

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 5 月 19 日 (19.05.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/100686 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 38/21 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01) **A61P 37/00** (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/130277

(22) 国际申请日: 2021 年 11 月 12 日 (12.11.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202011269123.7 2020 年 11 月 13 日 (13.11.2020) CN

(71) 申请人: 江苏恒瑞医药股份有限公司 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。上海恒瑞医药有限公司 (SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市闵行区文井路 279 号, Shanghai 200245 (CN)。上海盛迪医药有限公司 (SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区张江镇海科路 1288 号, Shanghai 201210 (CN)。

(72) 发明人: 杨晓容 (YANG, Xiaorong); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。陈钟威 (CHEN, Zhongwei); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。王淇 (WANG, Qi); 中国江苏省连云港市经济技术开发区昆仑山路 7 号, Jiangsu 222047 (CN)。

(74) 代理人: 北京戈程知识产权代理有限公司 (GE CHENG & CO., LTD); 中国北京市东城区东长安街 1 号东方广场东三办公楼 19 层程伟, Beijing 100738 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,

GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 关于申请人有权要求在先申请的优先权 (细则 4.17(iii))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第 21 条 (3))。
— 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) **Title:** A PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING HUMAN IL-2 VARIANT OR DERIVATIVE AND USE THEREOF

(54) **发明名称:** 一种包含人白细胞介素 2 变体或其衍生物的药物组合物及其用途

(57) **Abstract:** The present disclosure relates to a pharmaceutical composition comprising a human IL-2 variant or derivative and use thereof. In particular, the disclosure relates to a pharmaceutical composition comprising an IL-2 variant or derivative and a pharmaceutically acceptable excipient. The pharmaceutical composition has improved high temperature stability, freeze-thaw stability and normal temperature stability as well as appearance formulation reproducibility.

(57) **摘要:** 本公开涉及一种包含人白细胞介素 2 变体或其衍生物的药物组合物及其用途。具体而言, 本公开涉及一种包含 IL-2 变体或其衍生物以及药学上可接受的赋形剂的药物组合物。所述药物组合物具有改进的高温、冻融及常温稳定性、外观制剂重现性。



WO 2022/100686 A1

一种包含人白细胞介素 2 变体或其衍生物的药物组合物及其用途

本申请要求 2020 年 11 月 13 日提交的专利申请（申请号 202011269123.7）的
优先权。

5

技术领域

本公开涉及药物制剂领域，更具体地涉及到一种包含人白细胞介素 2 变体或其衍生物的药物组合物。

10 背景技术

人白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2)，也称为 T 细胞生长因子 (TCGF)。IL-2 的基因位于 4 号染色体 (4q27)，包括约 7kb 的序列，由约 133 个氨基酸组成，分子量约 15kD。

1976 年和 1977 年, Doris Morgan、Francis Ruscetti、Robert Gallo 和 Steven Gillis、
Kendal Smith 等分别发现活化后的 T 细胞培养液可以促进 T 细胞增殖。培养液中的刺激因子被纯化并被鉴定为单一的蛋白质，即 IL-2。IL-2 在体内扩充淋巴细胞群体和提高这些细胞的效应器功能的能力使得其具有抗肿瘤效果。IL-2 免疫疗法成为一些转移性癌症患者的治疗选择。目前，高剂量 IL-2 已被批准用于治疗转移性肾细胞癌和恶性黑素瘤。

目前已有多家制药公司正在研发 IL-2 变体，相关专利申请包括 WO2012062228、CN201280017730.1、US8906356、US9732134、US7371371、US7514073、US8124066、US7803361、WO2016014428 等。例如，WO2020125743 涉及一类新的 IL-2 变体及其衍生物，具有更高稳定性，并具有用作免疫治疗剂的改善特性。

IL-2 变体及其衍生物为蛋白药，口服易降解，具有热不稳定、容易水解的特性。获得稳定、外观优良的制剂具有重要意义。US4604377 描述了冷冻干燥的 IL-2 制剂，它包含稳定剂甘露醇和增溶剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 或者脱氧胆酸硫酸钠。US5417970 描述了包含水解明胶或人血清白蛋白和丙氨酸的 IL-2 冻干制剂。然而，SDS 可能与蛋白结合而难以除去，不利于复性；血清白蛋白市场需求量大，价格昂贵、制备工艺复杂。ZL01814445.4 公开了组氨酸、蔗糖和甘氨酸稳定的 IL-2 制剂，且发现吐温 80 促进可溶性 IL-2 凝聚物形成，在冻干前就有明显的可溶性凝聚物。Wang 等 (Dual effects of Tween 80 on protein stability, W. Wang et al. / International Journal of Pharmaceutics 347 (2008) 31–38) 也发现，虽然 Tween 80 显著抑制摇动诱导的 IL-2 突变蛋白的聚集，但 Tween 80 影响 IL-2 存储稳定性。这种影响与温度有关：在 5℃ 下存储 22 个月，由于 Tween 80 的存在，几乎无法检测到聚集；在 40℃ 下储存 2 个月期间，添加 0.1% Tween 80 可以显著提高储存期间

IL-2 突变蛋白的聚集速率。

此外，外观是冻干制品的重要质量属性之一，合格的冻干制品外观应是疏松多孔、色泽均匀、质地细腻的固体。在大规模生产中，冻干制品的饼块有时会出现收缩、裂化等不合格外观，从而造成极大的经济损失，而辅料成分会影响冻干制品的外观。

本公开根据 IL-2 的药物特性和剂型特点，通过大量的筛选工作，以外观、RP-HPLC\SE-HPLC\IE-HPLC 纯度、稳定性等指标对药物组合物的 pH、缓冲液、赋形剂、表面活性剂等多方面进行了筛选，获得了包含 IL-2 的药物组合物。所述药物组合物具有改进的高温、冻融、常温稳定性，外观良好，制剂重现性好，为实际生产和临床应用提供了具有更优性能的产品。

发明内容

本公开提供一种药物组合物，其包含IL-2、甘露醇和海藻糖。

一些实施方案中，IL-2是野生型IL-2、IL-2变体或其衍生物。

一些实施方案中，上述药物组合物中所述 IL-2 浓度为约 0.1mg/mL 至 100mg/mL，一些具体实施方案中，IL-2 的浓度为约 1mg/mL 至约 50mg/mL、约 1mg/mL 至约 10mg/mL、约 2mg/mL 至约 5mg/mL。

一些具体实施方案中，IL-2 的浓度为约 0.2mg/mL、0.3mg/mL、0.4mg/mL、0.5mg/mL、0.6 mg/mL、0.7 mg/mL、0.8 mg/mL、0.9 mg/mL、1.0 mg/mL、1.1 mg/mL、1.2 mg/mL、1.3 mg/mL、1.4 mg/mL、1.5 mg/mL、1.6 mg/mL、1.7 mg/mL、1.8 mg/mL、1.9 mg/mL、2.0 mg/mL、2.1 mg/mL、2.2 mg/mL、2.3 mg/mL、2.4 mg/mL、2.5 mg/mL、2.6 mg/mL、2.7 mg/mL、2.8 mg/mL、2.9 mg/mL、3.0 mg/mL、3.1 mg/mL、3.2 mg/mL、3.3 mg/mL、3.4 mg/mL、3.5 mg/mL、3.6 mg/mL、3.7 mg/mL、3.8 mg/mL、3.9 mg/mL、4.0 mg/mL、4.1 mg/mL、4.2 mg/mL、4.3 mg/mL、4.4 mg/mL、4.5 mg/mL、4.6 mg/mL、4.7 mg/mL、4.8 mg/mL、4.9 mg/mL、5.0mg/mL、6.0mg/mL、7.0mg/mL、8.0mg/mL、9.0mg/mL、10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、80mg/mL、90mg/mL、100mg/mL。

一些具体实施方案中，IL-2 的浓度为约 2 mg/mL±10%。

甘露醇、海藻糖：

一些实施方案中，本公开的药物组合物中包含糖（saccharide）。所述“糖”包含常规组合物（CH₂O）_n 及其衍生物，包括单糖，二糖，三糖，多糖，糖醇，还原性糖，非还原性糖等等。糖可选自葡萄糖，蔗糖，海藻糖，乳糖，果糖，麦芽糖，右旋糖苷，甘油，赤藻糖醇，丙三醇，阿拉伯糖醇，木糖醇（xylitol），山梨糖醇，甘露醇，密里二糖，松三糖，蜜三糖，甘露三糖，水苏糖，麦芽糖，乳果糖，麦芽酮糖，山梨醇，麦芽糖醇，乳糖醇，异-麦芽酮糖等等。

一些实施方案中，本公开的药物组合物中包括甘露醇、海藻糖。

一些实施方案中，甘露醇的浓度为约 5mg/mL 至约 100mg/mL。

一些具体实施方案中，甘露醇的浓度为约 10mg/mL 至约 50mg/mL、约 15mg/mL 至 40mg/mL、约 20mg/mL 至 35mg/mL、约 25mg/mL 至 40mg/mL、约 25mg/mL 至 35mg/mL。例如 5 mg/mL、6 mg/mL、7 mg/mL、8 mg/mL、9 mg/mL、10 mg/mL、
5 11 mg/mL、12 mg/mL、13 mg/mL、14 mg/mL、15 mg/mL、16 mg/mL、17 mg/mL、
18 mg/mL、19 mg/mL、20 mg/mL、21 mg/mL、22 mg/mL、23 mg/mL、24 mg/mL、
25 mg/mL、26 mg/mL、27 mg/mL、28 mg/mL、29 mg/mL、30 mg/mL、31 mg/mL、
32 mg/mL、33 mg/mL、34 mg/mL、35 mg/mL、36 mg/mL、37 mg/mL、38 mg/mL、
39 mg/mL、40 mg/mL、41 mg/mL、42 mg/mL、43 mg/mL、44 mg/mL、45 mg/mL、
10 46 mg/mL、47 mg/mL、48 mg/mL、49 mg/mL、50 mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、
80mg/mL、90mg/mL 或 100mg/mL。

一些具体实施方案中，甘露醇的浓度为约 30mg/mL。

一些实施方案中，本公开药物组合物中的海藻糖包括无水海藻糖或其水合物。

一些具体实施方案中，海藻糖为海藻糖二水合物。

15 一些实施方案中，海藻糖的用量以无水海藻糖计，浓度为约 10mg/mL 至约 100mg/mL、约 20mg/mL 至约 80mg/mL、约 20mg/mL 至约 60mg/mL、约 30mg/mL 至约 50mg/mL、约 30mg/mL 至 45mg/mL、约 35mg/mL 至 40mg/mL。例如约 10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、40mg/mL、50mg/mL、60mg/mL、70mg/mL、
80mg/mL、90mg/mL 或 100mg/mL。

20 一些具体实施方案中，海藻糖的用量以无水海藻糖计，浓度为约 10 mg/mL、
11 mg/mL、12 mg/mL、13 mg/mL、14 mg/mL、15 mg/mL、16 mg/mL、17 mg/mL、
18 mg/mL、19 mg/mL、20 mg/mL、21 mg/mL、22 mg/mL、23 mg/mL、24 mg/mL、
25 mg/mL、26 mg/mL、27 mg/mL、28 mg/mL、29 mg/mL 、30 mg/mL、31 mg/mL、
32 mg/mL、33 mg/mL、34 mg/mL、35 mg/mL、36 mg/mL、37 mg/mL、38 mg/mL、
25 39 mg/mL、40 mg/mL、41 mg/mL、42 mg/mL、43 mg/mL、44 mg/mL、45 mg/mL、
46 mg/mL、47 mg/mL、48 mg/mL、49 mg/mL、50 mg/mL、51 mg/mL、52 mg/mL、
52.5 mg/mL、53 mg/mL、54 mg/mL、55 mg/mL、56 mg/mL、57 mg/mL、58 mg/mL、
59 mg/mL、60 mg/mL、61 mg/mL、62 mg/mL、63 mg/mL、64 mg/mL、65 mg/mL、
66 mg/mL、67 mg/mL、68 mg/mL、69 mg/mL、70 mg/mL、71 mg/mL、72 mg/mL、
30 73 mg/mL、74 mg/mL、75 mg/mL、76 mg/mL、77 mg/mL、78 mg/mL、79 mg/mL、
80 mg/mL。

一些具体实施方案中，海藻糖的用量以无水海藻糖计，浓度为约 35mg/mL。

一些实施方案中，甘露醇和海藻糖（以无水海藻糖计）的比例为 1：10 至 10：
1、1：7 至 7：1、1：6 至 6：1、1：5 至 5：1、1：4 至 4：1、1：3 至 3：1、1：
35 2 至 2：1、1：7 至 6：7、1：7 至 1：1、1：6 至 6：7、1：6 至 1：1、1：5 至 6：
7、1：5 至 1：1、1：4 至 6：7、1：4 至 1：1、1：3 至 6：7、1：2 至 6：7、1：

2 至 1: 1、6: 8 至 6: 7。例如 1: 10、1: 9、1: 8、1: 7、1: 6、1: 5、1: 4、1: 3、1: 2、1: 1、2: 9、2: 8、2: 7、2: 6、2: 5、2: 4、2: 3、2: 2、2: 1、3: 9、3: 8、3: 7、3: 6、3: 5、3: 4、3: 3、3: 2、3: 1、4: 9、4: 8、4: 7、4: 6、4: 5、4: 4、4: 3、4: 2、4: 1、5: 9、5: 8、5: 7、5: 6、5: 5、5: 4、5: 3、5: 2、5: 1、6: 9、6: 8、6: 7、6: 6、6: 5、6: 4、6: 3、6: 2、6: 1、7: 9、7: 8、7: 7、7: 6、7: 5、7: 4、7: 3、7: 2、7: 1、8: 9、8: 8、8: 7、8: 6、8: 5、8: 4、8: 3、8: 2、8: 1、9: 9、9: 8、9: 7、9: 6、9: 5、9: 4、9: 3、9: 2、9: 1、10: 1、10: 9、10: 8、10: 7、10: 6、10: 5、10: 4、10: 3、10: 2、10: 1。

10 上述甘露醇和海藻糖的比例是质量比，可根据甘露醇和海藻糖的浓度实际换算得到，这种换算方法是本领域公知的。

同样，本公开所述的药物组合物中，IL-2 与甘露醇或海藻糖的质量比也可根据浓度换算得到。

一些实施方案中，IL-2 与甘露醇质量比的范围是 1: 1 至 1: 50，例如 1: 1、1: 2、1: 3、1: 4、1: 5、1: 6、1: 7、1: 8、1: 9、1: 10、1: 15、1: 20、1: 25、1: 30、1: 35、1: 40、1: 45、1: 50。

一些实施方案中，IL-2 与海藻糖质量比的范围是 4: 50 至 4: 150，例如 4: 50、4: 60、4: 70、4: 80、4: 90、4: 105、4: 120、4: 140。

表面活性剂:

20 一些实施方案中，本公开的药物组合物还包含表面活性剂。表面活性剂可选自聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 80、聚羟亚烃、Triton、十二烷基磺酸钠、月桂基磺酸钠、辛基糖甙钠、月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、硬脂基-磺基甜菜碱、月桂基-、肉豆蔻基-、亚油基-、硬脂基-肌氨酸、亚油基-、肉豆蔻基-、鲸蜡基-甜菜碱、月桂酰胺基丙基-、柯卡酰胺基丙基-、亚油酰胺基丙基-、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、异硬脂酰胺基丙基-甜菜碱、肉豆蔻酰胺基丙基-、棕榈酰胺基丙基-、异硬脂酰胺基丙基-二甲基胺、甲基可可酰基钠、甲基油基牛磺酸钠、聚乙二醇、聚丙二醇、乙烯与丙烯二醇的共聚物等等。

一些实施方案中，本公开的药物组合物包含聚山梨酯（例如聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60或聚山梨酯80）。

30 一些具体实施方案中，本公开的药物组合物中包含聚山梨酯80。本公开发现，聚山梨酯可能通过减少蛋白药物的团聚现象的产生，进而起到稳定剂的作用。聚山梨酯（例如聚山梨酯80）浓度为0.01mg/mL至0.2mg/mL、0.02mg/mL至0.15mg/mL、0.02mg/mL至0.1mg/mL、0.03mg/mL至0.1mg/mL、0.04mg/mL至0.1mg/mL、0.02mg/mL至0.05mg/mL、0.05mg/mL至0.1mg/mL；例如约0.01 mg/mL、约0.02mg/mL、约0.03mg/mL、约0.04mg/mL、约0.05mg/mL、约0.06mg/mL、约0.07mg/mL、约0.08mg/mL、约0.09mg/mL、约0.1mg/mL、约0.15mg/mL、约0.2mg/mL。

一些具体实施方案中，聚山梨酯（例如聚山梨酯80）浓度为约0.05mg/mL±10%。

缓冲体系：

一些实施方案中，本公开的药物组合物还包含缓冲液。所述的缓冲液包括例如枸橼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、组氨酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、碳酸缓冲液、琥珀酸盐缓冲液。一些具体实施方案中，所述缓冲液为磷酸盐缓冲体系。

在一些方案中，药物组合物中所述缓冲液浓度为约2 mM至约50mM、约5mM至约40mM、约5mM至约30mM、约5mM至约20mM、约5mM至约15mM、约5mM至约10mM，例如约2 mM、3 mM、4 mM、5 mM、6 mM、7 mM、8 mM、9 mM、10mM、11 mM、12 mM、13 mM、14 mM、15mM、16 mM、17 mM、18 mM、19 mM、20mM、25mM、30mM、40 mM、50 mM。

一些具体实施方案中，药物组合物中所述缓冲液浓度为约10mM±10%。

在一些方案中，药物组合物中所述缓冲液pH为约5.5-约7.5、约5.5-约7.0、约6.0-约7.5、约6.0-约7.0，例如约5.5、6.0、6.5、7.0、7.5，一些具体实施方案中，药物从组合物中所述缓冲液浓度为约5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5。

溶剂：

一些实施方案中，本公开的药物组合物还包含溶剂。

药物组合物中溶剂选自但不限于无毒性的生理学可接受的液体载体，如生理盐水、注射用水、葡萄糖溶液（如5%葡萄糖注射液、葡萄糖氯化钠注射液）等。

此外，本公开还提供包含IL-2的药物组合物，包含但不限于：

（1）药物组合物，其中包含：IL-2，30mg/mL的甘露醇，35mg/mL的海藻糖，和0.05mg/mL的聚山梨醇酯，pH约为6.5，其中所述IL-2的浓度为1mg/mL、2mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或100mg/mL；

（2）药物组合物，其中包含：IL-2，30mg/mL的甘露醇，35mg/mL的海藻糖，和0.1mg/mL的聚山梨醇酯，pH约为6.5，其中所述IL-2的浓度为1mg/mL、2mg/mL、5mg/mL、10mg/mL或100mg/mL；

（3）药物组合物，其中包含：2mg/mL的IL-2，甘露醇，35mg/mL的海藻糖，和0.1mg/mL的聚山梨醇酯，pH约为6.5，其中所述甘露醇的浓度为10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、35mg/mL或50mg/mL；

（4）药物组合物，其中包含：2mg/mL的IL-2，甘露醇，35mg/mL的海藻糖，和0.05mg/mL的聚山梨醇酯，pH约为6.5，其中所述甘露醇的浓度为10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、35mg/mL或50mg/mL；

（5）药物组合物，其中包含：2mg/mL的IL-2，30mg/mL的甘露醇，海藻糖，和0.1mg/mL的聚山梨醇酯，pH约为6.5，其中所述海藻糖的浓度为10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、35mg/mL或50mg/mL；

（6）药物组合物，其中包含：2mg/mL的IL-2，30mg/mL的甘露醇，海藻糖，

和 0.05mg/mL 的聚山梨醇酯，pH 约为 6.5，其中所述海藻糖的浓度为 10mg/mL、20mg/mL、30mg/mL、35mg/mL 或 50mg/mL。

一些实施方案中，所述 IL-2 是 IL-2 变体或衍生物。

本公开所述的 IL-2 包括 IL-2 变体或其衍生物。在可选的实施方案中，前述的
5 物组合物中的 IL-2 变体或其衍生物是在野生型人 IL-2 的第 11、20、26、27、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、70、71、72、78、82、88、125、126、132 位具有一个或多个氨基酸突变。本公开对于突变的表示方式为 abc、或 ab、或 bc，其中 a 为突变前的氨基酸类型，b 为突变位点，c 为突变后的氨基酸类型。例如，N26S，即第 26 位由天冬酰胺（N）突变为丝氨酸（S）；
10 N26 为第 26 位的天冬酰胺（N）发生突变；26S 为第 26 位突变为丝氨酸（S）。

具体地，本公开提供的 IL-2 变体或其衍生物含有以下位点上的一个或多个氨基酸突变或其任意组合：26、29、30、71、11、132、70、82、27、78 位。在一些实施方案中，突变前的氨基酸（例如野生型人 IL-2 中的）为：26 位为天冬酰胺（N）、29 位为天冬酰胺（N）、30 位为天冬酰胺（N）、71 位为天冬酰胺（N）、11 位为谷
15 氨酰胺（Q）、132 位为亮氨酸（L）、70 位为亮氨酸（L）、82 位为脯氨酸（P）、27 位为甘氨酸（G）、78 位为苯丙氨酸（F）。

在一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物的氨基酸突变方式为包含以下的任一或任意组合：26 位突变为 Gln（Q）、29 位突变为丝氨酸（S）、30 位突变为 Ser（S）、71 位突变为 Gln（Q），11、132、70、82、27、78 位突变为 Cys（C）。

20 在一些具体实施方案中，IL-2 变体或其衍生物包含第一类突变，所述第一类突变为如下（1）至（7）任一所示或其任意组合：

- (1) N26Q,
- (2) N29S,
- (3) N30S,
- 25 (4) N71Q,
- (5) Q11C 和 L132C,
- (6) L70C 和 P82C, 和
- (7) G27C 和 F78C。

30 在一些具体实施方案中，上述 IL-2 变体或其衍生物具有增加的稳定性，例如，增加的脱氨稳定性和/或热稳定性；具体地，本公开提供的第一类突变是包含所述突变的 IL-2 变体或其衍生物与野生型 IL-2 相比具有增加的稳定性，包括但不限于，具有增加的脱氨稳定性和/或热稳定性。

在另一方面，本公开提供的 IL-2 变体或其衍生物还含有如下位点上的一个或多个氨基酸突变或其任意组合：29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、
35 40、41、42、43、44、45、72。

在一些实施方案中，突变前的氨基酸（例如野生型人 IL-2 中的）为：29 位为

天冬酰胺(N)、30位为天冬酰胺(N)、31位为酪氨酸(Y)、32位为赖氨酸(K)、
33位为天冬酰胺(N)、34位为脯氨酸(P)、35位为赖氨酸(K)、36位为亮
氨酸(L)、37位为苏氨酸(T)、38位为精氨酸(R)、39位为甲硫氨酸(M)、
40位为亮氨酸(L)、41位为苏氨酸(T)、42位为苯丙氨酸(F)、43位为赖氨
5 酸(K)、44位为苯丙氨酸(F)、45位为酪氨酸(Y)、72位为亮氨酸(L)。

在一些具体实施方案中,IL-2变体或其衍生物还包含第二类突变,所述第二类
突变选自(8)至(11)中任一项所示的突变或(8)至(10)的任意组合:

(8) F42A,

(9) Y45A,

10 (10) L72G, 和

(11) 29-44位的氨基酸残基突变为QSMHIDATL。

一些实施方案中,所述第二类突变能够消除或降低IL-2对高亲和力受体
(IL-2R α / β / γ)的亲和力,并保留IL-2对中等亲和力受体(IL-2R β / γ)的亲和力;
第二类突变能够保留IL-2对效应细胞(如NK和T细胞)的诱导增殖和激活功能,
15 但降低IL-2对Treg细胞的诱导增殖和激活功能。

在第三方面,本公开提供的IL-2变体或其衍生物含有如下位点上的一个或多
个氨基酸突变或其任意组合:20、88、126。一些实施方案中,突变前的氨基酸(例
如野生型人IL-2中的)为:20位为天冬氨酸(D)、88位为天冬酰胺(N)、126
位为谷氨酰胺(Q)。

20 在一些实施方案中,IL-2变体或其衍生物的氨基酸突变方式为包含以下的任
一项或其任意组合:

20位突变为丙氨酸(A)或组氨酸(H)或异亮氨酸(I)或甲硫氨酸(M)或
谷氨酸(E)或丝氨酸(S)或缬氨酸(V)或色氨酸(W)或酪氨酸(Y);

88位突变为丙氨酸(A)或精氨酸(R)或谷氨酸(E)或亮氨酸(L)或苯丙
25 氨酸(F)或甘氨酸(G)或异亮氨酸(I)或甲硫氨酸(M)或丝氨酸(S)或Y
或缬氨酸(V)、或天冬氨酸(D);

126位突变为天冬酰胺(N)或亮氨酸(L)或P或苯丙氨酸(F)或甘氨酸(G)
或异亮氨酸(I)或甲硫氨酸(M)或精氨酸(R)或丝氨酸(S)或苏氨酸(T)
或酪氨酸(Y)或缬氨酸(V)。

30 在一些具体实施方案中,IL-2变体或其衍生物还包含第三类突变,其选自(12)
至(14)任一项所示的突变或其任意组合:

(12) N88突变为A、R、E、L、F、G、I、M、S、Y、V或D,

(13) D20突变为A、H、I、M、E、S、V、W或Y,

(14) Q126突变为N、L、P、F、G、I、M、R、S、T、Y、V。

35 一些实施方案中,所述第三类突变能够降低IL-2对高亲和力受体(IL-2R α / β / γ)
和中等亲和力受体(IL-2R β / γ)的亲和力,但对高亲和力受体的亲和力比中等亲

和力受体的亲合力降低得更多；第三类突变能够保留 IL-2 对 Treg 的诱导增殖和激活功能，但消除或降低 IL-2 对效应细胞（如 NK 和 T 细胞）的诱导增殖和激活功能。

5 一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物含有如上所述的第一类突变和第二类突变，或含有第一类突变和第三类突变。

一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物中的第一类突变选自（15）至（17），或（15）至（17）中的任一项与前述（5）至（7）中的任一项的组合：

（15）N26Q 和 N29S，

（16）N26Q、N29S 和 N71Q，和

10 （17）N26Q 和 N30S；

第二类突变选自（18）至（20）和（11）中的任一项：

（18）F42A 和 Y45A，

（19）F42A 和 L72G，和

（20）Y45A 和 L72G；

15 第三类突变为 N88R 或 N88G 或 N88I 或 N88D。

一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物包含选自（21）至（29）中任一项所示的突变：

（21）N26Q、N29S、F42A、N71Q 和 L72G，

（22）N26Q、N29S 和 N88R，

20 （23）N26Q、N29S、F42A 和 L72G，

（24）N26Q、N30S、F42A 和 L72G，

（25）Q11C、N26Q、N30S、F42A、L72G 和 L132C，

（26）N26Q、N30S、F42A、L70C、L72G 和 P82C，

（27）N26Q、G27C、N30S、F42A、L72G 和 F78C，

25 （28）N29S、F42A 和 L72G，和

（29）Q11C、29-44 位的 NNYKNPKLTRMLTFKF 突变为 QSMHIDATL、和 L132C。

除上述（1）至（29）外，本公开还提供 IL-2 变体，其具有（1）至（20）中突变位点、突变类型的任意组合方式，包括但不限于 WO2020125743A 中所公开的
30 IL-2 变体。

天然表达的人 IL-2 共 153 个氨基酸，1-20 位氨基酸是信号肽。切除信号肽后共 133 个氨基酸（即成熟人 IL-2），对应于本公开 SEQ ID No.2 的 2-134 位。出于重组表达目的，人工生产的 IL-2 首位额外带有甲硫氨酸（对应起始密码子 AUG）。一些实施方案中，上述突变是相对于野生型 IL-2 发生的突变，所述野生型 IL-2 的
35 氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。突变的位点编号根据 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列从第 2 位的氨基酸 A 开始计数，所述 IL-2 变体包含根据 SEQ ID NO: 2

所示的第 1 位的氨基酸 M 或不包含第 1 位的氨基酸 M。

一些实施方案中,所述 IL-2 变体包含根据 SEQ ID NO: 2 所示的第 1 位的氨基酸 M。

一些实施方案中,所述的 IL-2 变体或其衍生物包含选自 SEQ ID NO: 39 或 SEQ ID NO: 40 所示的氨基酸,第 1 位氨基酸为 M,上述的突变位点编号从第 2 位的氨基酸 A 开始计数。

在一些实施方式中,所述的 IL-2 变体或其衍生物包含选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 36 和 SEQ ID NO: 38 任一项所示的氨基酸。所述多肽的氨基酸和对应的核苷酸序列号如表 1 所示(下划线为突变氨基酸):

表 1. IL-2 变体氨基酸序列和核酸序列

编号	突变位点	人 IL-2 野生型及变体氨基酸序列	对应的核酸序列号
IL-2-WT	野生型	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFC QSIISTLT (SEQ ID NO: 2)	SEQ ID NO: 1
IL-2-01	N26Q	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL ^Q GINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLT (SEQ ID NO: 4)	SEQ ID NO: 3
IL-2-02	N30S	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIN <u>S</u> YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLT (SEQ ID NO: 6)	SEQ ID NO: 5
IL-2-03	Q11C/L132C	MAPTSSSTKKT <u>C</u> LQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIIST <u>C</u> T (SEQ ID NO: 8)	SEQ ID NO: 7
IL-2-04	L70C/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEV <u>C</u> NLAQSKNFHLR <u>C</u> RD ^C LISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLT (SEQ ID NO: 10)	SEQ ID NO: 9

IL-2-05	G27C/F78C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNCINN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNLAQSKNC HL RPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLT (SEQ ID NO: 12)	SEQ ID NO: 11
IL-2-06	29-44 位由 NNYKNPK LTRMLTFK F 突变为 QSMHIDAT L	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGIQS <u>MHIDAT</u> LYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTLT (SEQ ID NO: 14)	SEQ ID NO: 13
IL-2-07	F42A/Y45A	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 16)	SEQ ID NO: 15
IL-2-08	F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 17
IL-2-09	Y45A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINN YKNPKLTRMLTFKFAMPKKATELKHLQCLEE ELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFA QSIISTLT (SEQ ID NO: 20)	SEQ ID NO: 19
IL-2-10	N26Q/N30S /F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINIS YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 22)	SEQ ID NO: 21
IL-2-11	Q11C/N26Q /N30S/F42A /L72G/L132 C	MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILQGINIS YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTCT (SEQ ID NO: 24)	SEQ ID NO: 23
IL-2-12	N26Q/N30S /F42A/L70C /L72G/P82C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGINIS YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVCNGAQSKNFHLRC RD LISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 26)	SEQ ID NO: 25
IL-2-13	N26Q/G27C /N30S/F42A /L72G/F78C	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQCINS YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNGAQSKNC HL RPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 28)	SEQ ID NO: 27

IL-2-14	N29S/F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGISN YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVNLGAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 30)	SEQ ID NO: 29
IL-2-21	N26Q/N29S/F42A/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISN YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVNLGAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 32)	SEQ ID NO: 31
IL-2-22	N26Q/N29S/F42A/N71Q/L72G	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISN YKNPKLTRMLTAKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVNLGAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ ID NO: 34)	SEQ ID NO: 33
IL-2-23	Q11C/29-44位的 NNYKNPKLTRMLTFK F 突变为 QSMHIDATL/L132C	MAPTSSSTKKTCLQLEHLLLDLQMILNGIQS MHIDATLYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSE TTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTCT (SEQ ID NO: 36)	SEQ ID NO: 35
IL-2-24	N26Q/N29S/N88R	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILQGISN YKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVNLNLAQSKNFHLRPRDLISRNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITF AQSIISTLT (SEQ NO ID: 38)	SEQ ID NO: 37

(注：上述的突变位点编号按 SEQ ID NO: 2 所示的人 IL-2 成熟蛋白编号计算，人 IL-2 成熟蛋白不含有第 1 位的氨基酸 M，因此编号从第 2 位的氨基酸 A 开始计数。其中，“/”表示在同一个 IL-2 变体中，所述突变是同时存在的。所有变体均可以含有或不含有 C125A，含有 C125A 是避免形成二聚体。)

5

在一些实施方案中，IL-2 变体的衍生物包括涉及本公开 IL-2 变体的全长、部分蛋白或在本公开 IL-2 变体的基础上进一步突变获得的突变蛋白，功能性衍生物，功能性片段，生物活性肽，融合蛋白，同种型或其盐。例如，包含 IL-2 变体的融合蛋白，所述 IL-2 变体的单体或二聚物或三聚物或多聚物，所述 IL-2 变体的各种修饰形式（如 PEG 化，糖基化，白蛋白缀合或融合，Fc 融合或缀和，羟乙基化，去除 O-糖基化等），以及所述 IL-2 变体在各物种中的同源物。所述 IL-2 的修饰不会导致对治疗相关的免疫原性的不利影响。

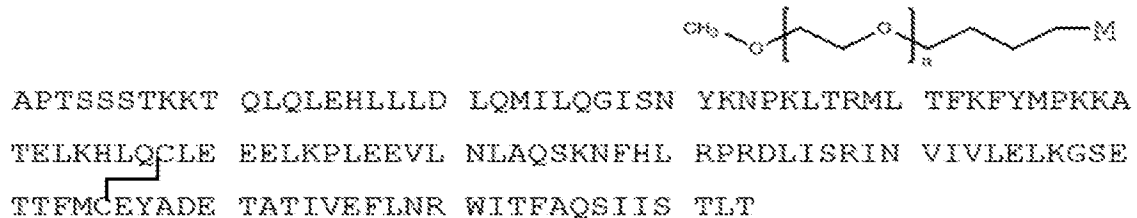
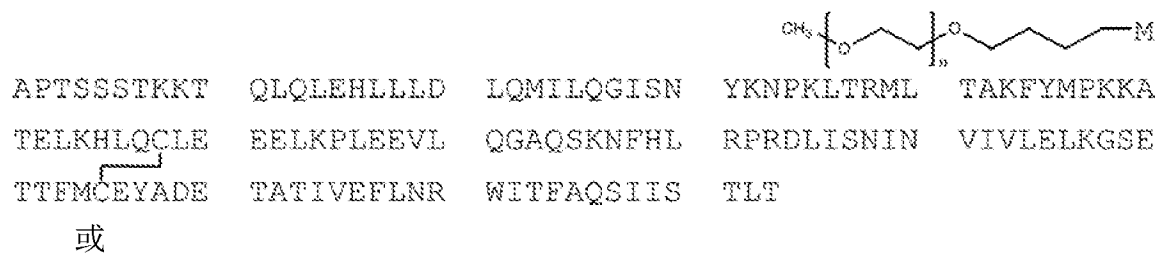
在一些实施方案中，IL-2 变体或衍生物是 PEG 化的（可以表示为 PEG-IL-2），例如是单或双 PEG 化的 IL-2 变体或衍生物。PEG-IL-2 变体或衍生物包括 SC-PEG 连接基。在另一些实施方案中，PEG-IL-2 变体或衍生物包括甲氧基-PEG-醛（mPEG-ALD）连接基。在某些实施方案中，PEG 部分的相对分子量在约 5KD 至

15

约 50KD, 具体地 5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50 KD; 或约 5KD 至约 40KD, 或约 10KD 至约 30KD, 或约 10KD 至约 30KD 之间, 或约 15KD 至约 20KD 之间。某些具体实施方案中, mPEG-ALD 连接基包括具有选自下列相对分子量的 PEG 分子: 约 5KDa、约 12KDa 或约 20KDa (质控标准为 20 ± 2 KDa)。在某些实施方案中, mPEG-ALD 的醛基可以是乙醛、丙醛或丁醛等。在一个实施方案中, IL-2 变体或其衍生物相比于野生型 IL-2 或其衍生物具有延长的血清半衰期。

本公开所述的 PEG 的相对分子量, 是指通过 MALDI-TOF 检测的相对分子质量, PEG 重复单元次数可以通过 PEG 的相对分子量逆推获得。

一些实施方案中, 所述 IL-2 变体或其衍生物选自:



其中 PEG 的相对分子量为约 20KD; n 为 PEG 重复单元次数, n 可以通过 PEG 的相对分子量逆推获得。

一些实施方案中, 所述 IL-2 变体或其衍生物不包含第 1 位的氨基酸 M。

当 IL-2 变体或其衍生物包含第二类突变时, 一些实施方案中, IL-2 变体或其衍生物能引发一种或多种选自下组的细胞应答: 激活的 T 淋巴细胞中的增殖、激活的 T 淋巴细胞中的分化、细胞毒性 T 细胞 (CTL) 活性、激活的 B 细胞中的增殖、激活的 B 细胞中的分化、天然杀伤 (NK) 细胞中的增殖、NK 细胞中的分化、通过激活的 T 细胞或 NK 细胞的细胞因子分泌、和 NK/淋巴细胞激活的杀伤细胞 (LAK) 抗肿瘤细胞毒性。一些实施方案中, IL-2 变体或其衍生物与野生型 IL-2 多肽相比具有降低的诱导调节性 T 细胞中 IL-2 信号传导的能力。在一个实施方案中, IL-2 变体或其衍生物相比于野生型 IL-2 或其衍生物诱导 T 细胞中更少的激活诱导的细胞死亡 (AICD)。一些具体实施方案中, IL-2 变体或其衍生物相比于野生型 IL-2 或其衍生物具有减小的体内毒性。

当 IL-2 变体或其衍生物包含第三类突变时, 一些实施方案中, IL-2 变体或其衍生物能够降低 IL-2 对高亲和力受体 (IL-2R $\alpha/\beta/\gamma$) 和中等亲和力受体 (IL-2R β/γ) 的亲和力, 但对高亲和力受体的亲合力比对中等亲和力受体的亲合力降低得更多。

一些实施方案中，IL-2 变体或其衍生物能够保留 IL-2 对 Treg 的诱导增殖和激活功能，但消除或降低 IL-2 对效应细胞（如 NK 和 T 细胞）的诱导增殖和激活功能。

在另一方面，本公开提供 IL-2 变体或其衍生物直接或通过接头间接地与 IL-2 模块连接的连接体或缀合物。一些实施方案中，其为免疫缀合物，其中，非 IL-2 模块为抗原结合模块。一些实施方案中，所述抗原结合模块靶向肿瘤细胞上呈现的或肿瘤细胞环境中的抗原。

一些实施方案中，IL-2 变体（或其衍生物）连接于至少一个非 IL-2 模块。一些实施方案中，IL-2 变体（或其衍生物）和非 IL-2 模块形成融合蛋白，即 IL-2 变体（或其衍生物）与非 IL-2 模块共享肽键。

一些实施方案中，IL-2 变体（或其衍生物）连接于至少一个非 IL-2 模块，例如第一和第二非 IL-2 模块。一些实施方案中，非 IL-2 模块为抗原结合模块。一些实施方案中，IL-2 变体（或其衍生物）与第一抗原结合模块共享氨基或羧基端肽键，且第二抗原结合模块与以下共享氨基或羧基端肽键：i) IL-2 变体（或其衍生物）；或 ii) 第一抗原结合模块。一些具体的实施方案中，IL-2 变体（或其衍生物）与所述第一非 IL-2 模块共享羧基端肽键，而与所述第二非 IL-2 模块共享氨基末端肽键。一些实施方案中，所述非 IL-2 模块是抗原结合模块。所述抗原结合模块可以是抗体或抗原结合片段，包括但不限于免疫球蛋白分子（例如 IgG（例如 IgG1）类免疫球蛋白分子）、抗体或其抗原结合片段。一些具体实施方案中，抗体或其抗原结合片段选自包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区的多肽复合物、Fab、Fv、sFv、F(ab')₂、线性抗体、单链抗体、scFv、sdAb、sdFv、纳米抗体、肽抗体 peptibody、结构域抗体和多特异性抗体（双特异性抗体、diabody、triabody 和 tetrabody、串联二-scFv、串联三-scFv）。在 IL-2 变体（或其衍生物）连接于超过一个抗原结合模块例如第一和第二抗原结合模块的情况下，每个抗原结合模块可以独立地选自各种形式的抗体和抗原结合片段，例如，第一抗原结合模块可以是 Fab 分子，而第二抗原结合模块可以是 scFv 分子，或第一和第二抗原结合模块中的每一个都是 scFv 分子，或第一和第二抗原结合模块中的每一个是 Fab 分子。一些实施方案中，在 IL-2 变体（或其衍生物）连接于超过一个抗原结合模块例如第一和第二抗原结合模块的情况下，能独立地选择每个抗原结合模块所针对的抗原，例如，所述第一和所述第二抗原结合模块针对不同的抗原或针对同一抗原。

一些实施方案中，所述抗原结合模块结合的抗原可以选自下组：生腱蛋白 C 的 A1 域(TNC A1)、生腱蛋白 C 的 A2 域(TNC A2)、纤连蛋白的外域(Extra Domain B) (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 和黑素瘤有关的硫酸软骨素蛋白聚糖 (MCSP)。一些实施方案中，肿瘤抗原包括但不限于 MAGE、MART-1/Melan-A、gp100、二肽基肽酶 IV (DPPIV)、腺苷脱氨酶结合蛋白 (ADA bp)、亲环素 (cyclophilin) b、结肠直肠有关的抗原 (CRC) -C017-1A/GA733、癌胚抗原 (CEA) 及其免疫原性表位 CAP-1 和 CAP-2、etv6、amL1、前列腺特异性抗原 (PSA) 及其免疫原性表

位 PSA-1、PSA-2 和 PSA-3、前列腺特异性膜抗原 (PSMA)、T 细胞受体/CD3-zeta 链、肿瘤抗原的 MAGE 家族 (例如 MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-Xp2 (MAGE-B2)、MAGE-Xp3 (MAGE-B3)、MAGE-Xp4 (MAGE-B4)、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、MAGE-C5)、肿瘤抗原的 GAGE 家族 (例如 GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、GAGE-9)、BAGE、RAGE、LAGE-1、NAG、GnT-V、MUM-1、CDK4、酪氨酸酶、p53、MUC 家族、HER2/neu、p21ras、RCAS1、 α -胎蛋白、E-钙粘蛋白、 α -连环蛋白 (catenin)、 β -连环蛋白和 γ -连环蛋白、p120ctn、gp100Pmel117、PRAME、NY-ESO-1、cdc27、腺瘤样结肠息肉蛋白 (adenomatous polyposis coli protein, APC)、胞衬蛋白 (fodrin)、连接蛋白 (Connexin) 37、Ig 独特型、p15、gp75、GM2 和 GD2 神经节苷脂、病毒产物 (如人乳头状瘤病毒蛋白)、肿瘤抗原的 Smad 家族、Imp-1、P1A、EBV 编码的核抗原 (EBNA) -1、脑糖原磷酸化酶、SSX-1、SSX-2 (HOM-MEL-40)、SSX-1、SSX-4、SSX-5、SCP-1 和 CT-7、以及 c-erbB-2。

一些实施方案中，病毒抗原的非限制性例子包括流感病毒血凝素、Epstein-Barr 病毒 LMP-1、丙肝病毒 E2 糖蛋白、HIV gp160 和 HIV gp120。

一些实施方案中，ECM 抗原的非限制性例子包括多配体聚糖 (syndecan)、类肝素酶 (heparanase)、整联蛋白、骨桥蛋白 (osteopontin)、钙粘蛋白、层粘连蛋白、EGF 型层粘连蛋白、凝集素、纤连蛋白、notch、生腱蛋白和基质蛋白。

一些实施方案中，包含上述抗原结合模块的 IL-2 变体或其衍生物包含第二类突变，不包含第三类突变。

一些实施方案中，提供增加 IL-2 或其衍生物、缀合物稳定性的方法，所述方法包括在 IL-2 或其衍生物、缀合物中引入 1)-7) 任一项所示的突变或其任意组合：

- 1) N26Q,
- 2) N29S,
- 3) N30S,
- 4) N71Q,
- 5) Q11C 和 L132C,
- 6) L70C 和 P82C, 和
- 7) G27C 和 F78C。

此处全文引入 WO2020/125743 中的 IL-2 变体或其衍生物、相关序列、以及制备方法。

冻干制剂：

本公开还提供一种制备包含 IL-2 的药物组合物的冻干制剂的方法，所述方法包括将前述药物组合物经冷冻干燥的步骤。

本公开还提供一种包含IL-2的药物组合物的冻干制剂,所述冻干制剂通过将前面任一所述的IL-2药物组合物经冷冻干燥获得。

在一些实施方案中,冻干制剂于2-8℃避光保存,稳定至少1个月,至少3个月,至少6个月,至少12个月,至少18个月,至少24个月,至少30个月。

5 在一些实施方案中,该冻干制剂于25℃稳定至少1个月,至少3个月,至少6个月,至少12个月。

在一些实施方案中,该冻干制剂于40℃稳定至少7天,至少14天或至少30天。

本公开还提供一种包含IL-2的复溶溶液,所述复溶溶液是通过将前述冻干制剂经复溶制备获得。

10 本公开还提供制备上述复溶溶液的方法,其中包括将前述冻干制剂经复溶的步骤,其复溶所用溶液选自但不限于:注射用水、生理盐水或葡萄糖溶液如5%葡萄糖注射液、葡萄糖氯化钠注射液等。

本公开还提供一种制品,其包括一个或多个容器,各容器中独立地装有前述的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液。容器标示装量根据需要调整,可选自0.5 mL、
15 0.6mL、0.7 mL、0.8 mL、0.9 mL、1.0 mL、1.1 mL、1.2 mL、1.3 mL、1.4 mL、1.5 mL、1.6 mL、1.7 mL、1.8 mL、1.9 mL、2.0 mL、2.1 mL、2.2 mL、2.3 mL、2.4 mL、2.5 mL、5.0 mL、10mL。注射剂在临床给药过程中可能会发生制剂的残留和损失,故为了保证标示装量,根据中国药典2020版四部注射剂通则中的要求,实际生产时应应对制剂适当增加装量,每约1mL药物组合物实际灌装生产时的目标装量设定为
20 约1.15mL,装量范围控制在约1.10-约1.20mL。

在一些实施方案中,该容器内包材为中硼硅玻璃管制注射剂瓶、注射用冷冻干燥用聚对二甲苯镀膜溴化丁基橡胶塞和抗生素瓶用铝塑组合盖。

制备方法:

制备本公开药物组合物可采用本领域常见的方法,包括将适宜量IL-2与前述药
25 用辅料混合的步骤。

在一些实施方案中,制备IL-2之后,制备包含它的药物制剂,包括将适宜量的海藻糖、甘露醇和可选的其他辅料成分添加到药物制剂中。

用途:

在另一方面,本公开提供上述包含 IL-2 的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液的
30 的制药用途。

当 IL-2 为野生型或包含第二类突变的变体时,其用于治疗增生性疾病、免疫性疾病、调节 T 细胞介导的免疫应答、刺激个体免疫系统的方法和相关制药用途。所述增生性疾病可以是肿瘤或癌(例如转移性肿瘤或癌),可以是实体瘤(例如转移性肾细胞癌和恶性黑素瘤)。

35 一些实施方案中,本公开的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液可用于治疗刺激宿主的免疫系统以获益的疾病情形,特别是期望增强细胞免疫应答的状况,可

以包括宿主免疫应答不足或缺陷性的疾病情形。一些实施方案中，施用药物组合物、冻干制剂或复溶溶液的疾病情形包括细胞免疫应答是特异性免疫的关键机制的肿瘤或感染，例如癌症（例如肾细胞癌或黑素瘤）、免疫缺陷（例如 HIV 阳性患者中、免疫受抑制的患者）、慢性感染等。一些实施方案中，增强细胞免疫应答可以包括以下任一种或多种：免疫功能的一般升高、T 细胞功能升高、B 细胞功能升高、淋巴细胞功能的恢复、IL-2 受体表达提高、T 细胞应答性提高、天然杀伤细胞活性或淋巴因子激活的杀伤（LAK）细胞活性升高等。一些实施方案中，本公开的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液用于治疗的疾病是增殖性病症，例如癌症。癌症的非限制性例子包括膀胱癌、脑癌、头和颈癌、胰腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食道癌、结肠癌、结肠直肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、血液癌、皮肤癌、鳞状细胞癌、骨癌和肾癌。其它可使用本公开的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液治疗的细胞增殖病症包括但不限于位于以下处的新生物：腹部、骨、乳房、消化系统、肝、胰、腹膜、内分泌腺（肾上腺、副甲状腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺）、眼、头和颈、神经系统（中枢和外周）、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾、胸部、和泌尿生殖系统。还包括癌症前期状况或损伤以及癌症转移。在某些实施方案中，癌症选自下组：肾细胞癌、皮肤癌、肺癌、结肠直肠癌、乳腺癌、脑癌、头和颈癌。类似地，其它细胞增殖病症也可用本公开的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液治疗，包括但不限于：高丙种球蛋白血症（hypergammaglobulinemia）、淋巴增生性病症、病变蛋白血症（paraproteinemias）、紫癜（purpura）、结节病、塞扎里综合征（Sezary Syndrome）、Waldenström's 巨球蛋白血症、高歇氏病（Gaucher's Disease）、组织细胞增多病（histiocytosis）以及任何其它位于上文所列的器官系统中的瘤形成（neoplasia）外的细胞增殖疾病。在另一些实施方案中，所述疾病涉及自身免疫性、移植排斥、外伤后免疫应答和传染性疾病（例如 HIV）。

当 IL-2 变体或其衍生物包含第三类突变时，其用于治疗自身免疫性疾病或缓解/治疗/预防器官移植之后的自身免疫反应。自身免疫性疾病可以是选自由以下各种组成的组：I 型糖尿病（type I diabetes mellitus）、类风湿性关节炎（rheumatoid arthritis）、多发性硬化症（multiple sclerosis）、慢性胃炎（chronic gastritis）、克罗恩病（Crohn's disease）、巴塞多病（Basedow disease）、别赫捷列夫病（Bechterew disease）、银屑病（psoriasis）、重症肌无力（myasthenia gravis）、自身免疫肝炎（autoimmune hepatitis）、APECED、变应性肉芽肿血管炎（Churg-Strauss syndrome）、溃疡性结肠炎（ulcerative colitis）、肾小球肾炎（glomerulonephritis）、吉兰-巴雷综合征（Guillain-Barré syndrome）、桥本甲状腺炎（Hashimoto thyroiditis）、硬化萎缩性苔藓（lichen sclerosus）、系统性红斑狼疮（systemic lupus erythematosus）、PANDAS、风湿热（rheumatic fever）、结节病（sarcoidosis）、舍格伦综合征（syndrome）、僵人综合征（Stiff-Man syndrome）、硬皮病（scleroderma）、韦格纳

肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)、白斑 (vitiligo)、自身免疫性肠病 (autoimmune enteropathy)、肺出血肾炎综合征 (Goodpastures syndrome)、皮炎 (dermatomyositis)、多发性肌炎 (polymyositis)、自身免疫性过敏症 (autoimmune allergy)、哮喘 (asthma)。在一些实施方案中, IL-2 变体或其衍生物可以与免疫抑制剂联用。一些实施方案中, 免疫抑制剂选自由以下各项组成的组: 糖皮质激素 (glucocorticoid), 包括去氧皮质酮 (decortin)、prednisol; 硫唑嘌呤 (azathioprine); 环孢素 A (cyclosporin A); 吗替麦考酚酯 (mycophenolatemofetil); 他克莫司 (tacrolimus); 抗 T 淋巴细胞球蛋白, 抗 CD3 抗体, 包括莫罗单抗 (muromonab); 抗 CD25 抗体, 包括巴利昔单抗 (basiliximab) 和达克珠单抗 (daclizumab); 抗 TNF- α 抗体, 包括英利昔单抗 (infliximab) 和阿达木单抗 (adalimumab); 硫唑嘌呤; 甲氨蝶呤 (methotrexate); 环孢素 (cyclosporin); 西罗莫司 (sirolimus); 依维莫司 (everolimus); 芬戈莫德 (fingolimod); 骁悉 (CellCept); 麦考酚酸钠肠溶剂 (myfortic); 以及环磷酰胺 (cyclophosphamide)。

一些实施方案中, 本公开的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液不能提供治愈而仅能提供部分益处。在一些实施方案中, 具有一些益处的生理学变化也被视为治疗有益的。如此, 在一些实施方案中, 提供生理学变化的 IL-2 变体或其衍生物、免疫缀合物的量被视为“有效量”或“治疗有效量”。需要治疗的受试者、患者或个体通常为哺乳动物, 更特定地为人。

一些实施方案中, 提供其中每日至少 2 次、每日至少 1 次、每 48 小时至少 1 次、每 72 小时至少一次、每周至少一次、每 2 周至少一次、每个月至少一次、每 2 个月至少一次或每 3 个月至少一次向受试者施用本公开的药物组合物、冻干制剂或复溶溶液的方法。

可通过任何有效途径施用药物组合物、冻干制剂或复溶溶液。例如, 通过注射, 可以是适用于注射的形式 (例如通过弹丸注射法) 或者持续输注法而施用到患者的血流中, 或静脉注射、皮下注射、皮内注射、腹腔注射等。作为选择, 可以在肿瘤部位局部施用 (肿瘤内或肿瘤周围施用)。在肿瘤内或肿瘤周围施用的情况中, 可以经由任意途径施用, 例如通过局部 (topical) 施用、区域 (regional) 施用、局地 (local) 施用、系统性地施用、对流增强输送或者它们的组合进行施用。

注射的形式, 包括无菌水溶液或分散体系。进一步地, 上述药物组合物可以制备成无菌粉末形式以用于即时配制无菌注射液或分散液。无论如何, 最终的注射形式必须是无菌的, 且为了易于注射, 必须是易于流动的。此外, 所述药物组合物在制备和储存过程中必须稳定。因此, 优选地, 所述药物组合物要在抗微生物 (如细菌和真菌) 污染的条件下保存。

35 术语

为了更容易理解本申请, 以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见

在本文件中的它处另有明确定义，否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本申请所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

本公开将已公开专利文本 WO2020/125743A1 的内容全部引入。

5 本申请所用氨基酸三字母代码和单字母代码如 J. Biol. Chem, 243, p3558 (1968) 中所述。

“白介素-2”或“IL-2”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物如灵长类（例如人）和啮齿动物（例如小鼠和大鼠）的任何天然的 IL-2。该术语涵盖未加工的 IL-2 以及源自细胞中的加工的任何形式的 IL-2。该术语还涵盖天然存在的 IL-2 变体，例如剪接变体或等位变体。示例性野生型人成熟 IL-2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示（或不含首位 M 的情形）。未加工的人 IL-2 额外包含 N 端 20 个氨基酸的信号肽（如 WO2012107417 中的 SEQ ID NO: 272 所示），所述信号肽在成熟的 IL-2 分子中是缺乏的。

“氨基酸突变”包括氨基酸取代、缺失、插入、修饰及其任意组合，以实现最终构建体，使得最终构建体拥有期望的特性，例如增强的稳定性。氨基酸序列缺失和插入包括氨基和/或羧基端缺失和氨基酸插入。末端缺失的例子是在全长人 IL-2 的位置 1 缺失丙氨酸残基。优选地氨基酸突变是氨基酸取代。例如，为了改变 IL-2 多肽的结合特性，可以进行非保守性的氨基酸取代，即将一个氨基酸用具有不同结构和/或化学特性的另一种氨基酸替换。优选地氨基酸取代包括用亲水性氨基酸替换疏水性氨基酸。氨基酸取代包括由非天然存在的氨基酸或由 20 种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物（例如 4-羟脯氨酸、3-甲基组氨酸、鸟氨酸、高丝氨酸、5-羟赖氨酸）替换。可以使用本领域中公知的遗传或化学方法生成氨基酸突变，包括定点诱变、PCR、基因合成、化学修饰等方法。

“野生型 IL-2”是在其它方面与变体 IL-2 多肽相同，只是在变体 IL-2 多肽的每个氨基酸位置具有野生型氨基酸的 IL-2 形式。例如，如果 IL-2 变体是全长 IL-2（即未与任何其它分子融合或缀合的 IL-2），那么此变体所对应的野生型形式是全长天然的 IL-2。如果 IL-2 变体是 IL-2 与其下游编码的另一种多肽（例如抗体链）之间的融合物，那么此 IL-2 变体所对应的野生型形式是融合至相同下游多肽的野生型氨基酸序列的 IL-2。此外，如果 IL-2 变体是 IL-2 的截短形式（在 IL-2 的非截短部分内经突变或修饰的序列），那么此 IL-2 变体的野生型形式是具有野生型序列的类似截短的 IL-2。为了对各种形式的 IL-2 变体与相应的 IL-2 野生型形式比较 IL-2 受体结合亲和力或生物学活性，术语“野生型”涵盖相比于天然存在的 IL-2，包含一处或多处不影响对 IL-2 受体结合的氨基酸突变的 IL-2 形式（例如在与 IL-2 的残基 125 对应的位置处的半胱氨酸取代为丙氨酸 C125A）。在一些实施方案中，野生型 IL-2 包含 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。

35 “衍生物”旨在被广义地解释，包括任意 IL-2 相关的产品。包括但不限于人和非人的 IL-2 同系物、片段或截短体、融合蛋白（如与信号肽融合或其他活性、非

活性成份融合，活性成份例如是抗体或其抗原结合片段）、修饰形式（如 PEG 化、糖基化、白蛋白缀合/融合、Fc 缀和/融合、羟乙基化等）、和保守修饰的蛋白等。

“高亲和力 IL-2 受体”指 IL-2 受体的异型三聚体形式，其由受体 γ 亚基（也称为通用细胞因子受体 γ 亚基、 γ_c 或 CD132）、受体 β 亚基（也称为 CD122 或 p70）和受体 α 亚基（也称为 CD25 或 p55）组成。比较而言，“中等亲和力 IL-2 受体”指仅包含 γ 亚基和 β 亚基而无 α 亚基的 IL-2 受体（参见例如 Olejniczak 和 Kasprzak, MedSci Monit14, RA179-189（2008））。

“亲和力”指分子（例如受体）的单一结合位点与其结合配偶体（例如配体）之间全部非共价相互作用总和的强度。除非另外指示，本文的“结合亲和力”指反映结合对的成员（例如受体和配体）之间 1:1 相互作用的内在结合亲和力。分子 X 对其配偶体 Y 的亲和力通常可以用解离常数（KD）来表述，其为解离与结合速率常数（分别为 $K_{\text{解离}}$ 和 $K_{\text{结合}}$ ）的比率。如此，相等的亲和力可能包含不同的速率常数，只要速率常数的比率保持相同。亲和力可以通过本领域常规的方法来测量，包括本文中所描述的方法。

“调节性 T 细胞”或“T 调节细胞”或“Treg”意指一种能抑制其它 T 细胞的应答的特殊化 CD4+T 细胞类型。Treg 的特征在于表达 IL-2 受体的 α 亚基（CD25）和转录因子叉头框 P3（FOXP3），并在诱导和维持对抗原（包括那些由肿瘤表达的抗原）的外周自体耐受性中起着关键作用。Treg 需要 IL-2 来实现其功能和发育以及其抑制性特征的诱导。

“效应细胞”指介导 IL-2 的细胞毒性效果的淋巴细胞群体。效应细胞包括效应 T 细胞如 CD8+细胞毒性 T 细胞、NK 细胞、淋巴因子激活的杀伤（LAK）细胞和巨噬细胞/单核细胞。

“抗原结合模块”指结合抗原决定簇的多肽分子。在一些实施方案中，抗原结合模块能指导其连接物（例如，细胞因子（IL-2 或其变体）和/或其它抗原结合模块）到达靶位点，例如到达特定类型的肿瘤细胞或具有特定抗原决定簇的肿瘤间质。抗原结合模块包括抗体或其抗原片段，优选地抗原结合模块包括抗体的抗原结合域，其可以包含抗体重链可变区和抗体轻链可变区。抗原结合模块可以包含抗体恒定区。如本领域中已知的，可用的重链恒定区包括以下 5 种同种型中的任意一种： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 。可用的轻链恒定区包括任意以下 2 种同种型中的任意一种： κ 和 λ 。IL-2 或其变体可通过一种或多种接头序列与一个或多个抗原结合模块连接以形成“免疫缀合物”。

“特异性结合”意指此结合对于抗原是选择性的，并且能与不想要的或非特异性的相互作用区别开来。抗原结合模块结合特异性抗原决定簇的能力能经由酶联免疫吸附测定法（ELISA）或本领域技术人员熟知的其它技术，例如表面等离子共振技术（在 BIAcore 仪器上分析）（Liljeblad 等, Glyco J17, 323-329（2000）），以及传统的结合测定法来测量（Heeley, Endocr Res28, 217-229（2002））。

“抗体”在本文中以最广义使用，并且涵盖各种抗体结构，只要它们展现出期望的抗原结合活性，所述抗体包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）和抗原结合片段。抗体可以包括鼠源抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、骆驼抗体。示例性的，抗体可以是免疫球蛋白，是由两条重链和两条轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将免疫球蛋白分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 μ 链、 δ 链、 γ 链、 α 链和 ϵ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 κ 链或 λ 链。

“保守修饰”适用于氨基酸和核苷酸序列。对于核苷酸序列，保守修饰是指编码相同或基本相同的氨基酸序列的那些核酸，或在核苷酸不编码氨基酸序列的情况下，是指基本上相同的核苷酸序列。对于氨基酸序列，“保守修饰”是指具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其它氨基酸置换蛋白中的氨基酸，使得可频繁进行改变而不改变蛋白的生物学活性。本领域技术人员知晓，一般而言，多肽的非必需区域中的单个氨基酸置换基本上不改变生物学活性（参见例如 Watson 等（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub.Co., 第 224 页，（第 4 版））。

“PEG 化”是指至少一个 PEG 分子与另一个分子（例如本公开的 IL-2 变体）连接。例如，批准 Adagen（腺苷脱氨酶的 PEG 化制剂）用于治疗严重联合免疫缺陷病。已经显示，聚乙二醇的连接可以防止蛋白水解作用（参见，例如，Sada 等人，（1991）J.Fermentation Bioengineering 71: 137-139）。在最常见形式中，PEG 是在一端与羟基连接的直链或支链聚醚，并且具有下列常规结构：HO-（CH₂CH₂O）_n-CH₂CH₂-OH。为了使 PEG 与分子（多肽、多糖、多核苷酸和小的有机分子）偶联，可以通过制备一些或两个末端具有官能团的 PEG 的衍生物来活化 PEG。蛋白的 PEG 缀合的常见途径是用官能团活化 PEG，该官能团适合与赖氨酸和 N-末端氨基酸基团的反应。尤其是，参与缀合的常见反应基团是赖氨酸的 α 或 ϵ 氨基。聚乙二醇化连接基与蛋白的反应可导致 PEG 部分主要在下列位点处的连接：蛋白的 N-末端的 α 氨基、赖氨酸残基侧链上的 ϵ 氨基、或组氨酸残基侧链上的咪唑基。由于大部分重组蛋白质具有单个 α 和许多 ϵ 氨基和咪唑基，可以根据连接基团的化学性质，产生许多位置异构体。

“施用”、“给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时，是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“施用”、“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触，

以及试剂与流体的接触，其中所述流体与细胞接触。“施用”、“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。“施用”、“给予”和“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时，是指治疗处理、预防或预防性措施，研究和诊断应用。

5 “治疗”意指给予受试者内用或外用治疗剂，诸如包含本公开的任一种 IL-2 变体及其衍生物或包含所述变体或衍生物的组合，所述受试者确诊患有、疑似患有、易感于一种或多种疾病症状，而己知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常，在受治疗受试者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂，无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床不可测量的程
10 度。

有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量（也称作“治疗有效量”）可根据多种因素变化，例如受试者的疾病状态、年龄和体重，以及药物在受试者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法，可评价疾病症状是否已被减轻。尽本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）在缓解每个患都有的目标疾病症状方面可能无效，但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如 Student t 检验、卡方检验、依据 Mann
15 和 Whitney 的 U 检验、Kruskal-Wallis 检验（H 检验）、Jonckheere-Terpstra 检验和 Wilcoxon 检验确定，其在统计学显著数目的受试者中应当减轻目标疾病症状。

“有效量”包含足以改善或预防医学病症或其病症的量。有效量还意指足以允许
20 或促进诊断的量。用于特定受试者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化：如待治疗的病症、受试者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

“缓冲剂”指通过其酸-碱共轭组分的作用而耐受 pH 变化的缓冲剂。将 pH 控制在适当范围中的缓冲剂的例子包括醋酸盐、琥珀酸盐、葡萄糖酸盐、组氨酸盐、
25 草酸盐、乳酸盐、磷酸盐、枸橼酸盐、酒石酸盐、延胡索酸盐、甘氨酸甘氨酸和其它有机酸缓冲剂。

“组氨酸盐缓冲剂”是包含组氨酸根离子的缓冲剂。组氨酸盐缓冲剂的实例包括组氨酸-盐酸盐，组氨酸-醋酸盐，组氨酸-磷酸盐，组氨酸-硫酸盐等缓冲剂，优选组氨酸-醋酸盐缓冲剂或组氨酸-盐酸缓冲剂，组氨酸-醋酸盐缓冲剂是组氨酸与醋
30 酸配制而成，组氨酸盐缓冲剂是组氨酸与盐酸配制而成。

“枸橼酸盐缓冲剂”是包括枸橼酸根离子的缓冲剂。枸橼酸盐缓冲剂的实例包括枸橼酸-枸橼酸钠、枸橼酸-枸橼酸钾、枸橼酸-枸橼酸钙、枸橼酸-枸橼酸镁等。优选地枸橼酸盐缓冲剂是枸橼酸-枸橼酸钠。

“琥珀酸盐缓冲剂”是包括琥珀酸根离子的缓冲剂。琥珀酸盐缓冲剂的实例包括
35 琥珀酸-琥珀酸钠、琥珀酸-琥珀酸钾、琥珀酸-琥珀酸钙盐等。优选地琥珀酸盐缓冲剂是琥珀酸-琥珀酸钠。

“磷酸盐缓冲剂”是包括磷酸根离子的缓冲剂，磷酸盐缓冲液选自本领域技术人员知晓的任一种适用于本公开体系的磷酸盐缓冲液即可，磷酸盐缓冲成分优选含有一种或多种磷酸盐缓冲液，例如，一碱价磷酸盐，二碱价磷酸盐等等的混合。特别有用的磷酸盐缓冲液选自碱金属和/或碱土金属的磷酸盐。磷酸盐缓冲剂的实例包括磷酸氢二钠-磷酸二氢钠、磷酸氢二钠-磷酸二氢钾、磷酸氢二钠-枸橼酸、Tris-HCl 缓冲液、磷酸钠-磷酸溶液、磷酸氢二钠-磷酸溶液、磷酸钠-磷酸二氢钠溶液等。优选地磷酸盐缓冲剂是磷酸氢二钠-磷酸二氢钠。根据需要，磷酸二氢钠和磷酸氢二钠可为无水或水合物，如无水磷酸氢二钠、一水磷酸二氢钠、二水磷酸二氢钠、七水磷酸氢二钠、十二水磷酸氢二钠等。

“醋酸盐缓冲剂”是包括醋酸根离子的缓冲剂。醋酸盐缓冲剂的实例包括醋酸-醋酸钠、醋酸组氨酸盐、醋酸-醋酸钾、醋酸醋酸钙、醋酸-醋酸镁等。优选地醋酸盐缓冲剂是醋酸-醋酸钠。

“药物组合物”表示含有一种或多种本文所述化合物（或其生理学上/可药用的盐或前体药物）与其他化学组分的混合物，所述其他组分是例如生理学/可药用的载体和赋形剂。药物组合物的目的是保持活性成分的稳定性，促进对生物体的给药，利于活性成分的吸收进而发挥生物活性。

本文中，“药物组合物”和“制剂”并不互相排斥。

“冻干制剂”表示液体或溶液形式的药物组合物或液体或溶液制剂经冷冻干燥步骤之后获得的制剂或药物组合物。

本文所用术语“约”、“大约”是指数值在由本领域一般技术人员所测定的具体值的可接受误差范围内，所述数值部分取决于怎样测量或测定（即测量体系的限度）。例如，“约”可意味着在 1 内或超过 1 的标准差。或者，“约”或“基本上包含”可意味着至多 20% 的范围，例如 1% 至 15% 之间、在 1% 至 10% 之间、在 1% 至 5% 之间、在 0.5% 至 5% 之间、在 0.5% 至 1% 之间变化，本公开中，数字或数值范围之前有术语“约”的每种情况也包括给定数的实施方案。除非另外说明，否则当具体值在本公开中出现时，“约”或“基本上包含”的含义应为在该具体值的可接受误差范围内。

本公开中数值为仪器测量值或仪器测量后计算值，存在一定程度的误差。一般而言， $\pm 10\%$ 均属于合理误差范围内，可以为 $\pm 9\%$ 、 $\pm 8\%$ 、 $\pm 7\%$ 、 $\pm 6\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 4\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 2\%$ 或 $\pm 1\%$ ，例如，PEG 是相对分子量是 20KD，相对分子量为 $20\text{KD} \pm 2\text{KD}$ 属于合理误差范围内。

本公开所述的冻干制剂能够达到一种稳定的效果：其中的活性成分在贮藏后基本上保留其物理稳定性和/或化学稳定性和/或生物学活性的药物组合物。例如，药物组合物在贮藏后基本上保留其物理和化学稳定性以及其生物学活性。贮藏期一般基于药物组合物的预定保存期来选择。目前有多种测量蛋白质稳定性的分析技术，包括 RP-HPLC、SE-HPLC、IE-HPLC，可测量在选定温度贮藏选定时间段后的稳定性。

在本公开中，技术人员应当理解 IL-2（IL-2 变体或其衍生物）的“稳定性”包括多个方面的稳定性，比如但不限于具体实施方案中评价的制剂的长期稳定性（也作货架稳定性，在储存条件下进行长期跟踪评价）、热稳定性（也作加速稳定性；在高温下进行老化测试）、机载稳定性（在上机条件下评价实际操作中的稳定性）、复溶稳定性（干粉制剂重新溶解后的稳定性）、冻融稳定性（在反复冷冻-溶解条件下）。这些不同方面的稳定性体现为 IL-2 变体或其衍生物的不同动力学特征；在不同稳定性评价中，IL-2 变体或其衍生物面临的是不同的物理、化学、生物压力。这意味着，在阅读本公开的教导之前，技术人员没有能力从 IL-2 变体或其衍生物的一种稳定性结果推测出另一种稳定性结果。

稳定的制剂是在下述情况下没有观察到显著变化的制剂：在一些实施方案中，冻干制剂于 2-8℃ 稳定至少 1 个月，例如至少 3 个月、至少 6 个月、至少 12 个月、至少 18 个月、至少 24 个月、至少 30 个月。在一些实施方案中，冻干制剂于 25℃ 稳定至少 1 个月，例如至少 3 个月、至少 6 个月、至少 12 个月。在一些实施方案中，冻干制剂于 40℃ 稳定至少 7 天，例如至少 14 天或至少 30 天。

稳定性的典型的可接受的标准如下：通过 RP-HPLC、SE-HPLC 或 IE-HPLC 测得，通常不超过约 10%，例如不超过约 5% 的 IL-2 变体或衍生物发生聚集或降解。通过视觉分析，制剂是淡黄色近无色澄明液体或者无色，或澄清至稍微乳白色。所述制剂的浓度、pH 和重量克分子渗透压浓度具有不超过±10% 变化。通常观察到不超过约 10%、例如不超过约 5% 的减少。如果在目检颜色和/或澄清度后，或者通过 UV 光散射、尺寸排阻色谱法（SEC）和动态光散射（DLS）测得，活性成分没有显示出显著的聚集增加、沉淀和/或变性，那么活性成分在药物制剂中“保留它的物理稳定性”。蛋白构象的变化可以通过荧光光谱法（其确定蛋白三级结构）和通过 FTIR 光谱法（其确定蛋白二级结构）来评价。

如果 IL-2 变体或衍生物没有显示出显著的化学改变，那么所述 IL-2 变体或衍生物在药物制剂中“保留它的化学稳定性”。通过检测和定量化学上改变的形式蛋白，可以评估化学稳定性。经常改变蛋白化学结构的降解过程包括水解或截短（通过诸如尺寸排阻色谱法和 SDS-PAGE 等方法来评价）、氧化（通过诸如与质谱法或 MALDI/TOF/MS 结合的肽谱法等方法来评价）、脱酰胺作用（通过诸如离子交换色谱法、毛细管等电聚焦、肽谱法、异天冬氨酸测量等方法来评价）和异构化（通过测量异天冬氨酸含量、肽谱法等来评价）。

如果 IL-2 变体或衍生物在给定时间的生物活性是在制备药物制剂时表现出的生物活性的预定范围内，那么所述 IL-2 变体或衍生物在药物制剂中“保留它的生物活性”。生物活性可以例如通过抗原结合测定来确定。

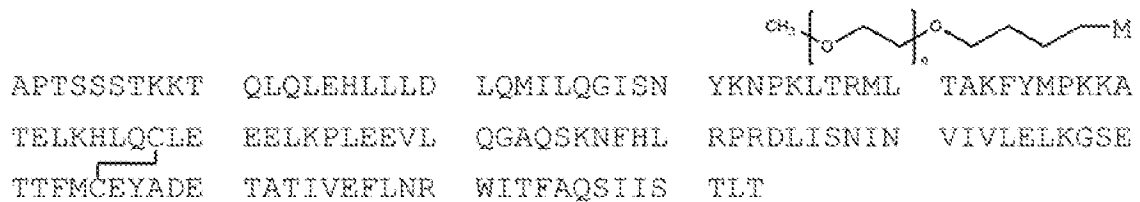
具体实施方案

以下结合实施例用于进一步描述，但这些实施例并非限制的范围。

实施例或测试例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。参见 Sambrook 等，分子克隆，实验室手册，冷泉港实验室；当代分子生物学方法，Ausubel 等著，Greene 出版协会，Wiley Interscience, NY，或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂，为市场购买的常规试剂。

实施例 1. IL-2 作为原料药的稳定性研究

1. 原料药 1 为如下所示结构信息和氨基酸序列的聚乙二醇化重组人 IL-2 变体 (SEQ ID No. 34)。



采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (还原型) 检测分子量: 35.4 ± 3.5 KD;

外观: 无色或微黄色澄明液体;

pH: 6.0 至 7.0。

对影响因素的考察结果表明，原料药 1 原液应低温避光保存。

其中：待测物所处溶液体系同在后实施例 5 筛选获得的溶液体系。

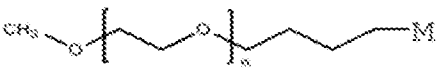
1) 高温条件: 待测物在 $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下放置 30 天, RP-HPLC 纯度下降 16.1%, SE-HPLC 纯度下降 46.9%, IE-HPLC 纯度下降 37.1%, 电泳法纯度下降 17.2%, 已超出质量标准范围, 生物学活性为 58% 已超出质量标准范围, 其余检测指标无显著变化。待测物在 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 条件下放置 30 天, RP-HPLC 纯度下降 3.4%, SE-HPLC 纯度下降 0.7%, IE-HPLC 纯度下降 3.7%, 电泳法纯度下降 1.6%, 其余检测指标无显著变化。表明高温条件对待测物影响很大。

2) 光照条件: 待测物在光照强度 $4500\text{lx} \pm 500\text{lx}$ 条件下放置 30 天, RP-HPLC 纯度下降 6.8%, 已超出质量标准范围, SE-HPLC 纯度下降 2.9%, IE-HPLC 纯度下降 4.1%, 电泳法纯度下降 4.3%, 其余检测指标无显著变化。表明光照条件对待测物有影响。

3) 冻融循环: 待测物在经历 $-35^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C} / 5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 5 次冻融循环后, 各检测项无显著变化, 结果均符合质量标准。表明待测物冻融稳定性良好。

4) 加速试验考察结果显示: 加速条件下 1 个月, 产品质量无明显变化。3 批待测物在加速 ($5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) 条件下放置 1 个月, 各项检测指标均无显著变化, 所有结果均在质量标准范围之内。

2. 原料药 2 为如下所示结构信息和氨基酸序列的聚乙二醇化重组人白介素-2 变体 (SEQ ID No. 38)。



APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILOGISN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA
TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISRIN VIVLELKGSE
TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFAQSIIS TLT

含有一对二硫键（Cys59-Cys106）；
采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（还原型）检测分子量：35.5±3.6KD；
外观：无色或微黄色澄明液体；pH： 4.5 至 6.0。

5 原料药 2 的微生物与细菌内毒素水平会对制剂成品的质量产生影响，故需对原料药 2 的微生物与细菌内毒素水平进行控制，均符合中国药典 2015 年版四部通则的规定。

实施例 2. IL-2 制剂中缓冲体系的筛选

10 为了筛选适宜的缓冲体系，在保持 IL-2 变体浓度为 2mg/mL、5%甘露醇作为赋形剂的前提下，分别制备缓冲体系为 10mM 甘氨酸-盐酸（pH 4.5 和 5.0）、10mM 琥珀酸钠-盐酸（pH 5.0）、10mM 组氨酸-盐酸（pH 5.5 和 6.0）、10mM 磷酸盐（pH 6.0、6.5、7.0 和 7.5）的冻干制剂。然后将上述不同缓冲体系的制剂于 40℃放置 30d，并于 0d、7d、14d、30d 考察相关指标。在样品制备过程中发现，原料药 1
15 在 10mM 甘氨酸-盐酸缓冲体系中不稳定、极易沉淀，故放弃该缓冲体系样品的制备。琥珀酸钠-盐酸、组氨酸-盐酸、磷酸盐缓冲体系样品的考察结果见表 2。

表 2. 不同缓冲体系的原料药 1 制剂 40℃ 30d 考察结果

考察项目 缓冲体系	时间	pH	外观	纯度（%）		
				RP-HPLC	SE-HPLC	IE-HPLC
10mM 琥珀酸钠-盐酸（pH 5.0）	0d	5.0	白色疏松体	98.48	99.87	99.61
	7d	5.0	白色疏松体	95.42	98.63	99.28
	14d	5.0	白色疏松体	93.77	97.82	96.79
	30d	5.0	白色疏松体	90.98	96.80	98.80
10mM 组氨酸-盐酸（pH 5.5）	0d	5.5	白色疏松体	98.63	99.89	99.64
	7d	5.5	白色疏松体	95.67	99.09	99.51
	14d	5.5	白色疏松体	93.54	99.04	98.82
	30d	5.5	白色疏松体	90.31	98.92	99.22
10mM 组氨酸-盐酸（pH 6.0）	0d	6.0	白色疏松体	98.54	99.88	99.72
	7d	6.0	白色疏松体	91.77	99.41	99.74
	14d	6.0	白色疏松体	86.12	98.33	98.52
	30d	6.0	白色疏松体	73.99	96.50	98.81
10mM 磷酸盐（pH 6.0）	0d	6.0	白色疏松体	98.39	99.82	99.61
	7d	6.0	白色疏松体	95.64	98.24	99.03
	14d	6.0	白色疏松体	93.93	97.11	96.37
	30d	6.0	白色疏松体	90.49	96.68	94.84
10mM 磷酸盐（pH 6.5）	0d	6.5	白色疏松体	98.36	99.73	99.62
	7d	6.5	白色疏松体	95.35	97.86	99.8
	14d	6.5	白色疏松体	93.57	96.01	97.17

	30d	6.5	白色疏松体	91.00	96.42	97.22
10mM 磷酸盐 (pH 7.0)	0d	7.0	白色疏松体	98.48	99.85	99.59
	7d	7.0	白色疏松体	93.71	97.54	99.54
	14d	7.0	白色疏松体	91.93	94.89	97.95
	30d	7.0	白色疏松体	88.87	95.16	98.09
10mM 磷酸盐 (pH 7.5)	0d	7.5	白色疏松体	98.45	99.70	99.51
	7d	7.5	白色疏松体	94.09	97.14	99.5
	14d	7.5	白色疏松体	92.28	95.06	97.63
	30d	7.5	白色疏松体	83.64	92.33	98.70

根据上述考察结果可知，与磷酸盐缓冲体系样品相比，pH6.0 组氨酸-盐酸缓冲体系样品的RP-HPLC纯度下降明显，稳定性较差；而pH5.0 琥珀酸钠-盐酸和pH 5.5 组氨酸-盐酸缓冲体系样品的稳定性，虽与磷酸盐缓冲体系样品的稳定性基本相当，但这两种缓冲体系可缓冲的pH范围较窄，存在一定不足。综上，最终选择使用磷酸盐缓冲体系。

实施例 3. IL-2 制剂中赋形剂的筛选

赋形剂会影响药物的外观和稳定性。鉴于甘露醇作为冻干骨架可以获得良好的外观，而海藻糖、蔗糖作为蛋白药常用的保护剂，有利于提高药物的稳定性。故初步选择使用甘露醇或/和海藻糖、蔗糖作为赋形剂，并对赋形剂的用量进行了考察。具体地，使用较为稳妥的冻干工艺（一次干燥温度为-29℃），分别制备 5%甘露醇、1%甘露醇+7%海藻糖、1%甘露醇+7%蔗糖、2%甘露醇+5.25%海藻糖和 3%甘露醇+3.5%海藻糖的样品（分别对应制剂编号 1 至 4）。然后将上述不同制剂的样品于 40℃放置 14d，并于 0d、7d、14d 考察相关指标。原料药 1 考察结果见表 3：

表 3.不同比例的赋形剂对 40℃ 14d 稳定性的影响

制剂 编号	赋形剂	考察条件		外观	纯度 (%)		
					RP-HPLC	SE-HPLC	IE-HPLC
1	5%甘露醇	起始	0 天	白色疏松体	98.28	99.61	99.29
		40℃	7 天	白色疏松体	95.43	97.75	99.22
			14 天	白色疏松体	92.84	95.10	98.74
2	1%甘露醇 +7%海藻糖	起始	0 天	白色疏松体，轻微缩底	98.19	99.77	99.36
		40℃	7 天	白色疏松体，轻微缩底	97.89	99.62	99.40
			14 天	白色疏松体，轻微缩底	97.79	99.79	99.15
3	2%甘露醇 +5.25%海藻 糖	起始	0 天	白色疏松体，轻微缩底	98.19	99.78	99.51
		40℃	7 天	白色疏松体，轻微缩底	97.64	99.57	99.38
			14 天	白色疏松体，轻微缩底	97.45	99.79	99.20
4	3%甘露醇 +3.5%海藻 糖	起始	0 天	白色疏松体	98.18	99.8	99.54
		40℃	7 天	白色疏松体	97.42	99.46	99.59
			14 天	白色疏松体	97.38	99.61	99.43

根据试验结果可知，高温 40℃放置 14d 后，制剂编号 1 样品的 RP-HPLC 和 SEC-HPLC 纯度有较明显的降低，而制剂编号 2 至 4 样品的稳定性变化趋势类似且无明显差异。另外，制剂编号 1 和 4 样品的外观良好，而制剂编号 2 和 3 样品冻干后的外观有轻微缩底（shrinkage）现象。相同实验条件下，即高温 40℃放置 14d 后，本研究中也检测了 1%甘露醇+7%蔗糖作为赋形剂的制剂，发现有较为明显缩底现象，因此不选择该赋形剂。综上，综合考虑样品的稳定性和外观，最终将待测物制剂中赋形剂组合物的用量确定为 3%甘露醇+3.5%海藻糖，即甘露醇的制剂浓度为 30mg/mL，海藻糖的制剂浓度为 35mg/mL（以二水物计，为 38.68mg/mL）。将甘露醇和海藻糖质量比控制在 6：6 至 6：8 的范围。

实施例 4. IL-2 制剂中表面活性剂的筛选

在制剂中加入表面活性剂有利于提高药物的稳定性，本实施例对聚山梨酯 80 提高药物稳定性的作用进行初步评估。具体地，以 5%甘露醇为赋性剂，分别制备不含聚山梨酯 80 和含有 0.05mg/mL 聚山梨酯 80 的样品。然后将上述两种制剂的样品于 40℃放置 30d，并于 0d、7d、14d、30d 考察相关指标。原料药 1 考察结果见表 4：

表 4. 不含和含表面活性剂原料药 1 样品 40℃ 30d 考察结果

表面活性剂	考察条件		外观	纯度（%）		
				RP-HPLC	SE-HPLC	IE-HPLC
0 mg/mL	起始	0 天	白色疏松体	98.44	99.73	99.58
	40℃	7 天	白色疏松体	94.58	95.82	99.76
		14 天	白色疏松体	92.96	93.05	97.80
		30 天	白色疏松体	89.64	92.59	97.90
0.05mg/mL	起始	0 天	白色疏松体	98.48	99.85	99.59
	40℃	7 天	白色疏松体	93.71	97.54	99.54
		14 天	白色疏松体	91.93	94.89	97.95
		30 天	白色疏松体	88.87	95.16	98.09

由上表考察结果可知，在高温下相对于不含聚山梨酯 80 的制剂，含有聚山梨酯 80 制剂的 SE-HPLC 纯度下降趋势明显变慢，说明聚山梨酯 80 确实起到了一定的提高制剂稳定性的作用，所以选择加入 0.05mg/mL 的聚山梨酯 80 作为待测物的表面活性剂。

类似的，以原料药 2 活性成分的浓度为 2mg/mL 的前提下，分别制备 1%甘露醇+7%海藻糖和 3%甘露醇+4%海藻糖样品，以及选择聚山梨酯 80 作为表面活性剂，然后将上述不同制剂的样品于 40℃放置，并于 14 天考察相关指标。考察结果见表 5。

表 5. 不同比例赋形剂对原料药 2 在 40℃ 14d 稳定性的影响

制 剂 编 号	赋形剂	表面活性 剂	检测条 件	RP-HPLC	SEC-HPLC	IE-HPLC
1	1% 甘 露 醇 +7%海藻糖	0.05mg/mL	0 天	98.18	99.89	97.68
2			40℃ 14 天	98.26	99.77	98.4
3	3% 甘 露 醇 +4%海藻糖	0.05mg/mL	0 天	98.19	99.86	97.66
4			40℃ 14 天	98.31	99.78	98.16

根据试验结果可知, 高温 40℃放置 14d 后, 在聚山梨酯 80 为 0.05mg/mL 时候, 1%甘露醇+7%海藻糖和 3%甘露醇+4%海藻糖制剂稳定性基本无差别, 7%海藻糖 +1%甘露醇外观轻微塌陷。综上, 综合考虑样品的稳定性和外观和工艺时长, 最终将待测物制剂中赋形剂组合物的用量确定为 3%甘露醇+4%海藻糖, 即甘露醇的制剂浓度为 30mg/mL, 海藻糖的制剂浓度为 40mg/mL, 聚山梨酯 80 为 0.05mg/mL。

实施例 5. IL-2 制剂组分的确定

根据筛选研究结果, 最终确定的制剂组分见表 6。

表 6. 制剂 (规格: 2mg)

组分名称	每毫升用量 (mg)	每瓶用量 (mg)
原料药 1	2	2.3
甘露醇	30	34.5
海藻糖 ^[1]	38.68	44.482
聚山梨酯 80	0.05	0.0575
磷酸二氢钠 ^[2]	1.052	1.2098
磷酸氢二钠 ^[3]	0.337	0.3876
注射用水 ^{[4] [5]}	加至 1mL	加至 1.15mL

备注:

[1] 海藻糖, 分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$;

[2] 磷酸二氢钠, 分子式为 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$;

[3] 磷酸氢二钠, 分子式为 Na_2HPO_4 ;

[4] 注射用水在冷冻干燥工序去除;

[5] 制剂标示装量为 1mL, 实际生产时的目标装量设定为 1.15mL。

实施例 6. IL-2 制剂的相关特性检测

IL-2 变体制剂 (表 6) 相关特性包括外观、溶液澄清度与颜色、不溶性微粒、可见异物、水分、pH 值、蛋白质含量、纯度、生物学活性、无菌与细菌内毒素等均符合申报临床注册批的质量要求。参见表 7, 各批次样品质量相当。

表 7. 制剂样品相关特性-含量、纯度与生物学活性

样品批号	规格	蛋白质含量 (%)	纯度 (%)				生物学活性 (%)
			RP-HPLC	SE-HPLC	IE-HPLC	电泳	
中试批 1	2mg	98	99.3	99.8	99.7	100.0	100
中试批 2		100	99.4	99.8	99.7	100.0	96
临床批 1		100	99.2	99.8	99.7	100.0	104

实施例 7. IL-2 制剂滤膜的吸附检测

按照表 6 的制剂组分配制 2mg/mL 液体制剂，然后使用 0.22μm PVDF 材质的
5 滤膜对上述液体制剂进行过滤，按照每 3ml 滤液为 1 个单位，连续收集 4 份过滤样品进行含量检测，并与过滤前液体制剂的含量进行比较。结果参见表 8，液体制剂经过 PVDF 材质的滤膜过滤后，各取样点的蛋白含量和聚山梨酯 80 含量与过滤前相比均无显著变化，可以选用 PVDF 材质的滤膜进行过滤。

表 8. 滤膜吸附考察

过滤体积 (mL)	蛋白含量 (mg/mL)	聚山梨酯 80 含量 (mg/mL)
未过滤液体制剂	2.08	0.051
3	2.05	0.054
6	2.06	0.057
9	2.07	0.047
12	2.06	0.046

10

实施例 8. IL-2 制剂的冻干

将 IL-2 制剂按照表 6 中制剂组分填充入西林瓶中，装入冻干箱中，冻干。冻干程序为预冻、一次干燥和二次干燥。冻干程序结束后，真空加塞。复溶样品进行冻干前后对比。结果表明，复溶溶液可保持液体制剂良好的性能。

15

虽然为了清楚的理解，已经借助于实例详细描述了上述发明，但是描述和实例不应当解释为限制本公开的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚结合。

权利要求书

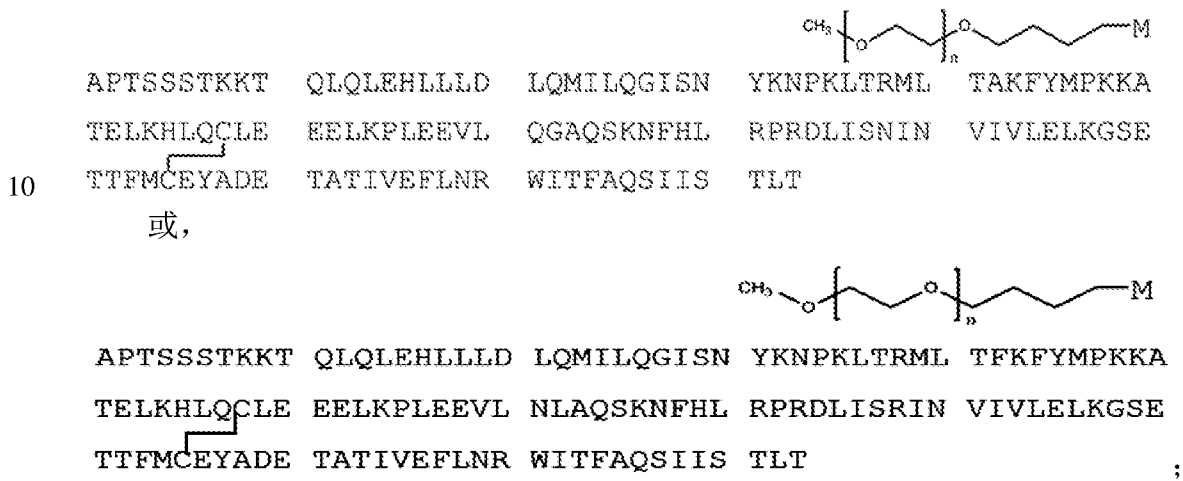
1. 一种药物组合物，其包含 IL-2、甘露醇、海藻糖和聚山梨醇酯；
所述 IL-2 为 IL-2 变体或其衍生物，
5 所述 IL-2 变体或其衍生物包含选自 N26Q 和/或 N29S 的突变。
2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其中甘露醇和海藻糖的质量比为 1：
10 至 10：1，优选为 1：7 至 1：1，更优选为 1：7 至 6：7，最优选为 6：8 至 6：
7。
- 10 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的药物组合物，其中：
所述 IL-2 的浓度为约 0.1mg/mL 至约 100mg/mL，优选为约 1mg/mL 至约
10mg/mL，更优选为约 2 mg/mL；和/或，
所述甘露醇浓度为约 10mg/mL 至约 100mg/mL，优选为约 10mg/mL 至约
15 50mg/mL，更优选为约 30mg/mL；和/或，
所述海藻糖浓度为约 10mg/mL 至约 100mg/mL，优选为约 30mg/mL 至约
60mg/mL；更优选为约 35mg/mL；和/或，
所述聚山梨醇酯为聚山梨醇酯 80；浓度为约 0.01mg/mL 至约 0.2mg/mL，优选为约
0.02mg/mL 至约 0.1mg/mL，最优选为约 0.05mg/mL。
- 20 4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的药物组合物，还包含缓冲液，所述缓
冲液选自枸橼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、组氨酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、碳
酸缓冲液、琥珀酸盐缓冲液；优选为磷酸盐缓冲液。
- 25 5. 根据权利要求 4 所述的药物组合物，所述缓冲液的浓度为约 2 mM 至约
50mM，优选为约 5mM 至约 20mM，更优选为约 10mM。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项所述的药物组合物，所述药物组合物的 pH
为 5.5 至 7.5，优选 pH 为 6.0 至 7.0，更优选 pH 为约 6.5。
- 30 7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项所述的药物组合物，所述 IL-2 溶于生理学可
接受的溶剂，优选生理盐水、注射用水、葡萄糖溶液。
8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的药物组合物，其中包含：
35 a) 0.1mg/mL 至 100mg/mL 的 IL-2，
b) 10 mg/mL 至 100mg/mL 的甘露醇，
c) 10 mg/mL 至 100mg/mL 的海藻糖，和

- d) 0.01 mg/mL 至 0.2mg/mL 的聚山梨醇酯，
所述药物组合物的 pH 为 5.0 至 7.5；
优选地，所述药物组合合物中包含：
- 5 a) 1 mg/mL 至 10 mg/mL 的 IL-2，
b) 10 mg/mL 至 50mg/mL 的甘露醇，
c) 30 mg/mL 至 60mg/mL 的海藻糖，
d) 0.02 mg/mL 至 0.1 mg/mL 的聚山梨醇酯 80，
e) 5mM 至 20mM 的磷酸盐缓冲液，
所述药物组合物的 pH 为 6.0 至 7.0；
10 更优选地，所述药物组合合物中包含：
a) 约 2 mg/mL 的 IL-2，
b) 约 30mg/mL 的甘露醇，
c) 约 35mg/mL 的海藻糖，
d) 约 0.05 mg/mL 的聚山梨醇酯 80，
15 e) 约 10mM 的磷酸盐缓冲液，
所述药物组合物的 pH 为约 6.5。
9. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的药物组合物，所述 IL-2 变体或其衍生物包含第一类突变，还包含第二类突变和/或第三类突变，以及任选地，所述 IL-2
20 变体或其衍生物可以包含或不包含 C125A；
其中，所述第一类突变选自 N26Q 和/或 N29S，
优选地，第一类突变进一步包含 N71Q；
所述第二类突变选自 1) 至 3) 中的任一项：
1) F42A 和 Y45A，
25 2) F42A 和 L72G，和
3) Y45A 和 L72G；
所述第三类突变为 N88R 或 N88G 或 N88I 或 N88D；
优选地，所述 IL-2 变体或其衍生物包含 4) 至 6) 中任一项所示的突变：
4) N26Q、N29S、F42A、N71Q 和 L72G，
30 5) N26Q、N29S 和 N88R，
6) N26Q、N29S、F42A 和 L72G。
10. 根据权利要求 9 所述的药物组合物，所述 IL-2 变体或其衍生物包含选自
SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO:
35 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 30 中任一项所示的多肽；
任选地，所述 IL-2 变体或其衍生物可以包含或不包含第 1 位的氨基酸 M。

11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的药物组合物, 所述 IL-2 是单体、和/或 PEG 化的、和/或糖基化的、和/或白蛋白缀合或融合的、和/或 Fc 融合的、和/或羟乙基化的、和/或去除 O-糖基化的;

- 5 优选地, PEG 连接至 IL-2 变体的 N 端;
更优选地, PEG 的相对分子量为 5KD 至 50KD;
最优选地, PEG 的相对分子量为约 20KD。

12. 根据权利要求 9 所述的药物组合物, 所述 IL-2 变体或其衍生物选自:



其中 PEG 的相对分子量为约 20KD;

任选地, 所述 IL-2 变体或其衍生物可以包含或不包含第 1 位的氨基酸 M。

15

13. 一种冻干制剂, 所述冻干制剂通过将权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物经冷冻干燥获得; 和/或, 所述冻干制剂经复溶可形成如权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物。

20

14. 一种复溶溶液, 所述复溶溶液通过将权利要求 13 所述的冻干制剂经复溶制备获得。

15. 根据权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物、或如权利要求 13 所述的冻干制剂、或如权利要求 14 所述的复溶溶液在制备药物中的用途;

25

当 IL-2 为含有第一类突变, 或含有第一类和第二类突变时, 所述的药物组合物用于治疗增生性疾病或转移性增生性疾病、免疫性疾病、调节 T 细胞介导的免疫应答、刺激个体免疫系统;

优选地, 所述增生性疾病是肿瘤或癌,

优选地, 所述免疫性疾病是糖尿病;

30

更优选地, 所述肿瘤或癌选自上皮细胞癌、内皮细胞癌、鳞状细胞癌、乳头

状瘤病毒引起的癌、腺癌、癌肿、黑素瘤、肉瘤、畸胎瘤、肺部肿瘤、转移性肺癌、淋巴瘤和转移性肾细胞癌；

当 IL-2 为含有第一类突变，或含有第一类和第三类突变时，所述的药物用于治疗自身免疫性疾病或器官移植之后的自身免疫反应；

- 5 优选地，所述自身免疫疾病选自 I 型糖尿病、类风湿性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、湿疹、哮喘。

16. 制备权利要求 1 至 12 任一项所述的药物组合物的方法，所述方法包括将 IL-2 与各药用辅料混合的步骤。

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130277

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/21(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; USTXT; EPTXT; WOTXT; JPTXT; CNKI; ISI; NCBI; China Patents Biological Sequence Search System: 江苏恒瑞医药, 上海盛迪医药, 杨晓容, 陈钟威, 王淇, 白细胞介素-2, 白介素-2, 白介2, 甘露醇, 海藻糖, 聚山梨醇酯, 吐温, 突变, 变体, JIANGSU HENGRUI MEDICINE, SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL, YANG XIAORONG, CHEN ZHONGWEI, WANG QI, interleukin-2, IL-2, mannitol, mycose, trehalose, polysorbate, tween, mutant, variant, N26Q, N29S, SEQ ID NO: 32, 34, 38, 22, 24, 26, 28, 30

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101002735 A (HUAXIN HI-BIOTECH CO., LTD., SHANGHAI) 25 July 2007 (2007-07-25) claims 1-8	1-16
A	CN 101244261 A (SHANDONG UNIVERSITY) 20 August 2008 (2008-08-20) entire description	1-16
A	CN 1437466 A (CHIRON CORPORATION) 20 August 2003 (2003-08-20) entire description	1-16
A	CN 111647068 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 11 September 2020 (2020-09-11) entire description	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 December 2021

Date of mailing of the international search report

09 December 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/130277

Box No. I **Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/130277

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
CN	101002735	A	25 July 2007	None			
CN	101244261	A	20 August 2008	CN	101244261	B	15 September 2010
CN	1437466	A	20 August 2003		NO20023123	A	07 August 2002
					HU0204136	A2	28 March 2003
				US	2008003294	A1	03 January 2008
				WO	0149274	A3	14 February 2002
					AU2603701	A	16 July 2001
					BR0016879	A	03 December 2002
					NZ520379	A	28 May 2004
					SK11142002	A3	08 September 2004
				CN	1853725	A	01 November 2006
				WO	0149274	A2	12 July 2001
				US	2003198602	A1	23 October 2003
					CZ20022265	A3	14 January 2004
				CN	100333790	C	29 August 2007
				JP	2003519175	A	17 June 2003
				EP	1244432	A2	02 October 2002
					AU783795	B2	08 December 2005
					IL150461	A	26 November 2008
					AU2006200923	A1	30 March 2006
CN	111647068	A	11 September 2020	None			

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/130277

A. 主题的分类

A61K 38/21(2006.01)i; A61K 9/19(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;DWPI;SIPOABS;USTXT;EPTXT;WOTXT;JPTXT;CNKI;ISI;NCBI;中国专利生物序列检索系统;江苏恒瑞医药, 上海盛迪医药, 杨晓容, 陈钟威, 王淇, 白细胞介素-2, 白介素-2, 白介2, 甘露醇, 海藻糖, 聚山梨醇酯, 吐温, 突变, 变体, JIANGSU HENGRUI MEDICINE, SHANGHAI SHENGDI PHARMACEUTICAL, YANG XIAORONG, CHEN ZHONGWEI, WANG QI, interleukin-2, IL-2, mannitol, mycose, trehalose, polysorbate, tween, mutant, variant, N26Q, N29S, SEQ ID NO:32, 34, 38, 22, 24, 26, 28, 30

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101002735 A (上海华新生物高科技有限公司) 2007年7月25日 (2007 - 07 - 25) 权利要求1-8	1-16
A	CN 101244261 A (山东大学) 2008年8月20日 (2008 - 08 - 20) 说明书全文	1-16
A	CN 1437466 A (希龙公司) 2003年8月20日 (2003 - 08 - 20) 说明书全文	1-16
A	CN 111647068 A (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2020年9月11日 (2020 - 09 - 11) 说明书全文	1-16



其余文件在C栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2021年12月1日

国际检索报告邮寄日期

2021年12月9日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

孙尚瑜

电话号码 (86-512)88996410

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/130277

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	101002735	A	2007年7月25日	无	
CN	101244261	A	2008年8月20日	CN	101244261 B 2010年9月15日
CN	1437466	A	2003年8月20日	N020023123 A 2002年8月7日	
				HU0204136 A2 2003年3月28日	
				US 2008003294 A1 2008年1月3日	
				WO 0149274 A3 2002年2月14日	
				AU2603701 A 2001年7月16日	
				BR0016879 A 2002年12月3日	
				NZ520379 A 2004年5月28日	
				SK11142002 A3 2004年9月8日	
				CN 1853725 A 2006年11月1日	
				WO 0149274 A2 2001年7月12日	
				US 2003198602 A1 2003年10月23日	
				CZ20022265 A3 2004年1月14日	
				CN 100333790 C 2007年8月29日	
				JP 2003519175 A 2003年6月17日	
				EP 1244432 A2 2002年10月2日	
				AU783795 B2 2005年12月8日	
				IL150461 A 2008年11月26日	
				AU2006200923 A1 2006年3月30日	
CN	111647068	A	2020年9月11日	无	