	Número de lote, tipo y pH del tampón	Condiciones	Tiempos	Aspecto	SEC (%)		
					Polímero	Monómero	Fragmento
5	Tampón succinato	congelación-descongelación		partículas pequeñas y suspendidas			
	pH 5,5	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,3	96,6	3,1
10	3	N/A	0	transparente	0,6	96,4	3,1
	10 mM	40 °C	17 días	transparente	0,4	90,1	9,5
	Tampón succinato	congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,6	96,4	3,0
15	pH 6,0	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,3	96,8	2,9
	4		0	transparente	0,5	96,9	2,6
		40 °C	17 días	transparente	0,4	93,3	6,3
20	Tampón citrato 10 mM	congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,6	96,4	3,1
	pH 5,0	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,3	96,7	3,0
25	5	N/A	0	transparente	0,6	96,4	3,0
		40 °C	17 días	transparente	0,3	93,9	5,8
	Tampón citrato 10 mM	congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,6	96,5	2,9
30	pH 5,5	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,4	96,6	3,1
	6	N/A	0	transparente	0,6	96,3	3,2
		40 °C	17 días	transparente	0,3	92,5	7,1
35	Tampón citrato 10 mM	congelación-descongelación	5 veces	partículas pequeñas y suspendidas	0,6	96,7	2,7
	pH 6,0	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,4	96,6	3,0
40	7	N/A	0	transparente	0,5	96,9	2,6
		40 °C	17 días	transparente	0,3	89,4	10,3
	Tampón 10 mM	congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,6	96,4	2,9
45	pH 6,0	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	partículas pequeñas	0,3	97,0	2,7
	8	N/A	0	transparente	0,6	95,9	3,5
50		40 °C	17 días	transparente	N/A	N/A	N/A
	Tampón 10 mM	congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,7	96,1	3,2
55	pH 7,0	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,6	95,2	4,2
	9	N/A	0	transparente	0,6	96,0	3,5
		40 °C	17 días	transparente	N/A	N/A	N/A
60	Tampón 10 mM	congelación-descongelación	5 veces	transparente	1,5	94,5	3,9
	pH 7,5	agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,5	92,8	6,6
65	10	N/A	0	transparente	0,6	95,2	4,2
		40 °C	17 días	transparente	N/A	N/A	N/A

	Número de lote, tipo y pH del tampón	Condiciones	Tiempos	Aspecto	SEC (%)		
					Polímero	Monómero	Fragmento
5	Tampón 10 mM fosfato pH 8,0	congelación-descongelación	5 veces	transparente	1,4	94,6	4,0
		agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,5	90,1	9,4
10	11 10 mM fosfato pH8,5	N/A	0	transparente	0,6	95,0	4,4
		40 °C	17 días	transparente	N/A	N/A	N/A
		congelación-descongelación	5 veces	transparente	1,1	94,8	4,1
15		agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,5	90,5	9,0
20	12 Tampón de histidina 10 mM pH 5,5	N/A	0	transparente	0,3	96,8	2,9
		40 °C	17 días	transparente	0,2	90,8	9,0
		congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,4	96,2	3,4
		agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,2	97,0	2,8
25	13 Tampón de histidina 10 mM pH 6,0	N/A	0	transparente	0,4	97,0	2,6
		40 °C	17 días	transparente	0,4	92,1	7,5
		congelación-descongelación	5 veces	transparente	0,4	97,1	2,5
30		agitación (25 °C 250 rpm)	2 días	transparente	0,3	97,0	2,7

Ejemplo 2

Formulaciones comparativas que comprenden el complejo 3 de proteína IL-15 a una concentración de 1 mg/ml, ácido cítrico-citrato de sodio 10 mM, 60 mg/ml de sacarosa, pH 5,5 se prepararon en tampones que contenían diversas concentraciones de tensioactivo de la siguiente manera:

- (1) 0,2 mg/ml de polisorbato 20
- (2) 0,4 mg/ml de polisorbato 20
- (3) 0,2 mg/ml de polisorbato 80
- (4) 0,4 mg/ml de polisorbato 80

Cada formulación se filtró y se cargó en un vial de 2 ml a 1 ml/vial, se tapó con un tapón, se cubrió y se selló. Las muestras se sometieron a pruebas de degradación forzada, tal como mediante la colocación a 40 °C de alta temperatura y la congelación-descongelación repetida. Los resultados de la estabilidad mostraron que no había diferencias significativas en la apariencia y SEC entre diferentes formulaciones. Los resultados obtenidos bajo la condición de 40 °C de temperatura alta y CE-SDS no reducido por congelación-descongelación mostraron que la estabilidad en el grupo de polisorbato 20 de 0,4 mg/ml es más superior.

Tabla 2. Resultados del cribado Tween para la estabilidad del complejo 3 de proteínas IL-15

Tipo y concentración de Tween	Condiciones experimentales	SEC (%)			CE-SDS no reducidos (%)	Aspecto
		Polímero	Monómero	Fragmento		
0, 2 mg/ml de polisorbato 20	0	0,1	97,8	2,0	87,3	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,1	96,8	3,1	87,8	partículas extremadamente pequeñas
	40 °C durante 14 días	0,1	95,5	4,3	81,1	transparente

Tipo y concentración de Tween	Condiciones experimentales	SEC (%)			CE-SDS no reducidos (%)	Aspecto
		Polímero	Monómero	Fragmento		
0, 4 mg/ml de polisorbato 20	0	0,2	97,4	2,5	86,4	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,1	97,0	2,9	89,5	partículas extremadamente pequeñas
	40 °C durante 14 días	0,1	95,6	4,3	82,8	transparente
0, 2 mg/ml de polisorbato 80	0	0,2	97,4	2,4	85,3	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,1	97,1	2,8	87,5	partículas extremadamente pequeñas
	40 °C durante 14 días	0,2	95,3	4,5	80,9	transparente
0, 4 mg/ml de polisorbato 80	0	0,2	97,4	2,4	86,0	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,2	96,9	3,0	88,1	partículas extremadamente pequeñas
	40 °C durante 14 días	0,1	95,4	4,4	82,0	transparente

Ejemplo 3

Se prepararon formulaciones farmacéuticas que comprenden el complejo 3 de proteína IL-15 a una concentración de 1 mg/ml, ácido cítrico-citrato de sodio 10 mM en tampones (pH 5,5) que contenían α , α -trehalosa dihidrato y sacarosa, respectivamente. Cada formulación se filtró y se cargó en un vial de 2 ml a 1 ml/vial, se tapó con un tapón, se cubrió y se selló. Las muestras se sometieron a pruebas de degradación forzada, tal como mediante la colocación a 40 °C de alta temperatura y la congelación-descongelación repetida. Los resultados mostraron que la estabilidad del complejo 3 de proteína IL-15 en el sistema de trehalosa es superior a la del sistema de sacarosa.

Tabla 3. Resultados de los azúcares de cribado para la estabilidad del complejo 3 de proteínas IL-15

Tipo y concentración de sacáridos	Condiciones experimentales	SEC (%)			CE-SDS no reducidos (%)	Aspecto
		Polímero	Monómero	Fragmento		
6 % trehalosa	0	0,2	97,5	2,3	87,2	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,2	97,0	2,8	88,9	partículas extremadamente finas
	40 °C durante 14 días	0,3	95,0	4,7	82,5	partícula filamentosa
9 % de trehalosa	0	0,1	97,6	2,3	85,3	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,2	96,8	3,0	88,7	partículas extremadamente finas
	40 °C durante 14 días	0,1	95,3	4,6	85,6	partícula filamentosa
6 % sacarosa	0	0,1	97,4	2,4	84,9	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,2	96,9	2,9	87,8	partículas extremadamente finas
	40 °C durante 14 días	0,2	95,4	4,4	81,7	partícula filamentosa
9 % sacarosa	0	0,2	97,3	2,5	86,7	transparente
	congelación-descongelación 5 veces	0,2	96,8	3,0	87,5	partículas extremadamente finas

Tipo y concentración de sacáridos	Condiciones experimentales	SEC (%)			CE-SDS no reducidos (%)	Aspecto
		Polímero	Monómero	Fragmento		
	40 °C durante 14 días	0,2	94,8	5,0	79,9	partícula filamentosa

Nota: En la presente descripción, el 6 % de trehalosa es de 60 mg/ml; y 9 % es 90 mg/ml.

Ejemplo 4: Optimización de la formulación

Para optimizar aún más la concentración de trehalosa y polisorbato 20, la fuerza iónica y el pH, se diseñó el experimento DOE mediante el uso del software JMP, y se obtuvo una serie de formulaciones mediante el uso del modelo RSM, en donde la concentración de proteína fue de 1 mg/ml. La solución se sometió a un método de degradación forzada, en el que SEC y CE-SDS no reducidos se usaron como índices de evaluación, y los resultados se analizaron estadísticamente mediante prueba de mínimos cuadrados. Los parámetros del DOE se muestran en la Tabla 4. Las formulaciones de prueba y los resultados se mostraron en las Tablas 5 y 6. Los resultados del análisis estadístico se muestran en las Figuras 1 a 3.

Tabla 4. Factores y niveles diseñados en el DOE

Factor	Nivel	Respuesta
pH	5,0 - 6,0	40 °C durante 20 días, congelación-descongelación 5 veces con agitación (300 rpm, 4 °C)
fuerza iónica	10 - 30 mM	
trehalosa	6~9 %	
polisorbato 20	0,1 - 0,6 mg/ml	SEC, CE-SDS (no reducido)

Tabla 5. Formulaciones de la proteína de IL-15 complejo 3 diseñadas por DOE

N.º	Tampón	pH	Fuerza iónica (mM)	Concentración de sacárido (%)	Concentración de polisorbato 20 mg/ml
01	ácido cítrico-citrato sódico	5	10	9	0,6
02		5	30	9	0,6
03		6	20	6	0,1
04		5,5	30	7,5	0,35
05		6	10	6	0,6
06		5,5	20	7,5	0,35
07		5,5	20	9	0,6
08		6	30	9	0,1
09		5	20	7,5	0,6
10		5	10	6	0,35
11		5,5	30	6	0,6
12		6	30	7,5	0,6
13		5	20	9	0,1
14		5	30	6	0,1
15		5,5	10	7,5	0,1
16		6	10	9	0,35

Nota: En la presente descripción, el 6 % de trehalosa es de 60 mg/ml; y 9 % es 90 mg/ml. Otras unidades se convierten de una manera similar.

Tabla 6. Resultados de las formulaciones cribadas por DOE

N.º	Pureza del monómero SEC (%)				CE-SDS no reducidos (%)			
	0	Congelación-descongelación 5 veces	40 °C durante 20 días	Agitación durante 15 días	0	Congelación-descongelación 5 veces	40 °C durante 20 días	Agitación durante 15 días
01	96,0	97,0	92,1	95,8	94,1	94,9	90,3	92,1
02	95,9	96,9	92,5	96,3	94,7	95,6	90,8	93,4
03	96,1	96,6	91,3	93,6	92,0	92,9	88,4	89,8
04	96,1	96,9	91,9	96,2	93,6	94,2	90,5	92,3
05	96,0	96,8	92,0	95,9	92,8	93,9	89,4	90,1
06	96,4	97,0	93,8	96,3	93,3	94,5	90,3	91,6
07	96,1	97,2	92,1	96,0	93,6	94,7	91,0	92,0
08	95,8	96,5	92,7	95,9	91,8	93,2	89,0	90,6
09	96,3	96,6	93,0	96,7	94,7	94,9	90,9	93,8
10	96,4	96,9	91,6	95,9	94,1	94,5	90,6	91,8
11	96,0	96,7	93,6	96,2	93,9	94,8	91,3	93,1
12	96,4	96,6	92,9	95,6	93,0	93,9	90,0	91,4
13	96,1	96,5	92,9	94,4	94,2	94,1	89,9	92,4
14	96,0	96,7	92,7	93,4	94,5	94,8	90,7	93,2
15	95,6	96,5	94,1	94,0	93,3	93,7	90,8	90,7
16	95,9	96,8	91,0	95,4	92,4	93,3	89,2	89,6

Los datos obtenidos de la degradación forzada se ajustaron y los resultados fueron los siguientes:

Se ajustaron la diferencia en los valores de la pureza del monómero SEC entre D0 y D15 (después de agitar) (el valor de diferencia se considera 0, cuando es negativo), $R^2 > 0,99$, $P < 0,05$, el modelo fue válido. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Usando CE-SDS no reducido, se ajustaron la diferencia en valores de pureza entre D0 y D15 (después de agitar), $R^2 > 0,98$, $P < 0,05$ y el modelo fue válido. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Para otros datos, el ajuste no fue válido.

Para garantizar una buena compactabilidad y una osmolalidad adecuada de la formulación liofilizada, la concentración de la trehalosa se estableció en $7,5 \pm 0,5$ % (75 ± 5 mg/ml). Se encontró que la fuerza iónica 10 ± 2 mM tenía suficiente capacidad de tamponamiento.

La concentración de trehalosa se estableció en 7,5 % (75 mg/ml), la fuerza iónica se estableció en 10 mM, el pH se representó en la abscisa, la concentración de polisorbato se representó gráficamente en la ordenada, y se representó gráficamente un mapa de contorno para mostrar la diferencia en valores de SEC después de agitar y CE-SDS no reducido. Los resultados se muestran en la Figura 3. Basándose en los resultados mostrados en la figura junto con el punto isoeléctrico del complejo de proteínas, se puede observar que un intervalo de pH preferido para la formulación es de pH 5,15 a pH 5,25, y la concentración de polisorbato es 0,4 - 0,6 mg/ml.

Ejemplo 5

El complejo 3 de proteína IL-15 se formuló a 1,0 mg/ml en ácido cítrico-citrato de sodio 10 mM (pH 5,2), 75 mg/ml de α , α -trehalosa dihidrato, 0,5 mg/ml de polisorbato 20, pH 5,2. La proteína se llenó en un vial de 2 ml a 1,1 ml/vial, se liofilizó a una temperatura de secado primario de -25 °C, -20 °C y -15 °C, respectivamente, y se selló con un tapón de goma liofilizado para el ensayo. Los resultados mostraron que la apariencia de todas las soluciones reconstituidas a varias temperaturas cumplieron los requisitos, y la apariencia de la formulación liofilizada a -25 °C fue mejor, y la torta de polvo estaba llena sin colapso.

Tabla 7. Etapas para la liofilización de la formulación

Parámetros para el proceso de liofilización	Temperatura (°C)	Grado de vacío (mBar)
precongelación	5	N/A

Parámetros para el proceso de liofilización	Temperatura (°C)	Grado de vacío (mBar)
	-45	N/A
secado primario	-25	0,08
secado secundario	25	0,01

Ejemplo 6

El complejo 3 de proteína IL-15 se formuló a 1,0 mg/ml en ácido cítrico-citrato de sodio 10 mM (pH 5,2), 75 mg/ml de α , α -trehalosa dihidrato, 0,5 mg/ml de polisorbato 20, pH 5,2. Las formulaciones se llenaron en viales de vidrio, bolsas de almacenamiento de líquidos y tanques de acero inoxidable 316L, respectivamente, y se colocaron a 2-8 °C y 25 °C, respectivamente durante 24 horas. El análisis de aspecto, pH, contenido de proteínas y pureza indicó que el complejo 3 de proteína IL-15 fue estable en 24 horas. La formulación fue compatible con viales de vidrio, tanques de acero inoxidable y bolsas de almacenamiento de líquidos.

Tabla 8. Estabilidad del complejo 3 de proteína IL-15 en diversos materiales de contacto

Temperatura	Agrupación	Tiempo (h)	Aspecto	pH	Contenido (mg/ml)	Pureza del monómero SEC (%)	CE-SDS no reducido (%)
2 - 8 °C	vidrio	0	transparente	5,28	1,043	99,83	96,4
		8	transparente	5,27	1,031	99,84	96,2
		24	transparente	5,28	1,030	99,82	96,0
	bolsas de almacenamiento de líquido	8	transparente	5,27	1,049	99,80	96,6
		24	transparente	5,27	1,027	99,82	96,1
	acero inoxidable	8	transparente	5,27	1,046	99,82	96,6
		24	transparente	5,27	1,056	99,90	95,3
25 °C	vidrio	8	transparente	5,28	1,032	99,83	96,9
		24	transparente	5,28	1,026	99,79	95,3
	bolsas de almacenamiento de líquido	8	transparente	5,28	1,029	99,84	97,0
		24	transparente	5,25	1,034	99,78	96,6
	acero inoxidable	8	transparente	5,29	1,032	99,76	96,0
		24	transparente	5,27	1,057	99,88	95,0

Ejemplo 7

Otras composiciones farmacéuticas alternativas (formulaciones) o soluciones reconstituidas Las formulaciones farmacéuticas estables que se proporcionan además comprenden:

(1) 5 mg/ml de complejo de proteína IL-15 3, 75 mg/ml de trehalosa, 0,5 mg/ml de polisorbato 20 y tampón 10 mM de ácido cítrico-citrato de sodio, con pH final de 5,2;

(2) 10 mg/ml de complejo 3 de proteína IL-15, 75 mg/ml de trehalosa, 0,5 mg/ml de polisorbato 20 y tampón 10 mM de ácido cítrico-citrato sódico, con pH final de 5,2;

(3) 10 mg/ml de complejo de proteína IL-15 3, 75 mg/ml de sacarosa, 0,5 mg/ml de polisorbato 20 y tampón 10 mM de ácido cítrico-citrato de sodio, con pH final de 5,25;

(4) 0,9 mg/ml de complejo de proteína IL-15 3, 60 mg/ml de trehalosa, 0,1 mg/ml de polisorbato 20 y tampón 20 mM de ácido cítrico-citrato de sodio (pH 5,0) (comparativo);

(5) 1 mg/ml de complejo de proteína IL-15 3, 75 mg/ml de trehalosa, 0,5 mg/ml de polisorbato 20 y tampón 10 mM de ácido cítrico-citrato de sodio (pH 5,2);

(6) 1,1 mg/ml de complejo de proteína IL-15 3, 90 mg/ml de trehalosa, 0,6 mg/ml de polisorbato 20 y tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 30 mM (pH 5,5);

ES 2 950 570 T3

(7) 0,9 mg/ml del complejo 3 de proteína IL-15, 60 mg/ml de trehalosa, 0,1 mg/ml de polisorbato 20 y tampón 20 mM de ácido cítrico-citrato sódico, con pH final de 5,0 (comparativo);

5 (8) 1,1 mg/ml del complejo 3 de proteína IL-15, 90 mg/ml de trehalosa, 0,6 mg/ml de polisorbato 20 y tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 30 mM, con pH final de 5,5;

(9) de 0,5 mg/ml de complejo de proteína IL-15 3, 65 mg/ml de trehalosa, 0,3 mg/ml de polisorbato 20 (pH 5,3) y tampón de ácido cítrico-citrato de sodio 15 mM (comparativo).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, que comprende:
 - (a) 1 mg/ml a 10 mg/ml de complejo de proteína IL-15
 - (b) tampón de citrato 5 mM a 30 mM, pH 5,0 a 6,0;
 - (c) 60 mg/ml a 90 mg/ml de trehalosa; y
 - (d) 0,1 mg/ml a 0,6 mg/ml de polisorbato 20;
- en donde el complejo de proteína IL-15 consiste en IL-15 que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de ID DE SEC. N.º:1 y una proteína de fusión del receptor IL-15 que tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con el polipéptido de ID DE SEC. N.º:2.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la concentración del complejo de proteína IL-15 en la composición farmacéutica es de 1 mg/ml a 5 mg/ml, preferiblemente de 1,0 mg/ml a 1,1 mg/ml, y más preferiblemente 1 mg/ml; y/o en donde el pH de la composición farmacéutica es de 5,0 a 6,0, preferiblemente de 5,0 a 5,5, más preferiblemente de 5,15 a 5,25, y lo más preferiblemente 5,2.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1 o 2, en donde la concentración del tampón citrato es de 5 mM a 20 mM, preferiblemente de 8 mM a 12 mM, y más preferiblemente de 10 mM, y particularmente en donde el pH del tampón citrato es de 5,0 a 5,5, preferiblemente de 5,15 a 5,25, y más preferiblemente 5,2.
4. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración de trehalosa es de 70 mg/ml a 80 mg/ml, y preferiblemente 75 mg/ml.
5. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la concentración de polisorbato 20 es de 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml, y preferiblemente 0,5 mg/ml.
6. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
 - (a) 1 mg/ml de complejo de proteína IL-15
 - (b) tampón de citrato de 8 mM a 12 mM;
 - (c) 70 mg/ml a 80 mg/ml de trehalosa; y
 - (d) 0,4 mg/ml a 0,6 mg/ml de polisorbato 20;
 con el pH de la composición farmacéutica de 5,15 a 5,25; y preferiblemente comprende:
 - (a) 1 mg/ml de complejo de proteína IL-15
 - (b) tampón de citrato 10 mM;
 - (c) 75 mg/ml de trehalosa; y
 - (d) 0,5 mg/ml de polisorbato 20;
 siendo el pH de la composición farmacéutica de 5,15 a 5,25, y preferiblemente 5,2.
7. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el complejo de proteína IL-15 consiste en IL-15 de ID DE SEC. N.º:1 y una proteína de fusión del receptor IL-15 de ID DE SEC. N.º:2.
8. Un método para preparar la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una etapa de mezclar el complejo de proteína IL-15 con el tampón de citrato, y particularmente comprende además una etapa de adición de trehalosa y polisorbato 20.
9. Un método para preparar una formulación liofilizada que comprende un complejo de proteína IL-15, que comprende una etapa de liofilización de la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y particularmente en donde la etapa de liofilización comprende etapas sucesivas de pre-congelación, secado primario y secado secundario.
10. Una formulación liofilizada que comprende un complejo de proteína IL-15 preparado por el método de la reivindicación 9.
11. Un método para preparar una solución reconstituida que comprende un complejo de proteína IL-15, que comprende una etapa de reconstituir la formulación liofilizada de la reivindicación 10, en donde el solvente usado para la reconstitución es preferiblemente agua para inyección.

12. Una solución reconstituida que comprende un complejo de proteína IL-15 preparado mediante el método de la reivindicación 11.
- 5 13. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la formulación liofilizada según la reivindicación 10 o la solución reconstituida según la reivindicación 12 para su uso en el tratamiento de enfermedades o afecciones relacionadas con la IL-15 siendo seleccionadas del grupo que consiste en enfermedad infecciosa, cáncer, enfermedad arterial, enfermedad inflamatoria y enfermedad autoinmune, en donde:
 - 10 el cáncer se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de piel, linfoma, carcinoma de células renales, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de estómago y cáncer de mama;
 - 15 la enfermedad infecciosa se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en infección por el virus de la viruela, infección por VIH, infección bacteriana, infección fúngica e infección por el VHB
 - la enfermedad sanguínea se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en anemia, leucemia mieloide aguda, síndrome mielodisplásico y leucemia linfocítica granulosa; y
 - la enfermedad autoinmune se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en esclerosis múltiple, psoriasis, artritis reumatoide, gastritis y mucositis.
- 20 14. La composición farmacéutica o formulación liofilizada o solución reconstituida para el uso según la reivindicación 13, el uso comprende la administración junto con un inhibidor de molécula pequeña o un fármaco de anticuerpo, en donde:
 - 25 el inhibidor de molécula pequeña es preferiblemente un fármaco quimioterapéutico dirigido o un fármaco radioterapéutico, y más preferiblemente un agente alquilante; y
 - el fármaco de anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal de anticuerpo, y más preferiblemente un anticuerpo anti-CD20, anti-PD1, anti-PDL1, anti-Her2, anti-EGFR o anti-c-MET.
- 30 15. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la formulación liofilizada según la reivindicación 10 o la solución reconstituida según la reivindicación 12 para su uso en inmunoterapia celular para células tumorales seleccionadas del grupo que consiste en inmunoterapia de células dendríticas, inmunoterapia de células asesinas inducidas por citocinas, inmunoterapia de células asesinas inducidas por células dendríticas, inmunoterapia de células asesinas inducidas por citocinas mejoradas, inmunoterapia de células asesinas naturales, inmunoterapia de células T estimuladas con antígeno combinado, inmunoterapia de células T inespecíficas de unión a antígeno, inmunoterapia de células T modificadas por receptor de células T e inmunoterapia de células T del receptor de antígeno quimérico.
- 35

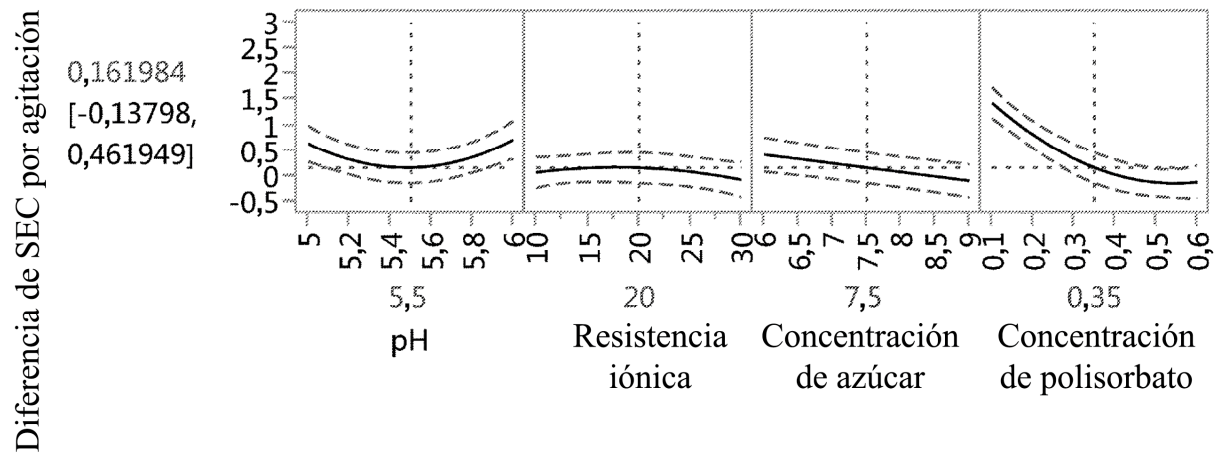


Figura 1

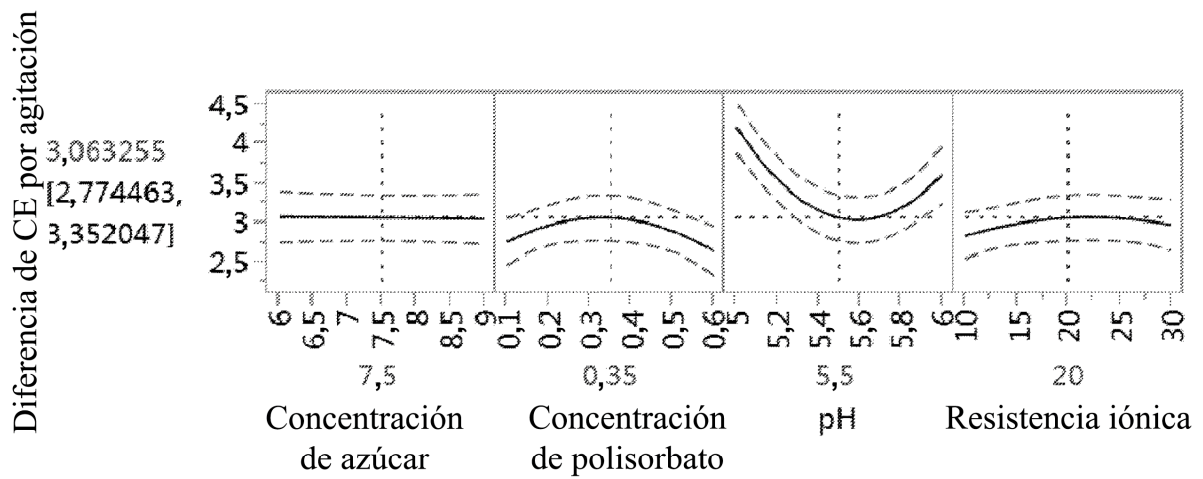


Figura 2

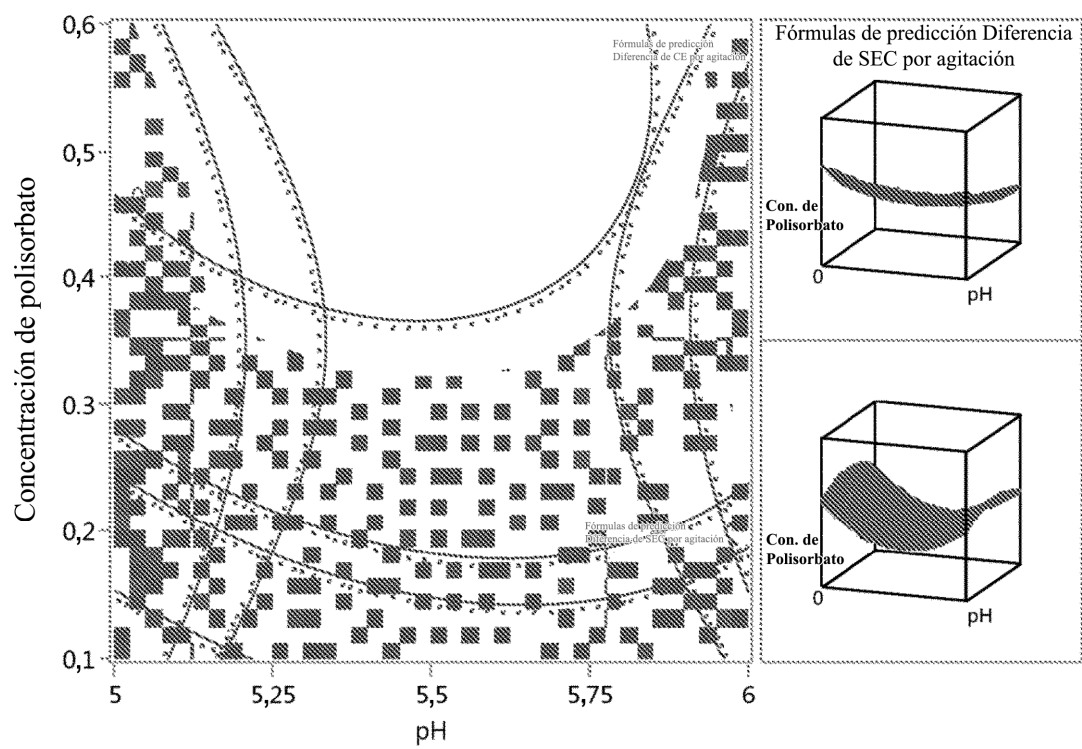


Figura 3