(19) SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) CH 695 848 A5

(51) Int. Cl.: A61K 38/20 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) PATENTSCHRIFT

(21) Gesuchsnummer: 00188/05

(22) Anmeldedatum: 07.02.2005

(24) Patent erteilt: 29.09.2006

(45) Patentschrift veröffentlicht: 29.09.2006

(73) Inhaber:
Chiron Corporation, 4560 Horton Street
Emeryville (CA 94608) (US)

(72) Erfinder:
HORA, Maninder, Emeryville, CA 94608 (US)

(74) Vertreter:
E. Blum & Co. Patentanwälte, Am Vorderberg 11
8044 Zürich (CH)

(54) Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Interleukin-2-Zusammensetzung.

(57) Ein Verfahren zur Herstellung von Aldesleukin für die pharmazeutische Verwendung, die Schritte umfassend, bei denen man: (a) SDS zu einer Zusammensetzung gibt, die Aldesleukin umfasst, um eine hohe Endkonzentration an SDS zu erreichen; (b) die SDS-Menge reduziert, um eine Zusammensetzung mit einer niedrigen SDS-Konzentration zu erhalten. Zugabe und anschliessende partielle Entfernung von SDS erzeugt Mikroaggregate von Aldesleukin und SDS, die für die pharmazeutische Verwendung geeignet sind.

Beschreibung

[0001] Alle zitierten Onlineinformationen und Dokumente sind in ihrer Ganzheit als Referenz beigefügt.

Technischer Bereich

[0002] Diese Erfindung betrifft den Bereich der Herstellung und Formulierung von Interleukin-2 für die pharmazeutische Verwendung.

Stand der Technik

[0003] Interleukin-2 (IL-2) ist ein Cytokin, das in vivo das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen fördert, weiterhin erhöht es die Zytotoxizität von CD8+ T-Zellen und von «natürlichen Killerzellen». Die Verabreichung an Patienten hat eine Vielzahl dosisabhängiger immunologischer Wirkungen zur Folge. Hierzu gehören die Aktivierung der zellulären Immunität durch erhebliche Lymphozytose, Eosinophilie, Thrombocytopenie, und die Produktion von Cytokinen, einschliesslich TNF, IL-1 und Interferon-γ. Weitere Details des IL-2 können seiner «GeneCard» unter der «Accession Number» GC04M123831 entnommen werden.

[0004] IL-2 ist in mehreren Ländern für die pharmazeutische Verwendung beim Menschen zugelassen. Der vorgeschlagene internationale, nicht-eigentumsrechtlich geschützte Name ist ALDESLEUKIN, und eine Formulierung wird von der Chiron Corportion unter dem Namen PROLEUKIN™ vermarktet. Die US-amerikanische FDA hat PROLEUKIN™ IL-2 zur Behandlung von Erwachsenen mit metastasierendem Nierenzell-Karzinom oder metastasierendem Melanom zugelassen.

[0005] Wie in den US-amerikanischen Verschreibungsinformationen dargestellt, existiert PROLEUKIN™ als biologisch aktive, nicht-kovalent gebundene Mikroaggregate mit einer durchschnittlichen Grösse von 27 rekombinanten EL-2 Molekülen. Es wird als ein steriler, weisser bis gebrochen weisser lyophilisierter Kuchen, in Einmal-Gefässen zur intravenösen (IV) Verabreichung geliefert. Wird diese Substanz mit 1,2 ml sterilem Wasser für die Injektion rekonstituiert, enthält jeder ml 18 Millionen IU (1,1 mg) PROLEUKIN™ IL-2, 50 mg Mannit, und 0,18 mg Natriumdodecylsulfat (SDS), gepuffert auf pH 7,5 mit ungefähr 0,17 mg Natriumdihydrogenphosphat (monobasisch) und 0,89 mg Dinatriumhydrogenphosphat (dibasisch). Einfaches Mischen dieser Bestandteile gibt jedoch nicht die gleiche IL-2 Mikroaggregatform wie das PROLEUKIN™-Produkt sie darstellt.

[0006] Die Mikroaggregation des IL-2 in dem PROLEUKIN™-Produkt ist wichtig für seine In-vivo-Effizienz. Die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften von nicht aggregiertem (freiem monomerem) IL-2 sind sehr verschieden von denen des mikroaggregierten IL-2 und die zwei Formen haben verschiedene therapeutische Indizes: Zu kleine Aggregate werden zu schnell vom Körper ausgeschieden, zu grosse Aggregate können unlöslich und weniger wirksam sein. Mikroaggregation ist daher eine wesentliche Eigenschaft des PROLEUKIN-Produktes.

[0007] Das Verfahren, mit denen die biologisch aktiven PROLEUKIN™-Mikroaggregate gebildet werden, ist der Öffentlichkeit bisher nicht zugänglich gemacht worden. Und dies, obwohl eine Vielzahl von Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen IL-2-Formulierungen im Stand der Technik beschrieben sind (siehe zum Beispiel Zitate 1–30). Insbesondere Zitat 9 gibt vor, die Herstellungsverfahren für PROLEUKIN™ zu offenbaren, einschliesslich Details zur Expression, Gewinnung, Aufreinigung, Formulierung und Endbearbeitung, aber diese Offenbarung ist in mehreren Aspekten unvollständig.

[0008] Es wäre für jeden, der ein IL-2-Produkt, ähnlich dem PROLEUKIN™, herstellen möchte, nützlich zu wissen, wie man dieselbe Mikroaggregat-Form des IL-2 erzielt, wie sie in dem PROLEUKIN™-Produkt vorliegt. Es ist deshalb beabsichtigt, mit dieser Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von IL-2 Mikroaggregaten zu ermöglichen, wie sie in dem PROLEUKIN™-Produkt vorliegen und auch derartiges mikroaggregiertes IL-2 zur Verfügung zu stellen. Ein weiteres Anliegen der Erfindung ist es, ein Verfahren für die Herstellung von IL-2 zu ermöglichen und die Offenbarung in Zitat 9 zu ergänzen.

Offenbarung der Erfindung

[0009] Das Verfahren, mit dem das PROLEUKIN™-Produkt hergestellt wird, umfasst die folgenden Schritte: (i) Reinigung von exprimiertem IL-2 aus der Zellkultur; (ii) solubilisieren des IL-2 unter Verwendung von SDS-Detergens; (iii) Reduzierung des IL-2 zu monomerer Form; (iv) Reinigung, Oxidierung und Präzipitation von IL-2; (v) Resolubisierung von IL-2 unter Verwendung einer hohen Konzentration von SDS-Detergens; (vi) Reinigung zur Entfernung von oligomerem IL-2; (vii) Diafiltration zur Verringerung der SDS-Konzentration, ohne es vollständig zu entfernen, jedoch bis zu einen optimalen Bereich, um ein entsprechend mikroaggregiertes IL-2-Präparat zu erhalten; (viii) Formulierung mit Mannit und Puffer; und (ix) Lyophilisierung und Verpackung.

[0010] Die Schritte (i), (iv), (vi), (viii) und (ix) dieses Verfahrens sind in Zitat 9 offenbart, aber die Schritte (ii), (iii), (v) und (vii) sind es nicht, obwohl die Verwendung eines nicht näher beschriebenen Detergens zur Resolubisierung des IL-2 vor Schritt (vi) offenbart wird. Weiterhin schlägt Zitat 9 vor, dass SDS zu dem IL-2 nach der Reinigung in Schritt (vi) zugegeben werden soll, während es tatsächlich entfernt wird.

[0011] Von den neun Schritten sind die kritischsten Schritte (v) und (vii), diejenigen, in denen die Mikroaggregate gebildet werden. Keiner der nachfolgenden Schritte (viii) oder (ix) haben eine signifikante Wirkung auf die Mikroaggregation und die Reinigungsschritte in (i), (ii), (iii), (iv) und (vi) haben ebenfalls nur wenige Wirkungen. Sobald das SDS in Schritt (v)

zugefügt ist, löst sich das IL-2, und es ist die folgende Verringerung der SDS-Menge in Schritt (vii), die zur Bildung der Mikroaggregate führt, wie sie in dem finalen PROLEUKIN™-Produkt vorliegen. Es muss genug SDS zugefügt werden, um das präzipitierte IL-2 in eine im Wesentlichen monomere, lösliche Form zu resolubisieren, und danach muss das SDS entfernt werden (aber nicht vollständig), um die gewünschten Mikroaggregate zu bilden.

[0012] Die Erfindung stellt deshalb ein Verfahren zur Herstellung von IL-2 für die pharmazeutische Verwendung vor, das Schritte umfasst, bei denen man: (a) Natriumdodecylsulfat (SDS) zu einer Zusammensetzung gibt, die Interleukin-2 umfasst, um eine Endkonzentration von mindestens 500 µg SDS pro mg IL-2 zu erhalten; (b) etwas, aber nicht alles SDS entfernt, um eine Zusammensetzung zu erhalten, die zwischen 95 und 250 µg SDS pro mg IL-2 enthält. Dieser Vorgang der SDS-Zugabe und der folgenden teilweise Entfernung erzielt optimale Bedingungen für eine enge Wechselwirkung von IL-2 und SDS Molekülen, um Mikroaggregate aus IL-2 und SDS zu bilden, so wie sie in dem PROLEUKIN™-Produkt vorliegen. Ferner erzielt dieser Vorgang bei einem bestimmten IL-2/SDS-Verhältnis eine andere Produktform als die, die durch einfaches Mischen von SDS und IL-2 erzielt wird.

[0013] Die wässrige Zusammensetzung, die im Laufe des Verfahrens entsteht, kann für die Versendung lyophilisiert werden und das lyophilisierte Material kann schliesslich, zur Anwendung beim Patienten, mit einem wässrigen Träger rekonstituiert werden. Nach der Rekonstitution hat die Zusammensetzung bevorzugt eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g und/oder umfasst SDS/IL-2 Aggregate mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm. Deshalb kann das Verfahren zusätzliche Schritte zur Lyophilisierung der Zusammensetzung und dann, gegebenenfalls, Schritte zur Rekonstituierung der Zusammensetzung mit einem wässrigen Medium enthalten. Die Zusammensetzung kann diese τ-Werte und/oder hydrodynamischen Eigenschaften auch vor dem Lyophilisierungsschritt haben.

[0014] Die Erfindung stellt eine Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Aggregate durch das erfindungsgemässe Verfahren erhalten werden. Diese Zusammensetzungen sind geeignet für die pharmazeutische Verwendung, wie es mit dem PROLEUKIN™-Produkt gezeigt wurde.

[0015] Die Erfindung stellt ferner eine Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g hat. Diese Zusammensetzungen sind geeignet für die pharmazeutische Verwendung, wie es mit dem PROLEUKIN™-Produkt gezeigt wurde.

[0016] Die Erfindung stellt ferner eine Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei Aggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm haben. Diese Zusammensetzungen sind geeignet für die pharmazeutische Verwendung, wie es mit dem PROLEUKIN™-Produkt gezeigt wurde.

[0017] Die Erfindung stellt weiterhin eine Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen, wobei die durchschnittliche Zahl der Interleukin-2 Moleküle pro Aggregat zwischen 10 und 50 liegt. Diese Zusammensetzungen sind geeignet für die pharmazeutische Verwendung, wie es mit dem PROLEUKIN™-Produkt gezeigt wurde.

[0018] Die Erfindung stellt eine lyophilisierte Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei die Zusammensetzung rekonstituiert werden kann, um eine wässrige Lösung zu ergeben, in der Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g hat. Nicht nur, oder sowohl als auch, sind die Aggregate durch τ charakterisiert, sondern sie können ferner einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm haben. Diese Zusammensetzungen sind geeignet für die pharmazeutische Verwendung, wie es mit dem PROLEUKIN™-Produkt gezeigt wurde.

[0019] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei: (i) die Zusammensetzung rekonstituiert werden kann, um eine wässrige Zusammensetzung zu ergeben, in der Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g hat und (ii) das Verfahren beinhaltet Schritte, in denen (a) Natriumdodecylsulfat zu einer Zusammensetzung, die Interleukin-2 umfasst, gegeben wird, wobei genügend Natriumdodecylsulfat zugegeben wird, so dass gelöstes monomeres Interleukin-2 entsteht, (b) die Konzentration an Natriumdodecylsulfat so weit gesenkt wird, dass das Interleukin-2 Aggregate mit dem Natriumdodecylsulfat bildet, und (c) die Zusammensetzung lyophilisiert wird.

[0020] Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten Zusammensetzung zur Verfügung, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei: (i) die Zusammensetzung rekonstituiert werden kann, um eine wässrige Zusammensetzung zu ergeben, in der Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Aggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm haben und (ii) das Verfahren Schritte umfasst, in denen (a) Natriumdodecylsulfat zu einer Zusammensetzung, die Interleukin-2 umfasst, gegeben wird, wobei genügend Natriumdodecylsulfat zugegeben wird, so dass gelöstes monomeres Interleukin-2 entsteht, (b) die Konzentration an Natriumdodecylsulfat so weit gesenkt wird, dass das Interleukin-2 Aggregate mit dem Natriumdodecylsulfat bildet, und (c) die Zusammensetzung lyophilisiert wird.

[0021] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten Zusammensetzung, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei: (i) die Zusammensetzung rekonstituiert werden kann, um eine wässrige Zusammensetzung zu ergeben, in der Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g hat und (ii) das Verfahren umfasst Schritte, in denen (a) Natriumdodecylsulfat und Interleukin-2 so gemischt werden, dass Natriumdodecylsulfat in einer ersten Konzentration vorliegt, (b) Natriumdodecylsulfat aus der Mischung entfernt wird, um es auf eine zweite Konzentration zu reduzieren, und (c) Lyophilisierung der Zusammensetzung, wobei die besagte Zusammensetzung erhalten wird. Die zweite Konzentration ist geringer als die erste: Die erste Konzentration ist im Allgemeinen zumindest 500 µg SDS pro mg IL-2 in der Mischung und die zweite Konzentration ist im Allgemeinen zwischen 95 und 250 µg SDS pro mg IL-2.

[0022] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei: (i) die Zusammensetzung rekonstituiert werden kann, um eine wässrige Zusammensetzung zu ergeben, in der Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Aggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm haben und (ii) das Verfahren Schritte umfasst, in denen (a) Natriumdodecylsulfat und Interleukin-2 so gemischt werden, dass Natriumdodecylsulfat in einer ersten Konzentration vorliegt, (b) Natriumdodecylsulfat aus der Mischung entfernt wird, so dass es in einer zweiten Konzentration vorliegt und (c) Lyophilisierung der Zusammensetzung, wobei die besagte Zusammensetzung erhalten wird. Die zweite Konzentration ist geringer als die erste: Die erste Konzentration ist im Allgemeinen zumindest 500 µg SDS pro mg IL-2 in der Mischung und die zweite Konzentration ist im Allgemeinen zwischen 95 und 250 µg SDS pro mg IL-2.

[0023] Die Erfindung stellt auch ein Verfahren zur Herstellung einer lyophilisierten Zusammensetzung bereit, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei: (i) die Zusammensetzung rekonstituiert werden kann, um eine wässrige Zusammensetzung zu ergeben, in der Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen und wobei die Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g hat und worin die SDS-Konzentration «χ» µg SDS pro mg IL-2 ist, wobei χ zwischen 95 und 250 ist und (ii) das Verfahren Schritte umfasst, in denen (a) Natriumdodecylsulfat und Interleukin-2 so gemischt werden, dass eine Mischung entsteht, in der die SDS-Konzentration vorliegt, die mindestens 4-mal höher als «χ» ist, (b) ein Teil des SDS aber nicht alles von der Mischung entfernt wird, so dass die SDS-Konzentration «χ» ist und (c) Lyophilisierung der Zusammensetzung. Die Konzentration ist bevorzugt mindestens 5-mal höher als «χ», und besonders bevorzugt mindestens 8-mal höher, 10-mal höher, 15-mal höher oder sogar 20-mal höher.

[0024] Die Erfindung beinhaltet ebenfalls Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung bestehend aus Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat (SDS), wobei (i) Interleukin-2 und SDS in der Zusammensetzung in der Form von Aggregaten vorliegen, wobei die Aggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm haben und wobei die SDS-Konzentration «χ» µg SDS pro mg IL-2 ist, wobei χ zwischen 95 und 250 ist und (ii) das Verfahren Schritte beinhaltet, in denen (a) Natriumdodecylsulfat und Interleukin-2 so gemischt werden, dass eine Mischung entsteht, in der die SDS-Konzentration vorliegt, die mindestens 4-mal höher als «χ» ist, (b) ein Teil des SDS aber nicht alles von der Mischung entfernt wird, so dass die SDS-Konzentration «χ» ist und (c) Lyophilisierung der Zusammensetzung. Die Konzentration ist bevorzugt mindestens 5-mal höher als «χ», und besonders bevorzugt mindestens 8-mal höher, 10-mal höher, 15-mal höher oder sogar 20-mal höher. In Fällen, wo das Verfahren der Erfindung die Reduzierung der SDS-Konzentration auf Werte zwischen 95–250 µg SDS pro mg IL-2 beinhaltet, ist es in einigen Fällen möglich, die Konzentration auf unter 95 µg/mg (zum Beispiel auf zwischen 50–95 µg/mg) zu senken und sie dann wieder auf Konzentrationen zwischen 95 und 250 µg/mg zu erhöhen. Dieser Anstieg auf 95–250 µg/mg kann bequem während der Rekonstitution des lyophilisierten Materials stattfinden, zum Beispiel kann dieses Verfahren eine Verringerung des SDS auf <95 µg/mg gefolgt von Lyophilisierung, gefolgt von Rekonstitution mit einer wässrigen SDS-Lösung beinhalten, so dass die SDS-Konzentration in den Bereich zwischen 95 und 250 mg/mg fällt.

Das Detergens

[0025] Die Verfahren der Erfindung beinhalten die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS), welches auch als Natriumlaurylsulfat bekannt ist. Die chemische Formel dieses anionischen Detergens ist $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3^-Na^+$ seine CAS Nummer ist 151-21-3 und die EC Nummer 205-788-1.

[0026] SDS ist ein Standardreagenz, das verwendet wird um Proteine zu lösen. Wenn IL-2 als Präzipitat vorliegt, bevor SDS zugegeben wird, dann wird es zur Erfüllung von Schritt (a) im Verfahren der Erfindung gebraucht. Ausgehend von einer Zusammensetzung, die präzipitiertes IL-2 umfasst, wird genügend SDS zugegeben um sicherzustellen, dass im Wesentlichen alles gefällte IL-2 gelöst wird (mit Ausnahme aller im Präzipitat vorliegenden kovalent gebundenen IL-2 Multimere, die auch in Gegenwart von SDS überwiegend weiterhin als Präzipitat vorliegen). Mikroaggregation von IL-2 bei einer Konzentration von 1 mg/ml ist im Wesentlichen nicht gegeben, wenn SDS in Konzentrationen von mehr als 500 µg/mg vorliegt, und deshalb wird typischerweise so viel SDS zugegeben, dass die Endkonzentration an SDS mindestens 500 µg SDS pro mg IL-2 beträgt (zum Beispiel mindestens 550, mindestens 600, mindestens 700, mindestens 800, mindestens 900, mindestens 1000, mindestens 1200, mindestens 1400, mindestens 1600, mindestens 1800 oder mindestens 2000 µg SDS pro mg IL-2). Die Verwendung von ungefähr 910 µg SDS pro mg IL-2 ist bevorzugt.

[0027] Die Ausgangskonzentration des SDS in einer Probe ist generell bekannt, da SDS natürlicherweise nicht in Zellen vorkommt und die Menge an SDS kontrolliert wird, die während der Verarbeitung von zellulärem Material zugegeben wurde. Für den Fall, dass die SDS-Konzentration nicht bekannt ist, kann diese mit Hilfe von konventionellen Versuchsverfahren bestimmt werden. Dies kann entweder durch Messung des gesamten Materials oder durch Messung eines Aliquots geschehen. Zum Beispiel offenbart Zitat 31 eine kapillarelektrophoretische Methode zur Auftrennung und Bestimmung von Tensiden, einschliesslich SDS; Zitat 32 offenbart eine «Einzel-Tropfen»-Methode für die Bestimmung von Dodecylsulfat-Ionen in einem Bereich von 0,2–100 µM unter Verwendung eines elektrodenfreien piezoelektrischen Quarz-Kristalls; Zitat 33 vergleicht drei Methoden für die bequeme Bestimmung von SDS in wässrigen Lösungen, namentlich Titration unter Verwendung von Celyltrimethylammonium-Bromid, wobei entweder eine ionenselektive Elektrode benutzt wird oder eine Endpunktbestimmung der Trübung durchgeführt wird, oder die Trübung in der Gegenwart von Myristyltrimethylammonium-Bromid gemessen wird; Zitat 34 offenbart eine Methode zur Bestimmung von SDS, basierend auf dessen Wechselwirkung mit fluoreszierenden Farbstoffen, wie Ethidiumbromid, etc. Die bevorzugte Methode zur Bestimmung des SDS-Gehaltes ist eine spektralphotometrische Messung, basierend auf der Reaktion von SDS mit Acridin-Orange, wie sie im Detail in den Beispielen in Zitat 35 beschrieben wird.

[0028] Alternativ zur Bestimmung des SDS-Gehaltes in Relation zur IL-2-Masse, kann der SDS-Gehalt auch relativ zur IL-2 Aktivität gemessen werden. Basierend auf einer IL-2 Aktivität von 18×10^6 IU in 1,1 mg IL-2 (wie er in PROLEUKIN™ vorliegt), sind 100 µg SDS pro mg IL-2 äquivalent zu 6,111 µg SDS pro MIU IL-2.

[0029] Anstelle der Verwendung von SDS in den Verfahren und Produkten der Erfindung, ist es auch möglich, Natriumlaurethsulfat (SLS) oder Ammoniumlaurylsulfat (ALS) zu benutzen. Mischungen von SLS, ALS und/oder SDS können ebenfalls verwendet werden. In den bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird jedoch SDS verwendet.

Entfernung des Detergens

[0030] Nach der Zugabe des SDS zu der IL-2-Zusammensetzung beinhaltet das Verfahren der Erfindung die Entfernung von einigem (aber nicht allem) SDS, wobei Mikroaggregate von IL-2 und SDS gebildet werden.

[0031] SDS kann mit Hilfe verschiedener Techniken entfernt werden. Ionen-Austausch-Chromatographie kann negativ geladenes SDS entfernen, und Gelfiltration kann auch durchgeführt werden. Am meisten bevorzugt ist jedoch die Entfernung des SDS mittels Diafiltration. Während der Diafiltration werden Lösungsmittel und/oder Mikrosolute (zum Beispiel Salze) durch andere Lösungsmittel und/oder Mikrosolute ersetzt. Im Allgemeinen erfolgen Entfernung und Ersetzung mit der gleichen Geschwindigkeit und das Volumen der Lösung bleibt im Wesentlichen konstant. Die allgemeine Wirkung besteht somit in dem Austausch der ursprünglichen Lösungsmittel/Mikrosolute gegen neue Lösungsmittel/Mikrosolute. Diafiltration gegen einen SDS-freien Puffer ist die bevorzugte Weise zur Entfernung von SDS, zum Beispiel Diafiltration gegen einen 10 mM Natriumphosphat Puffer mit pH 7,5.

[0032] Die Entfernung des SDS wird fortgesetzt, bis die Zusammensetzung zwischen 95 µg und 259 µg SDS pro mg Interleukin-2 umfasst, zum Beispiel 118–210 µg/mg, zwischen 135 µg/mg und 180 µg/mg oder ca. 160 µg/mg, umfasst. Die pharmakokinetischen Eigenschaften von IL-2 sind im Wesentlichen konstant in diesem Bereich und der Gehalt ans SDS ist nicht so hoch, als dass er Anlass zu toxikologischen Bedenken gäbe. Fällt die SDS-Konzentration unter ungefähr 95 µg/mg, kommt es jedoch zu einer starken Zunahme in der Grösse der Mikroaggregate (Fig. 1), sie steigt von durchschnittlich etwa 60 IL-2 Molekülen pro Aggregat bei 95 µg/mg auf durchschnittlich etwa 180 bei 75 µg/mg.

[0033] Zugabe und anschliessende unvollständige Entfernung des SDS führt zum Entstehen der biologisch aktiven IL-2 Mikroaggregate, wie sie in dem PROLEUKIN™-Produkt vorliegen. Einfaches Mischen von SDS und IL-2 in den Konzentrationen, in denen sie in dem PROLEUKIN™-Produkt vorliegen, führt nicht zur Bildung der Mikroaggregate. Zitat 36 beschreibt eine Studie, in der SDS zu IL-2 Präparaten zugegeben wurde, die wie das PROLEUKIN™-Produkt 1.1 mg IL-2 enthalten. Es zeigte sich, dass SDS zur Fällung von IL-2 führte, bei Detergens Konzentrationen zwischen 0,02% und 0,05%. Im Gegensatz hierzu fällt IL-2 nicht bei diesen SDS-Konzentrationen aus, wenn das SDS entsprechend der Erfindung entfernt wird – sogar wenn SDS von 1200 µg/mg (ungefähr 0.1% SDS basierend auf 1,1mg IL-2) auf 70 µg (< 0.01%) abgesenkt wird, findet keine IL-2 Fällung statt.

[0034] Während der Entfernung kann die SDS-Konzentration wie oben beschrieben bestimmt werden. Wenn die Methode zur Entfernung standardisiert und reproduzierbar ist, kann gegebenenfalls auf die Überprüfung der SDS-Mengen verzichtet werden, da im Allgemeinen das gleiche Ergebnis erwartet werden kann, wann immer das Verfahren durchgeführt wird (obwohl eine finale, bestätigende Messung durchgeführt werden sollte). Wenn jedoch die Methode zur Entfernung variiert, oder wenn regelmässiges Überwachen aus anderen Gründen notwendig ist, können regelmässige oder fortlaufende Bestimmungen der SDS-Mengen durchgeführt werden, bis die erwünschte Endkonzentration erreicht ist.

Weitere Verfahrensschritte

[0035] Wie oben erwähnt sind die wesentlichen Verfahrensschritte zur Herstellung von IL-2/SDS-Mikroaggregaten (a) die Zugabe von SDS und dann (b) die anschliessende Entfernung des SDS. Während diese zwei Schritte IL-2 in einer Form ergeben, die geeignet ist, um als aktive Substanz in pharmazeutischen Produkten gebraucht zu werden, sind diese allein nicht geeignet zur Herstellung einer endgültigen pharmazeutischen Zusammensetzung, und weitere Schritte sind

erforderlich. Diese Schritte können vor den Schritten (a) und (b), nach den Schritten (a) und (b) und/oder zwischen Schritt (a) und (b) erfolgen.

[0036] Der erste Schritt im Verfahren, um IL-2 für die pharmazeutische Verwendung herzustellen, ist gewöhnlich die Expression des Proteins. Dies beinhaltet gewöhnlich die Verwendung einer Wirtszelle, die das IL-2-Gen von Interesse kodiert, zum Beispiel bakterielle Wirtszellen, eine Hefe-Wirtszelle oder eine Säugetier-Wirtszelle. Als eine Alternative zu der rekombinanten Methode ist es jedoch auch möglich, die Expression eines zelleigenen IL-2-Gens in dem Genom einer Wirtszelle zu aktivieren oder anzukurbeln (zum Beispiel durch Promoter-Aktivierung), oder das Hormone kann aus einer natürlichen Quelle gereinigt werden (zum Beispiel aus Blut).

[0037] Die Expression von IL-2 in einem rekombinanten E.coli System ist die bevorzugte Methode zur Gewinnung von IL-2, wobei IL-2 sogenannte «Inclusion Bodies» bildet. Geeignete E.coli Stämme wurden 1984 unter den Bestimmungen des Budapester Abkommens im ATCC mit den Accession Numbers 39452 und 39626 hinterlegt.

[0038] Verfahren zum Wachstum, Ernten, Zerreissen oder der Extraktion von IL-2 aus verschiedenen Zelltypen sind im Stand der Technik bekannt, siehe zum Beispiel Zitate 19–30 und 37–41.

[0039] Nach der Expression, oder wenn das Ausgangsmaterial exprimiertes Material ist, ist ein erster Schritt zur Reinigung des IL-2 erforderlich. Wenn das IL-2 innerhalb von Zellen vorliegt, umfasst dieser Reinigungsschritt die Zellzerstörung (zum Beispiel durch osmotischen Schock, Homogenisierung, Ultraschallbehandlung etc.) mit dem Ziel, das Protein freizusetzen; wenn IL-2 schon in einer Lösung vorliegt (zum Beispiel wenn es nach der Expression ausgeschieden wurde) ist eine Zellzerstörung nicht erforderlich. Inaktivierung lebender Zellen kann möglicherweise auch durchgeführt werden, ebenso Zentrifugation. Am Ende des ersten Reinigungsschrittes liegt IL-2 typischerweise als Präzipitat vor, vor allem, wenn es aus «Inclusion Bodies» isoliert wurde, aber in jedem Fall ist es getrennt von zellulären Fremdkörpern und liegt als IL-2-reiche Paste für das weitere Vorgehen vor.

[0040] Nach der Herstellung von gefälltem, gereinigtem IL-2, oder ausgehend von gefälltem Material, kann IL-2 gelöst werden, zur Trennung von Proteinen der Wirtszelle etc. Solubilisierung kann durch Zugabe von Detergentien wie zum Beispiel SDS erreicht werden, bevorzugt sollte die Endkonzentration zwischen 4 und 4,5% betragen. Dies kann einfach erreicht werden, indem eine 5%ige SDS Lösung zugegeben wird.

[0041] Nach der Solubilisierung, oder wenn gelöstes Material als Ausgangsmaterial benutzt wird, kann IL-2 reduziert werden, um alle Disulfid-Brücken im Protein und insbesondere um alle intermolekularen Disulfid-Brücken zu brechen. Alle kovalenten IL-2-Aggregate, die durch intermolekulare Disulfid-Brücken entstanden sind, werden dadurch in ihre monomere Form überführt. Reduzierende Substanzen, die gewöhnlich benutzt werden, um Disulfid-Brücken zu brechen, sind β-Mercaptoethanol und Dithiothreit (DTT). Die Anwesenheit von Detergens wird gewöhnlich beibehalten, um die Löslichkeit des IL-2 zu gewährleisten.

[0042] Nach der Reduktion, oder wenn von reduziertem Material ausgegangen wird, kann das IL-2 reoxidiert werden, um monomeres IL-2 mit intramolekularen Disulfid-Brücken zu erhalten.

[0043] Nach der Re-Oxidation, oder wenn von re-oxidiertem Material ausgegangen wird, wird das IL-2 weiter gereinigt, um Reagenzien wie den oxidierenden Wirkstoff zu entfernen, sowie zur Entfernung von Endotoxin, DNA und/oder Proteine der Wirtszelle, IL-2 Isoformen oder Konformationsisomere (zum Beispiel oxidiertes IL-2) etc. Diese Reinigung kann bequem durch den Einsatz von reverse-phase HPLC erreicht werden.

[0044] Nach RP-HPLC, oder wenn das Ausgangsmaterial gelöstes RP-HPLC gereinigtes Material ist, kann IL-2 gefällt werden, zum Beispiel durch Zugabe von 0.8 N Natriumhydroxid. Neben der Fällung von IL-2 erlaubt dies die Trennung des Proteins von allen organischen Lösungsmitteln, die während der RP-HPLC benutzt wurden. Das gefällte Material kann bequem durch Zentrifugation gesammelt werden.

[0045] Material, das nach Expression, Reinigung, Lösung, Reduktion, Oxidation, RP-HPLC und Fällung (wie oben beschrieben) erhalten wurde, ist ideal für Resolubilisierung und Diafiltration gemäss dem erfindungsgemässen Verfahren, obwohl auch IL-2 benutzt werden kann, das auf anderen Reinigungswegen erhalten wurde. Typischerweise wird das IL-2 jedoch in einer gefällten Form vorliegen, bevor das SDS in Schritt (a) des Verfahrens der Erfindung zugefügt wird.

[0046] Wie oben beschrieben, bleiben kovalent gebundene IL-2-Multimere auch in Gegenwart von SDS gefällt. Da diese Multimere grösser sind als das SDS-solubilisierte IL-2 Protein (weil sie nicht dissoziierbar sind) können sie bequem zwischen Schritt (a) und Schritt (b) (zum Beispiel nach SDS-Zugabe, aber vor Diafiltration) durch Gelfiltration entfernt werden. Die Gegenwart des SDS sollte während der Gelfiltration aufrechterhalten bleiben, um das Ausfällen von IL-2 zu verhindern.

[0047] Nach der Diafiltration, um SDS zu entfernen und Mikroaggregate zu bilden, kann die IL-2 Lösung einen oder mehrere der folgenden Schritte durchlaufen: Verdünnung, um die gewünschte Dosis zu erhalten, Sterilisation, typischerweise durch Sterilfiltration, zum Beispiel durch einen 0,22-µm-Filter; pharmazeutische Formulierung (siehe unten); Lyophilisierung, Verpackung etc.

Mikroaggregate

[0048] Das Ergebnis der SDS-Solubilisierung und Diafiltration im Verfahren der Erfindung ist die Bildung von biologisch aktiven Mikroaggregaten aus SDS und IL-2, wie sie in dem PROLEUKIN™-Produkt vorliegen.

[0049] Die exakte molekulare Struktur der SDS/IL-2 Mikroaggregate ist nicht bestimmt worden, aber man nimmt an, dass es sich um micellare oder Micellen-artige Strukturen handelt. Bei einer SDS-Konzentration von ungefähr 160 µg/mg beinhaltet eine typische Micelle ungefähr 30 IL-2-Moleküle und ungefähr 150 SDS-Moleküle. Das SDS und IL-2 in den Mikroaggregaten interagieren in nicht-kovalenter Form und der hydrophobe Schwanz des IL-2 (Aminosäuren 121–133) kann mit dem Alkyl-Rückgrat des SDS in Wechselwirkung treten, um Micellen zu bilden. Einiges SDS kann frei in der Lösung verbleiben.

[0050] Die Mikroaggregate können mit Hilfe von Lichtstreuung bestimmt werden und diese Technik erlaubt es, auch die Grösse der Mikroaggregate zu bestimmen (siehe unten). Das Verhältnis zwischen SDS-Konzentration und durchschnittlicher Mikroaggregat- Grösse, wie sie mit klassischer Lichtstreuung gemessen wird, wurde, wie in Fig. 1 dargestellt, empirisch bestimmt.

[0051] Mit fortschreitender SDS-Entfernung wird eine Konzentration erreicht, unterhalb derer die Grösse der Mikroaggregate beginnt, exponentiell zuzunehmen (siehe Fig. 1). Gemäss der Erfindung wird das SDS entfernt, bis es eine Konzentration zwischen 95 µg und 250 µg pro mg IL-2 erreicht. In diesem Bereich liegt die spezifische Trübung (τ) zwischen ungefähr 0,05 und ungefähr 1,00 cm^2/g, was im Durchschnitt weniger als 50 IL-2-Moleküle pro Aggregat impliziert. Bei 160 µg SDS pro mg IL-2 liegt die spezifische Trübung (τ) bei ungefähr 0,48 (ungefähr 27 IL-2-Moleküle).

[0052] Der Fachmann wird verstehen, dass eine gegebene Zusammensetzung von SDS/IL-2 gemäss der Erfindung nur selten, wenn überhaupt, nur eine einzige Mikroaggregat-Spezies umfasst. Vielmehr ergeben Messungen der Lichtstreuung, dass die Mikroaggregate eine Vielzahl unterschiedlicher Grössen haben, die in eine Verteilung fallen, und Messungen können eine mittlere Grösse bestimmen. Wenn eine Zusammensetzung Mikroaggregate mit einer angegebenen mittleren Grösse umfasst, werden demnach im Allgemeinen einige Mikroaggregate kleiner und andere grösser sein.

[0053] Bevorzugte Zusammensetzungen der Erfindung umfassen derartige SDS/IL-2 Mikroaggregate, so dass die Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) zwischen 0,3 und 0,6, zum Beispiel zwischen 0,4 und 0,5 oder ungefähr 0,45 hat. Diese Zusammensetzungen treffen im Speziellen auf Zusammensetzungen zu, die nach Lyophilisierung rekonstruiert wurden, und der Wert für τ kann vor der Lyophilisierung und Rekonstitution geringer sein (Fig. 13).

[0054] Bevorzugte Zusammensetzungen der Erfindung umfassen SDS/IL-2 Mikroaggregate mit einem hydrodynamischen Durchmesser zwischen 11 nm und 13 nm.

[0055] Bevorzugte Zusammensetzungen der Erfindung umfassen zwischen 10 und 50 IL-2 Moleküle, zum Beispiel zwischen 20 und 35, und bevorzugt ungefähr 27.

[0056] In bevorzugten Zusammensetzungen liegt im Wesentlichen das gesamte IL-2 in Form von Mikroaggregaten vor. Zusammensetzungen können im Wesentlichen frei von monomeren IL-2 sein.

Spezifische Trübung (τ)

[0057] Da die SDS/IL-2 Mikroaggregate der Erfindung von den gegebenen Umständen beeinflusst werden, können Verfahren wie Grössen-Ausschluss-Chromatographie und Analytische Zentrifugation nicht benutzt werden, um ihre Grösse zu bestimmen. Stattdessen kann klassische (oder statische) Lichtstreuung (CLS) benutzt werden, um die Mikroaggregate nachzuweisen und zu analysieren, indem man ihre Trübung misst. Dynamische Lichtstreuung (DLS) kann ebenfalls benutzt werden. Die Messungen können mit einem speziellen Gerät durchgeführt werden, oder sie können mit einem Fluorimeter durchgeführt werden, wobei Anregungs- und Emissions-Monochromator auf die gleiche Wellenlänge eingestellt werden (zum Beispiel 467 nm für eine Xenon-Lampe oder 488 nm für eine Argon-Lampe, diese beiden Wellenlängen sind weit entfernt von Wellenlängen, die von dem Analyt absorbiert werden) und/oder es werden geeignete Filter eingesetzt (zum Beispiel gelbe Filter), so dass das Fluorimeter als ein 90°-CLS-Photometer arbeitet.

[0058] Ein Standard-Parameter zur Messung der Lichtstreuung ist die «Rayleigh ratio» ($R\Theta$). Wird gestreutes Licht bei 90° relativ zum eingestrahlten Licht gemessen (das heisst wenn Θ=90°), wird die «Rayleigh ratio» als R_{90} bezeichnet [siehe zum Beispiel Zitat 42], und 90°-Streuung wird für Trübungsmessungen benutzt.

[0059] Trübungsmessungen (Streuungsintensität bei 90°) kann relativ zu Toluol mit optischer Qualität normalisiert werden. Das heisst die Trübungsmessung einer Standard-Toluol-Probe wird durch den R_{90}-Wert von Toluol dividiert. Mit Hilfe einer derartigen Normalisierung kann der absolute Wert der Lichtstreuungsintensität bestimmt werden.

[0060] Die Trübung der IL-2-Mikroaggregate der Erfindung kann bei 25°C und 467 nm oder 488 nm gemessen werden. Vor der Trübungsmessung kann die Zusammensetzung zentrifugiert oder filtriert werden, um grössere Partikel (zum Beispiel gefälltes Protein), die andernfalls die Ergebnisse verfälschen würden, zu entfernen. Werden die IL-2-Zusammensetzungen der Erfindung zentrifugiert, verbleiben bevorzugt mindestens 97% (zum Beispiel ≥98%, ≥99% oder mehr) des gesamten IL-2 in dem Überstand.

[0061] Trübungsmessungen der SDS/IL-2 Mischungen können wie folgt in absolute spezifische Trübung (τ) umgerechnet werden:

$$\tau = \frac{T_t - 0{,}98T_i}{T_i} \times \frac{3{,}2\times10^{-2}}{C}$$

[0062] Wobei:
T_i die Trübungsintensität der IL-2-Zusammensetzung ist,
T_t die Trübungsintensität der Toluol-Kontrolle ist,
C die Konzentration des IL-2 in der IL-2-Zusammensetzung ist.

[0063] Werden T_i und T_t in cm^{-1} und C in g/ml gemessen (das heisst g/cm^3), dann ist die Einheit für τ cm^2/g. Dies ist die bevorzugte Masseinheit zur Bestimmung der Trübung der IL-2-Zusammensetzung der Erfindung.

[0064] Zusammensetzungen der Erfindung können spezifische Trübungen (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g haben, aber bevorzugt grösser als 0,1 cm^2/g. Bevorzugte Zusammensetzungen haben einen Wert für τ, der geringer als 0,7 cm^2/g ist. Die Zusammensetzungen der Erfindung haben bevorzugt einen Wert für τ, der zwischen 0,3 und 0,6 cm^2/g liegt.

Dynamische Lichtstreuung

[0065] Wie in Zitat 43 beschrieben, und hier insbesondere in Kapitel 10, kann Dynamische Lichtstreuung (DLS) benutzt werden, um den hydrodynamischen Durchmesser (oder Radius) von Partikeln in Lösung zu bestimmen. SDS/IL-2-Aggregate der Erfindung können mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) bestimmt werden. Wenn DLS benutzt wird, sollten die Aggregate bevorzugt einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm haben, bevorzugt zwischen10 nm und 15 nm, und besonders bevorzugt zwischen 11 nm und 13 nm, am meisten bevorzugt von ungefähr 12 nm. Wie in Fig. 16 gezeigt, haben die Aggregate Durchmesser, die um diesen Mittelwert liegen.

[0066] In der Praxis können einige grössere Partikel mit DLS nachgewiesen werden (zum Beispiel der 54-nm-Peak in Fig. 16), aber der oben genannte hydrodynamische Durchmesser ist der Haupt-Peak der DLS-Messung, der typischerweise zahlenmässig mindestens 90% (zum Beispiel mindestens 95%, mindestens 97%, mindestens 99%, mindestens 99.5% oder mehr) des DLS-Spektrums repräsentiert. Somit haben zahlenmässig mindestens 90% der Partikel, die mittels DLS nachgewiesen wurden, den spezifischen durchschnittlichen Wert.

[0067] Interpretation von DLS-Daten kann erschwert werden durch die Anwesenheit von sich «langsam verändernden» Komponenten, wie Staubpartikel oder durch das «Mischungs-Phänomen». Um solche Komplikationen zu vermeiden, sind IL-2-Mischungen der Erfindung, vor der DLS-Analyse bevorzugt frei von Partikeln mit einem Durchmesser von mehr als ungefähr µm (zum Beispiel staubfrei), und dies kann durch die Verwendung geeigneter Filter, zum Beispiel 0,22-µm-Filter, erreicht werden. Die Mischung sollte vor der DLS-Messung gut gemischt sein. Wenn die DLS-Messung sich «langsam verändernde» Komponenten in der Mischung aufweist, sollte die Messung verworfen und mit einer neuen Probe wiederholt werden.

Das Interleukin-2

[0068] IL-2 ist ein wohlbekanntes Protein und Verfahren und Produkte dieser Erfindung betreffen jede brauchbare Form des IL-2. IL-2 wird gewöhnlich humanen Ursprungs sein, oder es wird sich um Derivate handeln, die im Menschen ihre biologische Aktivität behalten.

[0069] IL-2 wird natürlicherweise im Menschen als ein Vorläufer-Protein translatiert (zum Beispiel das 153-mer, das in der GenBank unter der Accession Number NP_000 577.2 beschrieben wird). Der Vorläufer wird gespalten (zum Beispiel hinter Ser-20 in NP_000577.2) und ergibt ein matures Produkt mit einem N-terminalen Alanin (SEQ ID NO: 4).

[0070] Wenn IL-2 in E.coli exprimiert wird, ist es üblich, das natürliche Signalpeptid durch ein einzelnes N-terminales Methionin zu ersetzen (zum Beispiel SEQ ID NOS:3 und 4). Während der Expression wird dieses Methionin ohne weitere Eingriffe abgespalten, und es entsteht ein natürlicher humaner N-terminaler Alaninrest (zum Beispiel wird SEQ ID NOS:3 in SEQ ID NOS:1 konvertiert).

[0071] Dem IL-2 in PROLEUKIN™ fehlt der natürliche Ala-1-Rest. Das Fehlen des normalen N-terminalen Alanins bedeutet, dass das IL-2 in PROLEUKIN™ formell als «Des-alanyl-1-Form von IL-2» bezeichnet wird. Die «Des-alanyl-1-Form von IL-2» wird für die Verwendung in der Erfindung bevorzugt.

[0072] Das IL-2 in PROLEUKIN™ ist weiterhin so gestaltet, dass es 2 interne Cystein-Reste hat, anstelle der natürlich vorkommenden drei. Dies reduziert die Anzahl der möglichen Paarungen der Cystein-Reste (und damit die Bildung intramolekularer Disulfid-Brücken) von drei auf eine [46], und verbessert die Ergebnisse der Protein-Faltung und Lagerstabilität. Der Austausch eines Serin-Restes anstelle des natürlichen Cys-125-Restes [44] bedeutet, dass das IL-2 in PROLEUKIN™ formell als eine «Serin-125-Form von IL-2» bezeichnet wird. Serin-125-Formen von IL-2 werden bevorzugt für die Erfindung benutzt. Die dreidimensionale Kristallstruktur der Ser-125-Form des humanen IL-2, exprimiert in E.coli, ist in der Strukturdatenbank unter der Accession «3INK» verfügbar.

[0073] Weitere Austausche innerhalb der IL-2-Aminosäurensequenz können vorgenommen werden, speziell solche, die konservativ sind. Das heisst solche, die innerhalb einer Aminosäurenfamilie stattfinden, die in der Struktur ihrer Seitenketten ähnlich sind. Aminosäuren können in vier Familien unterteilt werden: (1) saure – Aspartat, Glutamat; (2) basische – Lysin, Arginin, Histidin; (3) nicht-polare – Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan; (4) ungeladene polare – Glycin, Asparagin, Glutamin, Cystein, Serin, Threonin, Tyrosin. Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin werden manchmal als die Familie der aromatischen Aminosäuren beschrieben. Es kann zum Beispiel mit einiger Sicherheit vorhergesagt werden, dass isoliertes Ersetzen von Leucin mit Isoleucin oder Valin, von Aspartat mit Glutamat, von Threonin mit Serin, oder ähnliche konservative Auswechslungen einer Aminosäure mit einer anderen strukturell verwandten Aminosäure keine grossen Einflüsse auf die biologische Aktivität haben. Es ist für den Fachmann ein Leichtes, auf Grund von natürlichen Variationen, Abgleichen von aktiven Formen des Proteins etc., Bereiche des IL-2 festzustellen, die Veränderungen tolerieren können, und veränderte Proteine können auf ihre biologische Aktivität hin getestet werden, zum Beispiel mit Hilfe von Standard 86/504.

[0074] Anleitung zum Auffinden von Regionen des IL-2-Proteins, die verändert werden können, zum Beispiel durch Aminosäurenaustausche, Deletionen oder Insertionen können auch im Stand der Technik gefunden werden (zum Beispiel Struktur-/Funktions-Zusammenhänge und/oder Bindungsstudien); beispielsweise in Zitaten 45 bis 52 etc. Zitat 53 offenbart eine Vielfalt von IL-2-Mutationen einschliesslich: Asn-26-Gln; Trp-121-Phe; Entfernung aller Aminosäuren, die auf Arg-120 folgen; und die Met-1-Formen hiervon. Zitat 44 offenbart IL-2 mit Deletionen und Austauschen von Cys-125, mit oder ohne N-terminales Ala. Zitat 54 offenbart Austausche oder Deletionen von Aminosäuren einschliesslich Aminosäure Nummer 2, 3, 4, 5, 6, 104 und 125. Met-104 wird leicht oxidiert, von daher können Mutationen dieser Aminosäure (zum Beispiel Austausch mit Glu, Val, Ala, etc.) die Stabilität erhöhen [55]. Zitat 56 offenbart IL-2 den Austausch von Asp-20 (mit His oder Ile), von Asn-88 (mit Arg, Gly, oder Ile), und/oder von Gln-126 (mit Leu oder Glu), welche nachgewiesenermassen weniger toxisch sind und eine erhöhte Affinität für den IL-2-Rezeptor aufweisen. Zitat 57 offenbart den Austausch von Arg-38-Ala und Phe-42-Lys mit der Absicht, die Toxizität während einer Immunotherapie zu verringern. Zitat 58 offenbart die Mutation der natürlichen Xaa1-Asp-Xaa2-Tripeptid-Sequenz, wobei Xaa1 entweder Leu, Ile, Gly oder Val ist, und Xaa2 entweder Val, Leu oder Ser ist, um ein Austreten der Substanz durch das vaskuläre System zu verringern. Zitat 59 offenbart Peptide mit einem N-terminalen Methionin, das mit den ersten 30 Aminosäuren des IL-2 verbunden wird, eventuell gekoppelt mit einem Asp-20-Lys-Austausch, von denen behauptet wird, dass sie Il-2-ähnliche Aktivität behalten.

[0075] Andere beschriebene Veränderungen umfassen: T7A, T7D, T7R, KSL, K9A, K9D, K9R, K9S, K9V, K9W, T10K, T10N, Q11A, Q11R, Q11T, E15A, H16D, H16E, L19D, L19E, D20E, I24L, K32A, K32W, N33E, P34E, P34R, P34S, P34T, P34V, K35D, K351, K35L, K35M, K35N, K35P, K35Q, K35T, L36A, L36D, L36E, L36F, L36G, L36H, L361, L36K, L36M, L36N, L36P, L36R, L36S, L36W, L36Y, R38D, R38G, R38N, R38P, R38S, L40D, L40G, L40N, L40S, T41E, T41G, F42A, F42E, F42R, F42T, F42V, K43H, F44K, M461, E61K, E61M, E61R, E62T, E62Y, K64D, K64E, K64G, K64L, K64Q, K64R, P65D, P65E, P65F, P65G, P65H, P651, P65K, P65L, P65N, P65Q, P65R, P65S, P65T, P65V, P65W, P65Y, L66A, L66F, E67A, L72G, L72N, L72T, F78S, F78W, H79F, H79M, H79N, H79P, H79Q, H79S, H79V, L80E, L80F, L80G, L80K, L80N, L80R, L80T, L80V, L80W, L80Y, R81E, R81K, R81L, R81M, R81N, R81P, R81T, D84R, S87T, N88D, N88H, N88T, V91A, V91D, V91E, V91F, V91G, V91N, V91Q, V91W, L94A, L94I, L94T, L94V, L94Y, E95D, E95G, E95M, T102S, T102V, M104G, E106K, Y107H, Y107K, Y107L, Y107Q, Y107R, Y107T, E116G, N119Q, T123S, T123C, Q126I, und Q126V.

[0076] Biologisch aktive Variationen des IL-2 haben generell mindestens ungefähr 70% (zum Beispiel ≥ 80%, ≥ 90%, ≥ 95%, ≥ 98%, ≥ 99%) Aminosäurensequenz-Identität mit der Aminosäurensequenz des Referenz-IL-2 Polypeptidmoleküls, wie das oben beschriebene native humane IL-2. Eine Variante kann sich zum Beispiel in nur 1–15 Aminosäuren, 1–10 Aminosäuren, 6–10 Aminosäuren, 5 Aminosäuren, nur 4, 3, 2 oder sogar nur 1 Aminosäure unterscheiden.

[0077] C-terminale Verlängerungen des IL-2 sind ebenfalls beschrieben worden [60]. IL-2, das in der Erfindung gebraucht wird, hat bevorzugt keine solchen Verlängerungen am C-terminalen Ende.

[0078] Weitere Formen des IL-2, die benutzt werden können, beinhalten nicht-humane Sequenzen von: Rhesusaffen (Mucucu mulatto; GenBank Accession P51498); Grüner Pavian (Papio anubis); GenBank Q865Y1); Halsband-Mangabe (Cercocebus torquatus atys; P46649); Javaneraffen (Macaca fascicularis; Q29615); Weisshandgibbon (Hylobates lar; ICGI2); Totenkopfaffen (Saimiri sciureus; Q8MKH2); Rind (Bos taurus; P05016 oder NP-851340; wobei die aktive Sequenz die Aminosäuren 24-158 der GenBank Accession No. NP-851340 umfasst); Wasserbüffel (Bubalus bubalis; Q95KP3); Pferd (Equus caballus; P37997); Ziege (Capra hircus; P36835); Schaf (Ovis aries; P19114); Hausschwein (Sus scrofu; P26891); Rothirsch (Cervus elaphus; P51747); Haushund (Canis familiaris; Q29416); Hauskatze (Felis catus; 407885); Kaninchen (Oryctolagus cuniculus; 077620); Schwertwal (Orcinus orca; 097513); Nördlicher See-Elefant (Mirounga angustirostris; 062641); Hausmaus (Mus musculus; NP-032392); Iberische Hausmaus (Mus spretus; 408867); Wanderratte (Rattus norvegicus; P17108); Mongolische Wüstenrennmaus (Meriones unguiculatus; Q08081). Jede variierende Form, die in diesen GenBank-Einträgen enthalten ist, kann ebenfalls genutzt werden. Diese GenBank-Einträge beinhalten normalerweise die vollständigen Sequenzen, die, wie oben für die humane Sequenz beschrieben, Verfahreniert werden, um eine biologisch aktive Form zu ergeben, zum Beispiel durch Abtrennung der ersten 20 Aminosäuren.

[0079] Die «Des-alanyl-1, Serin-125 Formen des humanen IL-2» werden zur Verwendung in der Erfindung besonders bevorzugt. Die am meisten bevorzugte Form des IL-2 hat die 132-mer-Aminosäurensequenz, wie sie in Fig. 2 dargestellt ist (SEQ ID NO: 1), und wie sie in PROLEUKTN™ vorliegt. Mischungen sind bevorzugt frei IL-2 Formen, die nicht das N-ter-

minale Ala aufweisen. Das in Fig. 2 dargestellte Protein kann exprimiert werden, wenn die Nukleinsäuresequenz zugrunde gelegt wird, die in Fig. 4 (SEQ ID NO: 2) dargestellt ist, nach Abtrennung des translatierten N-terminalen Methionins.

[0080] Das IL-2 in dem PROLEUKIN™-Produkt ist nicht glykosyliert, dies ist eine Folge der Expression in dem E.coli System. Nicht glykosyliertes IL-2 wird für die Verwendung mit der Erfindung bevorzugt genutzt.

[0081] Verfahren zum Nachweis der Anwesenheit von IL-2 in einer Mischung und zur Quantifizierung sind im Stand der Technik bekannt. Immunologischer Nachweis, unter Verwendung von anti-IL-2-Antikörpern (zum Beispiel ELISA) ist die gebräuchlichste Nachweismethode, und diese Methoden können auch quantitativ eingesetzt werden. Andere quantitative Methoden beinhalten Aminosäure-Analyse, Lowry-Proteinbestimmung unter Verwendung eines anerkannten Proteinstandards, HPLC-Analyse und intrinsische Ultraviolett Absorptionsmessungen.

[0082] Die Standard-Masseinheit für IL-2 ist die Internationale Einheit (IU), die nicht auf der Masse an Protein, sondern auf der Aktivität in einem biologischen Test basiert. Gemäss Standard 86/504 ist 1 IU die Menge an IL-2, die 50% der maximalen Proliferation einer anerkannt IL-2-abhängigen Ziellinie [61] CTLL-2 produziert. Quantifizierung der IL-2-Aktivität in anderen Präparaten wird durch den Vergleich von Dosis-Wirkungs-Kurven der Präparate mit vorhandenen Standards (zum Beispiel die WHO-IL-2-Standard-Ampulle, die nach Rekonstitution, 100 IU/ml enthält) erzielt, wobei eine Analyse paralleler Linien vorgenommen wird, oder Computer-Programme wie das ALLFIT Programm [62, 63] eingesetzt werden. In der Praxis, ist es möglich, wenn die Herstellung standardisiert ist, eine Konversion zwischen Substanzgewicht und IU durchzuführen. Für das PROLEUKIN™-Produkt, zum Beispiel, ist die Konversion wie folgt: 1,1 mg IL-2 entspricht 18×10^6 IU.

[0083] Aktivität kann in spezifische Aktivität umgerechnet werden (das heisst Aktivität pro Masseneinheit IL-2, zum Beispiel IU/mg), indem die Aktivität durch die Masse des vorhandenen IL-2 geteilt wird. Eine bevorzugte Formulierung der Erfindung hat eine spezifische Aktivität zwischen 16 und 17 MIU/mg.

Pharmazeutische Zusammensetzungen

[0084] Das Verfahren der Erfindung ergibt IL-2/SDS-Mikroaggregate, die für die pharmazeutische Verwendung beim Menschen geeignet sind, und somit stellt die Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Verfügung, die aus den IL-2/SDS-Mikroaggregaten der Erfindung besteht. Anstatt die Mikroaggregate direkt nach der Diafiltration zu benutzen, werden sie typischerweise formuliert, bevor sie den Patienten verabreicht werden.

[0085] Zum Beispiel, können die Mikroaggregate verdünnt werden, um eine Standardkonzentration zu erhalten und gleichzeitig die IL-2/SDS-Relation aufrechtzuerhalten. Typischerweise wird eine Verdünnung vorgenommen, die in einer IL-2-Konzentration von ungefähr 1,1 mg/ml resultiert.

[0086] Die Mikroaggregate können (zum Beispiel nach der Verdünnung) mit Stabilisatoren gemischt werden, insbesondere wenn sie lyophilisiert werden sollen. Die Zugabe von Zuckern (zum Beispiel Saccharose, Trehalose) ist gebräuchlich, um Stabilität während der Lyophilisierung zu gewährleisten, und ein bevorzugter Stabilisator ist Mannit. Dieser Zucker-Alkohol kann bis zu einer Endkonzentration zwischen 40 und 50 (zum Beispiel ungefähr 45,5) mg Mannit pro mg IL-2 (50 mg für 1,1 mg IL-2) zugegeben werden. Humanes Serumalbumin (bevorzugt rekombinant) kann auch als Stabilisator zugegeben werden. Mischungen von Zuckern können auch benutzt werden, zum Beispiel Saccharose & Mannit, Trehalose & Mannit etc.

[0087] Puffer können zu der Mikroaggregat-Zusammensetzung hinzugefügt werden, zum Beispiel ein Tris-Puffer, ein Histidin-Puffer, ein Glycin-Puffer, oder bevorzugt ein Phosphat-Puffer (der zum Beispiel Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat enthält). Zugabe von Puffer, um einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,8 zu erhalten, ist bevorzugt, und insbesondere ein pH-Wert von ca. 7,5.

[0088] Zusammensetzungen, die Mikroaggregate enthalten, können sterilisiert werden, typischerweise durch Filtersterilisation, zum Beispiel durch einen 0,22-µm-Filter. Dies kann nach Filtration durch einen Filter grösserer Porenweite erfolgen.

[0089] Wässrige Zusammensetzungen, die Mikroaggregate enthalten, können direkt in Spritzen verpackt werden, fertig zur Injektion. Sie können auch in Zerstäuber, fertig zur Inhalation, verpackt werden.

[0090] Wässrige Zusammensetzungen, die Mikroaggregate enthalten, können vor der Distribution lyophilisiert werden. Wässriges oder lyophilisiertes Material kann in Behälter (zum Beispiel Phiolen) verpackt werden, diese können dann hermetisch verschlossen werden. Die Lyophilisierung wird typischerweise in den Phiolen durchgeführt, und diese werden nach der Lyophilisierung verschlossen. Lyophilisiertes Material, das 22×10^6 IU IL-2 entspricht, kann in eine einzelne Phiole als eine einzelne Dosis für die Rekonstirution in einem Endvolumen von ungefähr 1,1 ml verpackt werden und ergibt dann ungefähr 18×10^6 IU/ml. Bruchteile hiervon (zum Beispiel 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/8) können ebenfalls als einzelne Dosen verpackt werden. Insbesondere Einheiten mit Dosen von ungefähr 9×10^6 IU, ungefähr $4{,}5\times10^6$ IU und ungefähr 14×10^6 IU können benutzt werden.

[0091] Für die Rekonstitution nach der Lyophisierung, kann «steriles Wasser zur Injektion» benutzt werden. Es ist auch möglich, den lyophilisierten Kuchen mit einer wässrigen Zusammensetzung, die humanes Serumalbumin (bevorzugt rekombinantes) enthält, zu rekonstituieren. Rekonstitution in ein wässriges Volumen zwischen 1,0 und 1,2 ml wird bevorzugt (das heisst IL-2 kann so verdünnt werden, dass es dieselbe Konzentration hat wie vor der Lyophilisierung). Dieses

rekonstituierte Material kann dann für intravenöse Infusionen steril in grössere Flüssigkeitsvolumina verdünnt werden, zum Beispiel in ca. 50 ml einer D5W-Lösung (5% «Dextrose zur Injektion»). Spezifische Trübung bleibt während der D5W-Verdünnung im Wesentlichen konstant, bis die IL-2-Konzentration unter etwa 0,1 mg/ml fällt. Verdünnungen können in verschiedenen Behältern angesetzt werden, zum Beispiel Glasflaschen, Plastikbeuteln (zum Beispiel Polyvinylchlorid) etc. Verdünnungen auf eine Endkonzentration von IL-2 ausserhalb eines Bereiches von 30–70 µg/ml sollten vermieden werden. Bedingungen, die Veränderungen in der Mikroaggregation hervorrufen, sollten vermieden werden, zum Beispiel Rekonstitution mit «bakteriostatischem Wasser zur Injektion» oder mit «0.9% Natriumchlorid zur Injektion».

[0092] Eine erste bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung ist daher eine wässrige Zusammensetzung mit einem pH von etwa 7,5, die 1,1 mg/ml IL-2; 0,18mg SDS; 50 mg/ml Mannit und Phosphatpuffer enthält, wobei IL-2 und SDS Mikroaggregate bilden, in denen die durchschnittliche Anzahl an IL-2-Molekülen pro Aggregat zwischen 10 und 50 liegt. Diese Zusammensetzungen können von lyophilisiertem Material rekonstituiert werden.

[0093] Eine zweite bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung ist das Produkt, das entsteht, wenn die erste bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzung in eine D5W-Lösung verdünnt wird.

[0094] Bevorzugte Zusammensetzungen sind frei von Konservierungsstoffen, Antibiotika sowie anderen Proteinen als IL-2 (einschliesslich HSA), das heisst diese Materialien sind nicht nachweisbar.

Pharmazeutische Verfahren und Verwendungen

[0095] Die Erfindung ermöglicht ein Verfahren zur Behandlung von Patienten, sie beinhaltet die Verabreichung einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäss der Erfindung an den Patienten. Der Patient ist bevorzugt ein Mensch, er kann ein Kind sein (zum Beispiel ein Kleinkind oder ein Säugling), ein Teenager oder ein Erwachsener, wird aber im Allgemeinen ein Erwachsener sein.

[0096] Die Erfindung stellt auch SDS/IL-2-Mikroaggregate der Erfindung zur Verfügung, um sie als Medikament zu benutzen.

[0097] Die Erfindung ermöglicht auch die Verwendung der Mikroaggregate der Erfindung in der Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Patienten.

[0098] Diese Anwendungen, Verfahren und Medikamente sind bevorzugt für die Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere solche mit soliden Tumoren, wie Nierenzell-Karzinom oder Melanom oder Krebse, die Metastasen gebildet haben. Diese Anwendungen, Verfahren und Medikamente sind auch geeignet für die Behandlung von Patienten, die eine Organtransplantation hinter sich haben, oder die für eine vorbereitet sind. Diese Anwendungen, Verfahren und Medikamente können auch zur Behandlung von Patienten eingesetzt werden, die mit HIV infiziert sind, einschliesslich solcher mit oder ohne AIDS.

[0099] Patienten, die mit der Erfindung behandelt werden können, sind deshalb als krebskrank diagnostiziert worden. Patienten, die jedoch nicht gemäss der Erfindung behandelt werden sollten, können Patienten beinhalten, die (1) einer Überempfindlichkeit gegen IL-2 oder jeden anderen Bestandteil der pharmazeutischen Zusammensetzung aufweisen; (2) Patienten mit einem Status der ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ≥2; (3) Patienten mit einem gleichzeitigen Status der ECOG >1 und mehr als einem Organ mit Metastasenbildung und einem Zeitraum < 24 Monaten zwischen der ursprünglichen Diagnose des Ausgangstumors und dem Zeitpunkt, zu dem der Patient für die IL-2-Behandlung evaluiert wurde; (4) Patienten mit einer einschlägigen Krankheitsgeschichte von, oder gegenwärtigen Anzeichen von schweren Herzkrankheiten; (5) Patienten mit Hinweisen auf aktive Infektion, die eine Antibiotikabehandlung erfordert; (6) Patienten mit einem PaO_2 < 60 mm Hg in der Ruhephase; (7) Patienten mit schon existierender schwerer Organdysfunktion, und (8) Patienten mit Metastasen im Zentralnervensystem oder Epilepsie, mit der Ausnahme von Patienten mit erfolgreich behandelten Gehirn-Metastasen.

[0100] Verfahren zur Bestimmung der Effizienz von therapeutischen IL-2-Behandlungen sind im Stand der Technik bekannt.

[0101] Die Halbwertszeit-Kurven von IL-2 im humanen Serum nach intravenöser Bolus-Verabreichung oder Infusion kann als bi-exponential beschrieben werden. Für einen Bolus beträgt die T½α 8 Minuten und die T½β 88 Minuten; für eine Infusion beträgt die T½α 15 Minuten und die T½β 96 Minuten. Beobachtete Serumwerte sind proportional zur IL-2-Dosis.

[0102] Charakteristika der gebräuchlichen Medikamente sind oben in dem Kapitel «Pharmazeutische Zusammensetzungen» beschrieben worden. Diese Zusammensetzungen werden im Allgemeinen direkt an einen Patienten verabreicht. Direkte Zuführung kann durch parenterale Injektion (zum Beispiel intravenös, subkutan, intraproitonial, intramuskulär oder in die interstitiellen Zwischenräume eines Gewebes) erfolgen oder durch rektale, orale, vaginale, topikale, transdermale, intranasale, okulare, aurale, pulmonare oder durch andere mukosale Verabreichung. Im Allgemeinen wird jedoch IL-2 mittels intravenöser Injektion verabreicht (zum Beispiel kontinuierliche Infusion oder Bolus) oder durch subkutane Injektion (zum Beispiel kontinuierliche Infusion oder Bolus).

[0103] IL-2-Dosierung ist gewöhnlich abhängig von der Körpergrösse des Patienten, gemessen entweder in Körpergewicht (kg) oder in Körperoberfläche («body specific area», BSA; gemessen in m^2 gemessen oder abgeschätzt aus einer Kombination der Grösse und des Gewichts des Patienten). Obwohl es keine exakte Umrechnung von Gewicht- auf BSA-

Dosierung gibt, gibt es eine gute Näherung: für eine Person mit durchschnittlichem Gewicht und Grösse (50% für jeden Parameter) sind 25 000 IU/kg = 1 MIU/m^2.

[0104] Die Behandlung kann als Einzeldosis oder als eine Mehrfachdosis erfolgen. Dosen können als Bolus oder als Infusion verabreicht werden. Ein typisches Behandlungsschema für IL-2 ist die Verabreichung von 18×10^6 IU pro m^2 pro 24 Stunden als eine kontinuierliche Infusion für 5 Tage, gefolgt von 2–6 Tagen ohne die Verabreichung von IL-2, dann eine erneute 5-tägige intravenöse IL-2-Behandlung, wie zuvor verabreicht als kontinuierliche Infusion und dann 3 Wochen ohne die Verabreichung von IL-2. Dies ist ein einzelner «Induktionszyklus» für IL-2. Nach der 3-wöchigen Ruheproiode des ersten Zyklus kann ein zweiter Induktionszyklus beginnen. Bis zu vier «Aufrechterhaltungszyklen» können mit 4-wöchigen Intervallen an Patienten verabreicht werden, die ansprechen oder eine Krankheitsstabilisierung zeigen. Sollte ein Patient diese Dosierungsverordnung jedoch nicht tolerieren können, sollte die Dosis reduziert oder die Verabreichung unterbrochen werden, bis sich die Toxizität gemildert hat. Eine andere Behandlungsverordnung für IL-2 ist die Verabreichung von 6×10^5 IU pro kg mittels intravenösen Bolus alle 8 Stunden für 14 Dosen über 5 Tage, gefolgt von einer zweiten Behandlung nach einer 9-tägigen Ruheperiode.

[0105] Bevorzugte Verabreichungen beinhalten: intravenöse Infusion zur Behandlung von metastasenbildendem Nierenzell-Karzinom; intravenöse Infusion zur Behandlung von metastasenbildendem Melanom; subkutaner Bolus zur Behandlung von metastasenbildendem Nierenzell-Karzinom; subkutane Infusion zur Behandlung von metastasenbildendem Nierenzell-Karzinom; pulmonale Verabreichung mittels Inhalation zur Behandlung von metastasenbildendem Nierenzell-Karzinom mit Lungenmetastasen.

Kombinationstherapien

[0106] IL-2-Mikroaggregate der Erfindung können als aktive Bestandteile von pharmazeutischen Substanzen benutzt werden. Solche pharmazeutischen Substanzen können alleine benutzt werden, um Patienten zu behandeln, oder sie können in Verbindung mit anderen aktiven Bestandteilen benutzt werden. Normalerweise wird IL-2 nicht vor der Verabreichung mit anderen aktiven Substanzen gemischt, stattdessen werden das IL-2 und der andere aktive Bestandteil als einzelne unabhängige Medikamente in einem kombinierten Protokoll verabreicht. Kombinationstherapie ist besonders geeignet zur Behandlung von Krebserkrankungen, besonders solchen, die bösartig oder metastasenbildend sind.

[0107] Somit betrifft die Erfindung (a) IL-2-Mikroaggregate der Erfindung und (b) einen zweiten pharmazeutischen Wirkstoff zur simultanen, getrennten Verabreichung oder zur aufeinanderfolgender Verabreichung.

[0108] Die Erfindung betrifft weiterhin, ein pharmazeutisches Präparat oder System, umfassen (a) einen ersten pharmazeutischen Wirkstoff, der IL-2-Mikroaggregate der Erfindung umfasst, und (b) einen zweiten pharmazeutischen Wirkstoff, worin der besagte erste oder zweite Wirkstoff entweder eine Beimischung oder eine separate Zusammensetzung darstellen, zum Beispiel zur simultanen, getrennten Verabreichung oder zur aufeinanderfolgenden Verabreichung.

[0109] Die Erfindung betrifft ferner Kits, umfassend: (a) einen ersten pharmazeutischen Wirkstoff, welcher IL-2-Mikroaggregate der Erfindung umfasst, und (b) einen zweiten pharmazeutischen Wirkstoff.

[0110] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von (a) IL-2-Mikroaggregaten der Erfindung und (b) einen zweiten pharmazeutischen Wirkstoff, in der Herstellung eines Kombinationsmedikamentes.

[0111] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von IL-2-Mikroaggregaten der Erfindung in der Herstellung eines Medikamentes, worin das Medikament für die Verabreichung an Patienten genutzt wird, die mit einem zweiten pharmazeutischen Wirkstoff vorbehandelt worden sind. In ähnlichem Sinne betrifft die Erfindung die Verwendung eines zweiten pharmazeutischen Wirkstoffes in der Herstellung eines Medikamentes, worin das Medikament für die Verabreichung an Patienten, die mit IL-2-Mikroaggregaten der Erfindung vorbehandelt worden sind, genutzt wird. Die «Vorbehandlung» kann kürzlich (zum Beispiel innerhalb von 24 vor der Verabreichung des besagten Medikamentes), intermediär (zum Beispiel mehr als 24 Stunden, aber nicht länger als 4 Wochen), mehr entfernt (zum Beispiel mindestens 4 Wochen früher), sehr entfernt (zum Beispiel mindestens 6 Monate früher) erfolgt sein, wobei sich diese Zeitangaben auf die letzte Vorbehandlungsdosis beziehen. Der Patient kann unempfänglich für die Behandlung mit dem pharmazeutischen Wirkstoff sein, der während der Vorbehandlung verabreicht wurde.

[0112] Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von IL-2-Mikroaggregaten der Erfindung, zur Herstellung eines Medikamentes, worin das Medikament gemeinsam mit einem zweiten pharmazeutischen Wirkstoff verabreicht wird. In ähnlichem Sinne betrifft die Erfindung die Verwendung eines zweiten pharmazeutischen Wirkstoffs in der Herstellung eines Medikamentes, worin das Medikament gemeinsam mit IL-2-Mikroaggregaten der Erfindung verabreicht wird. Die zwei Wirkstoffe werden bevorzugt innerhalb von 4 Stunden verabreicht.

[0113] Bevorzugte zweite pharmazeutische Wirkstoffe sind aus der folgenden Tabelle ausgewählt worden. Diese beinhaltet auch Details der Bedingungen, unter denen die Kombinationstherapie zur Behandlung eingesetzt werden kann (und, wo angezeigt, grundlegende Details wie die Kombinationstherapie verabreicht werden kann):

[0114]

Zweiter Wirkstoff	Zur Behandlung von
Ein anti-CD20-Antikörper, wie Rituximab, Ibritumomab oder Tositumomab; zum Beispiel Rituxan™, Mabthera™, Zevalin™, HuMax-CD20™, Bexxar™	Non-Hodgkin Lymphom. Chronische Lymphocyten-Leukämie. Insbesondere wenn ein NHL-Patient auf eine Rituximab-Behandlung nicht anspricht.
Ein anti-CD40-Antikörper.	Non-Hodgkin Lymphom. Multiples Myelom. Chronische Lymphocyten-Leukämie.
Ein anti-Her2-Antikörper, wie Trastuzumab; zum Beispiel Herceptin™	Brustkrebs Insbesondere wenn ein Patient auf eine Trastuzumab-Behandlung nicht anspricht.
Ein anti-EGFR-Antikörper, wie Cetuximab; zum Beispiel Erbitux™	«Non small cell lung cancer», oder kolorektaler Tumor. Insbesondere wenn ein Tumor EGFR überexprimiert. Insbesondere wenn ein Patient auf eine Cetuximab-Behandlung nicht anspricht.
Ein anti-VEGF-Antikörper wie Bevacizumab; zum Beispie Avastin™	kolorektaler Tumor.
Ein anti-CD52-Antikörper wie Alemtuzumab zum Beispiel Campath™	Chronische Lymphocyten-Leukämie.
Ein anti-CD33-Anktikörper wie Gemtuzumab; zum Beispiel Mylotarg™	Akute Myeloid-Leukämie.
Ein H2-Rezeptor-Agonist, wie Histamin oder in pharmazeutisch verträgliches Histaminsalz, zum Beispiel Histamindihydrochlorid	Fortgeschrittenes malignes Melanom (zum Beispiel Stadium IV), Akute Myelogene Leukämie oder Nierenzell-Karzinom. Insbesondere wenn der Patient Lebermetastasen hat. Beide Substanzen können als subkutane Injektion verabreicht werden. Für Melanom: IL-2 subkutan zweimal täglich (BID) an Tag 1 & 2 der Wochen 1 & 3, und an Tag 1–5 der Wochen 2 & 4; Histamin-diHCl subkutan für 10–30 min an Tag 1–5 aller 4 Wochen. Für Akute Myelogene Leukämie, eintretetend nach autologer Stammzell-Transplantation oder nach Chemotherapie.
Bacillus Calmette-Guerin (BCG)	Blasenkrebs. IL-2 kann mittels eines Foley-Katheters verabreicht werden.
Thalidomin	Non-Hodgkin-Lymphom
Lenalidomid	Multiples Myelom
Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib; zum Beispiel Velcade™	Non-Hodgkin-Lymphom
«CVP», dies ist eine Kombination aus: Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison.	Non-Hodgkin-Lymphom Werden als intravenöse Injektion verabreicht
«CHOP», dies ist eine Kombination aus: Cyclophosphamid, Hydroxydoxorubicin, Vincristin und Prenison.	Non-Hodgkin Lymphom Cyclophosphamid, Hydroxydoxorubicin, Vincristine werden als intravenöse Injektion verabreicht; Prednison wird oral als Tablette verabreicht.
«CHOP-R», dies ist eine Kombination aus: «CHOP» mit einem Rituximab.	Non-Hodgkin-Lymphom Insbesondere für Patienten, die auf «CHOP» oder «R» allein, nicht ansprechen.

Zweiter Wirkstoff	Zur Behandlung von
«CVP-R», dies ist eine Kombination aus: «CVP» mit einem Rituximab.	Non-Hodgkin-Lymphom Insbesondere für Patienten, die auf «CVP» oder «R» allein, nicht ansprechen.
Interferon-α («IFNα»)	Brustkrebs, kolorektaler Tumor oder Nierenzell-Karzinom.
Interferon-γ («IFNγ»)	Krebs
5-Fluor-Uracil («5-FU»)	Brustkrebs, kolorektaler Tumor oder Nierenzell-Karzinom.
Kombination von 5-FU & IFNα	Brustkrebs, kolorektaler Tumor oder Nierenzell-Karzinom.
Anti-retrovirale Präparate	HIV
Ein Tyrosinekinase-Inhibitor, wie Bay43-9006 oder SU11248	Nierenzell-Karzinom oder Melanom.
Decitabin	Schilddrüsenkrebs, Myelodysplastische Syndrome, Melanom oder Nierenzell-Karzinom.

[0115] Wenn der zweite Wirkstoff ein Antikörper ist, ist es bevorzugt ein monoklonaler Antikörper, besonders bevorzugt ein humanisierter oder ein humaner Antikörper. Antikörper werden gewöhnlich als Injektion verabreicht, zum Beispiel subkutan oder intravenös. Antikörper können an andere aktive Wirkstoffe, zum Beispiel Tiuxetan, Ozogamicin oder Radionuclide, ^{131}I etc., gebunden sein, im Speziellen zur Behandlung von Krebserkrankungen.

[0116] Im Allgemeinen kann der zweite Wirkstoff ein Antikörper sein, der ADCC (Antikörper-abhängige zelluläre Zelltoxizität) aufweist. Auf IL-2 basierende Kombinationstherapie ist erfolgreicher in der Behandlung von Krebserkrankungen zusammen mit Antikörpern, die ADCC vermitteln, als mit Wirkstoffen, die Krebs behandeln durch Inhibition von Vaskularisierung oder durch Veränderung der Zellzyklus-Signaltransduktion.

Definitionen

[0117] Der Ausdruck «enthaltend» (bzw. «enthält») erfasst «als Bestandteil enthalten» ebenso wie «bestehen aus», z.B. eine Mischung «enthaltend» X kann ausschliesslich aus X bestehen, oder kann etwas Zusätzliches enthalten, z.B. X + Y.

[0118] Der Ausdruck «etwa» (bzw. «ca.») in Zusammenhang mit einem numerischen Wert χ bedeutet z.B. x ± 10%. Wo erforderlich, kann der Ausdruck «etwa» (bzw. «ca.») weggelassen werden.

[0119] Der Ausdruck «im Wesentlichen» schliesst «vollständig» nicht aus, z.B. eine Mischung, die «im Wesentlichen» frei von Y ist, kann vollständig frei von Y sein. Wo erforderlich, kann der Ausdruck «im Wesentlichen» weggelassen werden.

[0120] Prozent Sequenzidentität kann mittels des «Smith-Waterman homology search»-Algorithmus bestimmt werden, unter Verwendung einer «affine gap search» mit dem Wert 12 für eine «gap open penalty» und dem Wert 2 für eine «gap extension penalty», sowie 62 für «BLOSUM matrix». Der «Smith-Waterman homology search»-Algorithmus wird in Zitat 64 gelehrt.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0121]

Fig. 1	zeigt den Anstieg der Spezifischen Trübung (τ) wenn SDS im Verlauf der Diafiltration entfernt wird.
Fig. 2 und 3	zeigen die Aminosäurensequenz von IL-2 in dem PROLEUKIN™-Produkt (SEQ ID NO: 1). Der Sequenz (i) fehlt das N-terminale Methionin der SEQ ID NO: 3, (ii) fehlt der Alaninrest, der sich am N-terminalen Ende des vollentwickelten humanen IL-2, wie in SEQ ID NO:4 dargestellt, befindet, und (iii) hat einen Serin-Rest im Austausch für den Cys-125-Rest, wie in SEQ ID NO: 4 dargestellt.
Fig. 4	zeigt eine Nukleinsäuresequenz, womit die in Fig. 2 dargestellte Sequenz (SEQ ID NO: 2, die das Start- und Stop-Codon beinhaltet, und die in als SEQ ID NO: 3 vor der Abspaltung des N-terminalen Methionin) kodiert wird. Die Zahlen auf der linken Seite bezeichnen die erste Base in jeder Reihe, gezählt vom 5´-Ende des (+)-DNA-Stranges des IL-2-Gens. Zahlen unter der Aminosäurensequenz bezeichnen Aminosäure-Nummern, gezählt vom N-terminus des nativen humanen IL-2. Pfeile bezeichnen Nukleotidunterschiede, in Relation zum humanen IL-2 (zum Beispiel die Unterschiede zwischen den SEQ ID NO: 2 und 5).
Fig. 5	

zeigt den Anteil des totalen IL-2, der durch Zentrifugation aus diesen sieben Proben pelletiert werden konnte, in Funktion der Menge SDS (µg) pro IL-2 (mg).

Fig. 6 zeigt die Plasma-Bioaktivität von sechs der sieben Proben.

Fig. 7 Vergleicht die 160 µg/mg und die 15 µg/mg Proben.

Fig. 8 ist eine Kombination der Fig. 6 und 7. X-Achsen zeigen die Zeit (Stunden) nach der Injektion; Y-Achsen zeigen die Plasma-Bioaktivität (ng/ml).

Fig. 9 zeigt τ (cm^2/g) gegen die SDS-Konzentration (mg/µg) während der Diafiltration und in

Fig. 10 wurde τ in MW (kDa) konvertiert.

Fig. 11 zeigt die Abnahme der SDS-Konzentration während der Diafiltration.

Fig. 12 kombiniert die Trübungsergebnisse aus Fig. 9 mit den SDS-Entfernungsprofilen aus Fig. 11.

Fig. 13 zeigt den Einfluss der Lyophilisierung auf τ (cm^2/g). Die Quadrate repräsentieren Werte vor der Lyophilisierung und Kreise repräsentieren Werte nach der Lyophilisierung. Die X-Achse zeigt die SDS-Konzentration der Probe (µg/mg).

Fig. 14 zeigt die Bioaktivität der IL-2-Mikroaggregate, vor und nach Verdünnung mit Serum, und einen Vergleich mit monomerem IL-2.

Fig. 15 und 16 zeigen Dynamische Lichtstreuungsspektren der IL-2-Mikroaggregate. Fig. 15 zeigt die Verteilung der Masse der Lösungskomponenten, und Fig. 16 die zahlenmässige Verteilung.

Verfahren zur Ausführung der Erfindung

1/Herstellung der IL-2-Mikroaggregate

[0122] E.coli, die mit einem Plasmid transformiert wurden, das die in Fig. 4 dargestellte Nukleotidsequenz enthält, wurden unter Standardbedingungen kultiviert, so dass ein IL-2-Protein mit der in Fig. 2 dargestellten Sequenz exprimiert wurde. Am Ende der Kultivierung lag das IL-2 hauptsächlich in der Form von «Inclusion Bodies» vor.

[0123] Erste Rückgewinnungsschritte beinhalteten Konzentrierung, Zellzerstörung, Diafiltration, Inaktivierung, Disprogierung («redisruption») und Auflösung in Saccharose. Konzentrierung der geernteten Zellen erfolgte durch den Gebrauch von «Crossflow-Filtern», mit dem Ziel, das Arbeitsvolumen etwa um das 5-Fache zu reduzieren. Die Zellen wurden mittels Homogenisierung zerstört, um die Isolation der IL-2 «Inclusion Bodies» zu gewährleisten. Die im Fermentationsmedium enthaltenen Salze wurden mittels Diafiltration entfernt und die Wirtsbakterien in der diafiltrierten Lösung wurden durch Zugabe von Alkohol getötet. Nach der Alkoholbehandlung wurden die Zellen mittels Homogenisierung zerstört. Saccharose wurde zugegeben, um eine Lösung höherer Dichte zu erhalten, um die Trennung der IL-2 Inclusion Bodies von Zelltrümmern während der Zentrifugation zu ermöglichen. Die IL-2-Partikel enthaltende Paste wurde mittels Zentrifugation gesammelt, aliquotiert und bei –70°C, oder kälter, bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

[0124] Die IL-2-Partikel enthaltende Paste wurde mit SDS gelöst und mit Dithiothreit (DTT) reduziert, um die monomere Form des löslichen IL-2 ohne Disulfid-Bindungen zu erhalten. Dieser Verfahrensschritt wurde durchgeführt, um die Ausbeute in der folgenden Chromatographie zur erhöhen.

[0125] Die monomere lösliche Form des IL-2 wurde mittels eines Verfahrenes gereinigt, der Grössen-Ausschluss-Chromatographie (SEC), Oxidation, Konzentrierung, RP-HPLC, Fällung und Zentrifugation beinhaltete. Der erste Chromatographie-Schritt, die SEC, wurde durchgeführt, um IL-2 von den Wirtsproteinen und Wirtsnukleinsäuren zu trennen. Die Fraktionen, die das IL-2 enthielten, wurden gesammelt und vereinigt. Das IL-2 wurde oxidiert, um die intramolekularen, Disulfid-Bindung zu erhalten. Konzentrierung der IL-2-Lösung erfolgte mittels Ultrafiltration in der Absicht, das Arbeitsvolumen zu reduzieren. Der zweite Chromatographieschritt, präparative RP-HPLC, wurde durchgeführt, um das IL-2 von bakteriellen Endotoxinen, Nukleinsäuren und Wirtsproteinen zu trennen und um IL-2-Isoformen, inklusive oxidierter Formen, zu entfernen. Die IL-2 enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und vereinigt. Das IL-2 wurde durch Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH) gefallt und mittels Zentrifugation gesammelt. Dieser Verfahrensschritt wurde durchgeführt, um die Lösungsmittel, die während der RP-HPLC-Reinigung benutzt wurden, zu entfernen. In diesem Stadium wird das Material als «HPLC-Paste» bezeichnet.

[0126] Die HPLC-Paste wurde dann unter Zugabe einer Lösung aus 0.05 M Na_2HPO_4 + 1% SDS gelöst. Wenn SDS in einer hinreichenden Konzentration zugegeben wird, beinhaltet die Zusammensetzung vorwiegend monomeres, gelöstes IL-2, jedoch kann auch ein kleiner Anteil oligomerisiertes IL-2 (das heisst kovalent verbundene IL-2-Moleküle in der Form von Oligomeren) während der Aufreinigung entstanden sein. Diese Oligomere wurden mittels Gelfiltration entfernt. Gelfiltration entfernt auch alle, von vorausgegangenen Schritten übriggebliebenen, organischen Lösungsmittel.

[0127] Da SDS giftig für die Zellen sein kann, wird es von dem gelösten IL-2 getrennt. Die Lösung wurde diafiltriert gegen einen 10-mM-Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5, bis die SDS-Werte ungefähr 160 µg/mg IL-2 erreicht hatten. Mikroaggregate aus IL-2 und SDS beginnen sich bei etwa 500–600 µg/mg zu bilden und ihre Grösse nimmt allmählich zu, je weiter der SDS-Wert abnimmt und sich dem Ziel von 160 µg/mg nähert (Fig. 1). Diese SDS-Entfernung, die der Schlüssel zur Bildung der Mikroaggregate ist, ist der letzte Schritt in dem Verfahren zur Reinigung des IL-2, bevor es formuliert wird.

2/Formulierung von IL-2-Mikroaggregaten zur pharmazeutischen Verwendung

[0128] Die diafiltrierte SDS/IL-2-Mischung, die Mikroaggregate enthielt, wurde auf ihre Proteinkonzentration (mg/ml) untersucht, indem ihrer Absorption bei 280 nm durch den IL-2-Extinktionskoeffizienten (0,79) geteilt wurde. Das Volumen der diafiltrierten IL-2-Lösung wurde ebenfalls bestimmt (ml). Die gesamte Menge an IL-2-Protein (mg) wurde berechnet, indem das Volumen der diafiltrierten IL-2-Lösung mit der Proteinkonzentration multipliziert wurde. Das endgültige Arbeitsvolumen (ml) zur Formulierung wurde berechnet, indem die Gesamtmenage des Proteins (in mg) mit dem Faktor 0,909 multipliziert wurden. Dieser Faktor berücksichtigt den Verlust an IL-2 während der Filtration.

[0129] Um das IL-2 während der Lyophilisation zu stabilisieren, wurde ein 1/4-Volumen einer 20%igen Mannitlösung zugegeben, um eine Mannit-Endkonzentration von 5% (das heisst 50 mg/ml) zu erhalten. Ein 10-mM-Natriumphosphat-Puffer, pH 7,5 wurde ebenfalls zugegeben, um das endgültige Arbeitsvolumen zu erreichen. Nachdem das Mannit und der Puffer zugegeben war, wurde die IL-2-Konzentration in der formulierten Lösung, durch Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt.

[0130] Das Endresultat nach der Formulierung war eine «Bulk-Lösung» mit einem pH von 7,5, enthaltend: IL-2 mit einer Endkonzentration von 1,1 ± 0,05 mg/ml; 0,18 mg/ml SDS; 50 mg/ml Mannit; 0,17 mg/ml Natriumdihydrogenphosphat (monobasisch); und 0,89 mg/ml Dinatriumhydrogenphosphat (dibasisch).

[0131] Die formulierte «Bulk-Lösung» wurde sterilfiltriert in einen sterilen «Bulk-Tank». Material wird aus diesem Tank in sterile Gefässe umgefüllt. 1,2 ml «Bulk-Lösung» wurde in jedes Gefäss gefüllt. Die Gefässe wurden dann in einen Lyophilisator gestellt und gefriergetrocknet. Stopfen wurden aufgesetzt und die Stopfen wurden verkapselt. Die Gefässe wurden dann etikettiert und verpackt.

3/Wirkung von SDS-Konzentration auf Trübung

[0132] Bevor der bevorzugte Konzentrationsbereich für SDS erreicht wurde, wurde IL-2 gemäss der oben beschriebenen Methode präpariert, allerdings wurden grosse Proben (~ 300 mg IL-2) zu verschiedenen Stadien im Verlauf der Diafiltration für Trübungs-Untersuchungen entnommen, um die Wirkung von SDS auf IL-2-Aggregation zu etablieren.

[0133] Fig. 11 zeigt die SDS-Konzentration während der Diafiltration des Ausgangsmaterials. Die Konzentrationsabnahme entspricht einer geraden Linie auf der logarithmischen Achse. Proben wurden bei den folgenden SDS-Konzentrationen entnommen (µg pro mg IL-2): 1195, 536, 351, 217, 173, 137, 123, 104 und 72.

[0134] Die IL-2-Reinheit war in allen Proben gleich (100% nach SDS-PAGE, >98.5% nach HPLC). Die Trübung wurde bei 488 nm gemessen und in absolute spezifische Trübung (τ) konvertiert, wie oben beschrieben, basierend auf der IL-2-Konzentration in der Probe. Ergebnisse sind in Fig. 9 gezeigt, und Fig. 12 kombiniert die Trübungs-Ergebnisse mit dem SDS-Entfernungs-Profil von Fig. 11.

[0135] Unterhalb von ca. 300 µg/mg nimmt die Trübung langsam zu, und unterhalb von ca. 95 µg/mg wird die Zunahme sehr steil.

[0136] Die τ-Werte können zum scheinbaren Molekulargewicht konvertiert werden, entsprechend folgender Formel:

$$MW = \frac{\tau \times 10^7}{8{,}1 + 2\tau}$$

[0137] Das Ergebnis dieser Konversion für Prä-Lyophilisations-Proben ist in Fig. 10 gezeigt. Diese und andere Daten zeigen, dass ein MW entsprechend monomerem IL-2 oberhalb von ca. 600 µg/mg gesehen wird, und das MW beginnt signifikant zu steigen, wenn SDS unterhalb von ca. 300 µg/mg ist, wobei die Zunahme sehr steil wird wenn SDS unterhalb von ca. 100 µg/mg fällt.

[0138] Basierend auf dem MW von monomerem IL-2 (15.3 kDa für natives IL-2), kann das Molekulargewicht eines Aggregats in eine abgeleitete Zahl von IL-2-Monomeren pro Aggregat konvertiert werden.

4/Lyophilisation und spezifische Trübung

[0139] Während der Diafiltration zur SDS-Entfernung wurden 15 ml Proben bei folgenden SDS-Konzentrationen entnommen: 1155; 840; 585; 400; 190; und 155 µg/mg IL-2. Die Trübung dieser Proben wurde bestimmt, vor und nach Herstellung der Formulierung (das heisst, nach Zugabe von Mannit, Phosphatpuffer, Lyophilisation und Rekonstitution). In beiden

Fällen ging den Trübungs-Messungen eine Filtration durch einen 0,2-µm-Filter voraus, um jegliche grosse Aggregate zu entfernen.

[0140] Fig. 13 zeigt die Wirkung der Lyophilisation auf τ (logarithmischer Massstab) für diese Proben. Die Graphik zeigt, dass Lyophilisation die Mikroaggregate nicht zerstört, aber dass sie oft die spezifische Trübung leicht erhöhen kann (das heisst, die Aggregate werden grösser), ohne die Abhängigkeit von der SDS-Konzentration zu beeinflussen. Diese Wirkung ist im Allgemeinen klein innerhalb des bevorzugten SDS-Bereichs.

5/Dynamische Lichtstreuung

[0141] IL-2-Mikroaggregate wurden präpariert wie oben beschrieben, mit einer SDS-Konzentration von 160 µg/mg, und wurden mittels DLS analysiert. Die Ergebnisse sind in Fig. 15 und 16 gezeigt. Fig. 15 zeigt die DLS-Ergebnisse, verteilt entsprechend der Masse der Lösungs-Komponenten, und Fig. 16 zeigt sie zahlenmässig.

[0142] In Fig. 15 hat der Haupt-Peak einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 12,7 nm, dieser repräsentiert 99,02% der Gesamtmasse. Es gibt auch einen Stromabwärts-Peak mit einem mittleren Durchmesser von 55,6 nm, dieser repräsentiert die fehlenden 0,98% der Masse. In Fig. 16 hat der Haupt-Peak einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 11,7 nm, dies repräsentiert 99,99% der Gesamtzahl. Es gibt auch einen Stromabwärts-Peak mit einem mittleren Durchmesser von 53,7 nm, dies repräsentiert die fehlenden 0,01% der Partikel.

6/Vergleich von Mikroaggregaten vs. monomerem IL-2

[0143] Mikroaggregiertes IL-2 wurde in mehreren Tests mit monomerem IL-2 verglichen. IL-2 Mikroaggregate wurden präpariert, wie oben beschrieben. Für vergleichende Zwecke wurde IL-2 in einer monomeren Form präpariert, wobei Tween 80 als Detergens an Stelle von SDS benutzt wurde. Dieses Detergens bildet keine Mikroaggregate mit IL-2, aber das Detergens solubilisiert das IL-2 und ergibt ein bioaktives, monomeres Produkt.

[0144] Beide Formen von IL-2 wurden als bioaktiv bestätigt. Das aggregierte IL-2 hatte eine Aktivität von ca. 20 MIU/mg. Nach Verdünnung mit Serum ex vivo war die Aktivität etwas verringert. In beiden Fällen war die Aktivität etwas höher als die von monomerem IL-2 (Fig. 15). Somit können die erfindungsgemässen IL-2-Mikroaggregate dissoziieren, um ein bioaktives Produkt zu ergeben, und die Bioaktivität ist äquivalent zu der von IL-2, das nicht aggregiert wurde.

[0145] Die In-vivo-Verteilung von radioaktiv markiertem IL-2 wurde nach intravenöser Verabreichung des Proteins verglichen, entweder in SDS-mikroaggregierter Form oder in monomerer Form. Die mikroaggregierte Form verteilte sich bevorzugt in Lunge, Leber und Niere, während das monomere Produkt fast zu 100% in die Niere verteilt wurde. Somit hat Mikroaggregation einen Einfluss auf die In-vivo-Verteilung.

[0146] Mikroaggregat und monomeres IL-2 wurden auch einem Tumor-Metastase-Modell verglichen. B16F10-Tumorzellen wurden intravenös in Mäuseschwänze injiziert, und 14 Tage später wurden die Lungen auf Tumore inspiziert. Behandelte Tiere erhielten IL-2 täglich an Tag 3–10. Die mediane Zahl von Lungenmetastasen an Tag 14 waren wie folgt:

[0147]

Dosis (mg/kg)	IL-2/SDS-Mikroaggregate	IL-2/Tween 80 Monomer
15	1	16
10	3	26
7,5	4,5	49
5	24	53,5
1	60	59,5
0,1	88,5	72

[0148] Somit ist im Tumormodell die mikroaggregierte Form von IL-2 effektiver als die monomere Form, denn Metastasen können mit viel niedrigerer Dosis von IL-2 verhindert werden. Weil jedoch IL-2 selbst toxisch sein kann, sind die Daten nicht direkt vergleichbar, z.B. 10 mg/kg IL-2-Mikroaggregate können ca. 1/2 einer Testpopulation töten. Der aussagekräftigste Vergleich ist daher die höchste nicht-lethale Dosis, also die 7.5-mg/kg-Dosis. Bei dieser äquitoxischen Dosis ist die mediane Zahl der beobachteten Metastasen mit Mikroaggregaten bei 4.5 (Bereich 1–18), verglichen mit 16 (Bereich 4–57) mit monomerem IL-2, mit einer statistisch signifikanten Differenz. Diese Differenz repräsentiert einen 3- bis 5-fach besseren therapeutischen Index für die mikroaggregierte Form von IL-2.

[0149] Weitere Studien mit diesem artifiziellen B16-Metastase-Modell zeigten, dass die SDS-Level im finalen Produkt scheinbar keinen Einfluss auf die Effizienz haben. Zum Beispiel, eine Mischung mit 160 µg/mg an SDS ergab die gleiche Wirkung wie eine mit 181 µg/mg. Mit SDS im Bereich von 95–250 µg/mg bleibt somit die Anti-Tumor-Aktivität optimal, während SDS-abhängige Toxizität vermieden wird.

7/Pharmakokinetische Wirkungen der finalen SDS-Konzentration

[0150] Wie oben gezeigt, steigt die Trübung von IL-2/SDS-Mischungen, wenn die SDS-Konzentration im Verlauf der Diafiltration sinkt. In einem pharmakokinetischen Test wurde die Diafiltration weit über den typischen Zielwert von 160 µg/mg hinaus ausgedehnt, bis hinunter auf 25 µg/mg. Proben wurden in mehreren Stufen des Diafiltrationsverfahrenes entnommen: 1090 µg/mg; 200 µg/mg; 160 µg/mg; 125 µg/mg; 95 µg/mg; 65 µg/mg; und 25 µg/mg.

[0151] Alle Proben, mit Ausnahme der am stärksten verdünnten (25 µg/mg) waren visuell klar. Die Reduktion der spezifischen Trübung (τ) der niedrigsten Konzentration entspricht einer riesigen Zunahme der Proteinpräzipitation bei 25 µg/mg, die für das Auge sichtbar war. Fig. 5 zeigt den Anteil an Gesamt-IL-2, welcher in den sieben Proben durch Zentrifugation pelletiert werden konnte, und eine starke Zunahme ist bei der niedrigsten SDS-Konzentration sichtbar, dagegen ist der Wert bei höheren Konzentrationen im Wesentlichen konstant. Dieses präzipitierte Material wurde sedimentiert und verursachte deshalb keine Trübung.

[0152] Im Gegensatz zur variablen Trübung und Präzipitation war die Bioaktivität (IU) im Wesentlichen konstant für die sieben Proben (ca. 19 IU/mg).

[0153] Zur Studie der Pharmakokinetik wurden alle Proben, ausser der am stärksten verdünnten, als Bolus in die Vene von Ratten injiziert (Triplikate pro SDS-Dosis, 18 Ratten insgesamt) mit 0,2 mg IL-2 pro kg Körpergewicht, basierend auf einer allometrischen Extrapolation der humanen Dosis. Blutproben wurden 1, 3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 und 60 Minuten nach der Injektion entnommen und wurden auf IL-2 Bioaktivität getestet. Fig. 6 zeigt Plasma-Bioaktivität (ng/ml) dieser Proben. Zwischen 0,5 und 1 Stunde, entspricht die oberste Linie der 160-µ/mg-Dosis (▪), und die niedrigste Linie ist 65 µg/mg (Δ), obgleich alle Linien sehr ähnlich sind.

[0154] In einer zweiten Studie wurde die Probe mit der höchsten Linie im ersten Experiment (160 µg/mg) mit der am stärksten verdünnten (25 µg/mg) verglichen. Die pharmakokinetischen Parameter der 160-µg/mg-Probe in der zweiten Studie entsprachen denen der ersten Studie. Während die Linien in Fig. 6 alle ähnlichen Verlauf zeigen, ergab hingegen die am stärksten verdünnte Probe sehr andersartige Ergebnisse (Fig. 7). Die Clearance-Raten, die aus den Kurven berechnet wurden, waren ~30-fach verschieden: 12.7 ml/min/kg für die 160-µg/mg-Dosis, und 362 ml/min/kg für die 25-µg/mg-Dosis. Wenn die Ergebnisse beider Experimente verglichen werden, ist die am stärksten verdünnte Probe klar unterscheidbar von den anderen sechs Proben (Fig. 8).

[0155] Somit hat der Aggregations-Status von IL-2 eine klare Wirkung auf dessen In-vivo-Pharmakokinetik.

8/Freies SDS

[0156] Die vorangehenden Experimente messen die Gesamtkonzentration an SDS in SDS/IL-2 Mischungen. Experimente wurden durchgeführt, um zu sehen, wie viel des Gesamt-SDS mit IL-2 assoziiert war und wie viel frei in Lösung verbleibt.

[0157] Gefässe mit PROLEUKTN™-Produkt wurden nach Vorschrift rekonstituiert und durch Centricon-10-Membranen (10 kDa Ausschlussgrenze) ultrafiltriert; mittels zweier Zentrifugationsschritte, jeder bei 3000 Upm für 30 Minuten. Die Ausgangsprobe und das Filtrat wurden auf SDS- und IL-2-Mengen analysiert. SDS wurde mittels Acridin-Orange-Test [35] gemessen. Kurze Testbeschreibung: Entnahme von 0,5 ml der Probe; Zugabe von 0,1ml von 1,75 M $NaHSO_4$ Lösung; Zugabe von 0,1 ml von 1% (w/v) Acridin-Orange-Lösung; Zugabe von 1,5 ml Toluol; versiegeln; vortexen für 3 Minuten; Trennung von organischer und wässriger Phase z.B. durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 Upm und bei Raumtemperatur; Messung der Extinktion der oberen organischen Phase bei 499 nm. Proben können vor dem Test verdünnt werden (z.B. mit reinem Wasser), um sie in den Bereich einer Standardkurve zu bringen. Z.B. wenn die Standardkurve auf bekannten SDS-Konzentrationen von bis zu to 25 µg/ml beruht, dann sollte die Probe verdünnt werden, um die SDS-Konzentration in diesen Bereich zu bringen. Der Nullwert für den spektrophotometrischen Schritt sollte mit einem Standard bestimmt werden, der kein SDS enthält und in gleicher Weise behandelt wurde wie die experimentelle Probe.

[0158] Die Ergebnisse zeigten, dass IL-2 vollständig durch die Ultrafiltrationsmembranen zurückgehalten wurde (kein IL-2 im Filtrat nachweisbar), dagegen konnten ca. 35% des SDS durch die Membran passieren.

[0159] Es ist zu verstehen, dass die Erfindung nur beispielhaft beschrieben wurde, und Änderungen im Detail können erfolgen, ohne von Geist und Inhalt der Erfindung abzuweichen.

ZITATE (Die vollständige Offenbarung wird durch Zitat aufgenommen)

[0160]

[1] Hora et al. (1990) Biotechnology (N Y) 8:755-8.
[2] US Patent 4 569 790.
[3] Meyers et al. (1991) Clin Pharmakol Ther. 49:307-13.
[4] US Patent 4 604 377.
[5] Hora et al. (1992) Dev Biol Stand 74:295-306.
[6] WO85/04328.
[7] US Patent 4 748 234.
[8] Ho et al. (1992) Vaccine 10:209-13.
[9] Geigert et al. (1993) Chapter 8 of Stability and Characterization of Protein and Peptide Drugs:

Case Histories (eds. Wang & Pearlman). ISBN 0-306-44365-1.
[10] Vemuri (1992) Dev Biol Stand. 74:341-51.
[11] Anderson et al. (1992) Am J Hosp Pharm 49:608-12.
[12] Johnston et al. (1992) Pharm Res 9:425-34.
[13] Anderson et al. (1992) J Immunother 12:19-31.
[14] Anderson & Sorenson (1994) Clin Pharmakokinet 27:19-31.
[15] Konigsberg et al. (1998) Biochim Biophys Acta 1370:243-51.
[16] Kanaoka et al. (2001) J Pharm Pharmakol 53:295-302.
[17] Ozbas-Turan et al. (2002) J Pharm Sci 91:1245-51.
[18] Bergmann et al. (1991) MolImmunol 28 (1-2):99–105.
[19] US Patent 4 908 434.
[20] US Patent 4 925 919.
[21] US Patent 4 853 332.
[22] US Patent 5 464 939.
[23] US Patent 5 824 330.
[24] US Patent 4 778 879.
[25] US Patent 4 992 271.
[26] US Patent 5 037 644.
[27] US Patent 5 078 997.
[28] US Patent 4 816 440.
[29] EP-B-0 268 110.
[30] EP-B-0 217 645.
[31] Heinig & Vogt (1999) Electrophoresis 20:3311-28.
[32] Nomura & Murakami (1999) Bunseki Kagaku 48:111-6.
[33] Fielden & Claesson (1998) J Colloid Interface Sci 198:261-5.
[34] Gabor & May (1996) Abstract # C-04,1996 FDA Science Forum Poster Abstractos.
[35] Sokoloff & Frigon (1981)Analytical Biochem 118:138-41.
[36] Arakawa et al. (1994) Int J Pept Protein Res 43:583-7.
[37] US Patent 4 738 927.
[38] US Patent 4 656 132.
[39] US Patent 4 530 787.
[40] US Patent 4 572 798.
[41] US Patent 4 931 543.
[42] Chapter 8 of Biological Spectroscopy (Campbell & Dwek). ISBN 0-8053-1849-6.
[43] Piccora (1985) Dynamic Light Scattering. Plenum Press, New York.
[44] US Patent 4 518 584.
[45] Bazan (1992) Science 257:410-2.
[46] Wang et al. (1984) Science 224:1431-3.
[47] McKay (1992) Science 257:412.
[48] Theze et al. (1996) Immunol Today 17:481-6.
[49] Buchli & Ciardelli (1993) Arch Biochem Biophys 307:411-5.
[50] Collins et al. (1988) PNAS USA 85:7709-13.
[51] Kuziel et al. (1993) J Immunol 150:5731.
[52] Eckenberg et al. (1997) Cytokine 9:488-98.
[53] EP-A-0 136 489.
[54] US Patent 4 752 585.
[55] EP-A-0 200 280.
[56] WO99/60 128.
[57] US Patent 5 229 109.
[58] WO00/58 456.
[59] US Patent 6 168 785.
[60] Ahmad et al. (1994) J Protein Chem 13:591-8.
[61] Gearing & Thorpe (1988) J Immunol Methods 114:3-9.
[62] Rossio (1997) Cytokines and immune cell products. Pages 348–356 of Manual of Clinical and Laboratory Immunology, 5th edition (eds. Rose, de Macario, Folds, Lane, Nakamura).
[63] Wadhwa et al. (2000) Quantitative biological assays for individual cytokines. Pages 207–239 of Cytokine Cell Biology: A Practical Approach (ed. Balkwill). ISBN 0-19-963 860-8.
[64] Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-9.

[0161]

SEQUENZ LISTING

<110> CHIRON CORPORATION

<120> HERSTELLUNG VON ALDESLEUKIN FUER DIE PHARMAZEUTISCHE VERWENDUNG

<130> 11760CH

<160> 5

<170> SeqWin99, version 1.02

<210> 1
<211> 132
<212> PRT
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Reifes des-Alanyl-1-Serin-125-Variante des humanen Interleukin-2

<400> 1

```
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1               5                  10                  15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
            20                  25                  30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
        35                  40                  45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
    50                  55                  60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65                  70                  75                  80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
                85                  90                  95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
            100                 105                 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
        115                 120                 125

Ser Thr Leu Thr
    130
```

<210> 2
<211> 402
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Des-Alanyl-1-Serin-125-Variante des humanen Interleukin-2

<400> 2

```
atgcctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat   60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc   120
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa   180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta   240
agacccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa   300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga   360
tggattacct tttctcagag catcatctca acactgactt ga                      402
```

<210> 3
<211> 133
<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Nascente des-Alanyl-1-Serin-125-Variante des humanen Interleukin-2

<400> 3
Met Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 133
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 405

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Human IL-2 Sequenz mit Met anstelle des Signals

<400> 5
atggcaccta cttcaagttc tacaaagaaa acacagctac aactggagca tttactgctg 60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120
ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaaacatct tcagtgtcta 180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactttcac 240
ttaagaccca gggacttaat cagcaatatc aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300
gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360
agatggatta ccttttgtca aagcatcatc tcaacactaa cttga 405

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Interleukin-2 für die pharmazeutische Verwendung, Schritte umfassend, bei denen man: a) Natriumdodecylsulfat (SDS) zu einer intramolekulare Disulfidbrücken entaltenden Interleukin-2 umfassenden Zusammensetzung gibt, um eine Endkonzentration von mindestens 500 µg SDS pro mg IL-2 zu erhalten; b) die SDS-Konzentration reduziert, wodurch etwas, aber nicht alles SDS aus der Zusammensetzung entfernt wird, und eine Zusammensetzung erhalten wird, die zwischen 95 und 250 µg SDS pro mg Interleukin-2 enthält.
2. Verfahren, gemäss Anspruch 1, wobei die Endkonzentration von SDS in Schritt a) mindestens 900 µg/mg beträgt.
3. Verfahren, gemäss Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei das Produkt von Schritt b) eine SDS-Konzentration zwischen 135 und 180 µg/mg hat.
4. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei zwischen Schritt a) und b) eine Gelfiltration durchgeführt wird, um jegliche präzipitierte, kovalente IL-2 Multimere zu entfernen.
5. Verfahren zur Herstellung von IL-2 zur pharmazeutischen Verwendung, das die Schritte umfasst: a) Reinigung von IL-2 über RP-HPLC; b) Fällung von IL-2; c) Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) zu dem präzipitierten IL-2, wobei eine SDS-Endkonzentration von mindestens 500 µg SDS pro mg IL-2 erhalten wird; d) Entfernern von präzipitieren, kovalenten IL-2-Multimeren mittels Gelfiltration; e) Reduzieren der SDS-Konzentration, sodass einiges, aber nicht alles SDS aus der Zusammensetzung entfernt wird, wobei eine Zusammensetzung erhalten wird, die zwischen 95–250 µg SDS pro mg IL-2 enthält.
6. Verfahren gemäss Anspruch 5, wobei die Endkonzentration von SDS in Schritt c) mindestens 900 µg/mg beträgt.
7. Verfahren gemäss Anspruch 5 oder 6, wobei das Produkt von Schritt e) eine SDS-Konzentration von 135–180 µg/mg aufweist.
8. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat (SDS) umfasst, wobei i) Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat (SDS) in Form von Aggregaten in der Zusammensetzung vorliegen; und ii) das Verfahren Schritte umfasst, bei denen man a) Natriumdodecylsulfat zu einer Zusammensetzung umfassend Interleukin-2, gibt, wobei genügend Natriumdodecylsulfat zugegeben wird, um monomeres, gelöstes Interleukin-2 zu erhalten, b) oligomeres IL-2 über Gelfiltration entfernt, und c) die Natriumdodecylsulfat-Konzentration auf ein Niveau reduziert, auf dem Interleukin-2 mit Natriumdodecylsulfat Aggregate bilden, so dass die Zusammensetzung, nach Lyophilisation und Rekonstitution eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g aufweist.
9. Verfahren gemäss Anspruch 8, wobei die Aggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm aufweisen.
10. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, bei dem man die SDS-Konzentration durch Diafiltration reduziert.
11. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, einen Schritt umfassend, bei dem man Mannit zugibt.
12. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, einen Schritt umfassend, bei dem man lyophilisiert.
13. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die spezifische Trübung (τ) der Zusammensetzung weniger als 0,7 cm^2/g beträgt.
14. Verfahren gemäss Anspruch 13, wobei die spezifische Trübung (τ) der Zusammensetzung zwischen 0,3 und 0,6 cm^2/g beträgt.
15. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die Zusammensetzung SDS/IL-2-Mikroaggregate umfasst, die einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 11 nm und 13 nm aufweisen.
16. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei die Zusammensetzung Mannit in einer Konzentration zwischen 40 und 50 mg Mannit pro mg IL-2 umfasst.

17. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 ein humanes IL-2 ist.
18. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 eine Des-Alanyl-1-Form von IL-2 ist.
19. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 eine Serin-125-Form von IL-2 ist.
20. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 die Des-Alanyl-1, Serin-125-Form des humanen IL-2 ist.
21. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 die Aminosäurensequenz SEQ ID NO: 1 hat.
22. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 nicht glykosiliert ist.
23. Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche, wobei IL-2 nach Expression in einem prokaryotischen Wirt gereinigt wird.
24. Zusammensetzung, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen, und wobei die Aggregate durch das Verfahren gemäss irgendeinem der vorherigen Ansprüche erhalten werden können.
25. Zusammensetzung, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen, und wobei die Zusammensetzung eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweist:
    i) die Zusammensetzung hat eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g;
    ii) die Zusammensetzung enthält SDS/IL-2-Aggregate mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm; und/oder
    iii) die Zusammensetzung enthält zwischen 95 und 250 µg SDS pro mg von Interleukin-2.
26. Lyophilisierte Zusammensetzung, die Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, wobei die Zusammensetzung mit einem wässrigen Medium zu einer Zusammensetzung gemäss Anspruch 25 rekonstituiert werden kann.
27. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–26, wobei die spezifische Trübung der Zusammensetzung weniger als 0,7 cm^2/g beträgt.
28. Zusammensetzung gemäss Anspruch 27, wobei die spezifische Trübung der Zusammensetzung zwischen 0,3 und 0,6 cm^2/g beträgt.
29. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–28, wobei die Zusammensetzung SDS/IL-2-Mikroaggregate umfasst, die einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 11 nm und 13 nm aufweisen.
30. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–29, wobei die Zusammensetzung Mannit in einer Konzentration zwischen 40 und 50 mg Mannit pro mg IL-2 umfasst.
31. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–30, wobei IL-2 ein humanes IL-2 ist.
32. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–31, wobei IL-2 eine Des-Alanyl-1-Form von IL-2 ist.
33. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–32, wobei IL-2 eine Serin-125-Form von IL-2 ist.
34. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–33, wobei IL-2 die Des-Alanyl-1, Serin-125-Form des humanen IL-2 ist.
35. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–34, wobei IL-2 die Aminosäurensequenz SEQ ID NO: 1 hat.
36. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–35, wobei IL-2 nicht glykosiliert ist.
37. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24–36, wobei IL-2 nach Expression in einem prokaryotischen Wirt gereinigt wird.
38. Zusammensetzung gemäss der Ansprüche 24 bis 37, mit einer IL-2-Konzentration von ca. 1,1 mg/ml.
39. Lyophilisierte pharmazeutische Zusammensetzung, die nach Rekonstitution mit 1,2 ml sterilem Wasser zur Injektion, in jedem Milliliter enthält: 1,1 mg nicht glykosiliertes Des-alanyl-1, Serin-125-Form des humanen IL-2; 50 mg Mannit; 0,18 mg Natriumdodecylsulfat (SDS); 0,17 mg Natriumdihydrogenphosphat (monobasisch); und 0,89 mg Dinatriumhydrogenphosphat (dibasisch) auf pH 7,5 eingestellt, wobei IL-2 und SDS in Form von Aggregaten vorliegen, so dass die rekonstituierte Zusammensetzung eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g hat.
40. Wässrige pharmazeutische Zusammensetzung, erhalten durch Rekonstitution der lyophilisierten Formulierung, gemäss Anspruch 39, mit 1,2 ml sterilem Wasser zur Injektion.
41. Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24 bis 40 und ein zweiter pharmazeutischer Wirkstoff zur simultanen separaten oder zur sequentiellen Verabreichung.
42. Kit, enthaltend a) die Zusammensetzung gemäss irgendeinem der Ansprüche 24 bis 40; und b) einen zweiten pharmazeutischen Wirkstoff.

43. Verwendung von Mikroaggregaten von a) Interleukin-2 und b) Natriumdodecylsulfat, für die Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten, wobei die Mikroaggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm aufweisen.

44. Verwendung einer Zusammensetzung, die sowohl Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat umfasst, für die Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten, wobei das Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat in der Form von Aggregaten vorliegen, und wobei die Zusammensetzung eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften aufweist:
i) die Zusammensetzung hat eine spezifische Trübung (τ) von weniger als 1,1 cm^2/g;
ii) die Zusammensetzung enthält SDS/IL-2 Aggregate mit einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm; und/oder
iii) die Zusammensetzung enthält zwischen 95 und 250 µg SDS pro mg von Interleukin-2.

45. Verwendung gemäss Anspruch 43 oder Anspruch 44, wobei das Medikament für die Krebsbehandlung ist.

46. Verwendung gemäss Anspruch 45, wobei die Krebserkrankung Nierenzell-Karzinom ist.

47. Verwendung gemäss Anspruch 45, wobei die Krebserkrankung Melanom ist.

48. Verwendung gemäss irgendeinem der Ansprüche 43 bis 47 für die Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen mit einem zweiten pharmazeutischen Wirkstoff vorbehandelten Patienten.

49. Verwendung gemäss irgendeinem der Ansprüche 43 bis 47 für die Herstellung eines Medikaments zur Verabreichung an einen Patienten gemeinsam mit einem zweiten pharmazeutischen Wirkstoff.

50. Verwendung von a) Mikroaggregaten von Interleukin-2 und Natriumdodecylsulfat, und b) eines zweiten pharmazeutischen Wirkstoffs, für die Herstellung eines Kombinations-Medikaments, wobei die Mikroaggregate einen mittleren hydrodynamischen Durchmesser zwischen 8 nm und 20 nm aufweisen.

51. Zusammensetzung gemäss Anspruch 41, wobei der zweite pharmazeutische Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.

52. Zusammensetzung gemäss Anspruch 51 wobei der Antikörper Antikörper-abhängige zelluläre Zelltoxizität (ADCC) aufweist.

53. Zusammensetzung gemäss Anspruch 41, wobei der zweite pharmazeutische Wirkstoff aus der Gruppe gewählt wird, umfassend: ein Anti-CD20 Antikörper; ein Anti-CD40 Antikörper, ein Anti-Her2 Antikörper, ein Anti-EGFR Antikörper, ein Anti-VEGF Antikörper, ein Anti-CD52 Antikörper, ein Anti-CD33 Antikörper, ein H2-Rezeptor-Agonist, Bacillus Calmette-Guerin; Thalidomid; Lenalidomid; ein Proteasom-Inhibitor; eine Kombination von Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison; eine Kombination von Cyclophosphamid, Hydroxydoxorubicin, Vincristin und Prednison; ein Cytokin; Interferon α; Interferon γ; 5-Fluor-Uracil; ein Antiretroviraler Wirkstoff; ein Tyrosinkinase-Inhibitor; und Decitabin.

54. Zusammensetzung gemäss Anspruch 53, wobei der H2-Rezeptor-Agonist Histamin ist, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von Histamin, wie Histamin-Dihydrochlorid.

55. Kit gemäss Anspruch 42, wobei der zweite pharmazeutische Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.

56. Kit gemäss Anspruch 55, wobei der Antikörper Antikörper-abhängige zelluläre Zelltoxizität (ADCC) aufweist.

57. Kit gemäss Anspruch 42, wobei der zweite pharmazeutische Wirkstoff aus der Gruppe gewählt wird, umfassend: ein Anti-CD20 Antikörper; ein Anti-CD40 Antikörper, ein Anti-Her2 Antikörper, ein Anti-EGFR Antikörper, ein Anti-VEGF Antikörper, ein Anti-CD52 Antikörper, ein Anti-CD33 Antikörper, ein H2-Rezeptor-Agonist, Bacillus Calmette-Guerin; Thalidomid; Lenalidomid; ein Proteasom-Inhibitor; eine Kombination von Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison; eine Kombination von Cyclophosphamid, Hydroxydoxorubicin, Vincristin und Prednison; ein Cytokin; Interferon α; Interferon γ; 5-Fluor-Uracil; ein Anti-retroviraler Wirkstoff; ein Tyrosinkinase-Inhibitor; und Decitabin.

58. Kit gemäss Anspruch 57, wobei der H2-Rezeptor-Agonist Histamin ist, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von Histamin, wie Histamin-Dihydrochlorid.

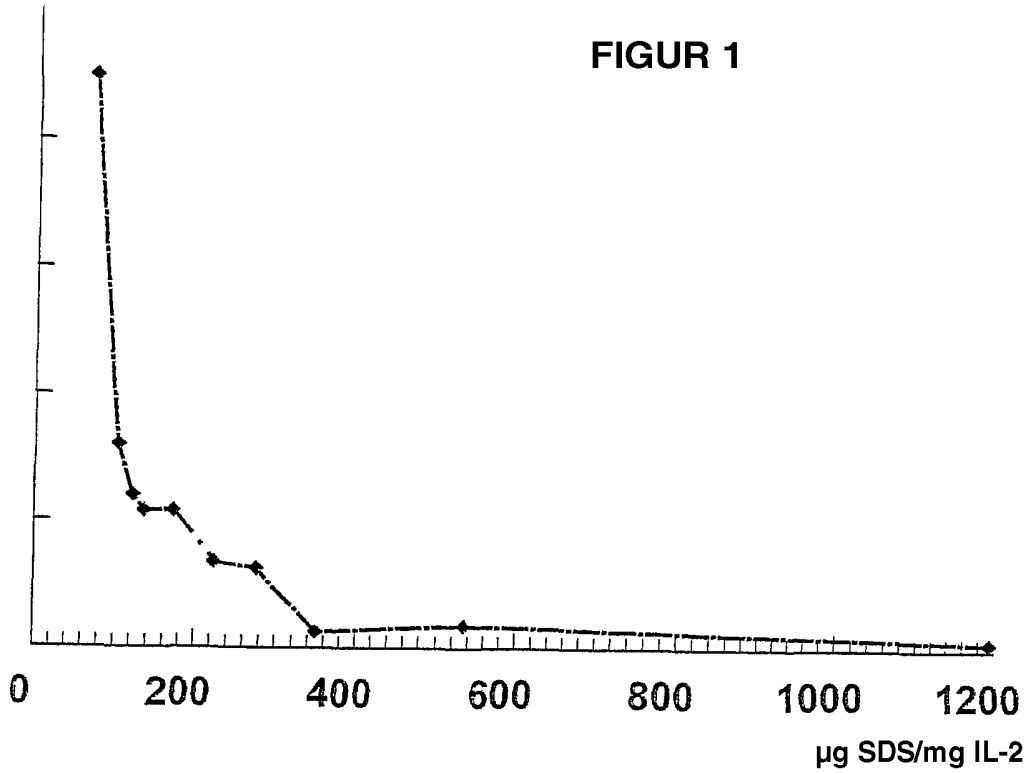
59. Verwendung irgendeines der Ansprüche 48 bis 50, wobei der zweite pharmazeutische Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.

60. Verwendung gemäss Anspruch 59, wobei der Antikörper Antikörper-abhängige zelluläre Zelltoxizität (ADCC) aufweist.

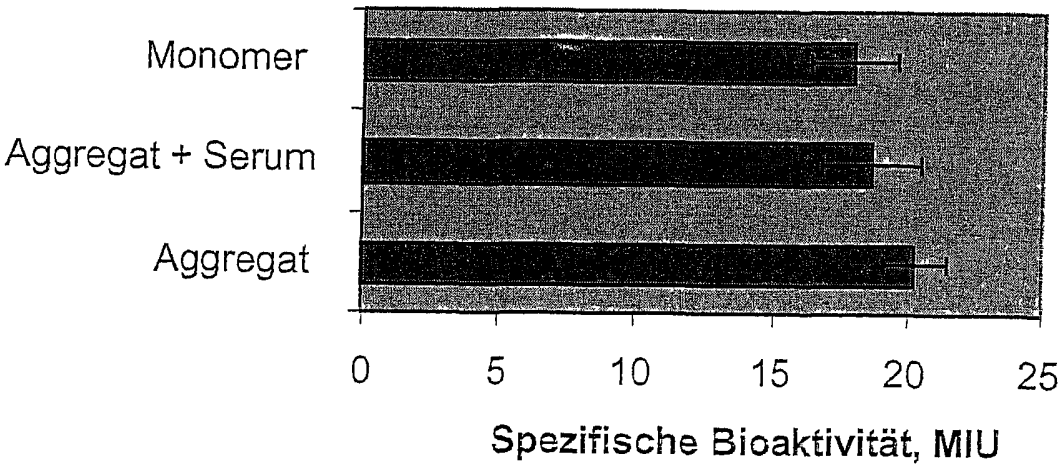
61. Verwendung irgendeines der Ansprüche 48 bis 50, wobei der zweite pharmazeutische Wirkstoff aus der Gruppe gewählt wird, umfassend: ein Anti-CD20 Antikörper; ein Anti-CD40 Antikörper, ein Anti-Her2 Antikörper, ein Anti-EGFR Antikörper, ein Anti-VEGF Antikörper, ein Anti-CD52 Antikörper, ein Anti-CD33 Antikörper, ein H2-Rezeptor-Agonist, Bacillus Calmette-Guerin; Thalidomid; Lenalidomid; ein Proteasom-Inhibitor; eine Komination von Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison; eine Kombination von Cyclophosphamid, Hydroxydoxorubicin, Vincristin und Prednison; ein Cytokin; Interferon α; Interferon γ; 5-Fluor-Uracil; ein Anti-retroviraler Wirkstoff; ein Tyrosinkinase-Inhibitor; und Decitabin.

62. Verwendung gemäss Anspruch 61, wobei der H2-Rezeptor-Agonist Histamin ist, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz von Histamin, wie Histamin-Dihydrochlorid.

FIGUR 1



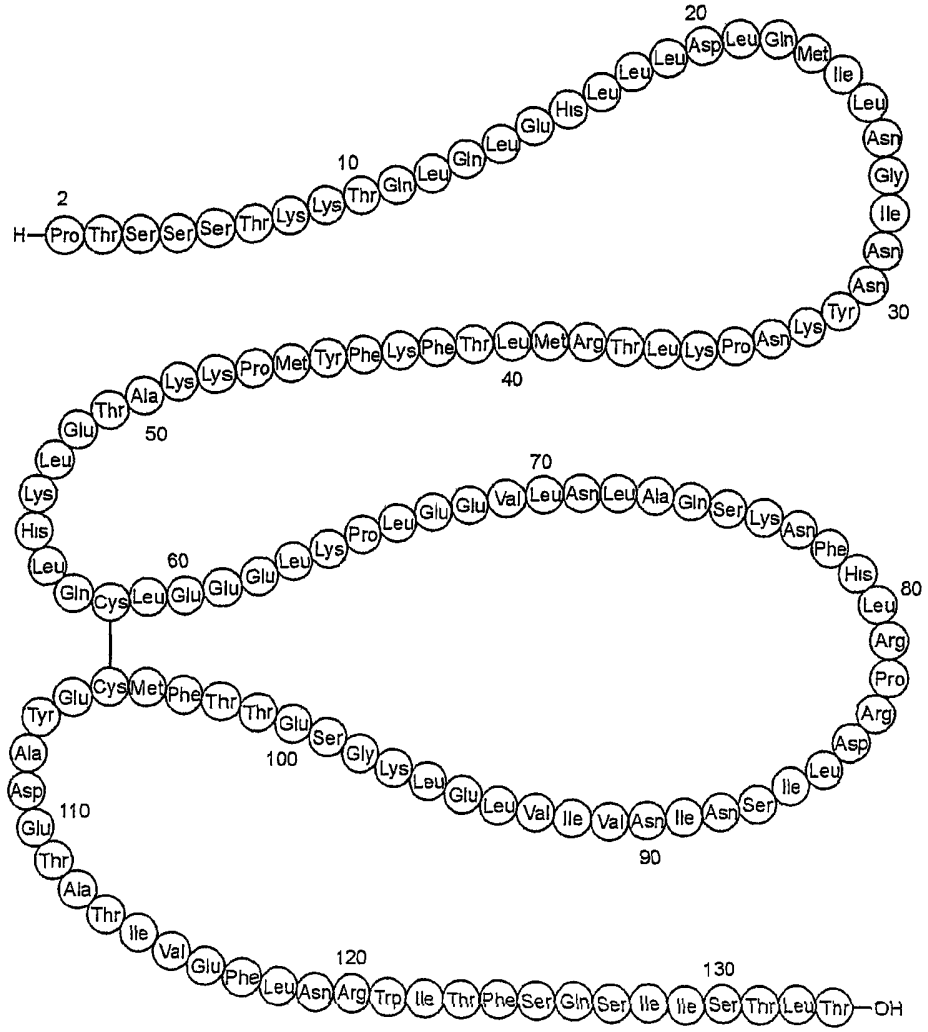
FIGUR 14



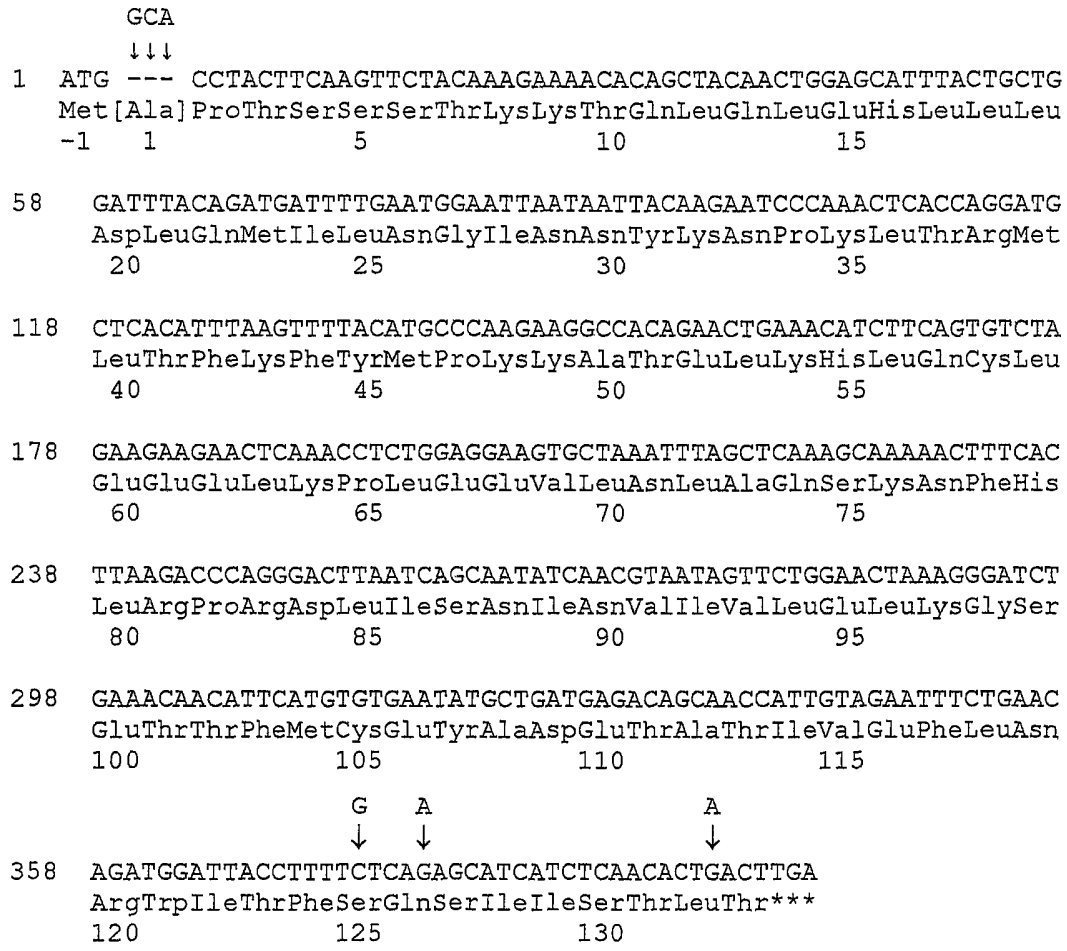
FIGUR 2

ProThrSerSerSerThrLysLysThrGlnLeuGlnLeuGlu
HisLeuLeuLeuAspLeuGlnMetIleLeuAsnGlyIleAsn
AsnTyrLysAsnProLysLeuThrArgMetLeuThrPheLys
PheTyrMetProLysLysAlaThrGluLeuLysHisLeuGln
CysLeuGluGluGluLeuLysProLeuGluGluValLeuAsn
LeuAlaGlnSerLysAsnPheHisLeuArgProArgAspLeu
IleSerAsnIleAsnValIleValLeuGluLeuLysGlySer
GluThrThrPheMetCysGluTyrAlaAspGluThrAlaThr
IleValGluPheLeuAsnArgTrpIleThrPheSerGlnSer
IleIleSerThrLeuThr

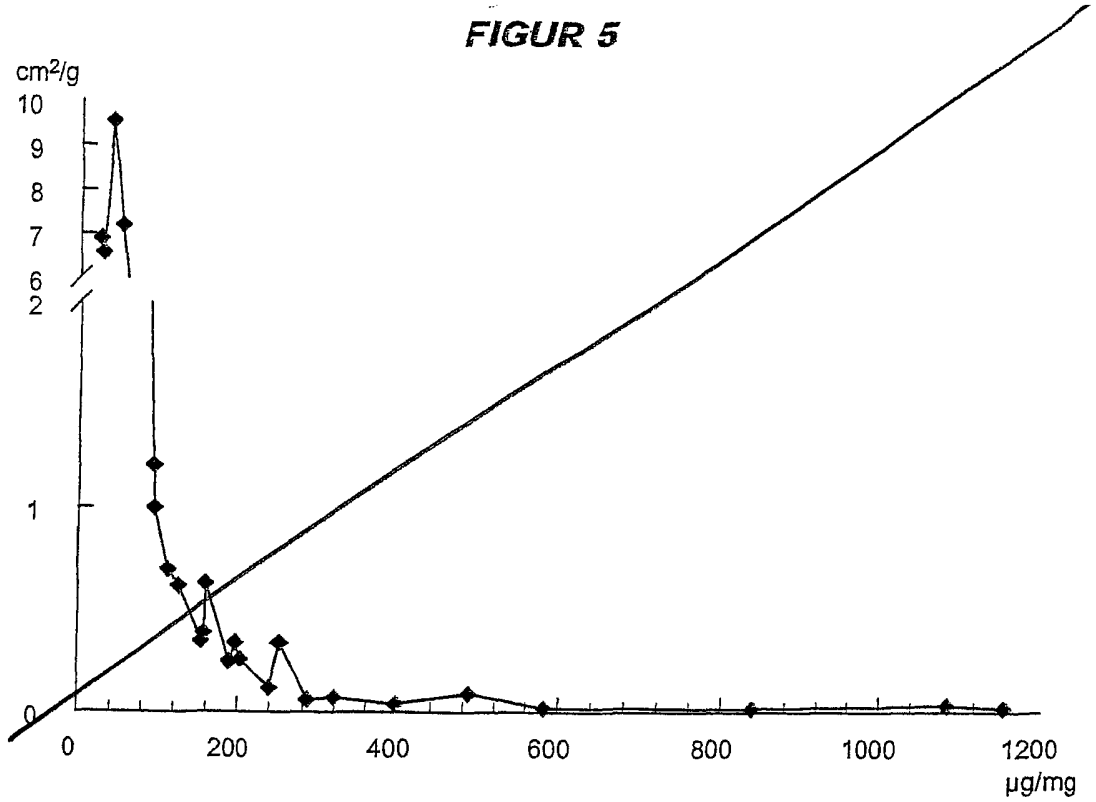
FIGUR 3

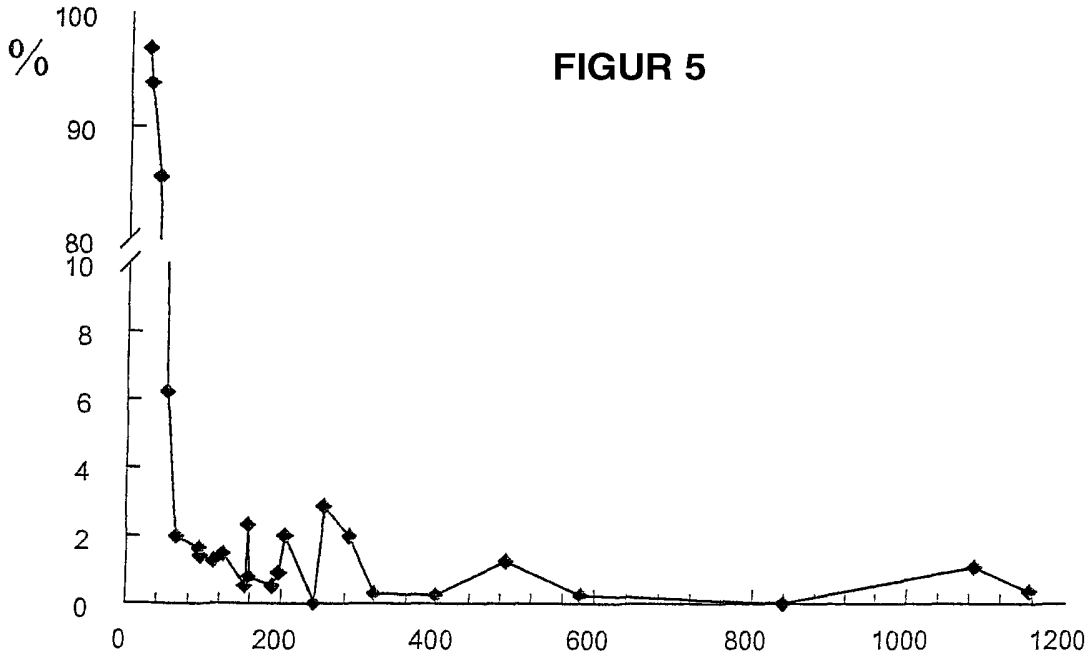


FIGUR 4


GCA
↓↓↓
1 ATG --- CCTACTTCAAGTTCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTG
Met[Ala]ProThrSerSerSerThrLysLysThrGlnLeuGlnLeuGluHisLeuLeuLeu
-1 1 5 10 15
58 GATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAATTACAAGAATCCCAAACTCACCAGGATG
AspLeuGlnMetIleLeuAsnGlyIleAsnAsnTyrLysAsnProLysLeuThrArgMet
20 25 30 35
118 CTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAACTGAAACATCTTCAGTGTCTA
LeuThrPheLysPheTyrMetProLysLysAlaThrGluLeuLysHisLeuGlnCysLeu
40 45 50 55
178 GAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACTTTCAC
GluGluGluLeuLysProLeuGluGluValLeuAsnLeuAlaGlnSerLysAsnPheHis
60 65 70 75
238 TTAAGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCT
LeuArgProArgAspLeuIleSerAsnIleAsnValIleValLeuGluLeuLysGlySer
80 85 90 95
298 GAAACAACATTCATGTGTGAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAAC
GluThrThrPheMetCysGluTyrAlaAspGluThrAlaThrIleValGluPheLeuAsn
100 105 110 115
G A A
↓ ↓ ↓
358 AGATGGATTACCTTTTCTCAGAGCATCATCTCAACACTGACTTGA
ArgTrpIleThrPheSerGlnSerIleIleSerThrLeuThr***
120 125 130

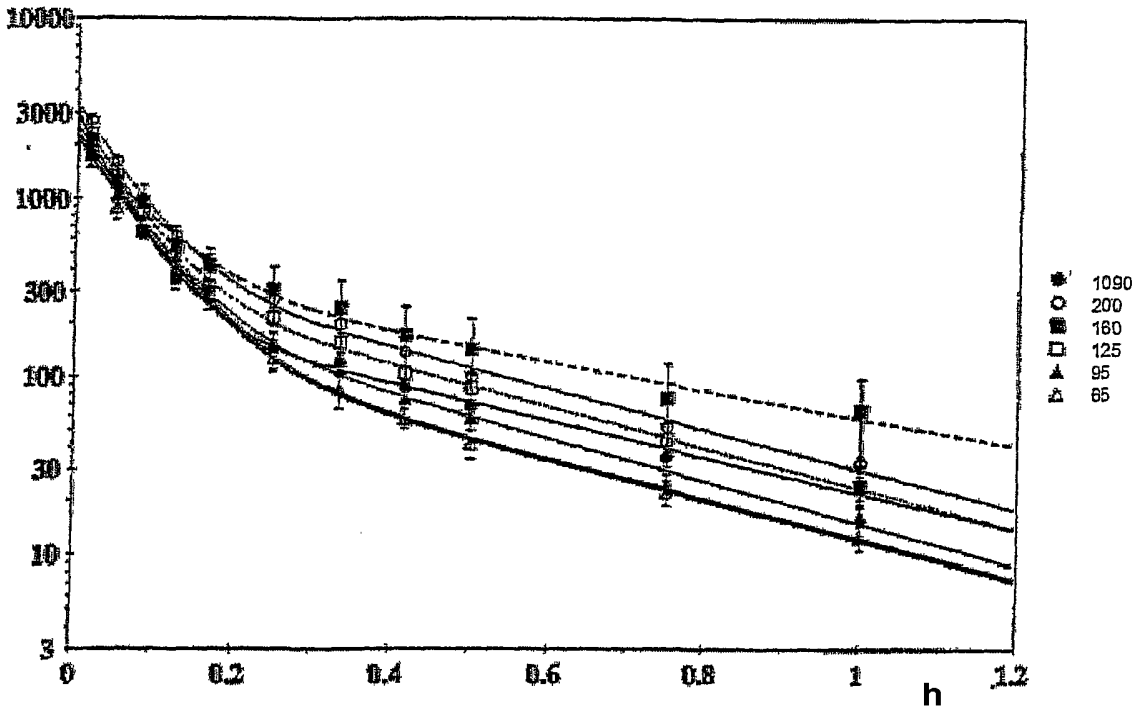
FIGUR 5



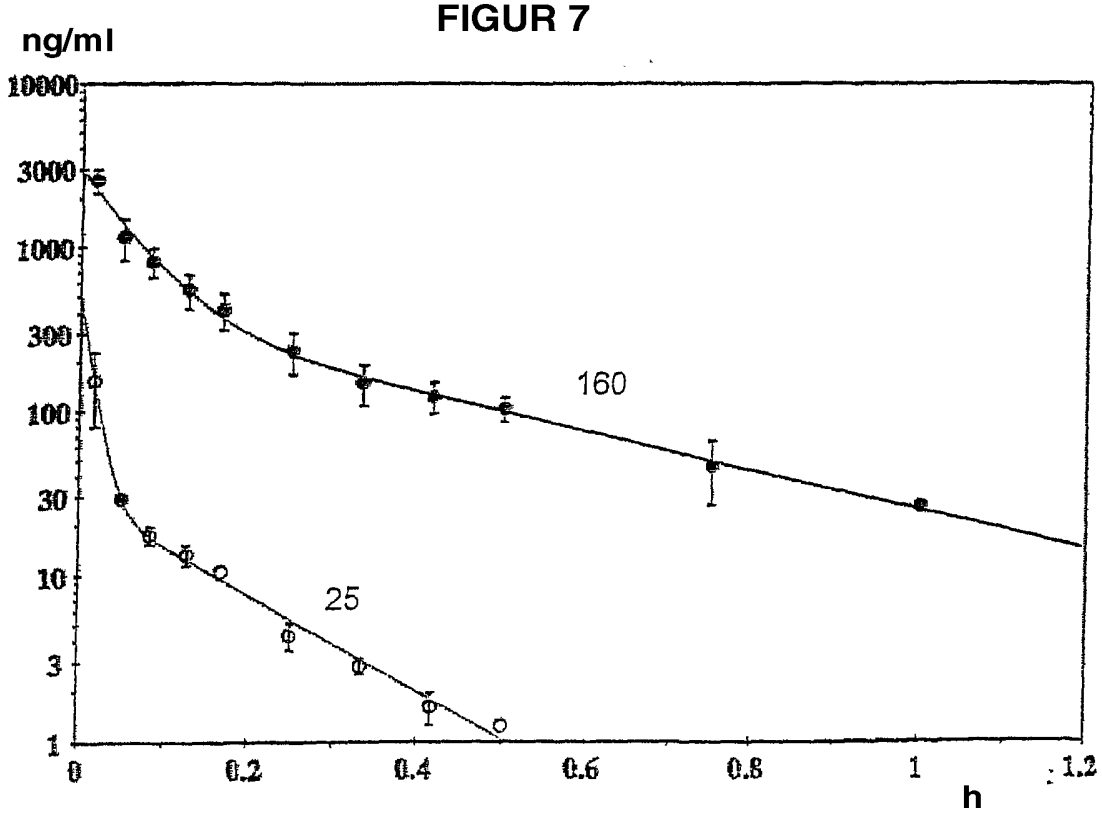


FIGUR 5

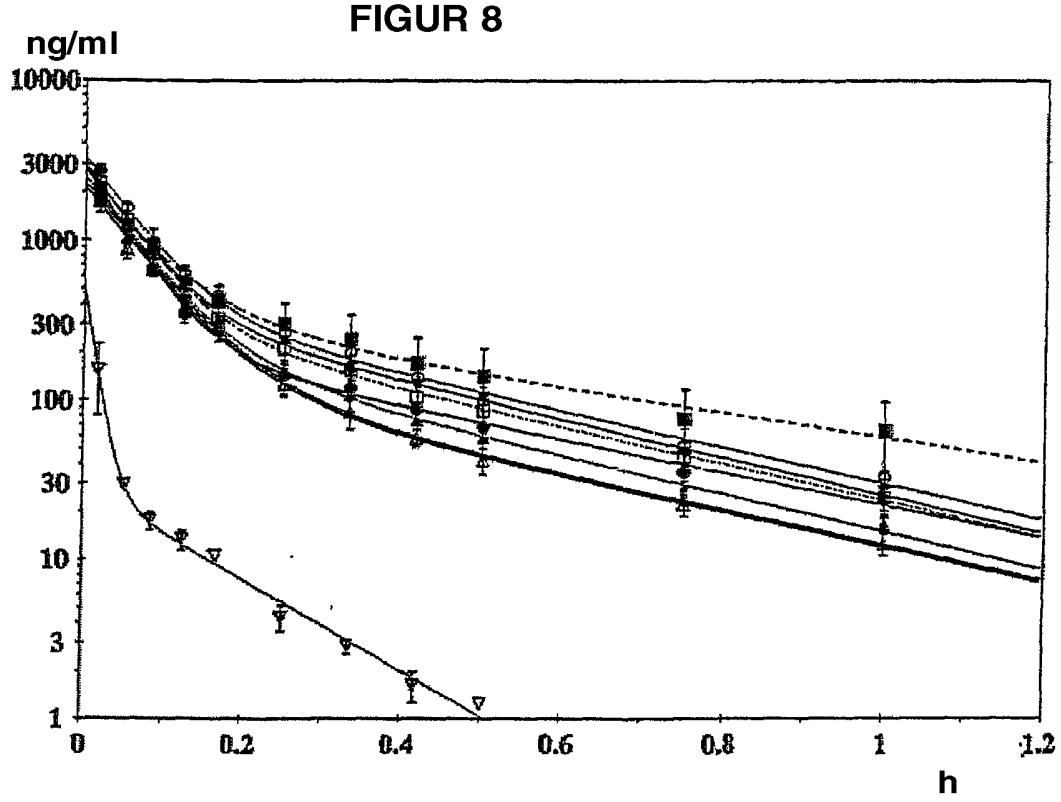
FIGUR 6



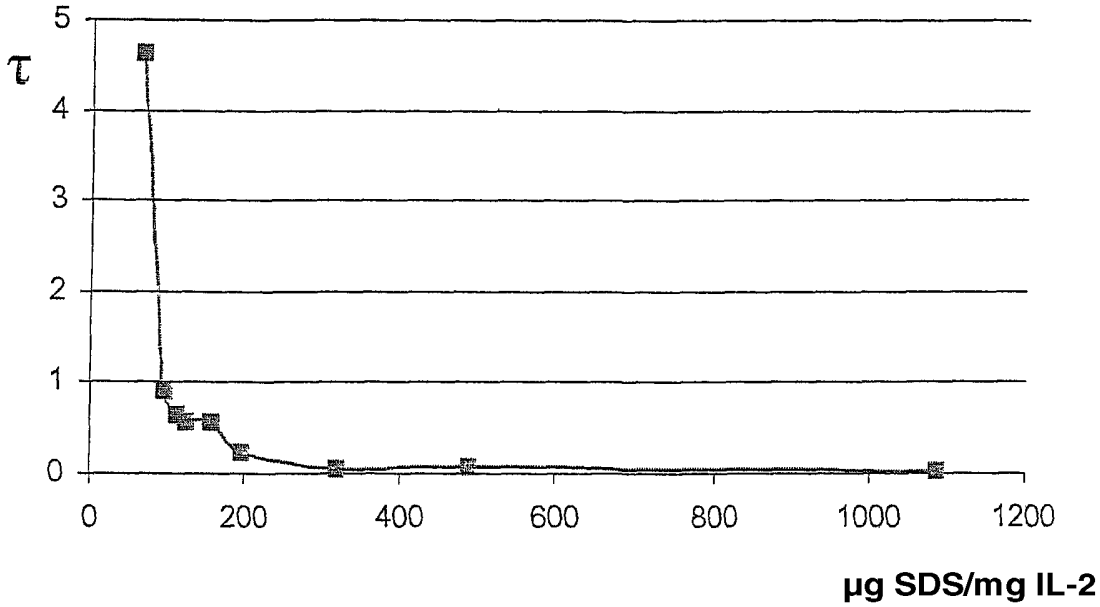
FIGUR 7



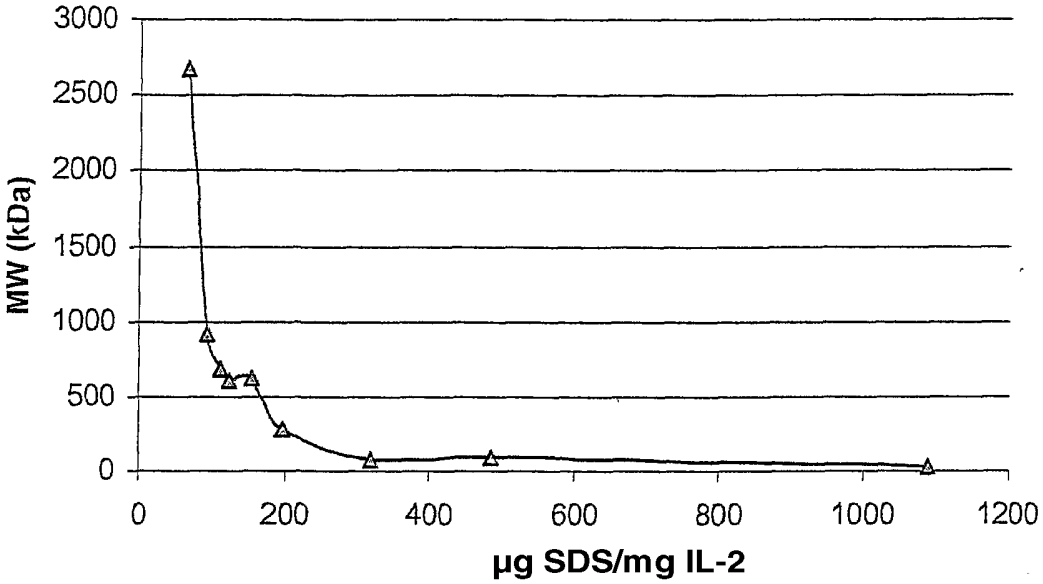
FIGUR 8



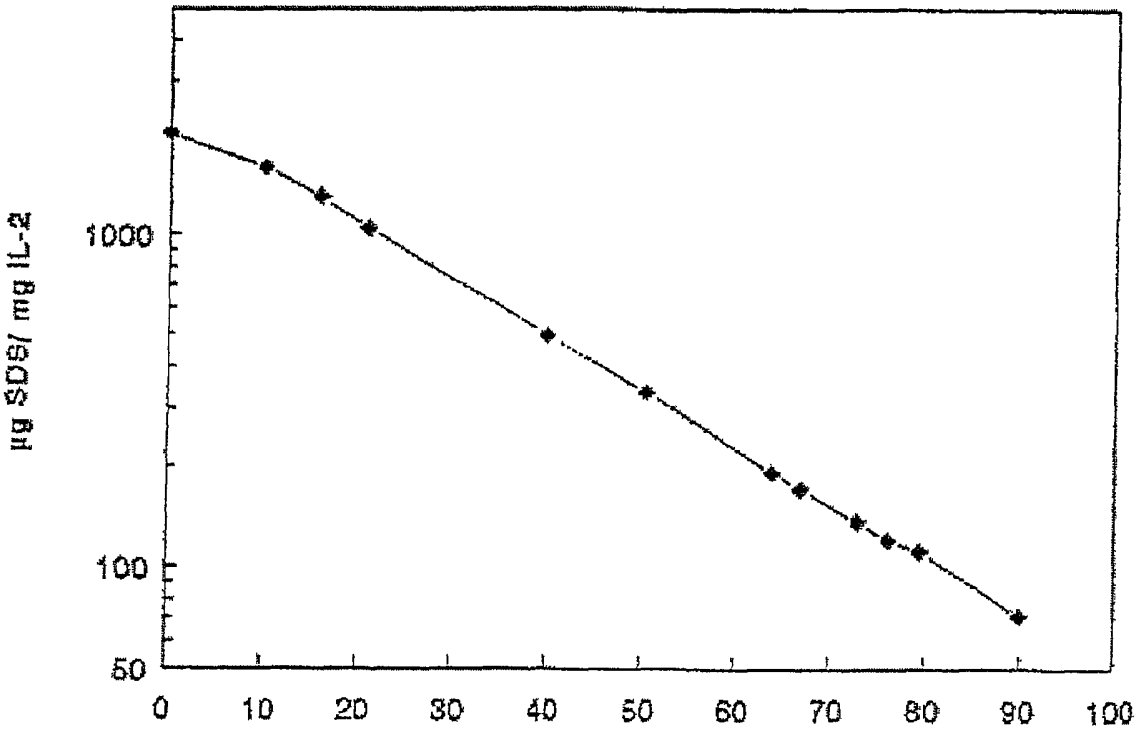
FIGUR 9



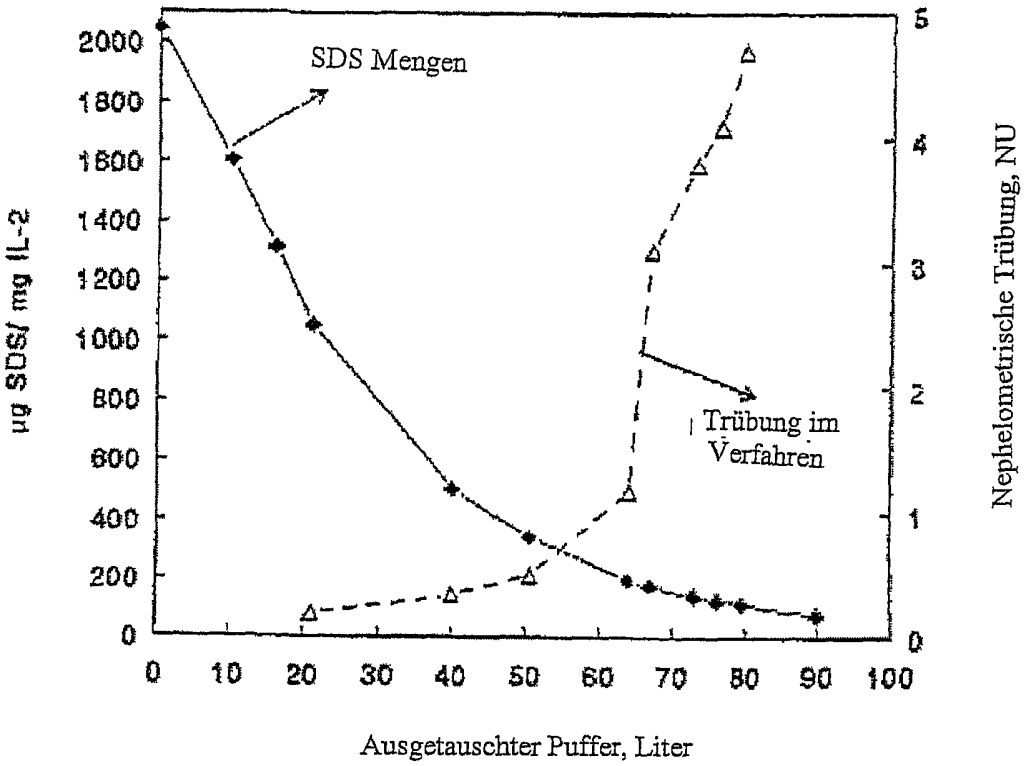
FIGUR 10



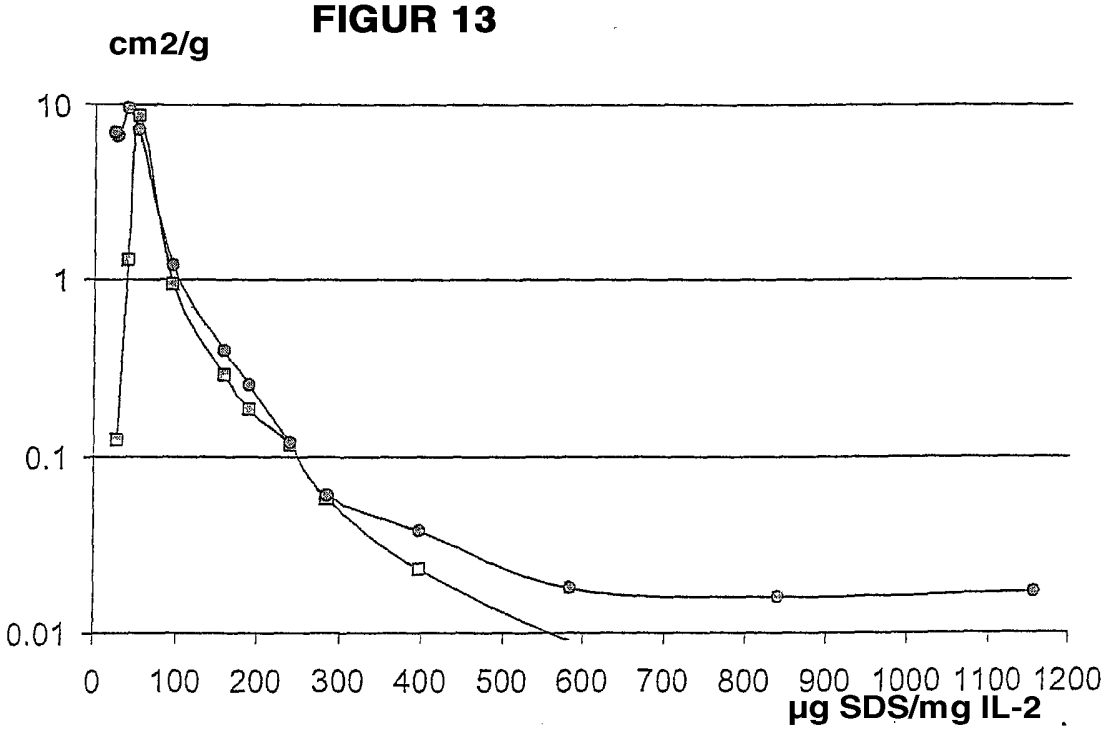
FIGUR 11



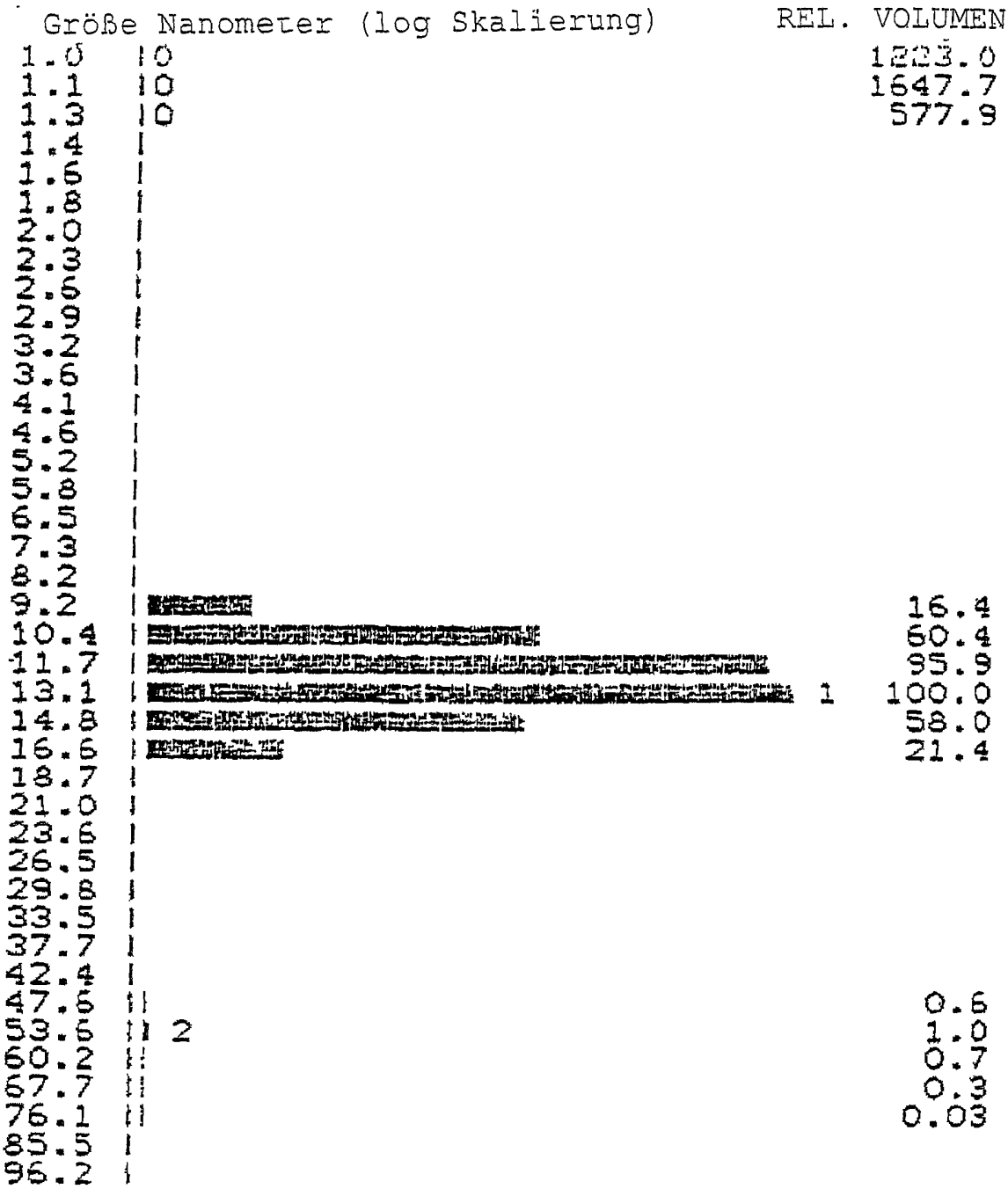
FIGUR 12



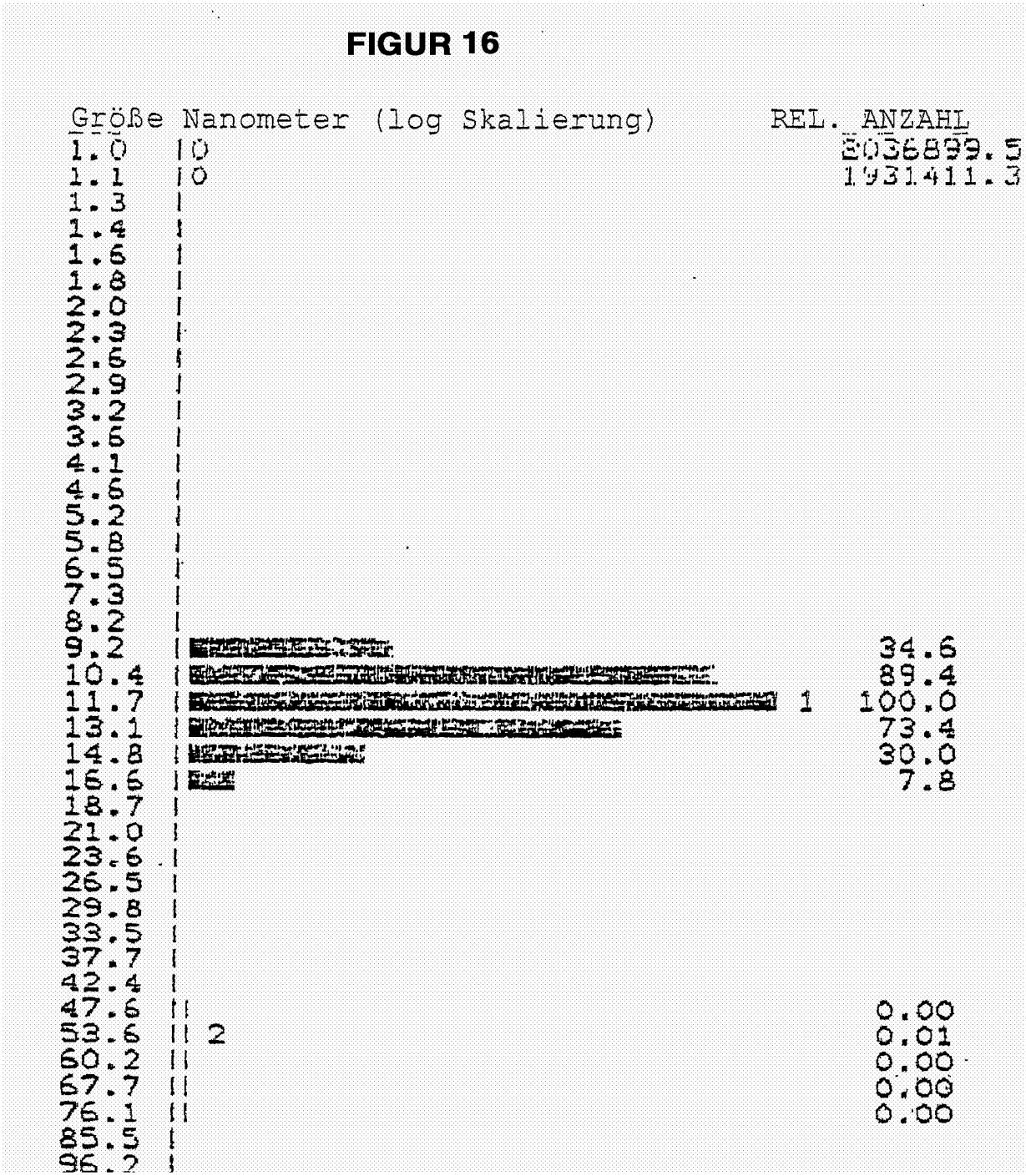
FIGUR 13



FIGUR 15


Größe Nanometer (log Skalierung)
REL. VOLUMEN
1.0
1.1
1.3
1.4
1.6
1.8
2.0
2.3
2.6
2.9
3.2
3.6
4.1
4.6
5.2
5.8
6.5
7.3
8.2
9.2
10.4
11.7
13.1
14.8
16.6
18.7
21.0
23.6
26.5
29.8
33.5
37.7
42.4
47.6
53.6
60.2
67.7
76.1
85.5
96.2
0
0
1
2
1223.0
1647.7
577.9
16.4
60.4
95.9
100.0
58.0
21.4
0.6
1.0
0.7
0.3
0.03

FIGUR 16


Größe Nanometer (log Skalierung)
REL. ANZAHL
1.0
1.1
1.3
1.4
1.6
1.8
2.0
2.3
2.6
2.9
3.2
3.6
4.1
4.6
5.2
5.8
6.5
7.3
8.2
9.2
10.4
11.7
13.1
14.8
16.6
18.7
21.0
23.6
26.5
29.8
33.5
37.7
42.4
47.6
53.6
60.2
67.7
76.1
85.5
96.2
0
0
2
1
8036899.5
1931411.3
34.6
89.4
100.0
73.4
30.0
7.8
0.00
0.01
0.00
0.00
0.00