



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007132125/14, 27.01.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.01.2006(30) Конвенционный приоритет:
27.01.2005 US 60/647,496

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2009

(45) Опубликовано: 27.11.2010 Бюл. № 33

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SLEIJFER D.T. et al. Phase II study of subcutaneous interleukin-2 in unselected patients with advanced., J Clin Oncol, 1992; 10: 1119-1123. WO 2004002526 A1, 08.01.2004. AMATO R.J., SCHELL J. et al: Phase II study of thalidomide+interleukin-2 (IL-2) in patients with metastatic renal cell carcinoma (MRCC). Proc ASCO 22:387, (abstr #1556), 2003. VERRA (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 27.08.2007

(86) Заявка РСТ:
US 2006/003116 (27.01.2006)(87) Публикация РСТ:
WO 2006/081510 (03.08.2006)

Адрес для переписки:
105064, Москва, а/я 88, "Патентные поверенные Квашнин, Сапельников и партнеры", пат.пов. В.П.Квашнину, рег.№ 4

(72) Автор(ы):

ЭЛИАС Лоренс (US),
ВАЙТРЕЛЛ Гэри (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОВАРТИС ВЭКСИНС ЭНД
ДИАГНОСТИКС ИНК. (US)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, в частности к способу лечения и к способам лечения метастатической почечноклеточной карциномы у пациентов с нарушенной функцией почек и/или не переносящих терапию высокими дозами IL-2. Раскрыты в настоящем изобретении

терапевтические схемы позволяют значительно ингибировать опухолевый рост при пониженной токсичности и ослабленных нежелательных побочных эффектах по сравнению с терапией высокими дозами IL-2. Человеку, страдающему почечноклеточной карциномой, проводят: а) во-первых, введение суточной дозы, составляющей 18 ММЕ

мутеина IL-2, в течение 5 суток на протяжении одной недели; б) во-вторых, введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ мутеина IL-2, в течение 2 суток, с последующим введением суточной дозы, составляющей 18 ММЕ мутеина IL-2, в течение 3 суток каждой недели, повторяемые в течение 5 недель; с) в-третьих,

отсутствие введения мутеина IL-2 в течение 3 недель; д) в-четвертых, введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ мутеина IL-2, в течение 5 суток каждой недели, повторяемое в течение 6 недель; и е) в-пятых, отсутствие введения мутеина IL-2, в течение 3 недель. 2 н. и 23 з.п. ф-лы, 5 ил., 9 табл.

(56) (продолжение):

N. et al. Immunotherapy with concurrent subcutaneous GM-CSF, low-dose IL-2 and IFN- α in patients with progressive metastatic renal cell carcinoma., Br J Cancer. 2003 May 6; 88(9): 1346-1351. RU 2174409 C2, 10.10.2001.

R U 2 4 0 4 7 9 5 C 2

R U 2 4 0 4 7 9 5 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
A61K 38/20 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2007132125/14, 27.01.2006**
 (24) Effective date for property rights:
27.01.2006
 (30) Priority:
27.01.2005 US 60/647,496
 (43) Application published: **10.03.2009**
 (45) Date of publication: **27.11.2010 Bull. 33**
 (85) Commencement of national phase: **27.08.2007**
 (86) PCT application:
US 2006/003116 (27.01.2006)
 (87) PCT publication:
WO 2006/081510 (03.08.2006)

Mail address:
**105064, Moskva, a/ja 88, "Patentnye poverennye
Kvashnin, Sapel'nikov i partnery", pat.pov.
V.P.Kvashninu, reg.№ 4**

(72) Inventor(s):
**EhLIAS Lorens (US),
VAJTRELL Gehri (US)**
 (73) Proprietor(s):
**NOVARTIS VEhKSINS EhND DIAGNOSTIKS
INK. (US)**

(54) METHODS FOR TREATMENT OF RENAL CELL CARCINOMA

(57) Abstract:
FIELD: medicine.
SUBSTANCE: invention relates to the field of medicine, in particular to method of treatment with methods of treatment of metastatical renal cell carcinoma in patients with renal malfunction and/or intolerance of therapy with high doses of IL-2. The following procedures are administered to an individual suffering renal cell carcinoma: a) first, introduction of daily dose, making 18 MME of mutein IL-2, for 5 days during one week; b) second, introduction of daily dose making 9 MME of mutein IL-2 for 2 days, with successive introduction of

daily dose making 18 MME of mutein IL-2, for 3 days of each week, repeated for 5 weeks; c) third, pause in introduction of mutein IL-2 for 3 weeks; d) fourth, introduction of daily dose making 9 MME of mutein IL-2, for 5 days of each week, repeated for 6 weeks; and e) fifth, pause in introduction of mutein IL-2, for 3 weeks.

EFFECT: therapeutical schemes disclosed in the present application make it possible to considerably inhibit tumor growth at low toxicity and mitigated undesirable side effects compared to therapy with high doses of IL-2.

25 cl, 5 dwg, 9 tbl

RU 2 404 795 C2

RU 2 404 795 C2

Область техники настоящего изобретения

Настоящее изобретение в основном относится к способам лечения почечноклеточной карциномы с помощью ИЛ-2. В частности, изобретение относится к способам лечения почечноклеточной карциномы у пациентов с нарушенной функцией почек или не переносящих терапию высокими дозами ИЛ-2.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) является мощным стимулятором пролиферации и функции натуральных киллеров (НК) и Т-лимфоцитов (Morgan et al. (1976) Science 193:1007-1011).

Было показано, что этот природный лимфокин обладает противоопухолевой активностью в отношении различных злокачественных новообразований как сам по себе, так и в сочетании с лимфокин-активированными киллерными (ЛАК) клетками или инфильтрующими опухоль лимфоцитами (ТИЛ) (см., например, Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. (1987) 316:889-897; Rosenberg, *Aim. Surg.* (1988) 208:121-135; Topalian et al., J. Clin. Oncol. (1988) 6:839-853; Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. (1988) 319:1676-1680; и Weber et al., J. Clin. Oncol. (1992) 10:33-40). Противоопухолевая активность ИЛ-2 была наилучшим образом описана у больных метастатической меланомой и почечноклеточной карциномой, получавших Proleukin®, коммерчески доступный состав на основе ИЛ-2 производства Chiron Corporation, Emeryville, CA. Оказалось, что другие заболевания, включая лимфому, также реагируют на лечение ИЛ-2 (Gisselbrecht et al., Blood (1994) 83:2020-2022). Однако высокие дозы ИЛ-2, используемые для достижения положительных терапевтических результатов, касающихся опухолевого роста, зачастую вызывают тяжелые побочные эффекты, включая лихорадку и озноб, гипотензию и повышение проницаемости капилляров (синдром повышенной проницаемости капилляров, или VLS) и неврологические изменения (см., например, Duggan et al., J. Immunotherapy (1992) 12:115-122; Gisselbrecht et al., Blood (1994) 83:2081-2085; и Sznol and Parkinson, Blood (1994) 83:2020-2022). Метастатическая почечноклеточная карцинома (RCC), как правило, резистентна к химиотерапии как отдельными средствами, так и сочетанием множества средств. Большой успех наблюдался при использовании иммунотерапии, особенно при использовании ИЛ-2. Внутривенная терапия высокими дозами ИЛ-2 приводила к объективным опухолевым ответам приблизительно у 15% пациентов, причем некоторые из них характеризовались большой продолжительностью. Однако введение ИЛ-2 в высоких дозах сопряжено с развитием синдрома повышенной проницаемости капилляров, что приводит к гипотензии и сниженному кровоснабжению органов, что может иметь тяжелые, а иногда фатальные, последствия. Такие уровни токсичности, как правило, ограничивали весьма выборочной группой пациентов применение ИЛ-2, вводимого врачами, обладающими значительным опытом его применения. В попытке разработки более широко применимого способа терапии этого заболевания были проведены исследования использования схем введения более низких доз и подкожного введения одного ИЛ-2 или его сочетаний с другими биологическими агентами, такими как α -интерферон (см., например, Nieken et al., Cancer Biother. Radiopharm. (1996) 11:289-295; Sleijfer et al., J. Clin. Oncol. (1992) 10:1119-1123; Lessoni et al., Anticancer Res. (2002) 22:1061-1-1064; Tourani et al., J. Clin. Oncol. (1998) 16:2505; и Schiller et al. Cancer Res. (1993) 53:1286-1292).

Остается потребность в усовершенствованном терапевтическом способе для лечения больных почечноклеточной карциномой, который способствовал бы снижению токсичности и повышению терапевтической эффективности.

Краткое изложение сущности настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к эффективному способу лечения почечноклеточной карциномы с помощью IL-2. Для снижения токсичности способ предусматривает использование относительно низкой дозы IL-2 по сравнению с дозами, ранее использовавшимися при терапии высокими дозами IL-2. Как показано в
5 приведенных в настоящем описании примерах, такая терапевтическая схема позволяет значительно ингибировать опухолевый рост при ослабленных нежелательных побочных эффектах и обеспечивает альтернативное лечение для пациентов, не способных переносить терапию высокими дозами IL-2.

В одном аспекте изобретение относится к способу лечения человека, больного почечноклеточной карциномой. В некоторых вариантах выполнения функция почек пациента нарушена. В некоторых вариантах выполнения почечноклеточная карцинома является метастатической. В некоторых вариантах выполнения пациент не
10 переносит лечение высокими дозами IL-2.

В одном варианте выполнения способ предусматривает а) введение суточной дозы, составляющей 1-52 ММЕ IL-2, 1-3 дозами в сутки в течение 3-6 суток в неделю, повторяемое в течение 1-24 недель; и б) отсутствие введения IL-2 в течение 1-4 недель.

В другом варианте выполнения способ предусматривает а) введение дозы, составляющей 1-52 ММЕ IL-2 через каждые 5 суток - 1 месяц, повторяемое в течение 1-
20 24 недель, причем IL-2 ковалентно конъюгирован с полиэтиленгликолем или с полиоксиэтилированным многоатомным спиртом; и б) отсутствие введения IL-2 в течение 1-4 недель.

В другом варианте выполнения способ предусматривает а) введение суточной дозы, составляющей 9-18 ММЕ IL-2, 1-3 дозами в сутки в течение 3-6 суток в неделю, повторяемое в течение 1-24 недель; б) отсутствие введения IL-2 в течение 1-4 недель; с)
25 введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ IL-2, 1-3 дозами в сутки в течение 3-6 суток в неделю, повторяемое в течение 1-24 недель; и d) отсутствие введения IL-2 в течение 1-4 недель.

В другом варианте выполнения способ предусматривает а) во-первых, введение суточной дозы, составляющей 18 ММЕ IL-2, в течение 5 суток на протяжении одной недели; б) во-вторых, введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ IL-2, в течение 2
30 суток с последующим введением суточной дозы, составляющей 18 ММЕ IL-2, в течение 3 суток каждой недели, повторяемые в течение 5 недель; с) в-третьих, отсутствие введения IL-2 в течение 3 недель; d) в-четвертых, введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ IL-2, в течение 5 суток каждой недели, повторяемое в течение 6 недель; и е) в-пятых, отсутствие введения IL-2 в течение 3 недель.

В каждом из раскрытых в настоящем описании способов IL-2 может представлять собой рекомбинантно продуцированный IL-2. IL-2 может включать в себя человеческий IL-2 или его варианты, содержащие последовательность, характеризующуюся, по меньшей мере, 70-100%-ной идентичностью последовательности с последовательностью человеческого IL-2 (SEQ ID NO: 1),
45 включая любой процент идентичности в пределах этих диапазонов, такой как 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% идентичность последовательности с ним. В некоторых вариантах выполнения IL-2 представляет собой мутеин IL-2, например, без ограничения, Ala₁₀₄ Ser₁₂₅ IL-2; дез-Ala₁ дез-Pro₂ дез-Thr₃ дез-Ser₄ Ala₁₀₄, Ser₁₂₅ IL-2; и дез-Ala₁ дез-Pro₂ дез-Thr₃ дез-Ser₄ дез-Ser₅ дез-Ser₆ IL-2. В предпочтительном варианте выполнения мутеин IL-2 представляет собой дез-аланил-1, серин-125 человеческий интерлейкин-2 (алдезлейкин).

В некоторых вариантах выполнения II-2 конъюгирован с полиэтиленгликолем. Типичные полиэтиленгликоли включают в себя без ограничения полиэтиленгликоль, характеризующийся средней молекулярной массой от 1000 до 40000 Дальтон, полиэтиленгликоль, характеризующийся средней молекулярной массой от 2000 до 20000 Дальтон, и полиэтиленгликоль, характеризующийся средней молекулярной массой от 3000 до 12000 Дальтон.

В некоторых вариантах выполнения II-2 ковалентно конъюгирован с полиоксиэтилированным многоатомным спиртом. Типичные полиоксиэтилированные многоатомные спирты включают в себя без ограничения полиоксиэтилированный сорбит, полиоксиэтилированную глюкозу и полиоксиэтилированный глицерин. В некоторых вариантах выполнения полиоксиэтилированный многоатомный спирт представляет собой полиоксиэтилированный глицерин, характеризующийся средней молекулярной массой от 1000 до 40000 Дальтон.

В соответствии с каждым из раскрытых в настоящем описании способов у субъекта может быть проведено множество циклов лечения в течение периода времени, достаточного для достижения, по меньшей мере, частичного опухолевого ответа. В некоторых вариантах выполнения период времени составляет, по меньшей мере, 6 месяцев. В некоторых вариантах выполнения период времени составляет, по меньшей мере, 12 месяцев. В некоторых вариантах выполнения период времени достаточен для достижения полного опухолевого ответа.

В некоторых вариантах выполнения способ лечения дополнительно предусматривает проведение множества циклов лечения, состоящих из а) введения суточной дозы, составляющей 9 ММЕ II-2, 1-3 дозами в сутки в течение 3-6 суток в неделю, повторяемое в течение 1-24 недель; и б) отсутствия введения II-2 в течение 1-4 недель; проводимых у указанного субъекта в течение периода времени, достаточного для достижения, по меньшей мере, частичного опухолевого ответа.

В соответствии с каждым из раскрытых в настоящем описании способов II-2 может быть введен путем подкожного, внутривенного, внутримышечного, перорального, легочного, назального, местного или чрескожного введения или введения с помощью инфузии или суппозитория. В предпочтительном варианте выполнения II-2 вводят подкожно.

Эти и другие варианты выполнения настоящего изобретения будут вполне очевидны специалистам в данной области техники ввиду приведенного в настоящем описании раскрытия.

Краткое описание чертежей

На фиг.1 приведено сравнение относительной эффективности низких доз II-2 у больных метастатической почечноклеточной карциномой, характеризующихся нормальной (содержание креатинина в сыворотке ($SCr \leq 1,5$ мг/дл) и нарушенной функцией почек ($SCr > 1,5$ мг/дл), после использования схемы введения, описанной в примере 3. На фиг.1 приведен график процентной доли субъектов, отображающий выживаемость без прогрессии (PFS) по времени в годах и график процентной доли выживших субъектов по времени в годах.

На фиг.2 приведена столбчатая диаграмма, отражающая общие уровни ответа у больных метастатической почечноклеточной карциномой, характеризующихся нормальной (содержание креатинина в сыворотке ($SCr \leq 1,5$ мг/дл) и нарушенной функцией почек ($SCr > 1,5$ мг/дл), получавших лечение низкими дозами II-2, после использования схемы введения, описанной в примере 3. Процентная доля субъектов, у которых наблюдался полный ответ (CR), показана светлой заливкой. Процентная

доля субъектов, у которых наблюдался частичный ответ (PR), показана темной заливкой.

На фиг.3 приведено сравнение характеристик пациентов (PS, до удаления почки) из популяции, получавшей лечение низкими дозами IL-2 в ходе описанного здесь клинического испытания фазы IV, с ранее описанными контрольными группами. См. Pyrhonen et al. (1999) J. Clin. Oncol. 17:2859-2867; Motzer et al. (1999) J. Clin. Oncol. 17: 2530-40; Ritchie et al. (1999) Lancet 353:14-17; Kriegmair et al. (1995) Urology 45:758-762; Jones et al. (1993) Cancer Biother. 8:275-288; Gleave et al. (1998) New Engl. J. Med. 338:1265-1271; Steineck et al. (1990) Acta Oncol. 29:155-162; и Osband et al. (1990) Lancet 335:994-998 для ознакомления с ранее описанными контрольными группами больных почечноклеточной карциномой, участвовавшими в клинических исследованиях.

На фиг.4 приведено сравнение исходов у пациентов (ORR, PFS, OS через 1 год, OS через 2 года) из популяции, получавшей лечение низкими дозами IL-2 в ходе описанного здесь клинического испытания фазы IV, с ранее описанными контрольными группами.

На фиг.5 приведено сравнение уровня выживаемости пациентов, получавших лечение низкими дозами IL-2, после использования схемы введения, описанной в примере 3, с таковым ранее описанной контрольной группы пациентов, получавших химиотерапию вместо IL-2 (Jones et al. (1993) J. Clin. Oncol. 12:2714-2722). Пациентов подразделяли на группы риска в соответствии с системой стратификации по факторам риска по Jones следующим образом: низкий риск (0-1 факторов риска), умеренный риск (2 фактора риска) и неблагоприятный прогноз (все 3 фактора риска). На фиг.5 приведены раздельные графики процентной доли выживших субъектов по времени в годах для каждой из групп риска. Данные для субъектов, получавших низкие дозы IL-2, показаны сплошной линией. Данные для субъектов, получавших химиотерапию, показаны пунктирной линией.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Если иное не указано особо, осуществление настоящего изобретения будет предусматривать использование стандартных методов фармакологии, химии, биохимии, методов рекомбинантных ДНК и иммунологии в пределах предшествующего уровня техники. Такие методики досконально описаны в литературе. См., например, Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell eds., Blackwell Scientific Publications); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.).

Все процитированные выше или ниже в настоящем описании публикации, патенты и заявки на выдачу патента включены в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки.

I. Определения

При описании настоящего изобретения использованы следующие термины в указанных ниже значениях.

Следует отметить, что использованные в настоящем описании и в приложенной формуле изобретения артикли единственного числа "a", "an" и "the" включают в себя и соответствующие объекты во множественном числе, если только иное очевидно не следует из контекста. Так, например, ссылка на "химиотерапевтическое средство" относится и к смеси двух или более таких средств и т.п.

Используемый здесь термин "IL-2" представляет собой белок, полученный из

лимфокина, продуцируемого нормальными лимфоцитами периферической крови, и присутствует в организме в низких концентрациях. IL-2 был впервые описан в Morgan et al. (1976) Science 193:1007-1008 и первоначально назван фактором роста Т-лимфоцитов благодаря своей способности индуцировать пролиферацию стимулированных Т-лимфоцитов. Он представляет собой белок с опубликованной молекулярной массой в диапазоне от 13000 до 17000 Дальтон (Gillis and Watson (1980) J. Exp. Med. 159:1709) и характеризуется изоэлектрической точкой в диапазоне 6-8,5. Под определение подпадают как полноразмерные белки IL-2, так и их биологически активные фрагменты. Термин также охватывает постэкспрессионные модификации IL-2, например формы, претерпевшие гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. Кроме того, для целей настоящего изобретения термин "IL-2" относится к белку, содержащему модификации нативной последовательности, такие как делеции, добавления и замены (как правило, консервативные по своей природе), при условии, что белок сохраняет биологическую активность, т.е. противоопухолевую активность. Эти модификации могут быть произвольными, такими как вызванные сайт-направленным мутагенезом, или могут быть случайными, такими как вызванные мутациями у хозяев, продуцирующих белки, или ошибками при PCR-амплификации.

Термин "полученный из" используется в настоящем описании для идентификации исходного источника молекулы, но он не должен пониматься как ограничивающий способ получения молекулы, который может осуществлен, например, с помощью химического синтеза или с использованием рекомбинантных методов. Термины "вариант", "аналог" и "мутеин" относятся к биологически активным производным исходной молекулы, сохраняющим желаемую активность, такую как раскрытая в настоящем описании противоопухолевая активность при лечении почечноклеточной карциномы. Как правило, термины "вариант" и "аналог" относятся к соединениям, характеризующимся нативной полипептидной последовательностью и структурой с одним или несколькими аминокислотными добавлениями, заменами (как правило, консервативными по своей природе) и/или делециями относительно нативной молекулы при условии, что модификации не нарушают биологическую активность, и являющимся "по существу гомологичными" по отношению к исходной молекуле, как определено ниже. Как правило, аминокислотные последовательности таких аналогов характеризуются высокой степенью гомологии последовательности по отношению к исходной последовательности, например гомологией аминокислотной последовательности, составляющей более 50%, как правило, более 60%-70%, еще более предпочтительно, 80%-85% или более, например по меньшей мере, 90%-95% или более по данным выравнивания двух последовательностей. Зачастую, аналоги включают в себя такое же количество аминокислот, но содержат замены, определенные в настоящем описании. Термин "мутеин" дополнительно относится к полипептидам, содержащим одну или несколько подобных аминокислотам молекул, включая без ограничения соединения, содержащие только amino- и/или иминомолекулы, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), полипептиды с замещенными связями, равно как и другие известные из предшествующего уровня техники модификации, как природные, так и неприродные (например, синтетические), циклизированные, разветвленные молекулы и т.п. Термин также охватывает молекулы, содержащие один или несколько N-замещенных глициновых остатков ("пептоиды"), и другие синтетические аминокислоты или пептиды (для ознакомления с описаниями пептоидов см., например, патенты США №№5,831,005; 5,877,278; и 5,977,301; Nguyen et al., Chem.

Biol. (2000) 7:463-473; и Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89:9367-9371).

Предпочтительно, аналог или мутеин обладают, по меньшей мере, такой же противоопухолевой активностью, как и нативная молекула. Способы получения аналогов и мутеинов полипептидов известны из предшествующего уровня техники и более подробно описаны ниже.

Как указано выше, аналоги, как правило, содержат замены, которые по своей природе являются консервативными, т.е. замены, происходящие в пределах семейства аминокислот, сходных по строению боковой цепи. Конкретнее, аминокислоты, как правило, подразделяются на четыре семейства: (1) кислые - аспартат и глутамат; (2) основные - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан; и (4) незаряженные полярные - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин.

Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда классифицируют как ароматические аминокислоты. Например, разумно предположить, что отдельная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичная консервативная замена аминокислоты структурно сходной аминокислотой не окажут существенного влияния на биологическую активность. Например, интересующий полипептид может содержать до около 5-10 консервативных или неконсервативных аминокислотных замен или даже до около 15-25 или замены в количестве целого числа от 5 до 25, при условии сохранности желаемой функции молекулы. Специалист в данной области техники может с легкостью определить области интересующей молекулы, которые могут претерпеть изменения в соответствии с шкалами Хоппа-Вудса и Кайта-Дулитла, хорошо известными из предшествующего уровня техники.

Под термином "производное" понимают любую подходящую модификацию интересующего нативного полипептида, фрагмента нативного полипептида или соответствующих им аналогов, такую как гликозилирование, фосфорилирование, конъюгирование с полимером (таким как полиэтиленгликоль) или иное добавление чужеродных фрагментов, при условии сохранности желаемой биологической активности нативного полипептида. Способы получения полипептидных фрагментов, аналогов и производных, главным образом, известны из предшествующего уровня техники.

Под термином "фрагмент" понимают молекулу, состоящую лишь из части интактной полноразмерной последовательности или структуры. Фрагмент может содержать С-концевую делецию, N-концевую делецию и/или внутреннюю делецию нативного полипептида. Активные фрагменты конкретного белка, как правило, содержат, по меньшей мере, около 5-10 смежных аминокислотных остатков из состава полноразмерной молекулы, предпочтительно, по меньшей мере, около 15-25 смежных аминокислотных остатков из состава полноразмерной молекулы, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, около 20-50 или более смежных аминокислотных остатков из состава полноразмерной молекулы, или любое целое число от 5 аминокислот до полноразмерной последовательности, при условии сохранности у обсуждаемого фрагмента биологической активности, такой как противоопухолевая активность, определенная в настоящем описании.

Термин "по существу очищенный", как правило, относится к выделению вещества (соединения, полинуклеотида, белка, полипептида, полипептидной композиции) таким образом, чтобы вещество составляло основную долю образца, в котором оно содержится. Как правило, по существу очищенный компонент составляет 50%, предпочтительно 80%-85%, более предпочтительно 90-95% образца. Методики очистки

интересующих полинуклеотидов и полипептидов хорошо известны из предшествующего уровня техники и включают в себя, например, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию и осаждение в градиенте плотности.

5 Термин "выделенный" применительно к полипептиду означает, что указанная молекула отдельна и дискретна от целого организма, с которым молекула связана в естественных условиях, или существует по существу в отсутствие других биологических макромолекул того же типа. Термин "выделенный" применительно к полинуклеотиду относится к молекуле нуклеиновой кислоты, полностью или частично лишенной последовательностей, обычно связанных с ней в природе; или к последовательности в естественном виде, но связанной с гетерологичными последовательностями; или к молекуле, диссоциировавшей от хромосомы.

15 Термин "гомология" относится к процентной идентичности между двумя полинуклеотидными или двумя полипептидными фрагментами. Две нуклеотидные или две полипептидные последовательности являются "по существу гомологичными" по отношению друг к другу, если последовательности характеризуются значением идентичности последовательности определенной части молекулы, составляющей, по меньшей мере, около 50%, предпочтительно, по меньшей мере, около 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, около 80%-85%, предпочтительно, по меньшей мере, около 90%, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, около 95%-98%. Используемый здесь термин "по существу гомологичный" также относится к последовательностям, характеризующимся полной идентичностью по отношению к указанной последовательности.

25 Как правило, термин "идентичность" относится к точному межнуклеотидному или межаминокислотному соответствию двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей соответственно. Процентная идентичность может быть определена путем прямого сопоставления информации о последовательностях двух молекул (референсной последовательности и последовательности с неизвестной 30 процентной идентичностью по отношению к референсной последовательности) путем выравнивания последовательностей, подсчета точного количества совпадений между двумя выравниваемыми последовательностями, деления на длину референсной последовательности и умножения результата на 100. Для облегчения проведения анализа могут быть использованы легкодоступные компьютерные программы, такие как ALIGN, Dayhoff, M.O., описанная в Atlas of Protein Sequence and Structure, M.O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, в которой алгоритм поиска локальной гомологии, описанный в Smith and Waterman, 40 Advances in Appl. Math. 2:482-489, 1981, приспособлен для пептидного анализа. Программы для определения идентичности нуклеотидных последовательностей, например, программы BESTFIT, FASTA и GAP, также основанные на алгоритме Смита и Уотермана, входят в состав Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 (поставляемого Genetics Computer Group, Madison, WI). Эти программы легко 45 реализуются при параметрах по умолчанию, рекомендованных производителем и описанных в упомянутом выше Wisconsin Sequence Analysis Package. Например, процентная идентичность конкретной нуклеотидной последовательности по отношению к референсной последовательности может быть определена в соответствии с алгоритмом поиска гомологии Смита и Уотермана с использованием предлагаемых по умолчанию таблицы оценки и штрафа за пропуск шести 50 нуклеотидных положений.

Другим способом оценки процентной идентичности в контексте настоящего

изобретения является использование пакета программ MPSRCH, авторские права на который принадлежат University of Edinburgh, разработанного John F. Collins и Shane S. Sturrok и распространяемого IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). Из этого набора пакетов может быть использован алгоритм Смита-Уотермана, в котором для таблицы
5 оценки использованы параметры по умолчанию (например, штраф за открытие пропуска 12, штраф за продление пропуска 1 и пропуск 6). В полученных данных значение "Match" отражает "идентичность последовательности". Другие подходящие программы для расчета процентной идентичности или сходства между
10 последовательностями, главным образом, известны из предшествующего уровня техники, например, другой программой для выравнивания является BLAST, используемая с параметрами по умолчанию. Например, BLASTN и BLASTP могут быть использованы со следующими параметрами по умолчанию: genetic code=standard; filter=none; strand=both; cutoff=60; expect=10; Matrix=BLOSUM62; Descriptions=50
15 sequences; sort by=HIGH SCORE; Databases=non-redundant, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+Swiss protein+Spupdate+PIR. Подробные сведения об этих программах широко известны.

Альтернативно, гомология может быть определена путем гибридизации
20 полинуклеотидов в условиях, при которых образуются стабильные дуплексные структуры между гомологичными областями, с последующими расщеплением специфичной(ыми) в отношении одноцепочечных молекул нуклеазой(ами) и определением размеров отщепленных фрагментов. По существу гомологичные последовательности ДНК могут быть идентифицированы в соответствии с
25 экспериментом Саузерн-гибридизации, например, в жестких условиях, определенных для данной конкретной системы. Определение подходящих условий гибридизации находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники. См., например, Sambrook et al., supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization, supra.

Используемый в настоящем описании применительно к молекуле нуклеиновой
30 кислоты термин "рекомбинантный" означает полинуклеотид геномного, кДНК, вирусного, полусинтетического или синтетического происхождения, который в силу своего происхождения или проведенных над ним манипуляций полностью или частично не связан с полинуклеотидом, с которым он связан в естественных условиях.
35 Термин "рекомбинантный" применительно к белку или полипептиду означает полипептид, продуцированный путем экспрессии рекомбинантного полинуклеотида. Как правило, интересующий ген клонируют и затем экспрессируют в трансформированных организмах, как описано ниже. Организм-хозяин экспрессирует
40 чужеродный ген в способствующих экспрессии условиях с продукцией белка.

Используемый в настоящем описании термин "с нарушенной функцией почек" относится к пациенту, характеризующемуся недостаточной скоростью клубочковой
фильтрации. Такой пациент характеризуется здесь содержанием креатинина в сыворотке (SCr), превышающим 1,5 мг/дл.

Под термином "противоопухолевая активность" понимают снижение скорости
45 клеточной пролиферации и, следовательно, снижение скорости роста имеющейся опухоли или опухоли, возникающей в ходе лечения, и/или разрушение имеющихся клеток новообразования (опухоли) или вновь образующихся опухолевых клеток и,
50 следовательно, снижение общего размера опухоли в ходе лечения. Такая активность может быть оценена на животных моделях, таких как модели ксенотрансплантатов почечноклеточной карциномы человека. Описание животных моделей см., например, в Pulkkanen et al., In Vivo (2000) 14:393-400 и Everitt et al., Toxicol. Lett. (1995) 82-83:621-

625.

Под "терапевтически эффективными дозой или количеством" П-2 или его варианта понимают количество, которое при описанном здесь введении приводит к положительному терапевтическому ответу, такому как противоопухолевая активность.

Используемый в настоящем описании термин "опухолевый ответ" означает уменьшение или исчезновение всех измеримых очагов. Критерии для оценки опухолевого ответа основаны на WHO Reporting Criteria [WHO Offset Publication, 48-World Health Organization, Geneva, Switzerland, (1979)]. В идеале, при каждой оценке должны быть измерены все измеримые в одном или двух измерениях очаги. Если в каком-либо органе имеются множественные очаги, такие измерения могут оказаться невозможными, и в таких обстоятельствах следует по возможности выбрать до 6 показательных очагов.

Используемый в настоящем описании термин "полный ответ" (CR) означает полное исчезновение всего клинически определяемого злокачественного заболевания по результатам 2 оценок, отстоящих друг от друга по времени, по меньшей мере, на 4 недели.

Используемый в настоящем описании термин "частичный ответ" (PR) означает 50%-ное или большее снижение по сравнению с фоновым значением суммы произведений наибольших перпендикулярных диаметров всех измеримых очагов без прогрессии оцениваемого заболевания и без признаков каких-либо новых очагов по результатам, по меньшей мере, двух последовательных оценок, отстоящих друг от друга по времени, по меньшей мере, на четыре недели. Оценки должны свидетельствовать о частичном снижении размера очагов лизиса, рекальцификации очагов лизиса или снижении плотности очагов роста. Вполне обычным для П-2 является индукция кратковременного воспаления в метастатических очагах. Отдельные увеличивающиеся в размере очаги необязательно свидетельствуют об отсутствии PR до тех пор, пока увеличение не будет зарегистрировано в ходе двух последовательных измерений, отстоящих друг от друга по времени, по меньшей мере, на 28 суток.

Используемый в настоящем описании термин "прогрессирующее заболевание" (PD) означает 25%-ное или большее увеличение размера, по меньшей мере, одного очага, измеримого в двух измерениях (как произведение наибольших перпендикулярных диаметров) или в одном измерении; явное ухудшение состояния любых оцениваемых очагов; повторное возникновение любых ранее исчезавших очагов; или возникновение новых очагов; по результатам, по меньшей мере, двух последовательных оценок, отстоящих друг от друга по времени, по меньшей мере, на 28 суток.

Используемый в настоящем описании термин "стабильное заболевание" (SD) или "без динамики" применительно (а) к измеримому в двух измерениях очагу означает снижение менее чем на около 50% или увеличение менее чем на около 25% суммы произведений наибольших перпендикулярных диаметров всех измеримых очагов и (b) к измеримому в одном измерении очагу означает снижение менее чем на около 50% или увеличение менее чем на около 25% суммы диаметров всех очагов. Новых очагов возникать не должно. Это свидетельствует об отсутствии полного ответа, частичного ответа или прогрессии. Поскольку костные очаги медленно отвечают на лечение, обозначение "без динамики" не следует применять до прошествия, по меньшей мере, восьми недель с начала терапии.

Используемый в настоящем описании термин "не отвечающий на лечение субъект"

относится к пациентам, у которых наблюдается стабильное заболевание или незначительные ответы (снижение опухолевой нагрузки более 25%, но менее 50%).

Используемый в настоящем описании термин "прогрессия" означает 25%-ное увеличение суммы произведений диаметров всех измеримых очагов по сравнению с наименьшей наблюдаемой суммой или по сравнению с исходным уровнем, если отсутствует снижение по сравнению с исходным уровнем; явное ухудшение состояния любых оцениваемых очагов; повторное возникновение любых ранее исчезавших очагов; возникновение любых новых очагов или участков, включая новые участки нецениваемого заболевания; и/или в случаях, когда может возникнуть первичный опухолевый симптомокомплекс (гиперкальциемия, боль в костях, эритема кожных очагов), симптомы должны либо персистировать в течение более четырех недель, либо должен существовать дополнительный симптом прогрессии.

Используемый в настоящем описании термин "общий ответ" означает ответ, определенный в результате изучения всех очагов злокачественного заболевания. У субъектов с измеримым заболеванием наихудшим ответом будет общий ответ. Отсутствие динамики неизмеримых очагов не будет уменьшать "частичности" ответа в измеримых очагах; т.е. общий ответ будет представлять собой частичный ответ. Отсутствие динамики неизмеримых очагов будет уменьшать "полноту" ответа в измеримых очагах; т.е. общий ответ будет представлять собой частичный ответ.

Используемый в настоящем описании термин "продолжительность ответа" означает время с первого зарегистрированного лучшего объективного опухолевого ответа до времени начала прогрессии.

Используемый в настоящем описании термин "выживаемость" означает время с введения первой дозы ПЛ-2 до времени смерти.

Используемый в настоящем описании термин "выживаемость без прогрессии" (PFS) относится к восприимчивым к лечению субъектам и означает время с введения первой дозы ПЛ-2 до времени начала опухолевой прогрессии, времени смерти или времени последнего визита пациента в клинику, если ответ все еще продолжается.

II. Способы осуществления настоящего изобретения

Перед тем, как приступить к подробному раскрытию настоящего изобретения, следует отметить, что настоящее изобретение не ограничено конкретными составами, или параметры способов как таковые, разумеется, могут варьироваться. Также следует понимать, что использованная в настоящем описании терминология использована исключительно для целей описания конкретных вариантов выполнения изобретения и не предназначена для ограничения.

Хотя для осуществления настоящего изобретения может быть использован ряд способов и веществ, сходных или эквивалентных описанным здесь, предпочтительные вещества и способы раскрыты в настоящем описании.

Настоящее изобретение основано на открытии нового терапевтического способа для безопасного и эффективного лечения почечноклеточной карциномы путем введения низких доз ПЛ-2. Раскрытая в настоящем описании схема лечения позволяет значительно ингибировать опухолевый рост при пониженной токсичности и ослабленных нежелательных побочных эффектах по сравнению со схемами лечения высокими дозами ПЛ-2.

Тогда как способы согласно изобретению предназначены для лечения существующей опухоли, подразумевается, что способы могут быть применимы для профилактики метастазирования опухоли, происходящего в ходе терапии. Способы согласно изобретению особенно применимы для лечения субъектов, страдающих

метастатической почечноклеточной карциномой, с нарушенной функцией почек и/или не способных переносить лечение высокими дозами IL-2.

IL-2, применимый для использования в соответствии со способами согласно изобретению, может быть нативным или полученным в соответствии с рекомбинантными методами и может происходить из любого источника, включая источники-млекопитающие, такие как, например, мышь, крыса, кролик, примат, свинья и человек. Последовательности IL-2 ряда видов хорошо известны из предшествующего уровня техники и включают в себя без ограничения следующие последовательности: IL-2 человека (*Homo sapiens*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank AАН66254; зрелая последовательность представлена остатками 211-153 последовательности каталожный № GenBank AАН66254); IL-2 макака-резуса (*Macaco mulatto*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P51498; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank P51498); IL-2 павиана анубиса (*Papio anubis*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q865Y1; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank Q865Y1); IL-2 дымчатого мангабея (*Cercosebus torquatus atys*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P46649; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank P46649); IL-2 макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q29615; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank Q29615); IL-2 белорукого гиббона (*Hylobates lar*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank ICGI2; зрелая последовательность представлена остатками 21-153 последовательности каталожный № GenBank ICGI2); IL-2 беличьего саймири (*Saimiri sciureus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q8МКН2; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank Q8МКН2); IL-2 коровы (*Bos taurus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P05016; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank P05016; см. также вариант последовательности-предшественника, приведенный в последовательности каталожный № GenBank NP-851340; зрелая последовательность представлена остатками 24-158 последовательности каталожный № GenBank NP-851340); IL-2 буйвола (*Bubalus bubalis*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q95КР3; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank Q95КР3); IL-2 лошади (*Equus caballus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P37997; зрелая последовательность представлена остатками 21-149 последовательности каталожный № GenBank P37997); IL-2 козы (*Capra hircus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P36835; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank P36835); IL-2 овцы (*Ovis aries*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P19114; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank P19114); IL-2 свиньи (*Sus scrofa*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P26891; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank P26891); IL-2 марала (*Cervus elaphus*; последовательность-предшественник, каталожный

№ GenBank P51747; зрелая последовательность представлена остатками 21-162 последовательности каталожный № GenBank P51747); IL-2 собаки (*Canis familiaris*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q29416; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank Q29416); IL-2 кошки (*Felis catus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q07885; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank Q07885); IL-2 кролика (*Oryctolagus cuniculus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank O77620; зрелая последовательность представлена остатками 21-153 последовательности каталожный № GenBank O77620); IL-2 касатки (*Orcinus orca*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank O97513; зрелая последовательность представлена остатками 21-152 последовательности каталожный № GenBank O97513); IL-2 северного морского слона (*Mirounga angustirostris*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank O62641; зрелая последовательность представлена остатками 21-154 последовательности каталожный № GenBank O62641); IL-2 домовый мыши (*Mus musculus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank NP_032392; зрелая последовательность представлена остатками 21-169 последовательности каталожный № GenBank NP_332392); IL-2 западной дикой мыши (*Mus spretus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q08867; зрелая последовательность представлена остатками 21-166 последовательности каталожный № GenBank Q08867); IL-2 серой крысы (*Rattus norvegicus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank P17108; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank P17108); IL-2 монгольской песчанки (*Meriones unguiculatus*; последовательность-предшественник, каталожный № GenBank Q08081; зрелая последовательность представлена остатками 21-155 последовательности каталожный № GenBank Q08081); любой из вариантов полипептидов IL-2, обозначенных этими приведенными выше каталожными номерами GenBank; причем каждая из указанных каталожных единиц GenBank включена в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Хотя для осуществления настоящего изобретения может быть использован IL-2 из любого источника, предпочтительно IL-2 происходит от человека, особенно если получающий лечение субъект является человеком. В некоторых вариантах выполнения IL-2, применимый в соответствии со способами согласно изобретению, получен в соответствии с рекомбинантными методами, например рекомбинантные белки IL-2 человека, включая без ограничения белки, продуцированные микробными хозяевами.

Композиции, применимые в соответствии со способами согласно изобретению, могут содержать биологически активные варианты IL-2, включая варианты IL-2 из любых видов. Такие варианты должны сохранять желаемую биологическую активность нативного полипептида настолько, чтобы содержащая вариант полипептида фармацевтическая композиция при введении субъекту оказывала такой же терапевтический эффект, что и фармацевтическая композиция, содержащая нативный полипептид. То есть вариант полипептида будет служить в качестве терапевтически активного ингредиента фармацевтической композиции аналогично нативному полипептиду. Из предшествующего уровня техники известны способы определения того, сохраняет ли вариант полипептида желаемую биологическую активность и, следовательно, может ли он служить в качестве терапевтически активного ингредиента фармацевтической композиции. Биологическая активность

может быть измерена с помощью анализов, специально разработанных для измерения активности нативного полипептида или белка, включая анализы, раскрытые в связи с настоящим изобретением. Кроме того, антитела, индуцированные против биологически активного нативного полипептида, могут быть исследованы на предмет их способности связываться с вариантом полипептида, причем эффективное связывание свидетельствует о сходстве конформации полипептида с таковой нативного полипептида.

Подходящие биологически активные варианты нативного, или природного, IL-2 могут представлять собой фрагменты, аналоги и производные такого определенного выше полипептида.

Например, варианты аминокислотной последовательности полипептида могут быть получены с помощью мутаций в клонируемой последовательности ДНК, кодирующей нативный интересующий полипептид. Способы мутагенеза и внесения изменений в нуклеотидную последовательность хорошо известны из предшествующего уровня техники. См., например, Walker and Gaastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York); патент США №4,873,192; и процитированные в них ссылки, включенные в настоящее описание посредством ссылки. С указаниями по надлежащему проведению аминокислотных замен, не влияющих на биологическую активность интересующего полипептида, можно ознакомиться в модели Dayhoff et al. (1978) в *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.),

включенном в настоящее описание посредством ссылки. Могут быть предпочтительны консервативные замены, такие как замены одной аминокислоты другой, характеризующейся сходными свойствами. Примеры консервативных замен включают в себя без ограничения Gly \leftrightarrow Ala, Val \leftrightarrow Ile \leftrightarrow Leu, Asp \leftrightarrow Glu, Lys \leftrightarrow Arg, Asn \leftrightarrow Gln и Phe \leftrightarrow Trp \leftrightarrow Tyr.

С указаниями относительно областей белка IL-2, которые могут быть изменены с помощью либо замен, либо делеций, либо инсерций остатков, можно ознакомиться в источниках предшествующего уровня техники. См., например, исследования структурно-функциональных связей и/или связывания, обсуждаемые в Bazan (1992) *Science* 257:410-412; McKay (1992) *Science* 257:412; Theze et al. (1996) *Immunol. Today* 17: 481-486; Buchli and Ciardelli (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* 307:411-415; Collins et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7709-7713; Kuziel et al. (1993) *J. Immunol.* 150:5731; Eckenberg et al. (1997) *Cytokine* 9:488-498; содержание которых включено в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки.

При конструировании вариантов интересующего полипептида IL-2 модификации проводят таким образом, чтобы такие варианты продолжали обладать желаемой активностью. Очевидно, любые мутации, проведенные в ДНК, кодирующей вариант полипептида, не должны нарушать рамку считывания последовательности и, предпочтительно, не вызывают появления комплементарных областей, которые могли бы образовывать вторичную структуру мРНК. См. Европейскую патентную публикацию №75444.

Биологически активные варианты IL-2, как правило, характеризуются идентичностью аминокислотной последовательности по отношению к аминокислотной последовательности референсной молекулы полипептида IL-2, такой как нативный IL-2 человека, которая служит основой для сравнения, на уровне, по

меньшей мере, около 70%, предпочтительно, по меньшей мере, около 80%, более предпочтительно, по меньшей мере, около 90%-95% или более, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, около 98%, 99% или более. Процентную идентичность последовательностей определяют в соответствии с алгоритмом поиска гомологии Смита-Уотермана с использованием аффинного поиска пропусков со штрафом за открытие пропуска 12 и штрафом за продление пропуска 2, матрицей BLOSUM 62. Алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана описан в Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. (1981) 2:482-489. Вариант может, например, отличаться 1-15 аминокислотными остатками, 1-10 остатками, например 6-10, 5, 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотным остатком.

Что касается оптимального выравнивания двух аминокислотных последовательностей, непрерывный сегмент вариантной аминокислотной последовательности может содержать такое же количество аминокислот, дополнительные аминокислотные остатки или делеции аминокислотных остатков относительно референсной аминокислотной последовательности. Непрерывный сегмент, используемый для сравнения с референсной аминокислотной последовательностью, содержит, по меньшей мере, 20 смежных аминокислотных остатков и может содержать 30, 40, 50 или более аминокислотных остатков. Значение идентичности последовательностей может быть скорректировано в связи с консервативными заменами остатков или пропусками (см. алгоритм поиска гомологии Смита-Уотермана). Биологически активный вариант нативного интересующего полипептида IL-2 может отличаться от нативного полипептида 1-15 аминокислотами, 1-10, например 6-10, 5, 4, 3, 2 или даже 1 аминокислотным остатком.

Точная химическая структура полипептида, обладающего активностью IL-2, зависит от ряда факторов. Поскольку в молекуле содержатся ионизируемые амино- и карбоксигруппы, отдельный полипептид может быть получен в виде кислой или основной соли или в нейтральной форме. Все такие препараты, сохраняющие свою биологическую активность при помещении в подходящие средовые условия, подпадают под используемое в настоящем описании определение полипептидов, обладающих активностью IL-2. Кроме того, первичная аминокислотная последовательность полипептида может быть увеличена путем дериватизации фрагментами сахаров (гликозилирование) и другими дополнительными молекулами, такими как липиды, фосфатные, ацетильные группы и т.п. Она также может быть увеличена путем конъюгирования с сахарами. Некоторые виды такого увеличения осуществляются с помощью систем посттрансляционного процессинга продуцирующего хозяина; другие такие модификации могут быть осуществлены *in vitro*. В любом случае такие модификации подпадают под используемое в настоящем описании определение полипептида IL-2 до тех пор, пока не нарушается активность IL-2. Предполагается, что такие модификации могут количественно или качественно влиять на активность, либо усиливая, либо ослабляя активность полипептида по результатам различных анализов. Кроме того, отдельные аминокислотные остатки в составе цепи могут быть модифицированы посредством окисления, восстановления или иной дериватизации, а полипептид может быть расщеплен с образованием фрагментов, сохраняющих активность. Такие изменения, не вызывающие исчезновения активности, не приводят к исключению полипептидной последовательности из используемого в настоящем описании определения интересующих полипептидов IL-2.

В предшествующем уровне техники содержится изрядное количество указаний

относительно получения и использования вариантов полипептидов. При получении вариантов IL-2 специалист в данной области техники способен легко определить, какие модификации нуклеотидной или аминокислотной последовательностей, соответствующих нативному белку, приведут к образованию варианта, подходящего для использования в качестве терапевтически активного ингредиента фармацевтической композиции, применимой в соответствии со способами согласно настоящему изобретению.

IL-2 или его варианты, применимые в соответствии со способами согласно настоящему изобретению, могут происходить из любого источника, но предпочтительно продуцированы в соответствии с рекомбинантными методами. Под терминами "рекомбинантный IL-2" или "рекомбинантный вариант IL-2" понимают интерлейкин-2 или его вариант, обладающие биологической активностью, сравнимой с таковой IL-2 нативной последовательности, и полученные в соответствии с методами рекомбинантных ДНК, описанными, например, в Taniguchi et al. (1983) Nature 302:305-310 и Devos (1983) Nucleic Acids Research 11:4307-4323, или мутационно измененный IL-2, описанный в Wang et al. (1984) Science 224:1431-1433. Как правило, ген, кодирующий IL-2, клонируют и затем экспрессируют в трансформированных организмах, предпочтительно в микроорганизме, и наиболее предпочтительно в *E. coli*, как раскрыто в настоящем описании. Организм-хозяин экспрессирует чужеродный ген в способствующих экспрессии условиях с продукцией IL-2. Синтетический рекомбинантный IL-2 также может быть получен с использованием эукариот, таких как дрожжевые или человеческие клетки. Способы культивирования, сбора, разрушения или выделения IL-2 из клеток подробно описаны, например, в патентах США №№4,604,377; 4,738,927; 4,656,132; 4,569,790; 4,748,234; 4,530,787; 4,572,798; 4,748,234 и 4,931,543, включенных в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки.

Для ознакомления с примерами вариантов белков IL-2 см. Европейскую патентную (EP) публикацию №EP 136489 (в которой раскрыты одно или несколько следующих изменений аминокислотной последовательности природного IL-2: Asn26 на Gln26; Trp121 на Phe121; Cys58 на Ser58 или Ala58; Cys105 на Ser105 или Ala105; Cys125 на Ser125 или Ala125; делеция всех остатков, следующих за Arg120; и их формы Met-1); и рекомбинантные мутеины IL-2, описанные в заявке на выдачу Европейского патента №83306221.9, поданной 13 октября 1983 года (опубликованной 30 мая 1984 года под номером публикации EP 109748), которая эквивалентна патенту Бельгии №893016 и принадлежащему тому же патентообладателю патенту США №4,518,584 (в котором раскрыт рекомбинантный мутеин IL-2 человека, в котором цистеин в положении 125, пронумерованный в соответствии с нативным IL-2 человека, делегирован или заменен нейтральной аминокислотой; аланил-ser125-IL-2; и дез-аланил-Ser125-IL-2). См. также патент США №4,752,585 (в котором раскрыты следующие варианты белков IL-2: ala104 Ser125 IL-2, ala104 IL-2, ala104 ala125 IL-2, val104 ser125 IL-2, val104 IL-2, val104 ala125 IL-2, дез-ala1 ala104 ser125 IL-2, дез-ala1 ala104 IL-2, дез-ala1 ala104 ala125 IL-2, дез-ala1 val104 ser125 IL-2, дез-ala1 val104 IL-2, дез-ala1 val104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 ala104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 ala104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 ala104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 val104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 val104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 val104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 ala104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 ala104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 ala104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 val104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 val104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 val104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез3-ser4 ala104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4

ala104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 ala104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 val104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 val104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 val104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 ala104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 ala104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3
 5 дез-ser4 дез-ser5 ala104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 val104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 val104 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 val104 ala125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 ala104 ala125 IL-2, дез-ala1
 10 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 ala104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 val104 ser125 IL-2, дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 val104 IL-2 и дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 val104 ala125 IL-2) и патент США №4,931,543 (в котором раскрыт мутеин IL-2 дез-аланил-1, серин-125 IL-2 человека, используемый в соответствии с примерами в составе настоящего описания,
 15 равно как и другие мутеины IL-2).

Также см. Европейскую патентную публикацию №EP 200280 (опубликованную 10 декабря 1986 года), в которой раскрыты рекомбинантные мутеины IL-2, в которых метионин в положении 104 заменен консервативной аминокислотой. Примеры
 20 включают в себя следующие мутеины: ser4 дез-ser5 ala104 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 ala104 ala125 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 glu104 ser125 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 glu104 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 glu104 ala125 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 ala104 ala125 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 ala104 IL-2; дез-ala1
 25 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 ala104 ser125 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 glu104 ser125 IL-2; дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 glu104 ala125 IL-2; и дез-ala1 дез-pro2 дез-thr3 дез-ser4 дез-ser5 дез-ser6 glu104 ala125 IL-2. Также см. Европейскую патентную публикацию №EP 118617 и патент США
 30 №5,700,913, в которых раскрыты негликозилированные варианты IL-2 человека, содержащие в качестве N-концевой аминокислоты аланин вместо метионина, как в нативной молекуле; негликозилированный IL-2 человека с первым метионином, делегированным таким образом, что N-концевой аминокислотой является пролин; и негликозилированный IL-2 человека с аланином, встроенным между N-концевыми
 35 аминокислотами метионином и пролином.

Другие мутеины IL-2 включают в себя мутеины, описанные в WO 99/60128 (замены аспартата в положении 20 гистидином или изолейцином, аспарагина в положении 88 аргинином, глицином или изолейцином или глутамина в положении 126 лейцином или
 40 глутаминовой кислотой), которые, как сообщалось, обладают селективной активностью в отношении высокоаффинных рецепторов IL-2, экспрессируемых клетками, экспрессирующими T-клеточные рецепторы, по сравнению с НК-клетками, и пониженной токсичностью IL-2; мутеины, раскрытые в патенте США №5,229,109 (замены аргинина в положении 38 аланином или замены аргинина в положении 42
 45 лизином), у которых наблюдается ослабленное связывание с высокоаффинным рецептором IL-2 по сравнению с нативным IL-2 при сохраненной способности стимулировать LAK-клеток; мутеины, раскрытые в международной публикации №WO 00/58456 (в которой раскрыто изменение или делеция природной
 50 последовательности (x)D(y) в нативном IL-2, в которой D представляет собой аспарагиновую кислоту, (x) представляет собой лейцин, изолейцин, глицин или валин, а (y) представляет собой валин, лейцин или серин), которые заявлены для борьбы с синдромом повышенной проницаемости сосудов; пептид IL-2 p1-30, раскрытый в

международной публикации №WO 00/04048 (соответствующий первым 30 аминокислотам IL-2, составляющим полную α -спираль A IL-2 и взаимодействующим с β -цепью рецептора IL-2), который, как сообщалось, стимулирует НК-клетки и индуцирует ЛАК-клетки; и мутантную форму пептида IL-2 p1-30, также раскрытую в WO 00/04048 (замена аспарагиновой кислоты в положении 20 лизином), которая, как сообщалось, не способна вызывать повышенную проницаемость сосудов, но сохраняет способность к генерации ЛАК-клеток. Кроме того, IL-2 может быть модифицирован полиэтиленгликолем, что обеспечивает повышенную растворимость и измененный фармакокинетический профиль (см. патент США №4,766,106).

Дополнительные примеры мутеинов IL-2 с предсказанной пониженной токсичностью раскрыты в предварительной заявке на выдачу патента США №60/550,868, поданной 5 марта 2004 года, включенной в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Эти мутеины содержат аминокислотную последовательность зрелого IL-2 человека с серином, заменившим цистеин в положении 125 последовательности зрелого IL-2 человека, и, по меньшей мере, одной дополнительной аминокислотной заменой в последовательности зрелого IL-2 человека, что обеспечивает следующие функциональные характеристики мутеина: 1) поддержание или усиление пролиферации натуральных киллеров (НК-клеток) и 2) индукцию пониженного уровня продукции провоспалительных цитокинов НК-клеток; по сравнению со сходным количеством дез-аланил-1, С125S IL-2 человека или С125S IL-2 человека в сравнимых аналитических условиях. В некоторых вариантах выполнения дополнительную замену выбирают из группы, состоящей из T7A, T7D, T7R, K8L, 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, K35I, K35L, K35M, K35N, K35P, K35Q, K35T, L36A, L36D, L36E, L36F, L36G, L36H, L36I, 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, M46I, E61K, E61M, E61R, E62T, E62Y, K64D, K64E, K64G, K64L, K64Q, K64R, P65D, P65E, P65F, P65G, P65H, P65I, 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 и Q126V; причем положение аминокислотных остатков приведено в нумерации аминокислотной последовательности зрелого IL-2 человека. В некоторых вариантах выполнения эти мутеины содержат аминокислотную последовательность зрелого IL-2 человека с аланином, заменившим цистеин в положении 125 последовательности зрелого IL-2 человека, и, по меньшей мере, одной дополнительной аминокислотной заменой в последовательности зрелого IL-2 человека, что обеспечивает такие же функциональные характеристики. В некоторых вариантах выполнения дополнительную замену выбирают из группы, состоящей из T7A, T7D, T7R, K8L, 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, K35I, K35L, K35M, K35N, K35P, K35Q, K35T, L36A, L36D, L36E, L36F, L36G, L36H, L36I, 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, M46I, E61K, E61M, E61R, E62T, E62Y, K64D, K64E, K64G, K64L,

K64Q, K64R, P65D, P65E, P65F, P65G, P65H, P65I, 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 и Q126V; причем положение аминокислотных остатков приведено в нумерации аминокислотной последовательности зрелого IL-2 человека. В альтернативных вариантах выполнения эти мутеины содержат аминокислотную последовательность зрелого IL-2 человека, по меньшей мере, с одной дополнительной аминокислотной заменой в последовательности зрелого IL-2 человека, что обеспечивает такие же функциональные характеристики. В некоторых вариантах выполнения дополнительную замену выбирают из группы, состоящей из T7A, T7D, T7R, K8L, 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, K35I, K35L, K35M, K35N, K35P, K35Q, K35T, L36A, L36D, L36E, L36F, L36G, L36H, L36I, 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, M46I, E61K, E61M, E61R, E62T, E62Y, K64D, K64E, K64G, K64L, K64Q, K64R, P65D, P65E, P65F, P65G, P65H, P65I, 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 и Q126V; причем положение аминокислотных остатков приведено в нумерации аминокислотной последовательности зрелого IL-2 человека.

Дополнительные мутеины, раскрытые в предварительной заявке на выдачу патента США №60/550,868, включают в себя указанные выше мутеины, за исключением содержащих делецию первого аланинового остатка в положении 1 последовательности зрелого IL-2 человека.

Подразумевается, что используемый в настоящем описании термин "IL-2" также охватывает гибридные молекулы IL-2 или конъюгаты, содержащие IL-2, слитый со вторым белком или ковалентно конъюгированный с полипролином или растворимым в воде полимером, что позволяет снизить частоту введения или улучшить переносимость IL-2. Например, IL-2 (или его вариант, определенный в настоящем описании) может быть слит с альбумином или фрагментом альбумина человека в соответствии с методиками, известными из предшествующего уровня техники (см. WO 01/79258). Альтернативно, IL-2 может быть ковалентно конъюгирован с гомополимерами полипролином или полиэтиленгликолем и полиоксиэтилированными многоатомными спиртами, причем гомополимер не замещен или замещен по одному концу алкильной группой, а многоатомный спирт не замещен, в соответствии с методиками, известными из предшествующего уровня техники (см., например, патенты США №№4,766,106, 5,206,344, 4,894,226 и 5,830,452).

В соответствии со способами согласно изобретению может быть использована любая фармацевтическая композиция, содержащая в качестве терапевтически активного ингредиента IL-2. Такие фармацевтические композиции известны из

предшествующего уровня техники; и включают в себя без ограничения композиции, раскрытые в патентах США №№4,745,180; 4,766,106; 4,816,440; 4,894,226; 4,931,544; и 5,078,997; включенных в настоящее описание посредством ссылки. Так, жидкие, лиофилизированные или высушенные распылением композиции, содержащие IL-2 или его варианты, известные из предшествующего уровня техники, могут быть 5
приготовлены в виде водного или неводного раствора или суспензии для дальнейшего введения субъекту в соответствии со способами согласно изобретению. Каждая такая композиция будет содержать в качестве терапевтически или профилактически 10
активного ингредиента IL-2 или его варианты. Под термином "терапевтически или профилактически активный ингредиент" понимают IL-2 или его варианты, конкретно включенные в состав композиции для обеспечения желаемого терапевтического или профилактического ответа относительно лечения или профилактики заболевания или 15
состояния у субъекта при введении фармацевтической композиции такому субъекту. Предпочтительно, фармацевтические композиции содержат подходящие стабилизаторы, наполнители или и то, и другое для минимизации проблем, связанных с потерей белком стабильности и биологической активности в процессе получения и хранения.

В предпочтительных вариантах выполнения изобретения содержащие IL-2 20
фармацевтические композиции, применимые в соответствии со способами согласно изобретению, представляют собой композиции, содержащие стабилизированный мономерный IL-2 или его варианты, композиции, содержащие мультимерный IL-2 или его варианты, и композиции, содержащие стабилизированный лиофилизированный 25
или высушенный распылением IL-2 или его варианты.

Фармацевтические композиции, содержащие стабилизированный мономерный IL-2 или его варианты, раскрыты в РСТ-заявке № РСТ/US00/27156, поданной 3 октября 2000 года, описание которой включено в настоящее описание посредством 30
ссылки. Под "мономерным" IL-2 понимают, что белковые молекулы находятся в составе описанных в настоящем описании фармацевтических композиций в своей по существу мономерной форме, а не в агрегированной форме. Следовательно, ковалентные или гидрофобные олигомеры или агрегаты IL-2 отсутствуют. Вкратце, IL-2 или его варианты вводят в состав этих жидких композиций с количеством 35
аминокислотного основания, достаточным для ослабления образования агрегатов IL-2 или его вариантов в ходе хранения. Аминокислотное основание представляет собой аминокислоту или сочетание аминокислот, причем каждая отдельная аминокислота находится либо в форме свободного основания, либо в форме его соли.

Предпочтительные аминокислоты выбирают из группы, состоящей из аргинина, лизина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. Эти композиции 40
дополнительно содержат забуферивающий агент для поддержания значения рН жидких композиций в диапазоне, приемлемом для обеспечения стабильности IL-2 или его вариантов, причем забуферивающий агент представляет собой кислоту, по 45
существу не содержащую свою соль, кислоту в форме соли или смесь кислоты и ее соли. Предпочтительно, кислоту выбирают из группы, состоящей из янтарной кислоты, лимонной кислоты, фосфорной кислоты и глутаминовой кислоты. Такие композиции в настоящем описании называют фармацевтическими композициями стабилизированного мономерного IL-2. 50

Аминокислотное основание в этих композициях служит для стабилизации IL-2 или его вариантов против образования агрегатов в ходе хранения жидкой фармацевтической композиции, тогда как использование в качестве забуферивающего

агента кислоты, по существу не содержащей своей соли, кислоты в форме соли или смеси кислоты и ее соли позволяет получить жидкую композицию, характеризующуюся приблизительно изотоничным осмотическим давлением. Жидкая фармацевтическая композиция может дополнительно содержать другие стабилизаторы, более конкретно метионин, неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, и ЭДТУ, для дальнейшего повышения стабильности полипептида. Такие жидкие фармацевтические композиции называют стабилизированными, поскольку добавление аминокислотного основания в сочетании с кислотой, по существу не содержащей своей соли, кислотой в форме соли или смесью кислоты и ее соли позволяет получать композиции, характеризующиеся повышенной стабильностью при хранении по сравнению с жидкими фармацевтическими композициями, приготовленными в отсутствие сочетания этих двух ингредиентов.

Эти жидкие фармацевтические композиции, содержащие стабилизированный мономерный IL-2 или его варианты, могут быть либо использованы в водной жидкой форме, либо храниться в замороженном состоянии для дальнейшего использования, либо в высушенной форме для дальнейшего восстановления в жидкую форму или другую форму, подходящую для введения субъекту в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. Под "высушенной формой" понимают, что жидкие фармацевтические композиция или состав высушены либо по методу сушки вымораживанием (т.е. лиофилизации, см., например, Williams and Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 55:48-59), сушки распылением (см. Masters (1991) в Spray-Drying Handbook (5th ed.; Longman Scientific and Technical, Essex, U.K.), pp.491-676; Broadhead et al. (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 75:1169-1206; и Mumenthaler et al. (1994) Pharm. Res. 11:12-20) или воздушной сушки (Carpenter and Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; и Roser (1991) Biopharm. 4:47-53).

Другие примеры составов IL-2, содержащих IL-2 в неагрегированной мономерной форме, включают в себя составы, описанные в Whittington and Faulds (1993) Drugs 46(3):446-514. Эти составы содержат рекомбинантный IL-2 продукт, в котором рекомбинантный мутеин IL-2 Teceleukin (негликозилированный IL-2 человека с добавленным на аминоконец метиониновым остатком) введен в состав с 0,25% человеческим сывороточным альбумином в лиофилизированном порошке, восстановленном изотоничным солевым раствором, рекомбинантный мутеин IL-2 Bioleukin (IL-2 человека с добавленным на аминоконец метиониновым остатком и заменой цистеинового остатка в положении 125 последовательности IL-2 человека аланином), приготовленный таким образом, что 0,1-1,0 мг/мл мутеина IL-2 объединено с кислотой, причем состав характеризуется значением pH от 3,0 до 4,0, предпочтительно, в отсутствие буфера, и значением проводимости менее 1000 мкСм/см (предпочтительно, менее 500 мкСм/см). См. EP 373,679; Xhang et al. (1996) Pharmaceut. Res. 13(4):643-644; и Prestrelski et al. (1995) Pharmaceut. Res. 12(9):1250-1258.

Примеры фармацевтических композиций, содержащих мультимерный IL-2 или его варианты, раскрыты в патенте США №4,604,377, принадлежащем тому же патентообладателю, описание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Под "мультимерными" понимают белковые молекулы, находящиеся в составе фармацевтической композиции в форме микроагрегатов, характеризующихся средним числом ассоциированных молекул 10-50. Эти мультимеры существуют в виде рыхло связанных, физически ассоциированных молекул IL-2. Лиофилизированная форма таких композиций коммерчески доступна под торговым наименованием Proleukin® (Chiron Corporation, Emeryville, California). Лиофилизированные составы,

раскрытые в указанной ссылке, содержат селективно окисленный продуцированный микроорганизмами рекомбинантный IL-2, причем рекомбинантный IL-2 смешан с растворимым в воде носителем, таким как маннит, обеспечивающим объем, и достаточным количеством додецилсульфата натрия для обеспечения растворимости рекомбинантного IL-2 в воде. Такие композиции подходят для восстановления в водных инъекционных средах для парентерального введения и являются стабильными и хорошо переносимыми пациентами-людьми. После восстановления IL-2 или его варианты остаются в мультимерном состоянии. Такие лиофилизированные или жидкие композиции, содержащие мультимерный IL-2 или его варианты, применимы в соответствии со способами согласно настоящему изобретению. Такие композиции в настоящем описании называют фармацевтическими композициями мультимерного IL-2.

В соответствии со способами согласно настоящему изобретению также могут быть использованы стабилизированные лиофилизированные или высушенные распылением фармацевтические композиции, содержащие IL-2 или его варианты, которые могут быть восстановлены в жидкую или другую подходящую форму для введения в соответствии со способами согласно изобретению. Такие фармацевтические композиции раскрыты в совместно рассматриваемой заявке на выдачу патента США №09/724,810, поданной 28 ноября 2000 года, и международной заявке №PCT/US00/35452, поданной 27 декабря 2000 года, включенных в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Такие композиции могут дополнительно содержать, по меньшей мере, один наполнитель, по меньшей мере, один агент в количестве, достаточном для стабилизации белка в ходе процесса сушки, или оба агента. Под "стабилизированными" понимают белок IL-2 или его варианты, сохраняющие после лиофилизации или сушки распылением с получением твердой или сухой порошковой формы композиции свою мономерную или мультимерную форму, равно как и другие ключевые качественные свойства, чистоту и активность. В составе таких композиций предпочтительные вещества-носители, применимые в качестве наполнителя, включают в себя глицин, маннит, аланин, валин или любое их сочетание, наиболее предпочтительно глицин. Наполнитель содержится в составе в диапазоне от 0% до около 10% (мас./об.) в зависимости от используемого агента. Предпочтительные вещества-носители, применимые в качестве стабилизатора, включают в себя любой сахар или сахарный спирт или любую аминокислоту. Предпочтительные сахара включают в себя сахарозу, трегалозу, раффинозу, стахиозу, сорбит, глюкозу, лактозу, декстрозу или любое их сочетание, предпочтительно глюкозу. Если стабилизатор представляет собой сахар, он содержится в диапазоне от около 0% до около 9,0% (мас./об.), предпочтительно от около 0,5% до около 5,0%, более предпочтительно от около 1,0% до около 3,0%, наиболее предпочтительно около 1,0%. Если стабилизатор представляет собой аминокислоту, она содержится в диапазоне от около 0% до около 1,0% (мас./об.), предпочтительно от около 0,3% до около 0,7%, наиболее предпочтительно около 0,5%. Такие стабилизированные лиофилизированные или высушенные распылением композиции могут необязательно содержать метионин, этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТУ) или одну из ее солей, такую как ЭДТА динатрия, или другой хелатирующий агент, защищающий IL-2 или его варианты от окисления метионина. Такое использование этих агентов описано в совместно рассматриваемой предварительной заявке на выдачу патента США №60/157696, включенной в настоящее описание посредством ссылки. Стабилизированные лиофилизированные или высушенные распылением композиции

могут быть приготовлены с использованием забуферивающего агента, который обеспечивает поддержание значения рН фармацевтической композиции в жидкой фазе в пределах приемлемого диапазона, предпочтительно от около рН 4,0 до около рН 8,5, например, в ходе приготовления или после восстановления высушенной композиции. Буферы выбирают таким образом, чтобы они были совместимы с процессом сушки и не влияли на качество, чистоту, активность и стабильность белка при обработке и хранении.

Ранее описанные стабилизированные мономерные, мультимерные и стабилизированные лиофилизированные или высушенные распылением фармацевтические композиции П-2 представляют собой подходящие композиции для использования в соответствии со способами согласно изобретению. Однако в соответствии со способами согласно изобретению применима любая фармацевтическая композиция, содержащая в качестве терапевтически активного ингредиента П-2 или его вариант.

Введение

Должен быть проведен, по меньшей мере, один терапевтически эффективный цикл лечения низкими дозами П-2 или его варианта. Под "терапевтически эффективным циклом лечения" понимают цикл лечения, проведение которого приводит к положительному терапевтическому ответу применительно к лечению у субъекта почечноклеточной карциномы, особенно метастатической почечноклеточной карциномы. Особенно интересен цикл лечения низкими дозами П-2, оказывающий определенный в настоящем описании противоопухолевый эффект. Термин "положительный терапевтический ответ" означает, что у субъекта, получающего лечение в соответствии с изобретением, наблюдается улучшение состояния по одному или нескольким симптомам почечноклеточной карциномы, по поводу которой субъект получает лечение.

Так, например, "положительным терапевтическим ответом" будет являться улучшение состояния больного в связи с терапией и/или ослабление одного или нескольких симптомов заболевания в связи с терапией. Таким образом, например, положительный терапевтический ответ будет заключаться в одном или нескольких следующих улучшениях состояния больного: (1) уменьшение размера опухоли; (2) уменьшение количества злокачественных клеток; (3) ингибирование (т.е. замедление до некоторой степени, предпочтительно остановка) опухолевого роста; (4) ингибирование (т.е. замедление до некоторой степени, предпочтительно остановка) инфильтрации злокачественными клетками окружающих органов; (5) ингибирование (т.е. замедление до некоторой степени, предпочтительно остановка) метастазирования опухоли; и (6) облегчения до некоторой степени одного или нескольких симптомов, связанных со злокачественной опухолью. Такие терапевтические ответы могут быть дополнительно охарактеризованы степенью улучшения. Так, например, улучшение может быть охарактеризовано как полный ответ. Под "полным ответом" понимают зарегистрированное исчезновение всех симптомов и знаков всех измеримых или оцениваемых очагов заболевания, подтвержденное физикальным обследованием, данными лабораторных, ЯМР и радиографических исследований (т.е. КТ (компьютерной томографии) и/или МРТ (магнитно-резонансной томографии)) и другими неинвазивными процедурами, повторно проведенными для исследования всех первоначальных аномалий и участков, давших положительные результаты в начале испытания. Альтернативно, улучшение состояния больного может быть охарактеризовано как частичный ответ. Под "частичным ответом" понимают более,

чем 50%-ное снижение суммы произведений перпендикулярных диаметров всех измеримых очагов по сравнению с измерениями до лечения без прогрессии оцениваемого заболевания и без образования каких-либо новых очагов в течение, по меньшей мере, 28 суток.

5 В некоторых вариантах выполнения изобретения фармацевтическая композиция, содержащая ПЛ-2 или его вариант, представляет собой состав длительного высвобождения или состав, вводимый с помощью устройства для длительного высвобождения. Такие устройства хорошо известны из предшествующего уровня
10 техники и включают в себя, например, пластыри для чрескожного введения и миниатюрные имплантируемые насосы, которые способны обеспечивать непрерывную постоянную доставку лекарственного средства во времени в различных дозах для достижения эффекта длительного высвобождения при использовании
15 фармацевтической композиции, не предназначенной для длительного высвобождения.

15 Фармацевтические композиции, содержащие ПЛ-2 или его вариант, могут быть введены в соответствии с любым принятым в медицине способом, известным из предшествующего уровня техники. Подходящие пути введения включают в себя парентеральное введение, такое как подкожное (п/к), внутривенное (в/в),
20 внутримышечное (в/м), внутривенное (в/в) или инфузионное, пероральное или легочное, назальное, местное, чрескожное или с помощью суппозитория. Если композицию вводят по методу легочной доставки, терапевтически эффективную дозу устанавливают таким образом, чтобы содержание растворенного агента, такого как ПЛ-2 или его вариант, в кровотоке было эквивалентно таковому, получаемому при
25 парентеральном, например п/к, в/б, в/м или в/в, введении терапевтически эффективной дозы. В некоторых вариантах выполнения изобретения фармацевтическую композицию, содержащую ПЛ-2 или его вариант, вводят путем в/м или п/к инъекции, особенно путем в/м или п/к инъекции местно в область, в которую должны быть
30 доставлены терапевтические агент или агенты, используемые в соответствии с протоколом противораковой терапии.

Факторы, влияющие на выбор подлежащего введению количества ПЛ-2, включают в себя без ограничения способ введения, частоту введения, конкретное подвергаемое
35 лечению заболевание, тяжесть заболевания, историю болезни, получает ли субъект одновременное лечение другим терапевтическим средством, возраст, рост, массу тела, состояние здоровья и физическое состояние получающего терапию субъекта. Как правило, чем больше масса тела получающего терапию субъекта, тем более высокая доза такого средства является предпочтительной.

40 Для достижения эффективности содержание ПЛ-2 в крови должно превышать определенный уровень в течение определенного времени. Эффективность дозозависима, и более высокие значения содержания ПЛ-2 оказывают более значительные противоопухолевые эффекты. В целях минимизации токсичности
45 содержание ПЛ-2 в крови должно поддерживаться ниже определенного уровня в пределах определенного периода времени и в течение данного периода времени (должен быть обеспечен "период отдыха" для выведения ПЛ-2). То есть содержание лекарственного средства должно быть ниже определенного уровня перед введением
50 следующей дозы. Более короткие периоды отдыха между введением доз приводят к большей токсичности.

В некоторых вариантах выполнения способ лечения большого почечноклеточной карциномой предусматривает цикл лечения низкими дозами ПЛ-2 (1-52 ММЕ) с последующим периодом отдыха для обеспечения "восстановления" пациента от

нежелательных эффектов ПЛ-2. В соответствии со схемой ежесуточного введения может быть введено множество доз ПЛ-2 или его варианта, например 1-52 ММЕ ПЛ-2, или более предпочтительно 9-18 ММЕ ПЛ-2, вводят ежесуточно одной-тремя дозами в сутки в течение 3-6 суток в неделю, повторяемое в течение 1-24 недель, с последующим 5 периодом отдыха. Предпочтительно период отдыха составляет от одной до четырех недель между проведением схем введения. После этого ПЛ-2 может быть введен по новой схеме с обеспечением следующей стимуляции иммунной системы. В некоторых вариантах выполнения второй цикл лечения предусматривает введение 9 ММЕ одной- 10 тремя дозами в сутки в течение трех-шести суток в неделю, повторяемое в течение 1-24 недель, с последующим периодом отдыха.

В некоторых вариантах выполнения способ лечения больного почечноклеточной карциномой предусматривает цикл лечения, состоящий из шести недель лечения 15 низкими дозами ПЛ-2 (9-18 ММЕ) один раз в сутки в течение пяти суток в неделю (qd x 5d) с последующим "периодом отдыха" в течение одной-четырёх недель, в течение которых ПЛ-2 не вводили, и последующего цикла лечения, состоящего из шести недель лечения ПЛ-2 в дозе 9 ММЕ один раз в сутки в течение пяти суток в неделю с 20 последующим периодом отдыха в течение одной-четырёх недель, в течение которых ПЛ-2 не вводили. В некоторых вариантах выполнения этот последующий цикл лечения, состоящий из шести недель лечения ПЛ-2 в дозе 9 ММЕ один раз в сутки в течение пяти суток в неделю с последующим периодом отдыха в течение одной- 25 четырёх недель, в течение которых ПЛ-2 не вводили, повторяют многократно.

В предпочтительном варианте выполнения больной почечноклеточной карциномой 25 получает лечение в виде, во-первых, введения суточной дозы, составляющей 18 ММЕ ПЛ-2, в течение 5 суток на протяжении одной недели; во-вторых, введения суточной дозы, составляющей 9 ММЕ ПЛ-2, в течение 2 суток с последующим введением суточной дозы, составляющей 18 ММЕ ПЛ-2, в течение 3 суток каждой 30 недели, повторяемых в течение 5 недель; в-третьих, отсутствия введения ПЛ-2 в течение 3 недель; в-четвертых, введения суточной дозы, составляющей 9 ММЕ ПЛ-2, в течение 5 суток каждой недели, повторяемого в течение 6 недель; и, в-пятых, отсутствия введения ПЛ-2 в течение 3 недель.

В некоторых вариантах выполнения ПЛ-2, используемый для лечения больного 35 почечноклеточной карциномой, ковалентно конъюгирован с полиэтиленгликолем или с полиоксиэтилированным многоатомным спиртом. В некоторых вариантах выполнения цикл лечения ПЛ-2, конъюгированного с полиэтиленгликолем или с полиоксиэтилированным многоатомным спиртом, предусматривает введение 1-52 40 ММЕ ПЛ-2 через каждые 5 суток - 1 месяц, повторяемое в течение 1-24 недель с последующим периодом отдыха.

В некоторых вариантах выполнения пациенту проводят множественные циклы 45 лечения в соответствии с любым из раскрытых в настоящем описании способов в течение периода, достаточного для формирования, по меньшей мере, частичного опухолевого ответа, например, период времени может составлять, по меньшей мере, 6 месяцев или, по меньшей мере, 12 месяцев. Предпочтительно, период времени достаточен для формирования полного опухолевого ответа. В некоторых вариантах 50 выполнения у больного почечноклеточной карциномой нарушена функция почек ($SCr > 1,5$ мг/дл) либо он не переносит или не подходит для лечения высокими дозами ПЛ-2. Такой пациент может получать лечение низкими дозами ПЛ-2 в соответствии с любым из раскрытых в настоящем описании способов.

Если у субъекта, получающего терапию в соответствии с ранее упомянутыми

схемами введения, наблюдается частичный ответ или рецидив после длительного периода ремиссии, для достижения полной ремиссии заболевания может потребоваться проведение дополнительных курсов лечения. Так, после перерыва, следующего за первым периодом лечения, субъект может пройти один или несколько дополнительных периодов терапевтического лечения IL-2. Такой период перерыва между периодами лечения в настоящем описании называют периодом прекращения. Очевидно, что продолжительность периода прекращения зависит от степени опухолевого ответа (т.е. полный или частичный), достигнутой в результате каждого предыдущего периода терапевтического лечения IL-2.

III. Экспериментальная часть

Ниже приведены примеры конкретных вариантов выполнения настоящего изобретения. Примеры приведены исключительно в иллюстративных целях и не должны быть истолкованы как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Для обеспечения точности использованных количественных значений (например, количеств, температур и т.д.) были приложены определенные усилия, но, разумеется, следует допускать существование некоторых экспериментальных ошибок и отклонений.

Пример 1

Фармацевтическая композиция IL-2 для клинического испытания фазы IV на человеке

Состав IL-2 был изготовлен Chiron Corporation из Emeryville, California под торговым наименованием Proleukin®. IL-2 в этом составе представлял собой рекомбинантно продуцированный негликозилированный мутеин IL-2 человека, называемый алдезлейкином, который отличался от аминокислотной последовательности нативного IL-2 человека делецией первого аланинового остатка и заменой цистеинового остатка в положении 125 сериновым остатком (обозначается как дез-аланил-1, серин-125 интерлейкин-2 человека). Этот мутеин IL-2 экспрессировали в *E. coli* и затем очищали путем диафильтрации и катионообменной хроматографии, как описано в патенте США №4,931,543, включенном в настоящее описание во всей полноте посредством ссылки. Состав IL-2, продаваемый как Proleukin®, поставлялся в виде стерильного от белого до беловатого не содержащего консерванты лиофилизированного порошка во флаконах, содержащих 1,3 мг белка (22 ММЕ).

Пример 2

Критерии отбора больных метастатической почечноклеточной карциномой для лечения IL-2 в ходе клинического испытания фазы IV на человеке

К больным метастатической почечноклеточной карциномой применяли следующие критерии.

Критерии включения:

Пациент страдает гистологически подтвержденной почечноклеточной карциномой (светлоклеточной, папиллярной, смешанной или саркоматоидной опухолью) с признаками метастазирования;

Пациент страдает измеримым и оцениваемым новообразованием, обнаруженным в течение 4 недель перед началом исследования;

Функциональный статус Kamofsky пациента составляет ≥ 60 , что соответствует функциональному статусу (PS) Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 0-2;

Пациенты должны быть старше 18 лет;

Пациенты должны обладать адекватной функцией почек, о которой

свидетельствует содержание креатинина в сыворотке менее 1,8 мг/дл;

Гемоглобин ≥ 10 г/дл; Лейкоциты ≥ 4000 /мл; Тромбоциты ≥ 100000 /мл;

Нормальное содержание тиреостимулирующего гормона (TSH); и

5 Пациент желает и способен дать письменное информированное согласие на участие в этом исследовании, включая все необходимые для исследования процедуры и последующие визиты.

Критерии исключения:

Пациент ранее получал лечение Proleukin®;

10 Больные активным заболеванием центральной нервной системы по данным сканирования с помощью компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ);

Пациент обладает гиперчувствительностью к любому из ингредиентов Proleukin®;

15 Пациент участвует в одновременных клинических испытаниях, предусматривающих введение исследуемых агентов, либо пациенту вводили исследуемые агенты в течение предыдущих четырех недель;

Пациент ранее получал системную терапию по поводу почечноклеточной карциномы (пациенты, перенесшие хирургическое вмешательство по поводу почечноклеточной карциномы, подходят для включения; пациенты, перенесшие лучевую терапию неисследуемого очага, подходят для включения в исследование через две недели после завершения облучения);

Пациент страдает заболеванием сердца класса III или IV New York Heart Association (NYHA);

25 У пациента диагностированы аутоиммунные заболевания, такие как болезнь Крона;

Пациент-женщина беременна или кормит грудью; и

Пациент страдал метастатическим заболеванием без признаков заболевания после хирургической резекции метастазов.

30 Пример 3

Клиническое испытание фазы IV низких доз IL-2, вводимых человеку

Дизайн и цели клинического исследования

Клиническое испытание фазы IV интерлейкина-2 в альтернативных дозах (ILIAD) проектировали как проспективное многоцентровое одностороннее открытое исследование для оценки эффективности и безопасности низких доз Proleukin®, подкожно вводимых больным метастатической почечноклеточной карциномой. Первичным результатом являлся объективный уровень ответа (ORR) $\geq 16\%$. Вторичные ответы включали в себя уровни полного ответа (CR) и частичного ответа (PR), длительность ответа, выживаемость без прогрессии (PF), общая выживаемость (OS) и частота нежелательных явлений (AE). Участники включали в себя клинических исследователей как из профессиональных ассоциаций, так и академических организаций с преобладанием клиницистов-членов ассоциаций. В исследовании ILIAD проводили проверку 270 пациентов, из которых 267 были включены в исследование.

45 Обследования перед лечением включали в себя сбор полного анамнеза, физикальное обследование, полный клинический анализ крови (CBC), биохимический анализ крови, определение содержания тиреостимулирующего гормона (TSH) и надлежащие радиографические исследования для регистрации метастатических очагов. Обследования в ходе лечения включали в себя CBC, биохимический анализ крови, определение содержания TSH и физикальное обследование перед началом каждого нового цикла лечения, CBC перед четвертой неделей каждого цикла лечения и оценка AE при каждом осмотре пациента. Перед началом каждого нового цикла лечения

после цикла 2 необходимо было провести радиографические оценки предварительно определенных метастатических очагов. В индивидуальных регистрационных картах регистрировали оцениваемые зоны метастазов и способы, использованные для проведения таких определений.

5 Схема лечения ILIAD

Все пациенты получали Proleukin® по следующей схеме лечения:

Временной интервал	Лечение Proleukin®
10 Цикл 1, неделя 1	18 ММЕ qd × 5 суток
Цикл 1, недели 2-6	9 ММЕ qd × 2 суток + 18 ММЕ qd × 3 суток
Цикл 1, недели 7-9	отдых
Недели 1-6 последующих циклов	9 ММЕ qd × 5 суток
Недели 7-9 последующих циклов	отдых

15 Proleukin® вводили в дозе 18 миллионов международных единиц (ММЕ)/сутки в течение 5 суток (неделя 1, цикл 1), 9 ММЕ/сутки в течение 2 суток с последующим введением 18 ММЕ/сутки в течение 3 суток (недели 2-6, цикл 1) и 9 ММЕ/сутки в течение 5 суток (недели 1-6, циклы ≥ 2). Все циклы лечения длились в течение девяти недель, причем шесть недель лечение проводили, а три недели не проводили. Лечение
20 предполагалось продолжать в течение, по меньшей мере, двух циклов. Больных прогрессирующей формой заболевания исключали из исследования, тогда как отвечающие на лечение субъекты могли продолжать лечение на усмотрение исследователя. Опухолевый ответ оценивали каждые девять недель до начала
25 прогрессии заболевания в течение срока до двух лет. Пациенты оценивались на выживаемость через один и два года. Выборка подлежащих лечению ILIAD субъектов (ITT) (n=263 пациента) получала, по меньшей мере, одну дозу исследуемого лекарственного средства.

30 Модификации дозы в силу токсичности проводили в соответствии с принципами, оговоренными в протоколе. Пациенты, у которых наблюдалась токсичность класса 3 и более, приостанавливали лечение до исчезновения симптомов и в дальнейшем получали вдвое меньшие дозы. При переносимости проводили постепенное повышение дозы обратно до прописанной в протоколе дозы. Скорость повышения
35 дозы и конечная доза оставались на усмотрение исследователя. В соответствии с протоколом любая целевая доза должна быть достаточно низкой для того, чтобы пациент мог получать Proleukin® амбулаторно, но достаточно высокой для обеспечения всасывания в циркуляторную систему (как правило, доза находится в диапазоне 5-10 ММЕ/сутки при подкожном введении). При токсичности,
40 персистирующей в течение более двух недель, пациента исключали из исследования.

Удалось собрать данные о 270 пациентах всего. Трое из 270 пациентов были исключены на стадии скрининга, а 4 были включены в исследование, но лечение так и не получали. Остальные 263 пациента получали, по меньшей мере, одну дозу
45 исследуемого препарата и подходили для проведения анализов (подлежащая лечению выборка). В соответствии со сведениями о введении 263 пациентам 142 пациента получили два цикла исследуемого лекарственного средства (выполнившая протокол выборка). Шестидесят пять процентов подлежащих лечению пациентов и 70,4% выполнивших протокол пациентов исключали из исследования из-за прогрессии или
50 рецидива заболевания.

Эффективность

После двух циклов лечения исследователь оценивал пациентов на предмет прогрессии или ответа (см. таблицу ниже). Различали следующие категории ответа:

"полный ответ" (CR), "частичный ответ" (PR), "прогрессирующее заболевание" (PD), "стабильное заболевание" (SD) и "не определено" (UD).

Шестерых из 263 подлежащих лечению пациентов (2,3%) исследователь оценивал как показавших полный ответ и 12 (4,6%) - как показавших частичный ответ. У сорока восьми подлежащих лечению пациентов (18,3%) наблюдалось стабильное заболевание, а у 156 (59,3%) заболевание находилось в состоянии прогрессии. Тридцать восемь подлежащих лечению пациентов (14,4%) сочли неопределяемыми, и у 3 (1,1%) оценки отсутствовали. Общий уровень ответа (полного и частичного ответов) составлял 6,8% при 95% доверительном интервале (CI) 4,1-10,6%.

Шестерых из 142 выполнивших протокол (т.е. получивших два цикла исследуемого лекарственного средства) пациентов (4,2%) исследователь оценивал как показавших полный ответ и 11 (7,7%) - как показавших частичный ответ. Общий уровень ответа (полного и частичного ответов) составлял 12,0% при 95% доверительном интервале 7,1-18,5%.

Оценка исследователем наилучшего ответа

	Подлежащие лечению (N=263)	Выполнившие протокол (N=142)
Полный ответ	6 (2,3%)	6 (4,2%)
Частичный ответ	12 (4,6%)	11 (7,7%)
Стабильное заболевание	48 (18,3%)	37 (26,1%)
Прогрессирующее заболевание	156 (59,3%)	87 (61,3%)
Невозможно определить	38 (14,4%)	0
Отсутствующие	3 (1,1%)	1 (0,7%)
Общий уровень ответа (95% CI)	6,8 (4,1-10,6)	12,0 (7,1-18,5)

Среди 263 подлежащих лечению пациентов 169 (64,3%) летальных исходов произошло в течение последующего двухлетнего периода. Среди 142 выполнивших протокол пациентов произошло 73 (51,4%) летальных исходов. В следующей таблице суммированы результаты анализа выживаемости.

Выживаемость

	Подлежащие лечению (N=263)	Выполнившие протокол (N=142)
Число летальных исходов	169 (64,3%)	73 (51,4%)
Медианная выживаемость в годах (95% CI)	1,08 (0,97, 1,27)	1,65 (1,39, 2,11)
Уровень однолетней выживаемости (95% CI)	0,54 (0,48, 0,60)	0,74 (0,67, 0,81)
Уровень двухлетней выживаемости (95% CI)	0,32 (0,26, 0,38)	0,45 (0,36, 0,55)

Подгруппы по функции почек

Анализ по подгруппам данных исследования ILIAD проводили путем сравнения пациентов с нормальной функцией почек (содержание креатинина в сыворотке (SCr) ≤ 1,5 мг/дл) с пациентами с нарушенной функцией почек (SCr > 1,5 мг/дл).

Сравнение подгрупп нормальной и нарушенной функции показало сходную частоту нефрэктомии (73 по сравнению с 70%), PS=0 (28 по сравнению с 23%), PS=1 (59 по сравнению с 60%) и PS=2-3 (13 по сравнению с 17%) соответственно. См. приведенную ниже таблицу.

	ILIAD (ITT)	ILIAD (SCr ≤ 1,5 мг/дл)	ILIAD (SCr > 1,5 мг/дл)
Оцениваемые пациенты	n=263	n=209	n=53
Нефрэктомия, %	72	73	70

PS=0, %	27	28	23
PS=1, %	59	59	60
PS=2-3, %	14	13	17

5 Сравнение эффективности для пациентов с нормальной и нарушенной функцией почек

Было обнаружено, что исходы для пациентов с нормальной и нарушенной функцией почек были сходны. На фиг.1-3 приведены графики, на которых проводится сравнение относительной эффективности низких доз IL-2 у больных метастатической почечно-клеточной карциномой, характеризующихся нормальной (содержание креатинина в сыворотке (SCr) ≤ 1,5 мг/дл) и нарушенной функцией почек (SCr > 1,5 мг/дл) после введения в соответствии с указанными выше схемами. По сравнению с пациентами с нормальной функцией почек для пациентов с нарушенной функцией почек были характерны сходные или более высокие встречаемости PR (5,7 по сравнению с 4,3%), ORR (7,6 по сравнению с 6,7%), медианная PFS (0,34 по сравнению с 0,33 года), PFS - 1 год (28 по сравнению с 18%), PFS - 2 года (16 по сравнению с 10%) и OS - 2 года (39 по сравнению с 31%). CR (1,9 по сравнению с 2,4%), медианная выживаемость (1,0 по сравнению с 1,1 года) и OS - 1 год (52 по сравнению с 55%) были слегка меньше для подгруппы нарушенной функции почек. С результатами сравнения эффективности лечения в подгруппах по функции почек можно ознакомиться в приведенной ниже таблице.

	ILIAD (ITT)	ILIAD (SCr ≤ 1,5 мг/дл)	ILIAD (SCr > 1,5 мг/дл)
25 Оцениваемые пациенты	n=263	n=209	n=53
CR, %	2,3	2,4	1,9
PR, %	4,6	4,3	5,7
ORR, %	6,8 (4,1-10,6)	6,7 (3,7-11,0)	7,6 (2,1-18,2)
30 Средняя продолжительность ответа, лет	1,7 (1,1-1,9)	1,5 (1,0-1,7)	NE
Медианная PFS, лет	0,33 (0,31-0,34)	0,33 (0,30-0,34)	0,34 (0,28-0,66)
PFS - 1 год, %	20 (15-25)	18	28
PFS - 2 года, %	11 (7-15)	10	16
Медианное время выживания, лет	1,1 (1,0-1,3)	1,1 (0,9-1,3)	1,0 (0,9-2,5)
35 OS - 1 год, %	54 (48-60)	55	52
OS - 2 года, %	32 (26-38)	31	39

Если подгруппы по функции почек контролировали по предшествующей нефрэктомии и функциональному статусу, PFS и OS оставались сравнимыми. Для расчета отношения шансов и 95% доверительных интервалов по Wald для ORR с применением стандартных программ SAS были получены модели одномерной безусловной логистической регрессии. Для пациентов с нарушенной функцией почек количественное значение ORR было ниже такового для пациентов с нормальной функцией почек, если подгруппы контролировались по нефрэктомии (отношение шансов = 0,52), PS=0 (отношение шансов = 0,57) и PS=1 (отношение шансов = 0,63). Однако эти различия не были статистически значимыми и должны интерпретироваться с осторожностью по причине малого количества отвечающих на лечение субъектов в подгруппах нормальной (n=14) и нарушенной (n=4) функции почек. Для получения относительных рисков и 95% доверительных интервалов для PFS и OS были использованы регрессионные модели пропорциональных рисков Кокса. PFS для пациентов с нарушенной функцией почек было сходным с таковым для пациентов с нормальной функцией почек, если подгруппы контролировались по

нефрэктомии (отношение рисков = 0,86), отсутствию нефрэктомии (отношение рисков = 1,09), PS=0 (отношение рисков = 1,15) и PS=1 (отношение рисков = 0,71). Значение выживаемости для пациентов с нарушенной функцией почек также было сходным с таковым для пациентов с нормальной функцией почек, если подгруппы контролировались по нефрэктомии (отношение рисков = 0,92), отсутствию нефрэктомии (отношение рисков = 1,03), PS=0 (отношение рисков = 1,11) и PS=1 (отношение рисков = 0,82). См. приведенную ниже таблицу.

Одномерная оценка подгрупп ILIAD (SCr>1,5 по сравнению с ≤1,5 мг/дл)			
ORR	Отношение шансов	95% Wald CI	Количество пациентов
Нефрэктомия	0,52	0,11-2,39	189
Без нефрэктомии	NE	NE	73
PS=0	0,57	0,06-5,02	70
PS=1	0,63	0,07-5,42	155
PFS	Отношение рисков	95% CI	Количество пациентов
Нефрэктомия	0,86	0,58-1,27	189
Без нефрэктомии	1,09	0,61-1,93	73
PS=0	1,15	0,58-2,29	70
PS=1	0,71	0,47-1,07	155
OS	Отношение рисков	95% CI	Количество пациентов
Нефрэктомия	0,92	0,58-1,46	189
Без нефрэктомии	1,03	0,54-1,95	73
PS=0	1,11	0,46-2,68	70
PS=1	0,82	0,51-1,31	155

NE=Не поддается оценке

Сравнение с описанными ранее контролями

Поиск по литературе позволил выявить восемь публикаций, в которых в ходе исследования больных почечноклеточной карциномой, ранее не получавших иммунотерапию, использовали контрольные группы плацебо или псевдоплацебо (Pyrhonen et al. (1999) J. Clin. Oncol. 17:2859-2867; Motzer et al. (1999) J. Clin. Oncol. 17:2530-40; Ritchie et al. (1999) Lancet 353:14-17; Kriegmair et al. (1995) Urology 45:758-762; Jones et al. (1993) Cancer Biother. 8:275-288; Gleave et al. (1998) New Engl. J. Med. 338:1265-1271; Steineck et al. (1990) Acta Oncol. 29:155-162; и Osband et al. (1990) Lancet 335:994-998). Результаты для контрольных групп в этих опубликованных исследованиях сильно различались, наиболее вероятно, благодаря различиям в контрольном лечении (отсутствующем, гормональном или химиотерапевтическом), дизайне исследования, критериях отбора пациентов и предшествующем лечении пациентов. См. приведенную ниже таблицу.

Данные по описанным ранее контролям

	Ritchie 1999	Pyrhonen 1999	Motzer 1999	Gleave 1998	Kriegmair 1995	Jones 1993	Steineck 1990	Osband 1990
Оцениваемые пациенты	168	n=81	=274	=90	n=35	377	=30	=45
Контроль	MPA	VLB	химио или гормоны	плацебо	MPA	химио	MPA	CIM
PS=0	UK	UK	0	36	UK	37	UK	54
PS=1	UK	UK	71	55	среднее	63	UK	UK
PS≥2	UK	UK	29	9	UK	0	UK	UK
Нефрэктомия, %	57	88	65	78	UK	79	90	75
Медианный возраст	55-65	62 [39-77]	58 [18-82]	62	66 [47-79]	58 [22-82]	62 [40-77]	63 [34-84]
CR, %	0	1,2	UK	3,3	0	0,80	3,3 (0-17)	0
PR, %	7,1	1,2	UK	3,3	0	4,2	0	4,8
ORR, %	7,1	2,4	UK	6,6 (2,7-14,5)	0	5,0 (3-7)	3,3 (0-17)	4,8
Медианная PFS, лет	0,25	0,17	UK	0,16 (0,14-0,32)	UK	UK	UK	UK
PFS-1 г., %	10	4,1	UK	4,0	UK	UK	UK	UK
PFS-2 г., %	1,1	4,1	UK	NE	UK	UK	UK	UK
Медианное время выживания, лет	0,54	0,73	0,53 (0,43-0,63)	1,3 (0,5-1,5)	0,83	0,63	0,58	0,73
OS-1 год, %	31	38	UK	54	30	32	26	45
OS-2 года, %	12	19	UK	9	20	11	16	NE

95% CI приведены в круглых скобках, интервалы приведены в квадратных скобках

UK = неизвестно, NE = не поддается оценке

MPA = медроксипрогестерон, VLB = винбластин, CIM = циметидин

Исходы в подгруппе нормальной функции почек, подгруппе нарушенной функции почек и ИТТ выборке ILIAD были более благоприятны, чем большая часть зафиксированных исходов в описанных ранее контрольных группах. Процентная доля пациентов с PS=0, PS=1 и до нефрэктомии в подгруппах по функции почек, получавших ILIAD, и ИТТ выборке составляла примерно медианное значение интервала для описанных ранее контрольных групп, что позволяло предположить, что выборка пациентов, получавших ILIAD, сравнима с таковыми описанных ранее контролей (см. фиг.3). Напротив, ИТТ выборка и подгруппы по функции почек, получавшие ILIAD, количественно характеризовались большинством (43/50, 86%) исходов, свидетельствующих об эффективности, более благоприятным по сравнению с описанными ранее контролями (см. фиг.4). Результаты в подгруппах по функции почек и ИТТ выборке были количественно такими же или ниже по сравнению с 7/50 (14%) исходов, свидетельствующих об эффективности, для описанных ранее контролей: CR в исследовании Steineck (1990); PR в исследовании Osband (1990); PR и ORR в исследовании Ritchie (1999); и CR, медианная выживаемость и OS-1 год в исследовании Gleave (1998). Исследование ILIAD давало более благоприятные конечные результаты, чем таковые в описанных ранее контролях по большинству исходов в части ответа (16/21, 76%), PFS (8/8, 100%) и выживаемости (19/21, 90%).

Кроме того, получавшие ILIAD пациенты, стратифицированные по группам риска, характеризовались более высоким уровнем выживаемости, чем описанные ранее контроли. Уровень выживаемости пациентов, получавших низкие дозы IL-2, сравнивали с таковым в описанной ранее контрольной группе (описанной в Jones et al., supra) пациентов, получавших химиотерапию вместо IL-2. Пациентов подразделяли на группы риска в соответствии с системой Jones стратификации по факторам риска, которая основана на сочетании выявленных факторов риска: ECOG PS>1, время от постановки диагноза до начала лечения <2 лет и более одного метастатического очага. Пациентов подразделяли на следующие группы риска по Jones: низкого

риска (0-1 факторов риска), умеренного риска (2 фактора риска) и неблагоприятного прогноза (все 3 фактора риска). На фиг.5 показаны отдельные графики процентной доли выживших субъектов по времени в годах для каждой из групп риска. Пациенты во всех трех группах риска по Jones, получавшие низкие дозы IL-2 в соответствии со схемой, описанной в примере 3, характеризовались количественно более высоким уровнем выживаемости по сравнению с описанными ранее контролями. Однако различие выживаемости между получавшими ILIAD пациентами и описанными ранее контролями снижается по мере снижения благоприятности группы риска. См.

приведенную ниже таблицу.

Группа риска	ILIAD (низкий)	Контроль (низкий)	ILIAD (умеренный)	Контроль (умеренный)	ILIAD (высокий)	Контроль (высокий)
Оцениваемые пациенты	n=70	n=118	n=125	n=140	n=63	n=94
Медианное время выживания, лет	2,0 (1,3-2,2)	0,96	1,1 (0,93-1,5)	0,55	0,61 (0,46-0,80)	0,43
OS-1 год, %	71 (60-82)	46	55 (46-64)	27	33 (21-45)	14
OS-2 года, %	47 (34-61)	17	32 (22-41)	10	17 (7-28)	8

95% CI приведен в круглых скобках

Токсичность

Нежелательные явления определялись исследователем как "не имеющие отношения", "возможно относящиеся" или "вероятно относящиеся" к исследуемому лечению. Наиболее частым нежелательным эффектом была усталость (41,1% пациентов), за которой следовали озноб (36,9%), тошнота (36,5%), лихорадка (32,7%), рвота NOS (22,1%) и отсутствие аппетита (20,9%). Следующие связанные с лечением нежелательные эффекты наблюдали, по меньшей мере, у 10% пациентов (см.

приведенную ниже таблицу):

Преобладающее состояние	Подлежащие лечению (N=263)	
	Пациенты (%)	
Усталость	108 (41,1)	
Озноб	97 (36,9)	
Тошнота	96 (36,5)	
Лихорадка	86 (32,7)	
Рвота NOS	58 (22,1)	
Отсутствие аппетита	55 (20,9)	
Диарея NOS	49 (18,6)	
Реакция в месте инъекции NOS	48 (18,3)	
Дерматит NOS	41 (15,6)	
Миалгия	28 (10,6)	

Терапия низкими дозами Proleukin® менее нефротоксична, чем высокие дозы Proleukin®. Было показано, что высокие дозы Proleukin® вызывают значительные нефротоксические эффекты, измеряемые по среднему пиковому SCr >4 мг/дл в первом цикле лечения и >6 мг/дл во втором цикле терапии пациентов с фоновым повышенным SCr (Belldegrun et al., 1987). Меньшее, но все же резкое повышение среднего пикового SCr (до 3 мг/дл) наблюдали у пациентов с нормальным фоновым SCr. Значения SCr возвращались к фоновым уровням в течение 30 суток у 60% пациентов с нарушенной функцией почек по сравнению с 98% пациентов с нормальной функцией почек. Эти результаты позволяют предположить, что высокие дозы Proleukin® вызывают более высокую нефротоксичность у пациентов с нарушенной функцией почек по сравнению с таковой пациентов с нормальной функцией почек. Напротив, низкие дозы Proleukin® вызывали лишь малое повышение SCr в ходе лечения (как правило, <2 мг/дл), которое было сравнимо в подгруппах нормальной и нарушенной функции почек. Повышения SCr >3 мг/дл были

редки в обеих подгруппах. Ожидается, что пациенты с колебаниями SCr в этом диапазоне (<3 мг/дл) не будут страдать тяжелыми симптомами или предъявлять особые требования к лечению.

5 Частота и степень выраженности нежелательных эффектов (АЕ), как правило, были сравнимы между подгруппами пациентов с нормальной и нарушенной функцией почек. По сравнению с подгруппой нормальной функции подгруппа нарушенной функции почек характеризуется несколько меньшим количеством случаев тяжелых нежелательных эффектов (SAE) вообще (26 по сравнению с 30%), АЕ (77 по сравнению с 89%) и связанных с лекарственным средством АЕ (76 по сравнению с 81%).

10 Количество случаев АЕ, приводящих к приостановке участия в исследовании, было несколько выше в подгруппе нарушенной функции почек (30 по сравнению с 25%). Как в подгруппе нормальной функции, так и в подгруппе нарушенной функции почек наибольшая процентная доля АЕ относилась к степени выраженности 3 (42 по сравнению с 34%), за которой следовали степень выраженности 2 (33 по сравнению с 23%), степень выраженности 4 (9 по сравнению с 13), степень выраженности 1 (4 по сравнению с 8%) и степень выраженности 5 (1 по сравнению с 0%) соответственно.

15 Наиболее частые нежелательные эффекты (возникшие у >10% пациентов из каждой подгруппы), как правило, были сравнимы между подгруппами пациентов с нормальной и нарушенной функцией почек и включали в себя усталость (43 по сравнению с 45%), озноб (38 по сравнению с 36%), лихорадка (39 по сравнению с 23%), реакция в месте инъекции (18 по сравнению с 21%), тошнота (39 по сравнению с 36%), рвота (25 по сравнению с 19%), диарея (20 по сравнению с 19%), дерматит NOS (18 по сравнению с 11%), отсутствие аппетита (23 по сравнению с 19%), кашель (20 по сравнению с 9%), затрудненное дыхание NOS (13 по сравнению с 26%), бессонница (9 по сравнению с 17%), артралгия (12 по сравнению с 13%), миалгия (11 по сравнению с 9%), отек нижних конечностей (8 по сравнению с 17%), снижение массы тела (11 по сравнению с 4%) и гипотензия NOS (6 по сравнению с 11%) соответственно.

20 Нефротоксичность низких доз Proleukin® была сходна между подгруппами по функции почек. Нефротоксичность терапии низкими дозами Proleukin® оценивали путем сравнения уровней SCr в ходе каждого цикла лечения с фоновыми измерениями. Хотя пиковые уровни SCr слегка повышались в ходе лечения большого количества пациентов, пиковое SCr>2,0 мг/дл наблюдали лишь у пяти пациентов в подгруппе нарушенной функции почек и у восьми пациентов в подгруппе нормальной функции почек. Пиковое SCr>3,0 мг/дл было нетипично и наблюдалось лишь у одного пациента в подгруппе нарушенной функции почек и у двух пациентов в подгруппе нормальной функции почек.

40 Заключение

Низкие дозы интерлейкина-2 безопасны и эффективны для лечения больных метастатической почечноклеточной карциномой с нарушенной функцией почек, которые не подходят для проведения терапии высокими дозами IL-2. Результаты клинического испытания фазы IV свидетельствуют о том, что низкие дозы Proleukin® вызывают сходные уровни ответа, значения выживаемости без прогрессии (PFS) и значения общей выживаемости (OS) у пациентов как с нормальной функцией, так и с нарушенной функцией почек. Количество свидетельствующих об эффективности исходов у пациентов с нормальной и нарушенной функцией почек, получавших лечение низкими дозами Proleukin®, как правило, было выше, чем таковое, зафиксированное в описанных ранее контрольных группах. Нефротоксичность низких доз Proleukin® была сходна между подгруппами по функции почек и гораздо ниже,

чем наблюдаемая при использовании высоких доз Proleukin® у пациентов с нарушенной функцией почек.

Пример 4

Лечение метастатической почечноклеточной карциномы путем введения низких доз ИЛ-2

Состав ИЛ-2 вводили пациентам с гистологически подтвержденным диагнозом метастатической почечноклеточной карциномы. Концентрация ИЛ-2 в составе составляла около 22 ММЕ. Состав ИЛ-2 вводили с помощью подкожной инъекции.

Лечение состояло из двух 9-недельных циклов. Первый цикл состоял из шести недель лечения низкими дозами ИЛ-2, составлявшими 9-18 ММЕ, один раз в сутки в течение пяти суток в неделю (qd × 5d) с последующим трехнедельным периодом отдыха.

Второй цикл состоял из шести недель лечения низкими дозами ИЛ-2, составлявшими 9 ММЕ один раз в сутки в течение пяти суток в неделю (qd × 5d) с последующим трехнедельным периодом отдыха. Циклы лечения повторяли у отвечающих на лечение пациентов.

Хотя предпочтительные варианты выполнения проиллюстрированы и описаны, очевидно, что в них могут быть сделаны различные изменения без выхода за пределы сущности и объема изобретения.

Формула изобретения

1. Способ лечения человека, страдающего почечно-клеточной карциномой, причем способ включает:

а) во-первых, введение суточной дозы, составляющей 18 ММЕ мутеина ИЛ-2, в течение 5 суток на протяжении одной недели;

б) во-вторых, введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ мутеина ИЛ-2, в течение 2 суток с последующим введением суточной дозы, составляющей 18 ММЕ мутеина ИЛ-2, в течение 3 суток каждой недели, повторяемые в течение 5 недель;

в) в-третьих, отсутствие введения мутеина ИЛ-2 в течение 3 недель;

г) в-четвертых, введение суточной дозы, составляющей 9 ММЕ мутеина ИЛ-2, в течение 5 суток каждой недели, повторяемое в течение 6 недель; и

е) в-пятых, отсутствие введения мутеина ИЛ-2 в течение 3 недель.

2. Способ по п.1, в котором указанный мутеин ИЛ-2 представляет собой рекомбинантно продуцированный ИЛ-2, содержащий аминокислотную последовательность, характеризующуюся, по меньшей мере, 70%-ной идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности ИЛ-2 человека.

3. Способ по п.2, в котором указанный мутеин ИЛ-2 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся, по меньшей мере, 80%-ной идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности ИЛ-2 человека.

4. Способ по п.3, в котором указанный мутеин ИЛ-2 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся, по меньшей мере, 90%-ной идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности ИЛ-2 человека.

5. Способ по п.4, в котором указанный мутеин ИЛ-2 содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся, по меньшей мере, 95%-ной идентичностью последовательности по отношению к аминокислотной последовательности ИЛ-2 человека.

6. Способ по п.1, в котором указанный мутеин IL-2 представляет собой дез-аланил-1, серин-125 человеческий интерлейкин-2 (алдезлейкин).

7. Способ по п.1, в котором указанный мутеин IL-2 выбран из группы, состоящей из Ala₁₀₄ Ser₁₂₅ IL-2; дез-Ala₁ дез-Pro₂ дез-Thr₃ дез-Ser₄ Ala₁₀₄, Ser₁₂₅ IL-2; и дез-Ala₁ дез-Pro₂ дез-Thr₃ дез-Ser₄ дез-Ser₅ дез-Ser₆ IL-2.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором мутеин IL-2 конъюгирован с полиэтиленгликолем.

9. Способ по п.8, в котором полиэтиленгликоль характеризуется средней молекулярной массой от 1000 до 40000 Да.

10. Способ по п.8, в котором полиэтиленгликоль характеризуется средней молекулярной массой от 2000 до 20000 Да.

11. Способ по п.8, в котором полиэтиленгликоль характеризуется средней молекулярной массой от 3000 до 12000 Да.

12. Способ по любому пп.1-7, в котором мутеин IL-2 ковалентно конъюгирован с полиоксиэтилированным многоатомным спиртом.

13. Способ по п.12, в котором полиоксиэтилированный многоатомный спирт выбран из группы, состоящей из полиоксиэтилированного сорбита, полиоксиэтилированной глюкозы и полиоксиэтилированного глицерина.

14. Способ по п.12, в котором полиоксиэтилированный многоатомный спирт представляет собой полиоксиэтилированный глицерин.

15. Способ по п.14, в котором полиоксиэтилированный глицерин характеризуется средней молекулярной массой от 1000 до 40000 Да.

16. Способ по п.1, в котором указанная почечно-клеточная карцинома является метастатической.

17. Способ по п.1, в котором у указанного субъекта проводится множество циклов лечения в течение периода времени, достаточного для достижения, по меньшей мере, частичного опухолевого ответа.

18. Способ по п.17, в котором период времени составляет, по меньшей мере, 6 месяцев.

19. Способ по п.17, в котором период времени составляет, по меньшей мере, 12 месяцев.

20. Способ по п.17, в котором достигается полный опухолевый ответ.

21. Способ по п.1, в котором указанный мутеин IL-2 вводят путем подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутривенного, перорального, легочного, назального, местного или чрескожного введения или введения с помощью инфузии или суппозитория.

22. Способ по п.21, в котором указанный мутеин IL-2 вводят подкожно.

23. Способ по п.1, в котором функция почек указанного пациента нарушена.

24. Способ по п.1, в котором указанный пациент не переносит лечение высокими дозами IL-2.

25. Применение мутеина IL-2 для производства лекарственного препарата для лечения человека, страдающего почечно-клеточной карциномой, в соответствии с любым из предшествующих пунктов.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Chiron Corporation

<120> Способы лечения почечноклеточной карциномы

<130> PP023880.0003

<150> 60/647,496

<151> 2005-01-27

<160> 1

<170> PatentIn версия 3.3

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

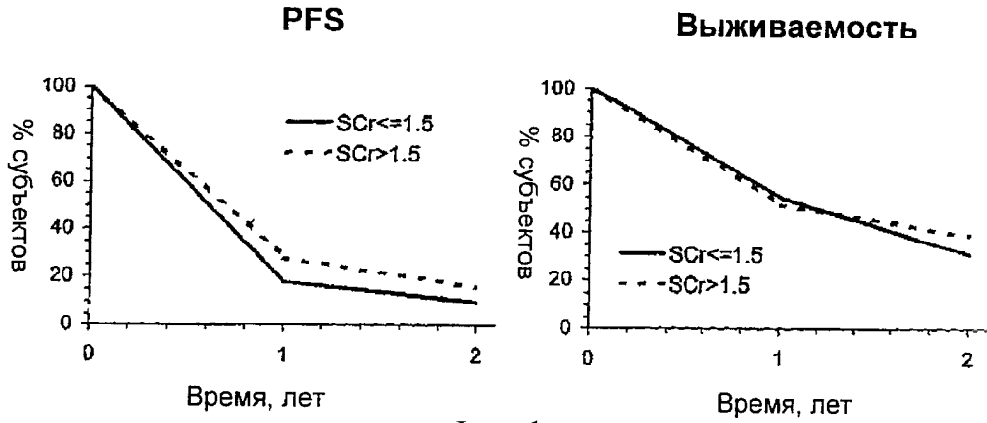
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95

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

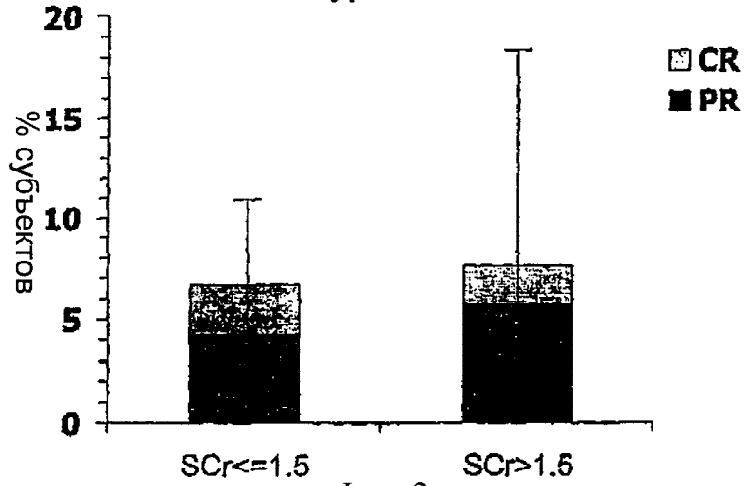
Ile Ser Thr Leu Thr
 130

Свидетельствующие об эффективности исходы в подгруппах по функции почек сходны



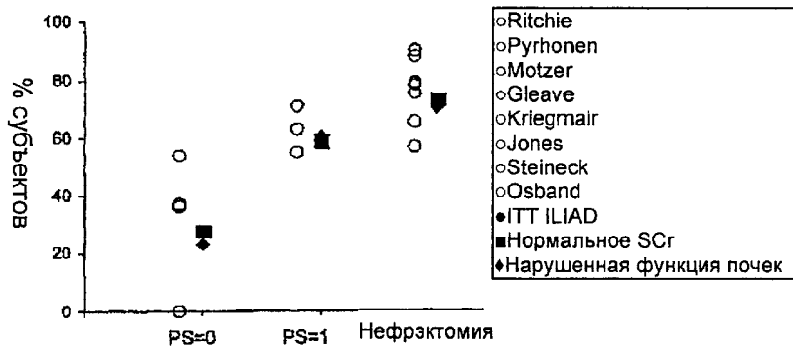
Фиг. 1

Общий уровень ответа



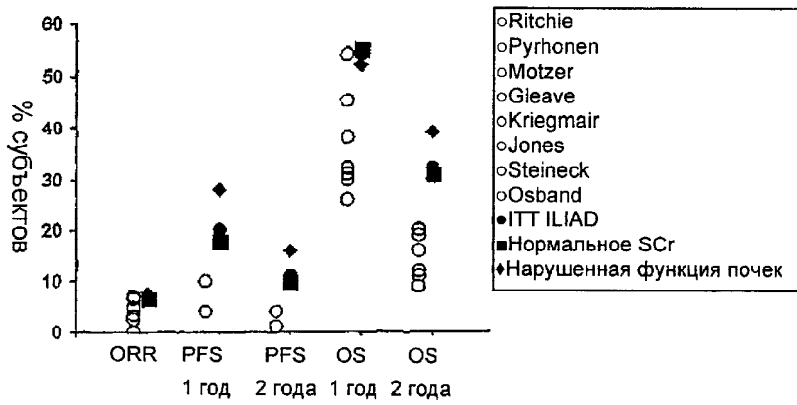
Фиг. 2

Характеристики получавших ILIAD подгрупп по функции почек сходны с описанными ранее контролями

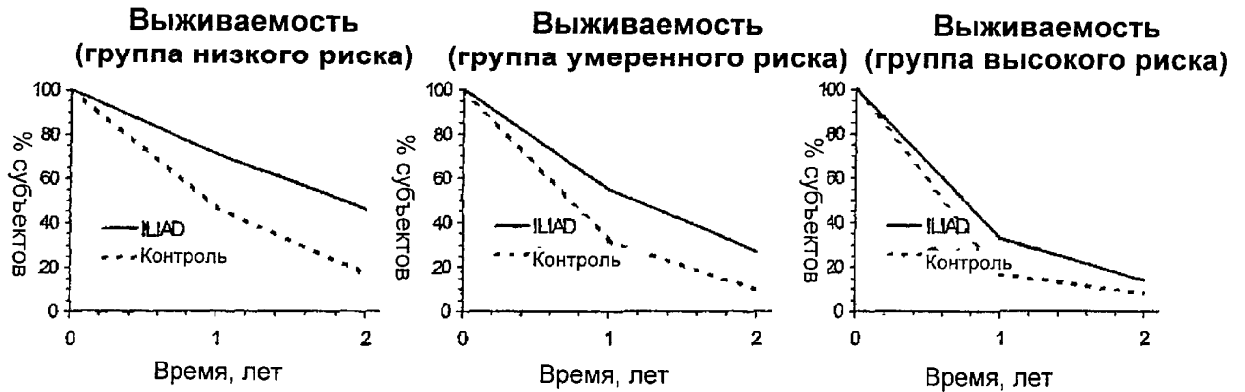


Фиг. 3

Исходы в получавших ILIAD подгруппах по функции почек более благоприятны по сравнению с описанными ранее контролями



Фиг. 4



Фиг. 5