



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115916242 A

(43) 申请公布日 2023.04.04

(21) 申请号 202180042991.8

(22) 申请日 2021.05.10

(30) 优先权数据

63/022,853 2020.05.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/031611 2021.05.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/231316 EN 2021.11.18

(71) 申请人 奥克梅斯制药爱尔兰有限公司

地址 爱尔兰都柏林

(72) 发明人 T·A·蔡丹 M·卡拉里亚

F·O·格布米塔

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 陈文平

(51) Int.Cl.

A61K 38/20 (2006.01)

权利要求书3页 说明书19页 附图6页

(54) 发明名称

IL-2融合多肽组合物及其制备和使用方法

(57) 摘要

本文提供包含多肽的组合物,所述多肽包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的白细胞介素-2(IL-2),以及制备和使用此类组合物的方法。

1. 一种组合物,所述组合物包含:
 - a) 约1mg至约50mg包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2的多肽;
 - b) 蔗糖;
 - c) 柠檬酸盐缓冲剂;和
 - d) 聚山梨醇酯20。
2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的氨基酸序列。
3. 如权利要求1所述的组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。
4. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约2.2mg所述多肽。
5. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约11mg所述多肽。
6. 如权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约33mg所述多肽。
7. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约100mg至约120mg蔗糖。
8. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约110mg蔗糖。
9. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约4.0mg至约6.0mg柠檬酸根阴离子。
10. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约5.0mg柠檬酸根阴离子。
11. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含柠檬酸:柠檬酸三钠二水合物的质量比在约1:10至约1:2之间的柠檬酸和柠檬酸三钠二水合物。
12. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含柠檬酸:柠檬酸三钠二水合物的质量比为约1:9的柠檬酸和柠檬酸三钠二水合物。
13. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含柠檬酸:柠檬酸三钠二水合物的质量比为约1:2的柠檬酸和柠檬酸三钠二水合物。
14. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约0.20mg至约0.24mg聚山梨醇酯20。
15. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约0.22mg聚山梨醇酯20。
16. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物为冻干饼。
17. 如权利要求16所述的组合物,其中所述冻干饼溶解在水中产生pH为约5.5至约6.5的水溶液。
18. 如权利要求17所述的组合物,其中所述冻干饼溶解在水中产生pH为约6.1的水溶液。
19. 如权利要求16至18中任一项所述的组合物,其中所述冻干饼溶解在水中产生具有约160至约230mOsm/kg的渗透压的水溶液。
20. 如权利要求19所述的组合物,其中所述冻干饼溶解在水中产生具有约179mOsm/kg的渗透压的水溶液。
21. 如权利要求16至18中任一项所述的组合物,其中所述冻干饼溶解在氯化钠溶液中产生具有约240至约340mOsm/kg的渗透压的水溶液。

22. 如权利要求21所述的组合物,其中所述氯化钠溶液包含约0.1%NaCl至约0.5%NaCl。
23. 如权利要求21所述的组合物,其中所述氯化钠溶液包含约0.12%NaCl至约0.41%NaCl。
24. 如权利要求21所述的组合物,其中所述氯化钠溶液包含约0.02M NaCl至约0.07M NaCl。
25. 如权利要求1至15中任一项所述的组合物,其中所述组合物为水溶液。
26. 如权利要求25所述的组合物,其中所述组合物包含约1mg/mL所述多肽。
27. 如权利要求26所述的组合物,其中所述组合物为包含约2.2mg所述多肽的2.2ml水溶液。
28. 如权利要求25所述的组合物,其中所述组合物包含约5mg/mL所述多肽。
29. 如权利要求28所述的组合物,其中所述组合物为包含约11mg所述多肽的2.2ml水溶液。
30. 如权利要求25所述的组合物,其中所述组合物包含约15mg/mL的所述多肽。
31. 如权利要求30所述的组合物,其中所述组合物为包含约33mg所述多肽的2.2ml水溶液。
32. 如权利要求25至31中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约45mg/mL至约55mg/mL蔗糖。
33. 如权利要求32所述的组合物,其中所述组合物包含约50mg/mL蔗糖。
34. 如权利要求25至33中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约10mM至约20mM柠檬酸盐缓冲剂。
35. 如权利要求34所述的组合物,其中所述组合物包含约12mM柠檬酸盐缓冲剂。
36. 如权利要求25至35中任一项所述的组合物,其中所述柠檬酸盐缓冲剂由含2.03mg/mL柠檬酸三钠二水合物和0.97mg/mL柠檬酸一水合物的组合的水溶液形成。
37. 如权利要求25至36中任一项所述的组合物,其中所述组合物包含约0.09mg/mL至约0.11mg/mL聚山梨醇酯20。
38. 如权利要求37所述的组合物,其中所述组合物包含约0.1mg/mL聚山梨醇酯20。
39. 如权利要求25至38中任一项所述的组合物,其中所述组合物的pH为约5.5至约6.5。
40. 如权利要求36所述的组合物,其中所述组合物的pH为约6.1。
41. 如权利要求25至40中任一项所述的组合物,其中所述组合物的渗透压为约160至约230mOsm/kg。
42. 如权利要求41所述的组合物,其中所述组合物的渗透压为约179mOsm/kg。
43. 如权利要求25至42中任一项所述的组合物,其中所述水溶液包含约0.03mg/mL所述多肽至约0.2mg/mL所述多肽。
44. 一种通过冻干如权利要求25至44中任一项所述的组合物制成的冻干组合物。
45. 如前述权利要求中任一项所述的组合物,其中所述组合物为单一单位剂量的所述多肽。
46. 一种包含如前述权利要求中任一项所述的组合物的制品。
47. 如权利要求46所述的制品,所述制品为玻璃小瓶。

48. 一种制备冻干组合物的方法, 所述方法包括冻干如权利要求25至43中任一项所述的水溶液。

49. 一种制备水性组合物的方法, 所述方法包括将如权利要求16或44所述的组合物溶解在水性溶剂中。

50. 如权利要求49所述的方法, 其中所述水性溶剂包含注射用水。

51. 如权利要求49所述的方法, 其中所述水性溶剂包含氯化钠溶液。

52. 如权利要求51所述的方法, 其中所述氯化钠溶液包含约0.1% NaCl至约0.5% NaCl。

53. 如权利要求51所述的方法, 其中所述氯化钠溶液包含约0.12% NaCl至约0.41% NaCl。

54. 如权利要求51所述的方法, 其中所述氯化钠溶液包含约0.02M NaCl至约0.07M NaCl。

55. 如权利要求51至54中任一项所述的方法, 其中水性组合物包含约240至约340mOsm/kg的渗透压。

56. 如权利要求49至55中任一项所述的方法, 其中将所述水性组合物的pH调节至约6.1。

57. 如权利要求49至56中任一项所述的方法, 其中用碱将所述水性组合物的pH调节至约6.1。

58. 如权利要求57所述的方法, 其中所述碱为氢氧化钠。

59. 如权利要求49至58中任一项所述的方法, 其中所述水性组合物进一步用包含约1% (w/w) 表面活性剂的水溶液稀释。

60. 如权利要求59所述的方法, 其中所述表面活性剂为聚山梨醇酯20。

61. 如权利要求59所述的方法, 其中所述水溶液还包含约0.1% (w/w) 柠檬酸一水合物、0.2% (w/w) 柠檬酸三钠二水合物和98.7% (w/w) 注射用水。

62. 一种活化受试者的自然杀伤细胞(NK)细胞的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求25至43中任一项所述的组合物。

63. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者施用有效量的如权利要求25至43中任一项所述的组合物。

64. 如权利要求63所述的方法, 其中所述癌症为肾细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌或肺癌。

65. 如权利要求63或64所述的方法, 其中所述癌症包括难治性实体瘤。

IL-2融合多肽组合物以及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年5月11日提交的美国临时申请序号63/022,853的权益,所述临时申请的全部公开内容以引用的方式并入本文。

发明领域

[0003] 本公开涉及包含多肽的组合物,所述多肽包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的白细胞介素-2 (IL-2),以及制备和使用此类组合物的方法。

背景技术

[0004] 包含与IL-2R α 链白细胞介素-2 (IL-2) 白细胞介素-2受体 α (IL-2R α) 的细胞外部分融合的环状排列的白细胞介素-2 (IL-2) 的多肽作为抗癌剂具有很大的前景。这些多肽保留了通过在记忆CD8+T细胞和自然杀伤(NK)细胞上表达的中等亲和力IL-2R复合物发出信号的全部能力,但在空间上被阻止与优先在CD4+FOXP3+调节性T细胞(CD4+Tregs)和内皮细胞上表达的高亲和力IL-2R复合物结合。由于这种选择性IL-2R结合,多肽选择性地活化CD8+T细胞和NK细胞,从而促进肿瘤细胞杀伤。无法活化内皮细胞上的高亲和力IL-2R也可能降低由毛细血管渗漏综合征(IL-2疗法的已知风险)所致的毒性风险。

[0005] 当用于治疗人受试者时,前述多肽必须在使用前储存并运输至施用地点。在受试者中可重复地达到多肽的所需水平需要将多肽储存在保持多肽生物活性的配制物中。因此,本领域需要多肽的稳定组合物。优选地,此类组合物将表现出长保质期,并且在储存和运输时是稳定的。

发明内容

[0006] 本公开提供包含多肽的组合物,所述多肽包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2,以及制备和使用此类组合物的方法。这些组合物经过专门配制以提高其中所含多肽的稳定性和保质期。

[0007] 在一个方面,本公开提供了一种组合物,所述组合物包含:

[0008] a) 约1mg至约50mg包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2的多肽;

[0009] b) 蔗糖;

[0010] c) 柠檬酸盐缓冲剂;和

[0011] d) 聚山梨醇酯20。

[0012] 在某些实施方案中,多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的氨基酸。在某些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在某些实施方案中,多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

[0013] 在某些实施方案中,组合物包含约100mg至约120mg蔗糖。在某些实施方案中,组合物包含约110mg蔗糖。

[0014] 在某些实施方案中,组合物包含约4.0mg至约6.0mg柠檬酸盐。在某些实施方案中,

组合物包含约5.0mg柠檬酸盐。在某些实施方案中,柠檬酸盐缓冲剂由含2.03mg/mL柠檬酸三钠二水合物和0.97mg/mL柠檬酸一水合物的组合的水溶液形成。在某些实施方案中,柠檬酸盐缓冲剂由含2.91mg/mL柠檬酸三钠二水合物和0.34mg/mL柠檬酸一水合物的组合的水溶液形成。

[0015] 在某些实施方案中,所述组合物包含柠檬酸:柠檬酸三钠二水合物的质量比为约1:10至约1:2(即约1:10、约1:9、约1:8、约1:7、约1:6、约1:5、约1:4、约1:3和约1:2)的柠檬酸和柠檬酸三钠二水合物。在某些实施方案中,所述组合物包含柠檬酸:柠檬酸三钠二水合物的质量比为约1:9的柠檬酸和柠檬酸三钠二水合物。在某些实施方案中,组合物包含柠檬酸:柠檬酸钠二水合物的质量比为约1:2的柠檬酸和柠檬酸三钠二水合物。

[0016] 在某些实施方案中,组合物包含约0.20mg至约0.24mg聚山梨醇酯20。在某些实施方案中,组合物包含约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0017] 在某些实施方案中,组合物包含约2.2mg多肽。在某些实施方案中,组合物包含约11mg多肽。在某些实施方案中,组合物包含约33mg多肽。

[0018] 在某些实施方案中,组合物为冻干饼。在某些实施方案中,冻干饼在水中的溶解产生具有约5.5至约6.5的pH的水溶液。在某些实施方案中,冻干饼在水中的溶解产生具有约6.1的pH的水溶液。

[0019] 在某些实施方案中,冻干饼在水中的溶解产生具有约160至约230mOsm/kg的渗透压的水溶液。在某些实施方案中,冻干饼在水中的溶解产生具有约179mOsm/kg的渗透压的水溶液。

[0020] 在某些实施方案中,冻干饼在氯化钠溶液中的溶解产生具有约240至约340mOsm/kg的渗透压的水溶液。

[0021] 在某些实施方案中,水溶液进一步用水或氯化钠溶液稀释。

[0022] 在某些实施方案中,水溶液包含约0.03mg/mL多肽至约0.2mg/mL多肽。

[0023] 在某些实施方案中,组合物为水溶液。

[0024] 在某些实施方案中,组合物为包含2.2mg多肽的2.2ml水溶液。在某些实施方案中,组合物为包含11mg多肽的2.2ml水溶液。在某些实施方案中,组合物为包含33mg多肽的2.2ml水溶液。在某些实施方案中,组合物为包含44mg多肽的2.2ml水溶液。

[0025] 在某些实施方案中,溶液的pH为约6.1。

[0026] 在某些实施方案中,组合物为单一单位剂量的多肽。

[0027] 在一个方面,本公开提供了一种组合物,其包含:

[0028] a) 约1mg至约50mg(例如约2、11或33mg)包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合环状排列的IL-2的多肽;

[0029] b) 约100mg至约120mg蔗糖;

[0030] c) 约4.0mg至约6.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0031] d) 约0.20mg至约0.24mg聚山梨醇酯20。

[0032] 在某些实施方案中,多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的氨基酸。在某些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0033] 在某些实施方案中,组合物包含约110mg蔗糖。在某些实施方案中,组合物包含约5.0mg柠檬酸根阴离子。在某些实施方案中,组合物包含约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0034] 在某些实施方案中,组合物包含约2.2mg多肽。在某些实施方案中,组合物包含约11mg多肽。在某些实施方案中,组合物包含约33mg多肽。在某些实施方案中,组合物包含约44mg多肽。

[0035] 在某些实施方案中,组合物为冻干饼。在某些实施方案中,冻干饼包含:

[0036] a) 约2.2mg包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;

[0037] b) 约110mg蔗糖;

[0038] c) 约5.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0039] d) 约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0040] 在某些实施方案中,冻干饼包含:

[0041] a) 约11mg包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;

[0042] b) 约110mg蔗糖;

[0043] c) 约5.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0044] d) 约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0045] 在某些实施方案中,冻干饼包含:

[0046] a) 约33mg包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;

[0047] b) 约110mg蔗糖;

[0048] c) 约5.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0049] d) 约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0050] 在某些实施方案中,组合物为水溶液。在某些实施方案中,组合物为2.2ml水溶液,其包含:

[0051] a) 约2.2mg包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;

[0052] b) 约110mg蔗糖;

[0053] c) 约5.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0054] d) 约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0055] 在某些实施方案中,组合物为2.2ml水溶液,其包含:

[0056] a) 约11mg包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;

[0057] b) 约110mg蔗糖;

[0058] c) 约5.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0059] d) 约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0060] 在某些实施方案中,组合物为2.2ml水溶液,其包含:

[0061] a) 约33mg包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;

[0062] b) 约110mg蔗糖;

[0063] c) 约5.0mg柠檬酸根阴离子;和

[0064] d) 约0.22mg聚山梨醇酯20。

[0065] 在某些实施例中,水溶液的pH为约6.1。

[0066] 在某些实施方案中,组合物为单一单位剂量的多肽。

[0067] 在另一方面,本公开提供了一种水性组合物,其包含:

[0068] a) 约1mg/mL至约20mg/mL包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环境排列的IL-2的多肽;

- [0069] b) 约45mg/mL至约55mg/mL蔗糖;
- [0070] c) 约10mM至约20mM(例如约10mM至约13mM) 柠檬酸盐;和
- [0071] d) 约0.09mg/mL至约1.1mg/mL聚山梨醇酯20,
- [0072] 其中溶液的pH为约5.5至约6.5。
- [0073] 在某些实施方案中,多肽包含与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。
- [0074] 在某些实施方案中,水性组合物包含约50mg/mL蔗糖。在某些实施方案中,水性组合物包含约12mM柠檬酸盐。
- [0075] 在某些实施方案中,水性组合物包含约0.1mg/mL聚山梨醇酯20。在某些实施方案中,水性组合物具有约6.1的pH。
- [0076] 在某些实施方案中,组合物包含约1mg/mL多肽。在某些实施方案中,组合物包含约5mg/mL多肽。在某些实施方案中,组合物包含约15mg/mL多肽。在某些实施方案中,组合物包含约20mg/mL多肽。
- [0077] 在另一方面,本公开提供了一种水性组合物,其包含:
- [0078] a) 约1、5或15mg/mL包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;
- [0079] b) 约50mg/mL至约55mg/mL蔗糖;
- [0080] c) 约12mM柠檬酸盐缓冲剂;和
- [0081] d) 约0.1mg/mL聚山梨醇酯20,
- [0082] 其中组合物的pH为约6.1。
- [0083] 在某些实施方案中,水性组合物包含:
- [0084] a) 约1mg/mL包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;
- [0085] b) 约50mg/mL蔗糖;
- [0086] c) 约12mM(例如11.95mM) 柠檬酸盐;和
- [0087] d) 约0.1mg/mL聚山梨醇酯20,
- [0088] 其中溶液的pH为约6.1。
- [0089] 在某些实施方案中,水性组合物包含:
- [0090] a) 约5mg/mL包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;
- [0091] b) 约50mg/mL蔗糖;
- [0092] c) 约12mM(例如11.95mM) 柠檬酸盐;和
- [0093] d) 约0.1mg/mL聚山梨醇酯20,
- [0094] 其中溶液的pH为约6.1。
- [0095] 在某些实施方案中,水性组合物包含:
- [0096] a) 约15mg/mL包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽;
- [0097] b) 约50mg/mL蔗糖;
- [0098] c) 约12mM(例如11.95mM) 柠檬酸盐;和
- [0099] d) 约0.1mg/mL聚山梨醇酯20,
- [0100] 其中溶液的pH为约6.1。
- [0101] 在另一方面,本公开提供了包含任何前述组合物的制品。在某些实施方案中,所述制品是玻璃小瓶。

[0102] 在另一方面,本公开提供了一种通过冻干任何前述水溶液制备的冻干组合物。

[0103] 在另一方面,本公开提供了一种制备冻干组合物的方法,所述方法包括冻干任何前述水溶液。

[0104] 在另一方面,本公开提供了一种制备水性组合物的方法,所述方法包括将任何前述冻干组合物溶解在水性溶剂中。

[0105] 在某些实施方案中,水性溶剂是注射用水。在某些实施方案中,水性溶剂是氯化钠溶液。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.1%NaCl至约0.5% NaCl。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.12%NaCl至约0.41% NaCl。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.02MNaCl至约0.07M NaCl。在某些实施方案中,水性组合物包含约240至约340mOsm/kg的渗透压。

[0106] 在某些实施方案中,将水性组合物的pH调节至约6.1。在某些实施方案中,用碱将水性组合物的pH调节至约6.1。在某些实施方案中,碱为氢氧化钠。

[0107] 在某些实施方案中,水性组合物进一步用包含约1% (w/w) 表面活性剂的水溶液稀释。在某些实施方案中,表面活性剂为聚山梨醇酯20。在某些实施方案中,水溶液进一步包含约0.1% (w/w) 柠檬酸一水合物、0.2% (w/w) 柠檬酸三钠二水合物和98.7% (w/w) 注射用水。

[0108] 在某些实施方案中,组合物包含药物组合物。

[0109] 在另一方面,本公开提供了一种活化受试者的自然杀伤细胞(NK)细胞的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的任何前述组合物。

[0110] 在另一方面,本公开提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的任何前述组合物。在某些实施方案中,癌症为肾细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌或肺癌。在某些实施方案中,癌症包含难治性实体瘤。

[0111] 附图简述

[0112] 从以下结合附图对说明性实施方案的详细描述,将更充分地理解本发明的前述和其它特征和优点。专利或申请文件含有至少一张彩色绘图。带有彩色附图的本专利或专利申请公开案的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0113] 图1描绘了多肽A在作为复原产品或冻干产品的几种配制物中的活性。在pSTAT5 ELISA分析中测量活性。

[0114] 图2描绘了多肽A在作为冻干产品的几种配制物中的尺寸排阻色谱结果。

[0115] 图3描述了多肽A在作为复原产品的几种配制物中的尺寸排阻色谱结果。

[0116] 图4描绘了多肽A作为缓冲剂组成的函数的差示扫描量热法研究。显示了展开结果的 T_m 。所有误差条都是三次重复实验的标准偏差。

[0117] 图5描绘了多肽A在72℃下作为缓冲剂组成的函数的OD350随时间变化的研究。显示了在72℃下8小时后的平均OD350。所有误差条都是三次重复实验的标准偏差。

[0118] 图6描绘了在以300RPM摇动3天后多肽A作为缓冲剂组成的函数的微流成像研究。显示了总亚可见粒子浓度,且误差条是三次重复实验的标准偏差。

[0119] 图7描绘了多肽A作为摇动应力和缓冲剂组成的函数的微流成像研究。显示了总亚可见粒子浓度,且误差条是三次重复实验的标准偏差。

具体实施方式

[0120] 本文提供包含多肽的组合物,所述多肽包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2,以及制备和使用此类组合物的方法。

[0121] 本文公开的配制物改进了其中所含多肽的稳定性和保质期。特别地,多肽产物保留了生物活性,包括在所述配制物中冻干并在注射用水(WFI)或类似可接受的稀释剂中复原之后。重要的是,本文所述的配制物已被设计为允许冻干产品在患者或医疗保健提供者可容易获得的WFI中复原。

[0122] 本文提供的配制物还产生具有优选外观的冻干饼。具体而言,饼是完整的(未破碎),从容器(例如玻璃小瓶)几乎没有收缩,并且具有平坦的凹面。

[0123] 选定的定义

[0124] 除非本文另有定义,否则本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。如果存在任何潜在的歧义,本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。除非另外说明,否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括”以及例如“包含”和“含有”的其它形式不是限制性的。

[0125] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具有”以及其语法变化形式应被视为指定所述特征、整数、步骤或组件,但不排除添加一个或多个额外特征,整数、步骤、组件或它们的组。这些术语包括术语“由……组成”和“基本上由……组成”。

[0126] 如本文所用,术语“环状排列”和“环状排列的”是指获取线性蛋白质或其同源核酸序列,并融合天然N末端和C末端(直接或通过接头,使用蛋白质或重组DNA方法)以形成环状分子,且接着在不同位置裂解(打开)环状分子以形成新的线性蛋白质或同源核酸分子,其末端与原始分子中的末端不同。因此,环状排列保留了蛋白质的序列、结构和功能,同时在不同位置产生新的C末端和N末端,与原始分子相比,这使得用于融合所需多肽融合配偶体的方向得到改善。

[0127] 如本文所用,术语“约”将被本领域普通技术人员理解并且将在一定程度上随其使用的上下文而变化。如本文所用,当提及诸如量、时间持续时间等的可测量值时,术语“约”意在涵盖相比于规定值至多 $\pm 5\%$ 的变化,包括 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 和 $\pm 0.1\%$,因为此类变化适合于执行所公开的方法。

[0128] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treated)”、“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括减少或减轻与所治疗的病状、病症或疾病相关或由其引起的至少一种症状。

[0129] 如本文所用,在向受试者施用疗法的上下文中的术语“有效量”是指实现期望的预防或治疗效果的疗法的量。

[0130] 如本文所用,术语“患者”、“个体”或“受试者”是指人或非人哺乳动物。非人哺乳动物包括例如家畜和宠物,例如羊、牛、猪、犬、猫和鼠类哺乳动物。在某些实施方案中,受试者是人。

[0131] IL-2融合多肽

[0132] 在一个方面,本公开提供包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的白细胞介素2(IL-2)的多肽组合物。相对于高亲和力IL-2R复合物(包含IL-2R α 、IL-2R β 和IL-2R γ),用于本文公开的组合物中的多肽表现出与包含IL-2R β 和共同 γ 链IL-2R γ 的中等亲

和力IL-2R复合物的优先结合,并作为中间亲和力IL-2R复合物的选择性激动剂起作用。此类多肽的设计和产生描述于美国专利第9,359,415号中,所述专利以引用方式整体并入本文。

[0133] 可用于包含在本文公开的组合物中的示例性多肽在以下SEQ ID.NO:1中列出:

[0134] SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTGGSSSTKKT
QLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVNLNAQSGGGSELCCCC
PPEIPHATFKAMAYKEGTMLNCECKRGFRRIKSGSLYMLCTGNSSHSSWDNQCQCTSSATRNTTKQVTPQPPEEQKE
RKTTEMQSPMQPVDQASLPGHCREPPPWENEATERIYHFVVGQMVYYQCVQGYRALHRGPAESVCKMTHGKTRWTQ
PQLICTG (SEQ ID NO:1)

[0135] 因此,在某些实施方案中,多肽的氨基酸序列包含SEQ ID.NO:1的氨基酸序列。在某些实施方案中,多肽的氨基酸序列由SEQ ID.NO:1的氨基酸序列组成。

[0136] 技术人员将理解,SEQ ID.NO:1的氨基酸序列变体也可用于本文公开的组合物中。例如,在某些实施方案中,多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80% (例如80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%) 同一性的氨基酸序列或由其组成。在某些实施方案中,多肽的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0137] 技术人员还将理解,本文公开的组合物中所用的多肽的氨基酸序列可被衍生或修饰,例如聚乙二醇化、酰胺化等。

[0138] 在某些实施方案中,配制物中多肽的量为约1mg至约50mg (例如约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg、约11mg、约12mg、约13mg、约14mg、约15mg、约16mg、约17mg、约18mg、约19mg、约20mg、约25mg、约30mg、约33mg、约40mg、约44mg、约45mg或约50mg)。在某些实施方案中,多肽的量为约2.2mg。在某些实施方案中,多肽的量为约11mg。在某些实施方案中,多肽的量为约33mg。在某些实施方案中,多肽的量为约44mg。

[0139] 在某些实施方案中,水性配制物中多肽的浓度为约1mg/mL至约50mg/mL。在某些实施方案中,多肽的浓度为约1mg/mL至约20mg/mL (例如约1mg/mL、约2mg/mL、约3mg/mL、约4mg/mL、约5mg/mL、约6mg/mL、约7mg/mL、约8mg/mL、约9mg/mL、约10mg/mL、约11mg/mL、约12mg/mL、约13mg/mL、约14mg/mL、约15mg/mL、约16mg/mL、约17mg/mL、约18mg/mL、约19mg/mL、约20mg/mL、约25mg/mL、约30mg/mL、约35mg/mL、约40mg/mL、约45mg/mL或约50mg/mL)。在某些实施方案中,多肽的浓度为约1mg/mL。在某些实施方案中,多肽的浓度为约5mg/mL。在某些实施方案中,多肽的浓度为约15mg/mL。在某些实施方案中,多肽的浓度为约20mg/mL。

[0140] 在某些实施方案中,用水或氯化钠溶液进一步稀释水性配制物,从而降低配制物中多肽的浓度。在某些实施方案中,水溶液包含约0.03mg/mL多肽至约0.2mg/mL多肽 (例如约0.03mg/mL、约0.04mg/mL、约0.05mg/mL、约0.06mg/mL,约0.07mg/mL,约0.08mg/mL、约0.09mg/mL、约0.10mg/mL、约0.11mg/mL、约0.12mg/mL、约0.13mg/mL、约0.14mg/mL、约0.15mg/mL、约0.16mg/mL、约0.17mg/mL、约0.18mg/mL、约0.19mg/mL或约0.2mg/mL)。

[0141] 在某些实施方案中,水性配制物进一步用包含约1% (w/w) 表面活性剂的水溶液稀释。在某些实施方案中,表面活性剂为聚山梨酯20。在某些实施方案中,水溶液还包含约0.1% (w/w) 柠檬酸一水合物、0.2% (w/w) 柠檬酸三钠二水合物和98.7% (w/w) 注射用水。

[0142] 赋形剂和缓冲剂

[0143] 在某些实施方案中,本文公开的组合物包含一种或多种赋形剂和/或缓冲剂。

[0144] 如本文所用,术语“赋形剂”是指添加至组合物或配制物中以提供所需稠度、粘度或稳定效果的任何非治疗剂。用于本文公开的组合物的合适赋形剂可用作例如粘度增强剂、稳定剂、增溶剂等。赋形剂可为离子型或非离子型的。合适的离子型赋形剂包括盐,例如NaCl,或氨基酸组分,例如精氨酸-HCl。合适的非离子型赋形剂包括糖类,例如单糖(例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等);二糖(例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等);多糖(例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等);和糖醇(例如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨醇(山梨醇(glucitol))等)。例如,糖可为蔗糖、海藻糖、棉子糖、麦芽糖、山梨醇或甘露醇。另外或替代地,糖可为糖醇或氨基糖。在某些实施方案中,糖为蔗糖。

[0145] 在某些实施方案中,配制物中赋形剂(例如蔗糖)的量约为1mg至约150mg(例如约1mg、约10mg、约20mg、约30mg、约40mg、约50mg、约60mg、约70mg、约80mg、约90mg、约100mg、约110mg、约120mg、约130mg、约140mg或约150mg)。在某些实施方案中,配制物中赋形剂(例如蔗糖)的量约为90mg至约130mg。在某些实施方案中,配制物中赋形剂(例如蔗糖)的量约为99mg至约121mg。在某些实施方案中,配制物中赋形剂(例如蔗糖)的量约为110mg。

[0146] 在某些实施方案中,水性配制物中赋形剂(例如蔗糖)的浓度为约1mg/mL至约100mg/mL(例如约1mg/mL、约10mg/mL、约20mg/mL、约30mg/mL、约40mg/mL、约45mg/mL、约50mg/mL、约55mg/mL、约60mg/mL、约70mg/mL、约80mg/mL、约90mg/mL或约100mg/mL)。在某些实施方案中,赋形剂(例如蔗糖)的浓度为约30mg/mL至约70mg/mL。在某些实施方案中,赋形剂(例如蔗糖)的浓度为约45mg/mL至约55mg/mL。在某些实施方案中,赋形剂(例如蔗糖)的浓度为约50mg/mL。

[0147] 用于本文公开的组合物中的合适的缓冲剂包括有机酸和盐,例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐;Tris、氨丁三醇盐酸盐或磷酸盐缓冲剂。另外,氨基酸组分也可用作缓冲剂。此类氨基酸组分包括甘氨酸、组氨酸和甲硫氨酸。在某些实施方案中,缓冲剂是柠檬酸盐缓冲剂。如本文所用,术语“柠檬酸盐缓冲剂”是指利用柠檬酸根离子的pH缓冲系统(水性或冻干形式)。柠檬酸盐缓冲剂可使用任何本领域公认的方法制备,包括通过组合:(i)柠檬酸、柠檬酸三钠二水合物和柠檬酸一水合物;或(ii)柠檬酸一水合物、磷酸氢二钠和柠檬酸。在某些实施方案中,使用柠檬酸钠二水合物和柠檬酸制备柠檬酸盐缓冲剂。

[0148] 在某些实施方案中,调配物中缓冲剂(例如柠檬酸盐)的量约为1mg至约10mg(例如约1mg、约2mg、约3mg、约4mg、约5mg、约6mg、约7mg、约8mg、约9mg、约10mg)。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)的量约为5.9mg至约7.2mg(例如约5.9mg、约6.0mg、约6.1mg、约6.2mg、约6.3mg、约6.4mg、约6.5mg、约6.6mg、约6.7mg、约6.8mg、约6.9mg、约7.0mg、约7.1mg或约7.2mg)。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)的量约为6.6mg。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)中柠檬酸根阴离子的量为约4.0mg至约6.0mg。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)中柠檬酸根阴离子的量为约5.0mg。

[0149] 在某些实施方案中,本文公开的水性配制物中缓冲剂(例如柠檬酸盐)的浓度为约1mM至约50mM(例如约1mM、约2mM、约3mM、约4mM、约5mM、约6mM、约7mM、约8mM、约9mM、约10mM、约11mM、约12mM、约13mM、约14mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约25mM、

约30mM、约35mM、约40mM、约45mM或约50mM)。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)的浓度为约11mM至约13mM(例如约11.1mM、11.2mM、11.3mM、11.4mM、11.5mM、11.6mM、11.7mM、11.8mM、11.9mM、12.1mM、12.2mM、12.3mM、12.4mM、12.5mM、12.6mM、12.7mM、12.8mM或12.9mM)。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)的浓度为约12mM。在某些实施方案中,缓冲剂(例如柠檬酸盐)的浓度为约11.95mM。在某些实施方案中,柠檬酸盐缓冲剂含有2.03mg/mL (6.90mM) 柠檬酸三钠二水合物和0.97mg/mL (5.05mM) 柠檬酸。

[0150] 在某些实施方案中,本文公开的组合物具有约5.0至约8.0、约5.5至约7.5、约5.0至约7.0、约6.0至约8.0或约6.0至约7.0的pH。在某些实施方案中,组合物具有约5.5至约6.5的pH。在某些实施方案中,组合物具有约5.8至约6.4的pH。在某些实施方案中,组合物具有约6.1的pH。在某些实施方案中,将组合物的pH调节至约6.1的pH。在某些实施方案中,用碱调节pH。在某些实施方案中,碱是氢氧化物盐,例如氢氧化钠(NaOH)或氢氧化钾(KOH)。在某些实施方案中,组合物是水性组合物并且所述水性组合物的pH被调节至约6.1的pH。

[0151] 如本文所用,术语“表面活性剂”是指具有两亲结构的有机物质;即,它们由具有相反溶解性倾向的基团、典型地油溶性烃链和水溶性离子基团组成。根据表面活性部分的电荷,表面活性剂可分为用于各种药物组合物和生物材料制剂的阴离子剂、阳离子剂和分散剂。用于本文公开的组合物中的合适的表面活性剂包括非离子表面活性剂、离子表面活性剂和两性离子表面活性剂。用于本发明的典型表面活性剂包括脱水山梨醇脂肪酸酯(例如脱水山梨醇单辛酸酯、脱水山梨醇单月桂酸酯、脱水山梨醇单棕榈酸酯)、脱水山梨醇三油酸酯、甘油脂肪酸酯(例如甘油单辛酸酯、甘油单肉豆蔻酸酯、甘油单硬脂酸酯)、聚甘油脂肪酸酯(例如单硬脂酸十甘油酯、二硬脂酸十甘油酯、单亚油酸十甘油酯)、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯山梨醇单月桂酸酯、聚氧乙烯山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯山梨醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇单棕榈酸酯、聚氧乙烯山梨醇三油酸酯、聚氧乙烯山梨醇三硬脂酸酯)、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯(例如聚氧乙烯山梨醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯山梨醇四油酸酯)、聚氧乙烯甘油脂肪酸酯(例如聚氧乙烯单硬脂酸甘油酯)、聚乙二醇脂肪酸酯(例如聚乙二醇二硬脂酸酯)、聚氧乙烯烷基醚(例如聚氧乙烯月桂基醚)、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚(例如聚氧乙烯聚氧丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯丙基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基醚)、聚氧乙烯烷基苯基醚(例如聚氧乙烯壬基苯基醚)、聚氧乙烯氢化蓖麻油{例如聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯氢化蓖麻油}、聚氧乙烯蜂蜡衍生物(例如聚氧乙烯山梨醇蜂蜡)、聚氧乙烯羊毛脂衍生物(例如聚氧乙烯羊毛脂)和聚氧乙烯脂肪酸酰胺(例如聚氧乙烯硬脂酸酰胺); C10-C18烷基硫酸盐(例如十六烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、油基硫酸钠)、平均添加了2至4摩尔环氧乙烷单元的聚氧乙烯C10-C18烷基醚硫酸盐(例如聚氧乙烯月桂基硫酸钠)和C1-C18烷基磺基琥珀酸酯盐(例如月桂基磺基琥珀酸酯钠);和天然表面活性剂,例如卵磷脂、甘油磷脂、鞘磷脂(例如神经鞘磷脂)和C12-C18脂肪酸的蔗糖酯。组合物可包括这些表面活性剂中的一种或多种。在某些实施方案中,本文公开的组合物包含聚氧乙烯山梨醇酯脂肪酸酯,例如聚山梨醇酯20、40、60或80。在某些实施方案中,本文公开的组合物包含聚山梨醇酯20。

[0152] 在某些实施方案中,配制物中表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.1mg至约1mg(例如约0.1mg、约0.15mg、约0.2mg、约0.25mg、约0.3mg、约0.35mg、约0.4mg、约0.45mg、约0.5mg、约0.55mg、约0.6mg、约0.65mg、约0.7mg、约0.75mg、约0.8mg、约0.85mg、约

0.9mg、约0.95mg或约1mg)。在某些实施方案中,表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.15mg至约0.3mg(例如约0.16mg、约0.17mg、约0.18mg、约0.19mg、约0.21mg、约0.22mg、约0.23mg、约0.24mg、约0.26mg、约0.27mg、约0.28mg或约0.29mg)。在某些实施方案中,表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.20mg至约0.24mg。在某些实施方案中,水性配制物中表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.22mg。

[0153] 在某些实施方案中,水性配制物中表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.01mg/mL至约1mg/mL(例如约0.01mg/mL、约0.1mg/mL、约0.2mg/mL、约0.3mg/mL、约0.4mg/mL、约0.5mg/mL、约0.6mg/mL、约0.7mg/mL、约0.8mg/mL、约0.9mg/mL或约1mg/mL)。在某些实施方案中,表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.05mg/mL至约0.15mg/mL(例如约0.05mg/mL、约0.06mg/mL、约0.07mg/mL、或约0.08mg/mL、约0.09mg/mL、约0.1mg/mL、约0.11mg/mL、约0.12mg/mL、约0.13mg/mL、约0.14mg/mL或约0.15mg/mL)。在某些实施方案中,表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.09mg/mL至约0.11mg/mL。在某些实施方案中,水性配制物中表面活性剂(例如聚山梨醇酯20)的浓度为约0.1mg/mL。

[0154] 本领域技术人员将理解,本发明的组合物组分和组合物可用除mg/mL以外的单位来描述。例如,本发明的组合物组分和组合物可用摩尔浓度单位来描述。本发明的组合物组分和组合物可进一步以重量或质量百分比为单位来描述。

[0155] 冻干

[0156] 在一个方面,本公开提供了本文公开的多肽的冻干组合物(例如冻干饼),以及其制备方法。

[0157] 冻干一般包括三个主要阶段:冷冻、一次干燥和二次干燥。冷冻对于将水转化为冰或将一些无定形配制物成分转化为结晶形式是必要的。一次干燥是通过在低压和低温下直接升华从冷冻产品中去除冰时的工艺步骤。二次干燥是利用残留水扩散至蒸发表面从产品基质中去除结合水的工艺步骤。二次干燥期间的产品温度通常高于一次干燥期间的温度。参见Tang X.等人(2004)“Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: Practical advice,”Pharm.Res.,21:191-200;Nail S.L.等人(2002)“Fundamentals of freeze-drying,”Development and manufacture of protein pharmaceuticals.Nail SL 编.New York:Kluwer Academic/Plenum Publishers,第281-353页;Wang等人(2000)“Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals,”M J Pharm., 203:1-60;Williams NA等人(1984)“The lyophilization of pharmaceuticals;A literature review.”J.Parenteral Sci.Technol,38:48-59;和WO 2010/148337 A1。

[0158] 由于温度和压力在冻干过程中的变化,需要适当选择赋形剂或其它组分,例如稳定剂、缓冲剂、填充剂和表面活性剂,以防止本文公开的多肽在冷冻干燥和储存过程中降解(例如蛋白质聚集、脱酰胺和/或氧化)。本文公开的冻干组合物含有允许稳定长期储存本文公开的多肽的成分的特定组合,所述多肽包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环境排列的白细胞介素2(IL-2)。

[0159] 在另一方面,本公开提供一种冻干组合物,其通过冻干本文公开的包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环境排列的白细胞介素-2(IL-2)的水性组合物中的任一种制备。在某些实施方案中,冻干组合物是冻干饼。在某些实施方案中,冻干组合物通过遵循表2、表3或表4中所述的冻干方案冻干本文公开的水性组合物中的任一种来制备。

[0160] 在另一方面,本公开提供一种制备冻干组合物的方法,所述方法包括冻干本文公开的包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的白细胞介素-2 (IL-2) 的水性组合物中的任一种。在某些实施方案中,制备冻干组合物的方法包括遵循表2、表3或表4中所述的冻干方案。

[0161] 在另一方面,本公开提供一种制备水性组合物的方法,所述方法包括将本文公开的包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的白细胞介素-2 (IL-2) 的冻干组合物中的任一种溶解于水性溶剂中。在某些实施方案中,冻干组合物是冻干饼。在某些实施方案中,冻干组合物溶解在2.2ml水中。在某些实施方案中,冻干组合物溶解在氯化钠溶液中。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.1% NaCl至约0.5% NaCl。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.12% NaCl至约0.41% NaCl。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.10%、0.11%、0.12%、0.13%、0.14%、0.15%、0.16%、0.17%、0.18%、0.19%、0.20%、0.21%、0.22%、0.23%、0.24%、0.25%、0.26%、0.27%、0.28%、0.29%、0.30%、0.31%、0.32%、0.33%、0.34%、0.35%、0.36%、0.37%、0.38%、0.39%、0.40%、0.41%、0.42%、0.43%、0.44%、0.45%、0.46%、0.47%、0.48%、0.49%或0.50% NaCl。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.02M NaCl至约0.07M NaCl。在某些实施方案中,氯化钠溶液包含约0.02M、0.03M、0.04M、0.05M、0.06M或0.07M NaCl。在某些实施方案中,当溶解在氯化钠溶液中时,水性组合物包含约240至约340mOsm/kg的渗透压。在某些实施方案中,溶解在氯化钠溶液中的水性组合物可通过皮下施用向患者施用。

[0162] 多肽组合物的用途

[0163] 本文公开的组合物特别可用于治疗、预防或改善与白细胞介素2受体信号传导相关的任何疾病或病症。

[0164] 在一个方面,提供了一种活化受试者的自然杀伤细胞(NK)细胞的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文公开的组合物中的任一种,所述组合物包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2。

[0165] 在另一方面,提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的本文公开的组合物中的任一种,所述组合物包含与IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2。适合使用本文公开的组合物治疗的癌症包括肾细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌和肺癌。在某些实施方案中,癌症包含难治性实体瘤。

[0166] 在某些实施方案中,组合物经静脉内施用。

[0167] 在某些实施方案中,组合物以约1 μ g/kg至约15 μ g/kg的剂量静脉内施用。在某些实施方案中,组合物以约1 μ g/kg、约2 μ g/kg、约3 μ g/kg、约4 μ g/kg、约5 μ g/kg、约6 μ g/kg、约7 μ g/kg、约8 μ g/kg、约9 μ g/kg、约10 μ g/kg、约11 μ g/kg、约12 μ g/kg、约13 μ g/kg、约14 μ g/kg或约15 μ g/kg的剂量静脉内施用。

[0168] 在某些实施方案中,连续五天每天静脉内施用组合物。

[0169] 在某些实施方案中,连续五天每天静脉内施用组合物,随后连续九天不静脉内施用组合物。

[0170] 在某些实施方案中,连续五天每天静脉内施用组合物,随后连续十六天不静脉内施用组合物。

[0171] 在某些实施方案中,如下地施用组合物:1) 第一周期包括连续五天每天静脉内施

用组合物,随后连续九天不静脉内施用组合物;和2) 第二周期包括连续五天每天静脉内施用组合物,随后连续十六天不静脉内施用组合物。

[0172] 在某些实施方案中,方法包括至少一个额外施用周期,其中每个额外周期包括连续五天每天静脉内施用组合物,随后连续十六天不静脉内施用组合物。

[0173] 在某些实施方案中,组合物经皮下施用。

[0174] 在某些实施方案中,方法包括皮下施用上述水性组合物,所述水性组合物包含约240至约340mOsm/kg的渗透压。

[0175] 在某些实施方案中,组合物以约1mg至约15mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约1mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约2mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约3mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约4mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约5mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约6mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约7mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约8mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约9mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约10mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约11mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约12mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约13mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约14mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物以约15mg的剂量皮下施用。

[0176] 在某些实施方案中,组合物每周一次 (Q1W)、每两周一次 (Q2W) 或每三周一次 (Q3W) 经皮下施用。

[0177] 在某些实施方案中,组合物每周一次 (Q1W)、每两周一次 (Q2W) 或每三周一次 (Q3W) 以约1mg至约15mg的剂量皮下施用。

[0178] 在某些实施方案中,组合物每周一次 (Q1W) 以约3mg的剂量皮下施用。在某些实施方案中,组合物每三周一次 (Q3W) 以约6mg的剂量皮下施用。

[0179] 在某些实施方案中,黑色素瘤是粘膜黑色素瘤或晚期皮肤黑色素瘤中的一种或两种。

[0180] 对本领域技术人员将显而易见的是,在不脱离本文所公开的实施方案的范围的情况下,可使用合适的等效物对本文所述的方法进行其它合适的修改和改写。现已详细描述了某些实施方案,通过参考以下实施例将更清楚地理解相同的实施方案,所述实施例仅出于说明的目的而被包括在内,并不旨在限制。

[0181] 实施例

[0182] 通过以下实施例进一步说明本发明,所述实施例不应被解释为进一步的限制。除非另有说明,否则本发明的实施将采用本领域技术范围内的有机合成、细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学和免疫学的常规技术。

[0183] 实施例1-多肽组合物的设计和测试

[0184] 为了确定多肽A (与包含SEQ ID NO:1的氨基酸的IL-2R α 链的细胞外部分融合的环状排列的IL-2) 的最佳配制物,测试了多肽A的几种配制物对蛋白质稳定性、pH稳定性、理化行为、冻干饼均匀性和对冻干后与储存小瓶粘附的抗性的影响。下表1列出了每种测试配制物的具体组分和其浓度。不同的组合物经受在下表2-4中列举的冻干循环方案之一。

[0185] 表1:多肽A配制物的成分

[0186]

组分	配制物 1	配制物 2	配制物 3
填充赋形剂 (浓度)	蔗糖(50mg/mL)	甘露醇(50mg/mL)	蔗糖(50mg/mL)
缓冲剂(浓度)	甘氨酸(10mg/mL)	甘氨酸(10mg/mL)	组氨酸(10mg/mL)
表面活性剂 (浓度)	聚山梨醇酯 20 (0.1 mg/mL)	聚山梨醇酯 20 (0.1 mg/mL)	聚山梨醇酯 20 (0.1 mg/mL)
缓冲剂 pH	5.9	5.7	6.5
密度	1.020 g/mL	1.021 g/mL	1.018 g/mL
过滤后的 pH	6.6	6.6	6.5
过滤后的多肽 A 的浓度	0.75 mg/mL	0.96 mg/mL	0.79 mg/mL
组分	配制物 4	配制物 5	配制物 6
填充赋形剂 (浓度)	蔗糖(50mg/mL)	无	蔗糖(50 mg/mL)
缓冲剂(浓度)	柠檬酸钠(3 mg/mL)	琥珀酸(40 mg/mL)	甲硫氨酸(10 mg/mL)
表面活性剂 (浓度)	聚山梨醇酯 20 (0.1 mg/mL)	聚山梨醇酯 20 (0.1 mg/mL)	聚山梨醇酯 20 (0.1 mg/mL)
缓冲剂 pH	6.3	5.5	5.9
密度	1.015 g/mL	1.021 g/mL	1.011 g/mL
过滤后的 pH	6.1	5.4	6.3
过滤后的多肽 A 的浓度	1.03 mg/mL	1.00 mg/mL	0.85 mg/mL

[0187] 表2:冻干循环-2mg小瓶

[0188]

区段	类型	温度设定点(°C) (±5°C)	时间设定点(小时) (±0.5 小时)	腔室压力设定点 (μmHg) (± 20 μmHg)
1	保持	5	4.0	≤ 14.7 psia
2	升温	-50	3.7	≤ 14.7 psia
3	保持	-50	7.0	≤ 14.7 psia

[0189]

4	抽空	-50		40
5	升温	-28	0.7	40
6	保持	-28	60	40
7	升温	25	3.5	40
8	保持	25	9	40
9	加塞	25		14.7 psia ± 0.7 psia

[0190] 表3:冻干循环-10mg小瓶

[0191]	区段	类型	温度设定点(°C) (±5°C)	时间设定点(小时) (±0.5 小时)	腔室压力设定点 (μmHg) (± 20 μmHg)
	1	保持	5	4.0	≤14.7 psia
	2	升温	-50	1.8	≤14.7 psia
	3	保持	-50	4.0	≤14.7 psia
	4	抽空	-50		30
	5	升温	-28	0.7	30
	6	保持	-28	66	30
	7	升温	25	3.5	30
	8	保持	25	9	30
9	加塞	25		14.7 ± 0.7 psia	

[0192] 表4:冻干循环-30mg小瓶

[0193]	区段	类型	温度设定点(°C) (±5°C)	时间设定点(小时) (±0.5 小时)	腔室压力设定点 (μmHg) (± 20 μmHg)
	1	保持	5	4.0	≤14.7 psia
	2	升温	-45	2.8	≤14.7 psia
	3	保持	-45	4.0	≤14.7 psia
	4	抽空	-45		50
	5	升温	-25	0.8	50
	6	保持	-25	66	50
	7	升温	30	3.1	50
	8	保持	30	8	50
9	加塞	30		14.7 ± 0.7 psia	

[0194] 理化测试

[0195] 配制物1-6中的多肽A的理化行为在低温下通过测量电阻、进行冷冻干燥显微术和进行差示扫描量热法来表征。

[0196] 电阻

[0197] 使用0至20兆欧电阻仪器和由陶瓷板上的两个平行金条组成的陶瓷电阻探针,在20mm玻璃样品管中的大约1.8mL样品上测量电阻。使用位于金板另一侧上的陶瓷探针处的32号T型热电偶测量温度。使用美国国家标准与技术研究院 (NIST) 可溯源参考标准,在用于分析的温度范围内校准测量和记录仪器。使用标准参考溶液验证系统的准确性。

[0198] 使用标准方法,以每分钟0.5°C的平均受控速率冷却和加热材料,以评估其热特征,以便建立材料特定的相变。在大气条件下分析电阻样品。电阻的偏差用于确定升温时相变的开始。在整个分析过程中,使用带有Collect程序的Kaye Validator仪器每十秒记录一次温度测量值。

[0199] 冷冻干燥显微术

[0200] 将大约0.15mL的溶液分配至玻璃池中。接着将池置于温度受控的冷冻干燥工作台上。样品池配备了两个32号T型热电偶,它们直接放置在池底部和中心的材料中,以监测样品温度。液体样品以每分钟0.5°C的平均受控速率冷却至-50°C或更低的目标设定点。冷冻

完成后,抽空工作台室以启动冰的升华。接着在升华和干燥过程中以每分钟0.5℃的平均受控速率加热工作台。使用与Super WDR CCD相机联用的能够放大16至330倍的Infinivar显微镜观察样品在冷冻和干燥过程中的行为。观察到的反映材料超过相变的样品的冷冻和干燥部分的变化与样品温度相关。在整个分析过程中,使用带有Collect程序的Kaye Validator仪器每十秒记录一次温度测量值。

[0201] 差示扫描量热法

[0202] 低温差示扫描量热法(LT DSC)与上述分析结合使用,作为评估冷冻和升温期间的理化行为以确定相变的一种手段。LT DSC分析遵循当前的USP<891>且使用TA Instruments Q200 DSC进行。TA Instruments Q200 DSC使用冷藏冷却系统运行。使用TA Advantage软件(v5.0.4)实施测试参数。记录扫描数据且使用TA通用分析软件(v4.5A)绘制图表。将19.4mg溶液的样品量放入铝制样品盘中,且将盖子卷曲到位。使用氮气,NF以50毫升/分钟的流速连续吹扫样品。所述仪器根据Lyophilization Technology, Inc.的校准程序进行了校准。在冷却和加热过程中,样品的放热或吸收热量反映了样品经历热事件时的能量差异。记录这种热能差异以用于分析结果。

[0203] 理化行为表征结果

[0204] 理化行为表征的结果揭示,配制物4产生的冻干饼具有均匀的外观,在倒置和震荡时保持完整,在冻干后粘附在小瓶的侧面和底部的残留物质最少,并且具有最高的玻璃化转变特性。配制物4的结果优于所有其它测试的配制物。此外,其它测试的配制物未能产生用于生产冻干多肽A组合物的稳定冻干循环。

[0205] 稳定性测试

[0206] 多肽A在配制物1-6中的稳定性使用毛细管等电聚焦(cIEF)、尺寸排阻高效液相色谱(HPLC)、SDS-PAGE和活性分析来表征。

[0207] 毛细管等电聚焦(cIEF)

[0208] cIEF用于测量测试配制物中电荷变体的存在。通过在2.2mL注射用水(WFI)中复原样品来制备药品样品。目视检查样品以确保内容物不含可见颗粒。通过使用以下等式计算下表中所需的每种试剂的体积,制备主混合物来制备用于分析的参考标准品、样品和空白:“试剂体积”=[(“n+2”)×“V”],其中:n=样品数;V=每个样品的试剂体积(μL)(见下表5)。

[0209] 表5:用于cIEF分析的试剂混合物

试剂(200μL总体积)	V(μL/样品)
1%甲基纤维素(0.35%最终浓度)	70
Pharmalytes 5-8(3%最终浓度)	6
Pharmalytes 3-10(1%最终浓度)	2
pI 5.12标记	0.5
pI 7.90标记	0.5

[0211] 将计算体积的试剂添加至合适尺寸的管中且涡旋混合。通过将158μL主混合物转移至1.5mL微量离心管且向管中添加242μL WFI且轻轻涡旋混合来制备空白。多肽A参考标准品的制备方法与空白相同。通过将79μL主混合物转移至每个样品的1.5mL管中,且向管中添加121μL样品且轻轻涡旋混合来制备样品。所用的进样顺序和分析条件分别列于表6和7中。为了进行分析,pI标记之间的所有峰都被积分。通过报告≥0.05%的所有峰的pI和面

积%来计算结果。

[0212] 表6:用于cIEF分析的进样顺序

[0213]	样品标识	进样次数
	空白	1
	多肽A参考标准品	1
	样品	各1
	多肽A参考标准品	1
	空白	1

[0214] 表7:用于cIEF分析的分析条件

	托盘类型:	48 小瓶托盘, 带 4 个冲洗小瓶
[0215]	托盘温度:	5.0°C
	聚焦期 1:	1500 V 持续 1.00 min
	聚焦期 2:	3000 V 持续 7.00 min

[0216] 尺寸排阻HPLC

[0217] 使用尺寸排阻HPLC测量测试配制物的纯度。通过在2.2mL WFI中复原样品来制备药品样品。目视检查样品以确保内容物不含可见颗粒。分别使用表8和9中列出的以下分析条件和进样顺序对参考标准品、样品和空白进行分析测试。

[0218] 表8:用于HPLC分析的分析条件

	流动相	50 mM 磷酸钠、200 mM NaCl, pH 7.2
	运行时间	15 分钟
	流速	1.0 mL/min
[0219]	柱	TSKgel G2000SW _{XL} , 7.8 mm ID×30 cm, 5 μm
	柱温度	25°C ± 5°C
	样品温度	5°C ± 3°C
	检测	280 nm 处的 UV 吸光度
	进样体积	100 μL

[0220] 表9:用于HPLC分析的进样顺序

[0221]	样品标识	进样次数
	流动相	1+
	配制物缓冲剂空白	1
	凝胶过滤标准品 (GFS)	1
	多肽A参考标准品	1
	样品	1
	多肽A参考标准品	1
	凝胶过滤标准品 (GFS)	1

[0222] 结果报告为大于0.05%面积的所有积分峰的面积%和洗脱时间。图2和图3描绘了每种测试配制物的SEC峰。

[0223] 基于细胞的活性分析

[0224] 每种配制物中的多肽A的活性通过测量配制物与HH细胞(在其表面上存在 $\beta\gamma$ IL2受体同种型的人T淋巴细胞细胞系)的结合来评估。使用ELISA分析,通过测定与每种配制物接触后HH细胞中存在的磷酸化STAT5(磷酸化-STAT5或pSTAT5)的量来测量多肽A结合。Invitrogen InstantOne ELISA磷酸化-STAT5 α/β (pTyr694/pTyr699)试剂盒用于进行ELISA分析。

[0225] 通过在2.2mL WFI中复原样品来制备药物产品样品。目视检查样品以确保内容物不含可见颗粒。

[0226] 通过将25mL胎牛血清(FBS)添加至500mL汉克斯平衡盐溶液(HBSS)中制备样品稀释剂,最终浓度为5% FBS,并升温至37℃。使用包含具有0.05% Tween 20的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的洗涤缓冲剂。

[0227] 将样品和标准品稀释至分析中750ng/mL、250ng/mL、83ng/mL、28ng/mL、9.3ng/mL、3.1ng/mL、1.0ng/mL和0.3ng/mL的最终蛋白质浓度。制备密度为大约 1.2×10^6 个细胞/mL的HH细胞储备溶液,并将50 μ L细胞储备溶液添加至含有稀释样品或标准品的96孔板的每个孔中。将细胞在37℃下培育30分钟。培育后,将细胞在细胞裂解缓冲剂中裂解10分钟。裂解后,将50 μ L裂解的细胞混合物转移至ELISA板上,然后加入50 μ L磷酸化-STAT5 A/B抗体混合液。接着将混合物培育1小时,接着用洗涤缓冲剂洗涤3次。接着将100 μ L检测试剂添加至每个孔中,并将板培育15分钟。接着将100 μ L终止溶液添加至每个孔中,并在酶标仪上以450nm读取板。

[0228] 测量单个EC50值并计算参考标准EC50值和对照EC50值的%相对标准偏差(RSD)。

[0229] 计算参考标准的三个EC50值的几何平均值(Ref Std EC50GM)和对照的三个EC50值的几何平均值(对照EC50)。对照的相对效力使用以下等式计算:相对效力=(RefStd EC50GM)/(对照EC50) $\times$ 100%。

[0230] 样品以相同的方式计算。分析结果由以下等式确定:相对效力=(RefStd EC50GM)/(测试样品EC50) $\times$ 100%。

[0231] 基于HH细胞系的活性分析的结果表明,多肽A在测试的各种配制物中保持活性(图1)。

[0232] 稳定性测试结果

[0233] 前述稳定性表征的结果揭示配制物4在保持多肽A的pH和蛋白质稳定性方面优于测试的其它配制物。

[0234] 实施例2-不同缓冲剂组分的筛选和其对稳定性的影响

[0235] 使用差示扫描量热法和OD350时程分析(用于基于热应力的筛选)和微流成像(用于基于振动应力的筛选)筛选适于pH范围6.0-7.0内的医药用途的几种缓冲剂对多肽A的稳定作用。

[0236] 将多肽A(最初在PBS缓冲剂中为11.6mg/mL)透析至pH 6.0的10mM组氨酸、10mM柠檬酸盐、100mM柠檬酸盐、10mM磷酸盐或10mM琥珀酸盐的五种缓冲剂之一中。透析在4℃下在Slide-A-Lyzer盒中进行,截留分子量为10,000Da且容量为3mL,且透析液体积与缓冲剂体

积之比为1:500+,以4+小时间隔更换2次缓冲剂,且在透析液回收前培育过夜。用过滤的(0.2 μ m)透析缓冲剂将透析液稀释至1.0mg/mL多肽A。接着一式三份地对这些样品进行分析。对于微流成像,将3mL的各样品一式两份地添加至5mL小瓶中,且将小瓶以300RPM摇动3天,接着合并复本。还在相同条件下摇动3mL缓冲剂以进行缓冲剂减除和空白处理。

[0237] 差示扫描量热法(DSC)

[0238] 使用配备有自动进样器的MicroCal毛细管差示扫描量热仪,以1mg/mL的多肽A浓度对所有样品一式三份地进行DSC实验。样品以60 $^{\circ}$ C/小时的速率从10 $^{\circ}$ C加热至90 $^{\circ}$ C,且记录温谱图。在每次进样之间清洗样品和参考细胞。使用Origin 7中的MicroCal分析包附加组件分析数据,并插值到相同的x轴值,以便能够求平均值。

[0239] 图4显示了温谱图的 T_m 值作为缓冲剂组成的函数。10mM柠檬酸盐的 T_m 值是所有样品中最高的,且10mM组氨酸缓冲剂的 T_m 值相对较低。

[0240] OD350时程(动力学)分析

[0241] OD350时程(动力学)分析在Cary 100UV-可见分光光度计上一式三份地进行,每个比色皿使用260 μ L体积的蛋白质溶液。每五分钟测量一次350nm处的光密度,平均时间为两秒,同时将温度保持在72 $^{\circ}$ C的恒定值。所有数据都导入到Origin实验室并插值到相同的x轴值,以便能够求平均值

[0242] 在72 $^{\circ}$ C的恒定温度下,每五分钟一式三份地收集多肽A样品的OD350值,持续八小时。图5显示了8小时后的平均OD350值。在72 $^{\circ}$ C下8小时后,含有柠檬酸盐缓冲剂的样品具有最低的OD350值。

[0243] 微流成像

[0244] 使用具有100 μ m硅烷涂层流通池的MFI DPA-4200 (Protein Simple, Santa Clara, CA) 系统检查2至70 μ m范围内的亚可见粒子。在测量之前,使用10 μ m聚苯乙烯粒子标准品(Duke)校准仪器。对于所有样品,在环境温度下一式三份地进行测量。在所有测量之前,用无粒子水冲洗池并使用无粒子水优化照明。样品在低蛋白结合、过滤头移液器(Neptune Scientific)中小心吸取,并使用0.2mL/min的流速进行分析。每次测量的吹扫体积为0.4mL,且分析了0.6mL样品。

[0245] 在以300RPM摇动3天后,对所有多肽A样品一式三份地进行MFI,且结果显示在图6中。10mM组氨酸中的样品在摇动3天后具有最高的总亚可见粒子浓度,且10mM柠檬酸盐中的样品具有最低的总亚可见粒子浓度。

[0246] 缓冲剂筛选的结论

[0247] 10mM组氨酸中的多肽A样品的热稳定性最低,在72 $^{\circ}$ C下随时间变化的初始OD350最高,且在3天摇动应力后的总亚可见粒子浓度最高。柠檬酸盐缓冲剂中的样品在72 $^{\circ}$ C下随时间变化的OD350最低,在3天摇动应力后的总粒子浓度最低,且在DSC数据中的样品热稳定性最高。

[0248] 实施例3-组氨酸缓冲剂与含蔗糖的柠檬酸盐以及含蔗糖和聚山梨醇酯20的柠檬酸盐的比较

[0249] 为了确定聚山梨醇酯20在3mg/mL柠檬酸盐、50mg/mL蔗糖,pH 6.1中的存在对总亚可见粒子浓度作为摇动应力的函数的影响,进行了微流成像。测试的缓冲剂为10mM组氨酸、含50mg/mL蔗糖的3mg/mL柠檬酸盐,以及含50mg/mL蔗糖和0.01%聚山梨酯20的3mg/mL柠檬

酸盐。在以300RPM摇动3天后通过微流成像一式三份地测量所有多肽A样品的总亚可见粒子浓度；且结果示于图7中。聚山梨醇酯20样品中的总亚可见粒子浓度最低。

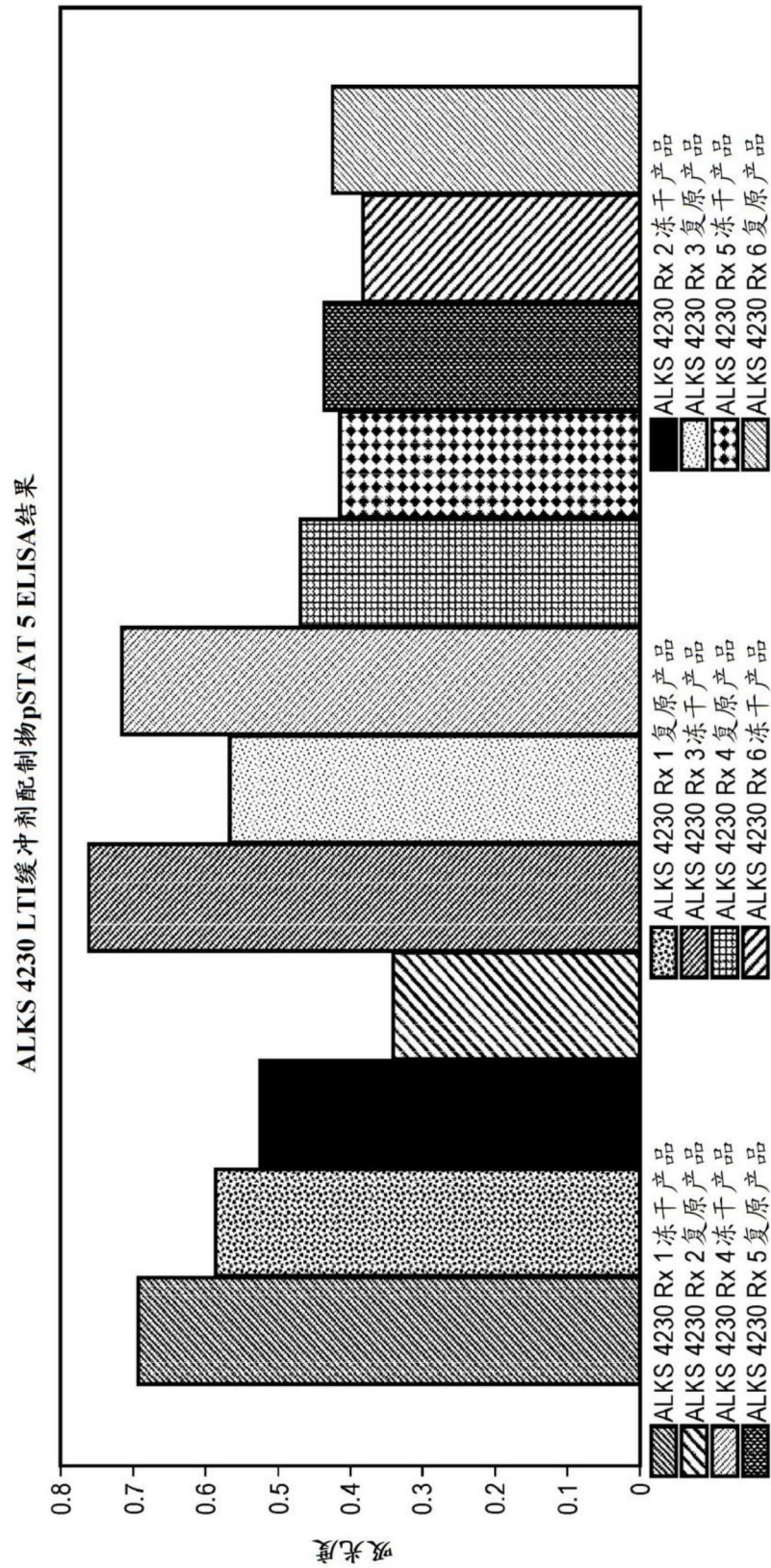


图1

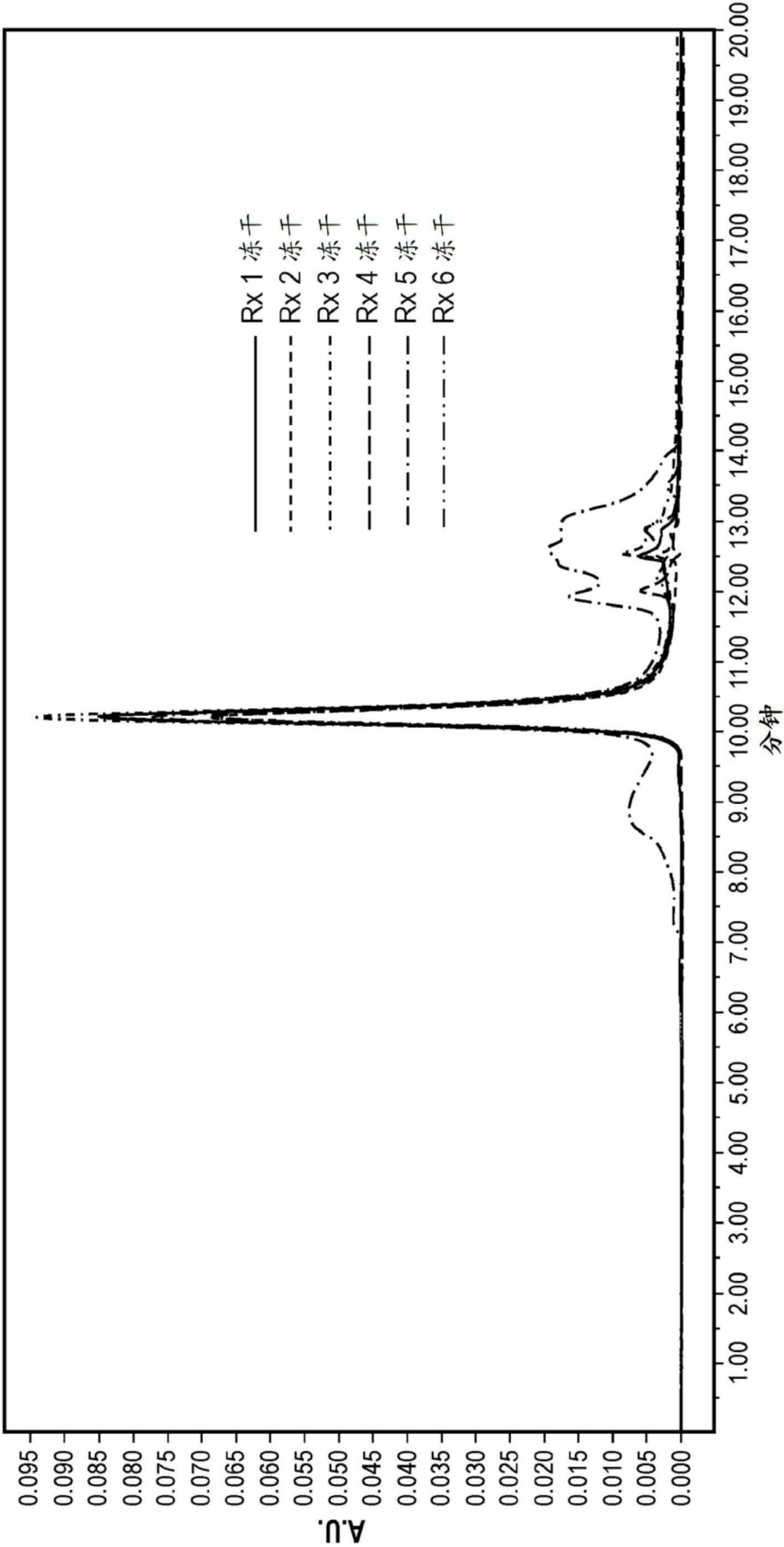


图2

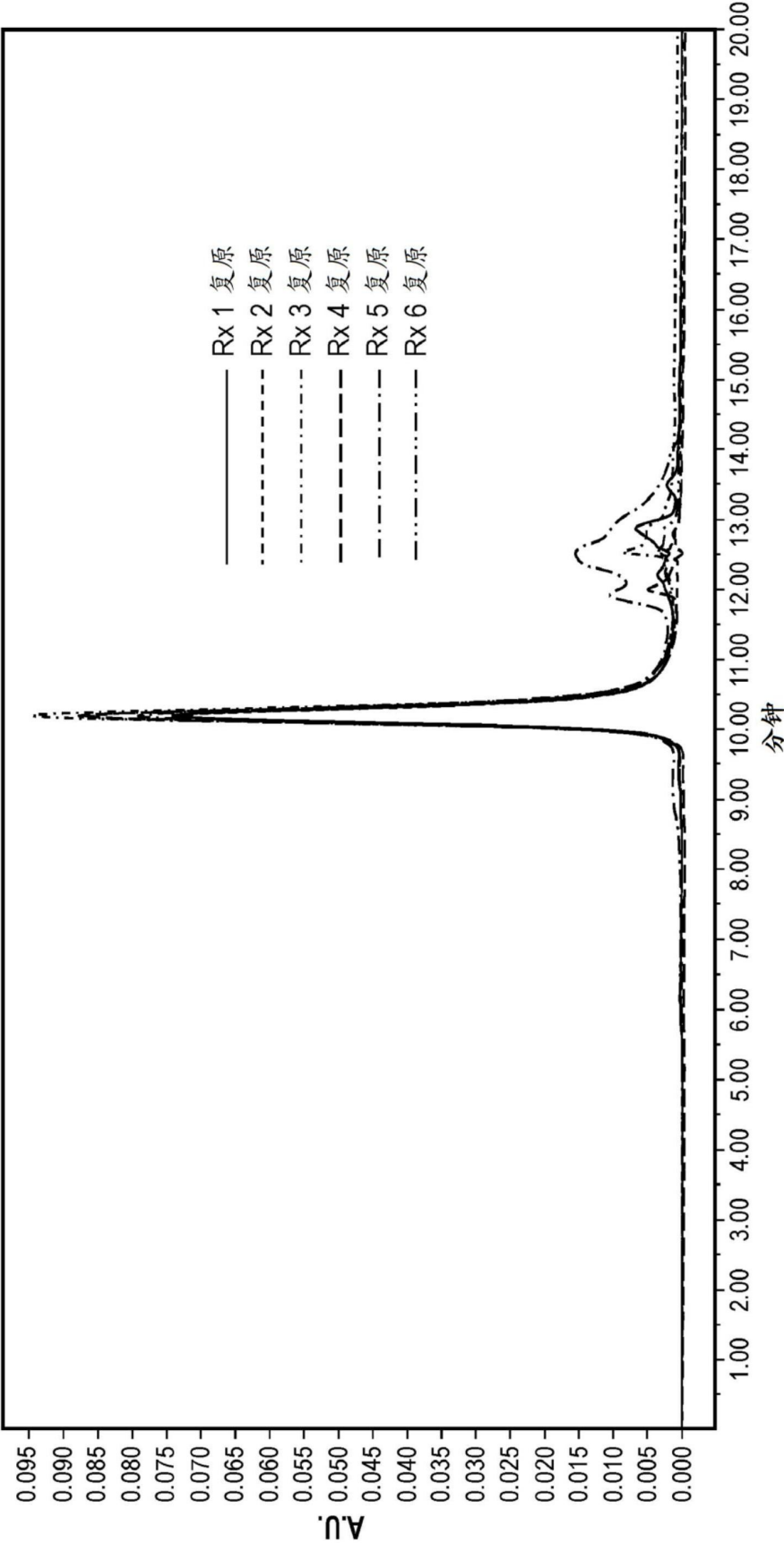


图3

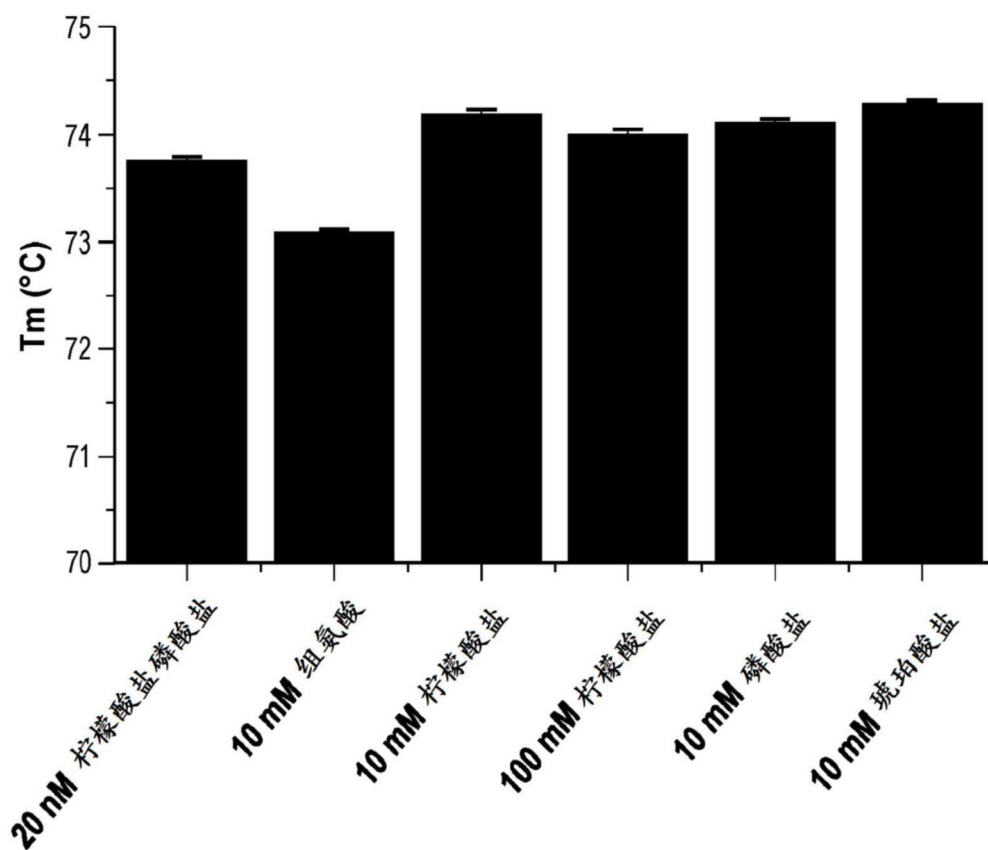


图4

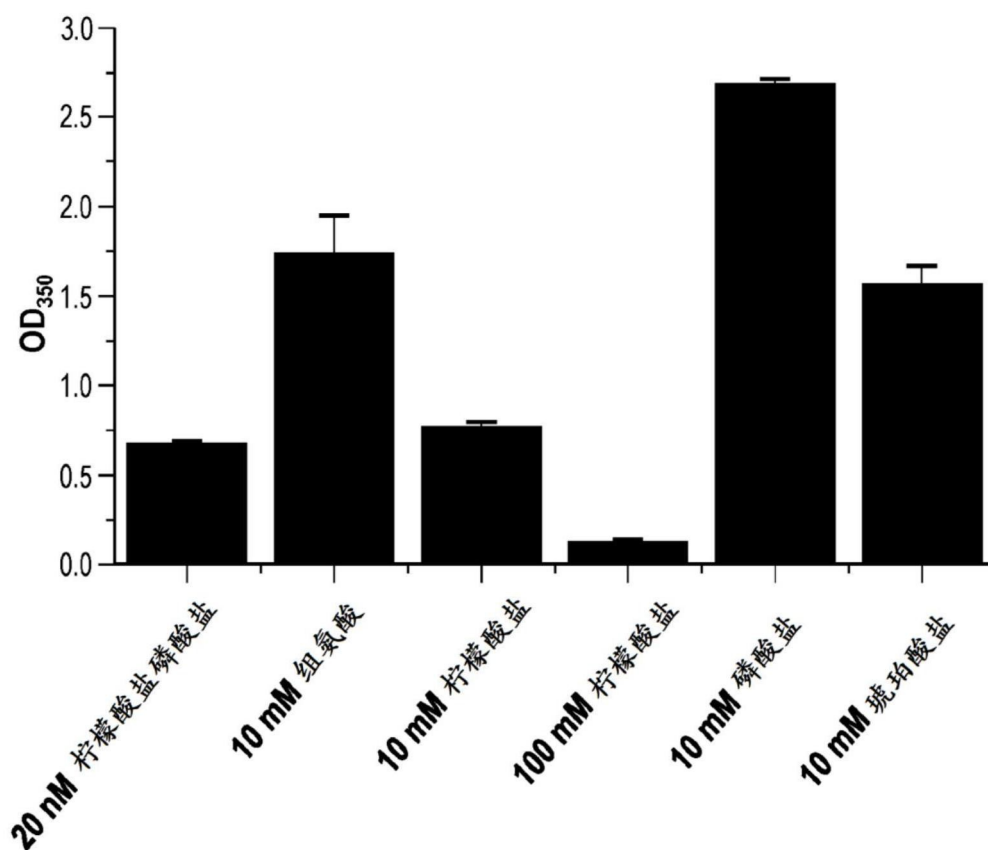


图5

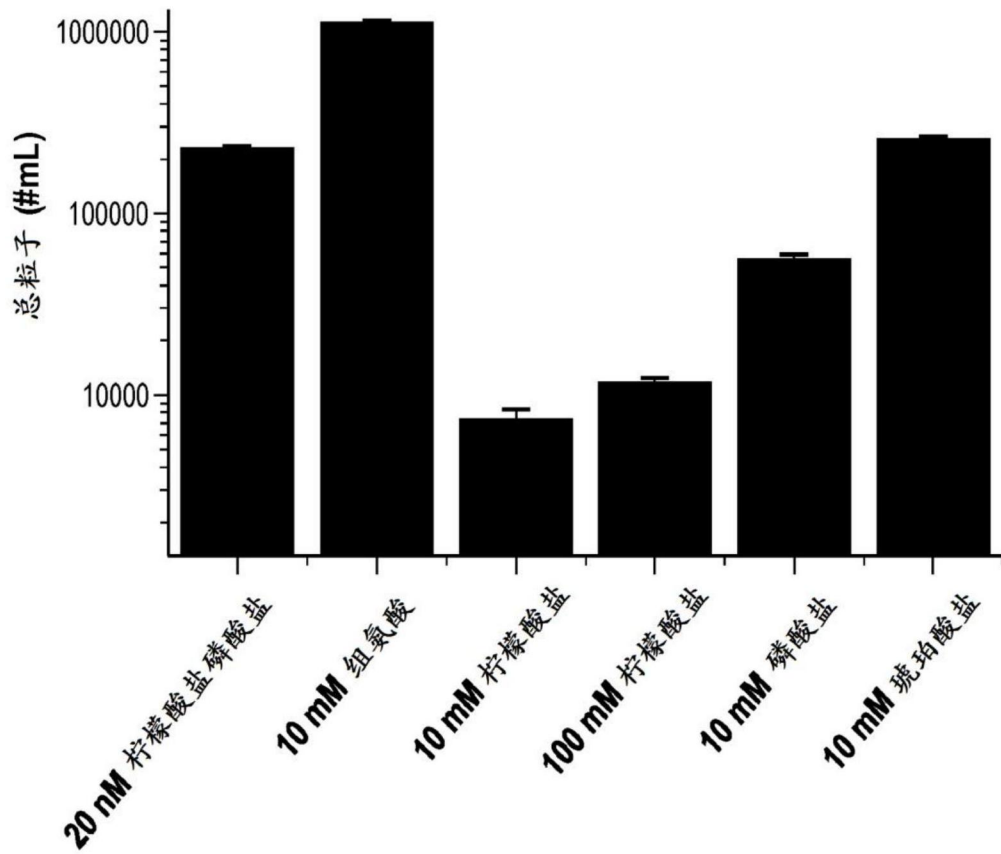


图6

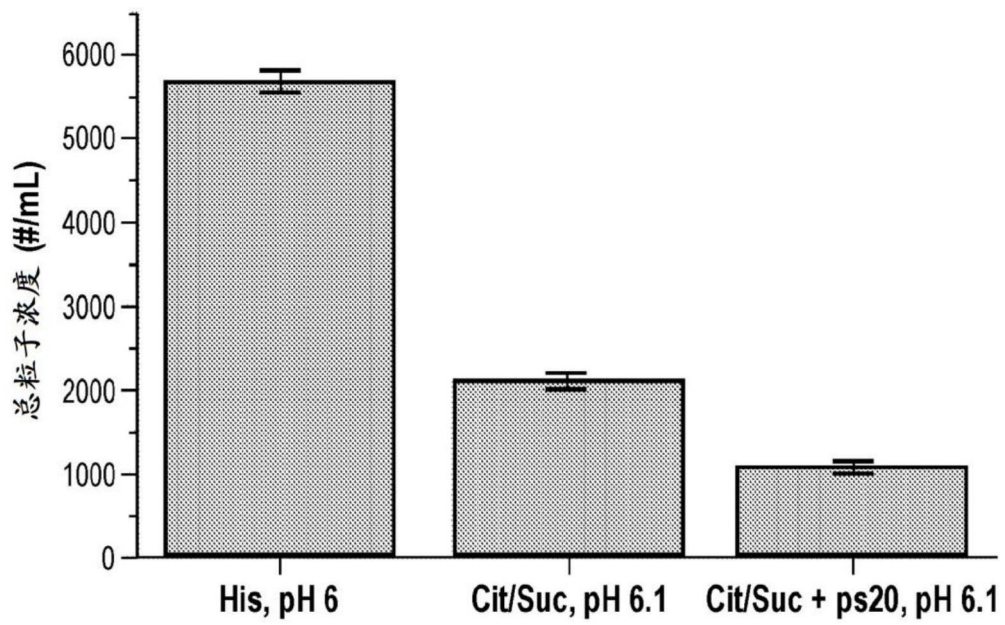


图7