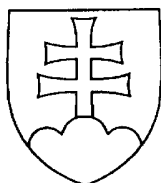


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ  
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: **27. 12. 2000**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/173 922**  
**09/724 810**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **30. 12. 1999**  
**28. 11. 2000**  
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US, US**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **8. 9. 2004**  
Vestník ÚPV SR č.: **9/2004**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US00/35452**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO01/49274**

(11), (21) Číslo dokumentu:

**1114-2002**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> :

**A61K 9/72,**  
**A61K 9/14,**  
**A61K 9/19,**  
**A61K 38/20**

(71) Prihlasovateľ: **CHIRON CORPORATION, Emeryville, CA, US;**

(72) Pôvodca: **Chen Bao-Lu, San Ramon, CA, US;**  
**Hora Maninder, Danville, CA, US;**

(74) Zástupca: **Bezák Marián, Ing., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Liečivo na poodávania interleukínu-2 a stabilizovaný lyofilizovaný alebo sprejovo sušený farmaceutický prostriedok s obsahom interleukínu-2**

(57) Anotácia:  
Je popísané použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, a použitia interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na zvýšenie biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu. Je popísaný aj stabilizovaný lyofilizovaný alebo sprejovo sušený farmaceutický prostriedok, ktorý obsahuje interleukínu-2 ako terapeuticky účinnú zložku.

SK 1114-2002 A3

## LIEČIVO NA PODÁVANIE INTERLEUKÍNU-2 A STABILIZOVANÝ LYOFILIZOVANÝ ALEBO SPREJOVO SUŠENÝ FARMACEUTICKÝ PROSTRIEDOK S OBSAHOM INTERLEUKÍNU -2

### Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka použitia interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, a použitia interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na zvýšenie biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu. Vynález sa taktiež týka stabilizovaného lyofilizovaného alebo sprejovo sušeného farmaceutického prostriedku, ktorý obsahuje interleukínu -2 ako terapeuticky účinnú zložku.

### Doterajší stav techniky

Pľúcna inhalácia poskytuje sľubný spôsob absorpcie peptidov a proteínov, ktoré sú ťažko orálne biologicky dostupné v dôsledku nedostatočného transportu cez gastrointestinálny epitel alebo z dôvodu vysokej hladiny prvotného pečeneového metabolizmu. Prípadné výhody tohto spôsobu dodávania liečiv obsahujúcich peptidy alebo proteíny je väčšia miera absorpcie z dôvodu absorpčnej povrchovej plochy, ktorá je približne 140 m<sup>2</sup>, a vysokého objemu krvi (5000 ml/min v ľudských pľúcach), prúdiacim cez pľúca. (Hollinger (1985) v Respiratory Pharmacology and Toxicology (Saunders, PA) s. 1-20). Nedostatok niektorých foriem peptidázovej/proteázovej aktivity v porovnaní s gastrointestinálnym traktom a nedostatok prvotného pečeneového metabolizmu absorbovaných zlúčenín zvyšuje potenciálne výhody podávania proteínových liečiv prostredníctvom pľúcnej inhalácie. Záujem o tento spôsob podávania sa zvýšil v posledných rokoch, pretože veľké množstvo potenciálnych liečiv obsahujúcich proteíny alebo peptidy je absorbovaných efektívnejšie z pľúc ako z gastrointestinálneho traktu. (Patton a Platz (1992) Adv. Drug. Del. Rev. 8: 179-196; Niven (1993) Pharm. Technol. 17: 72-82).

Podávanie farmaceutických formulácií obsahujúcich peptidy alebo proteíny pulmonálnou inhaláciou je známe, avšak len niekoľko príkladov bolo kvantitatívne doložené. Pozri, napríklad, Hubbard a kol. (1989) *Ann. Internal Med.* 3(3): 206-212 (plazma  $\alpha$ -1-antitrypsín); Smith a kol. (1989) *J. Clin. Invest.* 84: 1145-1154 ( $\alpha$ -1-proteinázový inhibítor). Pokusy na zvieratách ukázali, že ak sa rekombinantný ľudský rastový hormón zavádza pomocou aerosólu, ten je

absorbovaný z pľúc rýchlejšie a výsledkom je rýchlejší rast pri porovnaní s subkutánnou injekciou (Oswein a kol. (1990), „Aerosolization of Proteins“ v Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II (Keystone, Colorado, March 1990). Rekombinantné verzie cytokínov gama interferón (IFN- $\gamma$ ) a nádorový nekrotický  $\alpha$  faktor (TNF- $\alpha$ ) boli tiež pozorované v krvnom riečisku po aerosólovom podaní do pľúc (Debs a kol. (1988) J. Immunol. 140: 3482-3488). Uskutočniteľnosť pulmonálneho dodávania faktoru stimulujúceho kolónie granulocytov (G-CSF) a erytropoietínu (EPO) cicavcom bolo tiež predvedené. Pozri U.S. patenty č. 5 284 656 a 5 354 934, prípadne pozri U.S. patent č. 5 907 848, kde sa systémovo uskutočňovalo dodávanie inzulínu cicavčiemu hostiteľovi pomocou inhalácie suchého práškového aerosólu obsahujúceho inzulín.

Napriek týmto príkladom dodávania proteínu pulmonálnou cestou, zostáva nepredpovedateľné či určitý peptid môže byť dodávaný so systémovým efektom takýmto spôsobom. Ďalej, biologická dostupnosť polypeptidov zavádzaných pulmonálnou cestou je zvyčajne dosť nízka. Napríklad, pulmonálne podanie endotelínu-1 (ET-1), 21 aminokyselinového vazokonstričného peptidu produkovaného endoteliálnymi bunkami, nie je také účinné ako intravenózne podanie (Braquet a kol. (1989) J. Cardio. Pharm. 13, suppl. 5: 143-146). Vazoaktívny intestinálny peptid, malý polypeptid s molekulovou hmotnosťou 3 450 daltonov (D), ktorý zapríčiňuje bronchodilatáciu, keď sa podá intravenózne zvieratám, vrátane ľudí, nemá dostatočný účinok, keď sa podáva inhaláciou. (Barrowcliffe a kol. (1986) Thorax. 41/42: 88-93).

Úspešné dodávanie peptidov alebo proteínov hlboko do tkanív pľúc závisí od mnohých faktorov. Rozsah absorpcie vnútri pľúcnych tkanív sa mení podľa veľkosti a štruktúry polypeptidu a použitého zariadenia na zavádzanie, v rozsahu od 0 - 95 % podávanej dávky. Prístroje na dodávanie sú nebulizátory, inhalátory odmeriavajúce dávku a práškové inhalátory. Príprava farmaceutických kompozícií obsahujúcich proteíny alebo peptidy ako vodné kvapalné aerosóly, nevodné suspenzné aerosóly alebo suché práškové

aerosóly na pľúcne zavádzanie s použitím takýchto prístrojov na dodávanie môže ovplyvniť stabilitu polypeptidu, a z toho dôvodu biologickú dostupnosť a taktiež biologickú aktivitu po zavedení. Pozri Wall (1995) Drug delivery 2: 1 - 20, Krishnamurthy (March 1999) BioPharm., s. 34 - 38). Teda, úspešné pľúcne podávanie určitého terapeutického proteínu spôsobujúce systémový efekt sa nedá predpokladať dopredu pri testovaní na zvieracích modeloch. Jedným takýmto modelom je intratracheálna (IT) technika (Niven a kol. (1994) Pharm. Res. 12: 1142 - 1149; Niven a kol. (1995) Pharm. Res. 12 1889-1895). Tento model predpovedá pľúcnu absorpciu terapeutického proteínu (pozri, napríklad Patton a kol. (1994) J. Controlled Release 28: 79-85).

Interleukín-2 sa normálne podáva intravenóznou alebo subkutánnou injekciou. Pľúcne podávanie tohto proteínu poskytuje neinvazívnu alternatívu k týmto spôsobom podávania. Pľúcna inhalácia interleukínu-2 bola opísaná s použitím nebulizátora, ktorým sa dodáva vodná kvapalná formulácia obsahujúca IL-2. (U.S. patent č. 5 399 341 a 5 780 012). Avšak sa ukázalo, že pľúcne podávanie polypeptidov vo forme aerosólu s použitím rozprašovacieho systému denaturuje niektorých polypeptidov. (pozri Ip a kol. (1995) J. Pharm. Sci. 84: 1210-1214 (interferón); Niven a kol. (1994) Int. J. Pharm. 109: 17-26 (rekombinantný faktor stimulujúci kolónie granulocytov); a Niven a kol. (1995) Phar. Res. 12: 53-59). V priebehu rozprašovania je polypeptid vystavený šmykovému napätiu, ktoré môže zvyšovať stratu biologickej aktivity.

So zreteľom na vyššie uvedené, dodávanie proteínov s vysokou biologickou dostupnosťou zostáva náročnou úlohou. Navyše existuje potreba neinvazívnych metód podávania IL-2 so systémovou odozvou.

### **Podstata vynálezu**

Predmetom tohto vynálezu je použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, spôsobom, ktorý zahrňuje:

- a) získanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný monomérny IL-2 alebo jeho varianty,
- b) výrobu tohto prostriedku ako vodného, alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo nevodnej suspenzie, alebo ako suchej práškovej formy; a
- c) podanie tohto roztoku, suspenzie a suchej práškovej formy tohto prostriedku uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

Predmetom tohto vynálezu je taktiež použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, spôsobom, ktorý zahrňuje:

- a) získanie vysoko absorbovateľného farmaceutického prostriedku obsahujúceho monomérny IL-2, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.
- b) výrobu tohto prostriedku ako vodného, alebo alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo alebo nevodnej suspenzie alebo ako suchej práškovej formy; a
- c) podanie tohto roztoku, suspenzie a suchej práškovej formy tohto prostriedku uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

Predmetom tohto vynálezu je ďalej použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, spôsobom, ktorý zahrňuje:

- a) získanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho multimérny IL-2 alebo jeho varianty,
- b) výrobu uvedeného prostriedku ako vodného, alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo alebo nevodnej suspenzie alebo ako suchej práškovej formy; a
- c) podanie uvedeného roztoku, suspenzie alebo suchej práškovej formy tohto prostriedku subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

Predmetom tohto vynálezu je rovnako použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, spôsobom, ktorý zahrňuje:

- a) získanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný lyofilizovaný, alebo sprejovo sušený IL-2, alebo jeho varianty ;
- b) výrobu uvedeného prostriedku ako vodného, alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo alebo nevodnej suspenzie alebo ako suchej práškovej formy; a
- c) podanie uvedeného roztoku, suspenzie alebo suchej práškovej formy tohto prostriedku subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

Predmetom tohto vynálezu je rovnako použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na zvýšenie biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, spôsobom, ktorý zahŕňa podávanie vysoko absorbovateľného farmaceutického prostriedku obsahujúceho monomérny IL-2 uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.

Predmetom tohto vynálezu je rovnako použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na zvýšenie biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, spôsobom, ktorý zahŕňa podávanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho multimérny IL-2 uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.

Predmetom tohto vynálezu konečne je použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na zvýšenie biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, spôsobom, ktorý zahŕňa podávanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný, lyofilizovaný, alebo sprejovo sušený IL-2 uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.

Predmet tohto vynálezu ďalej tvorí stabilizovaný lyofilizovaný alebo sprejovo sušený farmaceutický prostriedok, ktorého podstata spočíva v tom, že obsahuje:

interleukín-2 (IL-2) ako terapeuticky účinnú zložku;

aspoň jedno činidlo na zväčšenie objemu prítomné v množstve od asi 0 % do asi 5 %;

aspoň jeden cukor vybraný zo súboru pozostávajúceho zo sacharózy, trehalózy, rafinózy, stachyózy, sorbitolu alebo aspoň z jednej aminokyseliny vybranej zo skupiny pozostávajúcej z arginínu a lyzínu, kde tento cukor je prítomný od asi 0 % do asi 9 %, a kde táto aminokyselina je prítomná od asi 0 % do asi 1 %; a

pufrovacie činidlo na udržanie tohto prostriedku pri pH v rozsahu od asi 4,0 do asi pH 8,5 keď je tento prostriedok rekonštituovaný ako kvapalina.

### **Prehľad obrázkov na výkresoch**

Obrázok 1 ukazuje profily strednej plazmovej koncentrácie Proleukinu po intratracheálnom (IT) (750  $\mu\text{g}$  rhIL-2/zviera) a subkutánnom (SC) (150  $\mu\text{g}$  rhIL-2/zviera) podaní krysám.

Obrázok 2 ukazuje profily strednej plazmovej koncentrácie monomérneho rhIL-2 s polysorbátom 80 (Tween 80) po intratracheálnom (IT) (375  $\mu\text{g}$ /zviera) a subkutánnom (SC) (75  $\mu\text{g}$ /zviera) podaní krysám.

Obrázok 3 ukazuje plazmovú koncentráciu IL-2 po intratracheálnom (IT) (375  $\mu\text{g}$ /zviera), subkutánnom (SC) (150  $\mu\text{g}$ /zviera) alebo intravenóznom (IV) (150  $\mu\text{g}$ /zviera) podaní monomérneho rhIL-2 s alebo bez polysorbátu 80 (Tween 80) krysám.

Obrázok 4 ukazuje plazmovú koncentráciu IL-2 po intratracheálnom (IT) (400  $\mu\text{g}$ /zviera), subkutánnom (SC) alebo intravenóznom (IV) (0,5 mg/zviera) podaní monomérneho rhIL-2 s alebo bez polysorbátu 80 (Tween 80) alebo arginínu krysám.



Obrázok 5 ukazuje plazmovú koncentráciu IL-2 po intratracheálnom (IT) (400 µg/zviera) podaní monoméneho rhIL-2 alebo Proleukinu s rôznymi povrchovo aktívnymi činidlami (Poloxamer 188, PEG 4600 a polysorbát 80 (Tween 80) v rôznych časoch). Všetky monoméne rhIL-2 formulácie obsahujú arginín, zatiaľ čo formulácie Proleukinu neobsahujú arginín.

### **Podrobný opis vynálezu**

Vynález je založený na spôsoboch podávania interleukínu-2 (IL-2) prostredníctvom pľúcnej inhalácie. Použitia podľa tohto vynálezu zahŕňajú prípravu farmaceutického prostriedku obsahujúceho IL-2 na následné podávanie ako vodného alebo nevodného roztoku alebo suspenzie alebo suchej práškovej formy. Medzi prostriedky na použitie podľa tohto vynálezu patria prostriedky obsahujúce stabilizovaný monométny IL-2 alebo jeho varianty, prostriedky obsahujúce multimétny IL-2 a prostriedky obsahujúce stabilizovaný lyofilizovaný alebo sprejovo sušený IL-2. Každý z týchto prostriedkov môže ďalej obsahovať tenzid v dostatočnom množstve na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po jeho pľúcnej inhalácii. Takéto prostriedky sú označované ako vysoko absorbovateľné prostriedky.

Vynález umožňuje spôsob zvýšenia biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie. Tento spôsob zahŕňa prípravu aerosolu alebo iného vhodného preparátu vysoko absorbovateľných prostriedkov popísaných v tomto vynáleze a podávanie aerosolu alebo iného vhodného preparátu subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

Spôsoby podávania interleukínu, predovšetkým interleukínu-2, subjektu sa vykonávajú prostredníctvom pľúcnej inhalácie. Interleukín-2 je lymfokín produkovaný normálnymi periférnymi lymfocytmi v krvi a je v tele prítomný v nízkych koncentráciách. To spôsobuje proliferáciu T buniek stimulovaných antigénom alebo mitogénom po vystavení pôsobeniu rastlinným lektínom, antigénom alebo iným stimulom. IL-2 prvý raz opísal Morgan a kol. (1976) Science 193: 1007-1008 a pôvodne bol pomenovaný ako rastový faktor T

buniek kvôli jeho schopnosti indukovať proliferáciu stimulovaných T lymfocytov. Ide o proteín s uvádzanou molekulovou hmotnosťou v rozmedzí od 13 000 do 17 000 (Gillis a Watson (1980) J. Exp. Med. 159: 1709) a izoelektrický bod ma v rozmedzí od 6 - 8,5. Pripúšťa sa okrem toho, že vlastnosti rastového faktora, menia funkcie imunitného systému *in vitro* alebo *in vivo*. IL-2 je jeden z niekoľkých lymfocyty produkujúcich mediátorových regulátorov, ktoré sprostredkovávajú interakcie a funkcie v bunke. Spôsoby tu opísané zahŕňajú pulmonálnu inhaláciu IL-2 alebo jeho variantov. IL-2 proteíny a jeho varianty zahrnuté v predkladanom vynáleze sú uvedené podrobne nižšie, po opísaní spôsobov a kompozícií podľa vynálezu.

Spôsoby podľa vynálezu zahŕňajú prípravu farmaceutických kompozícií obsahujúcich IL-2 alebo jeho varianty vo forme vhodnej na pulmonálne dodávanie a podávanie prípravku subjektu pulmonálnou inhaláciou. Výrazom „pulmonálna inhalácia“ sa myslí podávanie farmaceutickej kompozície priamo do pľúc zavádzaním tejto kompozície v aerosóle alebo inej vhodnej forme z dodávacieho prístroja do ústnej dutiny subjektu pričom subjekt inhaluje cez

ústnu dutinu. Výrazom „aerosól“ sa myslí suspenzia pevných alebo kvapalných častíc v prúdiacom vzduchu alebo inom fyziologicky prijateľnom plynnom prúde. Iné vhodné prípravky zahŕňajú, nie sú však na ne obmedzené, hmlu, paru alebo sprejové prípravky, pokiaľ častice obsahujúce kompozíciu proteínu sú zavádzané vo veľkosti, ktorá je nižšie opísaná pre farmaceutickú kompozíciu vo forme suchého prášku. Pulmonálna inhalácia sa môže uskutočňovať aj inými vhodnými spôsobmi, ktoré sú známe odborníkom v odbore. Tie môžu zahŕňať kvapalnú instiláciu, pri ktorej sa použije vhodné zariadenie alebo iné takéto spôsoby. Pulmonálna inhalácia má za následok usadzovanie inhalovaných kompozícií proteínu v alveolách pľúc subjektu. Usadené proteíny sa môžu absorbovať, pasívne alebo aktívne, cez vrstvy epitelu alveol alebo epitelu kapilár do krvného riečiska na následnú systémovú distribúciu.

Pulmonálne podávanie polypeptidov alebo proteínov ako je IL-2 vyžaduje dávkovanie biologicky aktívnych substancií z dávkovacích prístrojov do ústnej dutiny subjektu počas inhalácie. Pre účely predkladaného vynálezu, kompozície obsahujúce IL-2 alebo jeho varianty sa podávajú inhaláciou aerosólu alebo iného vhodného prípravku, ktorý sa získa z vodného alebo nevodného roztoku alebo suspenzie alebo pevnej alebo suchej práškovej formy farmaceutickej kompozície, v závislosti od použitého dávkovacieho prístroja. Takéto dávkovacie prístroje sú známe zo stavu techniky, ale nie sú na ne obmedzené, nebulizátory, inhalátory odmeriavajúce dávku, inhalátory suchého prášku a iné primerané dávkovacie mechanizmy, ktoré umožňujú dávkovanie farmaceutických kompozícií vo forme vodného alebo nevodného roztoku alebo suspenzie alebo ako pevné alebo suché prášky. Výrazom „vodný“ sa myslí kompozícia pripravená s, obsahujúca alebo rozpustená vo vode, vrátane zmesi kde je voda prevládajúcou substanciou zmesi. Prevládajúca substancia je prítomná v omnoho väčšom množstve ako ostatné komponenty zmesi. Výrazom „nevodný“ sa myslí kompozícia pripravená s, obsahujúca alebo rozpustená v substancii inej ako voda alebo zmesi, kde voda nie prevládajúcou substanciou v zmesi. Výrazom „roztok“ sa myslí homogénny prípravok jednej alebo dvoch substancií, ktoré môžu byť pevné, kvapalné alebo plynné alebo ich vzájomné kombinácie. Výrazom „suspenzia“ sa myslí zmes substancií, pričom

jedna alebo viac nerozpustných substancií je homogénne dispergovaných v inej prevládajúcej substancii.

Pre účely predkladaného vynálezu sú výrazy „pevný“ alebo „suchý prášok“ zameniteľné. Výrazom „pevná“ alebo „suchá prášková“ forma farmaceutickej kompozície sa myslí kompozícia vysušená na jemný prášok s obsahom vlhkosti menej ako približne 10 % hmotn., zvyčajne menej ako približne 5 % hmotn. a výhodne menej ako približne 3 % hmotn. Táto suchá prášková forma kompozície pozostáva z častíc obsahujúcich IL-2 alebo jeho varianty. Častice majú výhodne stredný priemer menej ako približne 10  $\mu\text{m}$ , výhodnejšie menej ako približne 7  $\mu\text{m}$ , ešte výhodnejšie menej ako približne 6  $\mu\text{m}$  a ešte výhodnejšie v rozmedzí od 0,1 do 5  $\mu\text{m}$ , najvýhodnejšie v rozmedzí od 1,0 do približne 5  $\mu\text{m}$ .

Teda, kvapalnú farmaceutickú kompozíciu obsahujúcu IL-2 alebo jeho varianty určenú na použitie v spôsoboch podľa predkladaného vynálezu môžu byť ďalej použité ako kvapalnú roztok alebo suspenzia v dávkovacom prístroji alebo môžu byť najskôr spracované na suchú práškovú formu s pomocou lyofilizácie alebo sprejových sušiacich techník známych v odbore. Kvapalnú roztok alebo suspenzia sa používa v dodávacom prístroji, nebulizátore, inhalátore odmeriavajúcom dávku alebo inom vhodnom dodávacom zariadení ako jednotlivá a rozdelená dávka na pulmonálnu inhaláciu farmaceuticky účinného množstva kompozície do pľúc subjektu ako kvapôčky, ktoré majú rovnakú veľkosť ako bolo vyššie uvedené pre suchú práškovú formu. Výrazom „farmaceuticky účinné množstvo“ sa myslí množstvo potrebné na liečenie, prevenciu alebo diagnostiku choroby alebo ťažkostí. Kvapalnú roztok alebo suspenzia kompozície sa môže použiť s fyziologicky vhodnými stabilizujúcimi činidlami, napučňavkami, excipientami, povrchovo aktívnymi látkami alebo ich kombináciami ako sa pojednáva ďalej. Príklady vhodných excipientov zahrňujú, ale nie sú na ne obmedzené, pufre, modifikátory viskozity alebo iné terapeuticky neaktívne ale funkčné aditíva.

Kvapalnú farmaceutickú kompozíciu sa prednostne lyofilizujú na použitie v spôsoboch podľa vynálezu, pričom lyofilizované kompozície sa melú za získania jemného suchého prášku pozostávajúceho z častíc veľkosti uvedených vyššie. Sprejové sušenie sa používa na získanie suchej práškovej formy kvapalnej farmaceutickej kompozície, pričom proces sa realizuje za podmienok, výsledkom ktorých je v podstate jemný amorfný suchý prášok pozostávajúci z častíc, ktorých požadovaná veľkosť je uvedená vyššie. Podobne, keď je už počiatočná farmaceutická kompozícia v lyofilizovanej forme, môže sa kompozícia pomlieť, za získania suchej práškovej formy na ďalšiu prípravu aerosólu alebo iného prípravku vhodného na pulmonálnu inhaláciu. Keď začiatočnou farmaceutickou kompozíciou je sprejovo šušená forma, kompozícia je výhodne pripravená tak, že je už v suchej práškovej forme častice majú vhodnú veľkosť na dávkovanie ako vodný alebo nevodný roztok alebo suspenzia alebo suchá prášková forma v súlade so spôsobmi pulmonálneho podávania podľa vynálezu. Spôsoby prípravy suchej práškovej formy farmaceutických kompozícií pozri, napr. WO 96/32149, WO 97/41833, WO 98/29096 a U.S. patenty č. 5 976 574, 5 985 248 a 6 001 336; tu uvedené ako odkazy.

Výsledná suchá prášková forma kompozície sa potom umiestni vo vnútri vhodného dávkovacieho prístroja kvôli následnej príprave aerosólu alebo iného vhodného prostriedku, ktorý je dodávaný subjektu pulmonálnou inhaláciou. Suchá prášková forma farmaceutickej kompozície sa pripraví a dávkuje sa za použitia inhalátora odmeriavajúceho dávku alebo iného vhodného prístroja ako vodný alebo nevodný roztok alebo suspenzia. Farmaceuticky účinné množstvo suchej práškovej formy kompozície sa podáva ako aerosól alebo iný prostriedok vhodný na pulmonálnu inhaláciu. Množstvo suchej práškovej formy kompozície umiestnené vo vnútri dodávacieho prístroja umožňuje dostatočné dodávanie farmaceuticky účinného množstva kompozície subjektu inhaláciou. Množstvo suchej práškovej formy umiestnené v dodávacom prístroji bude kompenzovať možné straty prístroja počas skladovania a dodávania suchej práškovej formy kompozície. Po umiestnení suchej práškovej formy vo vnútri dodávacieho prístroja, častice vhodnej veľkosti ako je uvádzané vyššie sú

suspendované v pohonnej látke aerosólu. Stlačená nevodná suspenzia je potom uvoľnená z dodávacieho prístroja do dýchacích ciest subjektu počas inhalácie. Dodávací prístroj dodáva dávku kompozície jednorazovo alebo rozdelenú na viacero dávok pulmonálnou inhaláciou do pľúc subjektu v farmaceuticky účinnom množstve. Aerosólová pohonná látka môže byť každá bežná látka používaná na tento účel, ako je chlórfluóruhlík, hydrochlórfluóruhlík, hydrofluóruhlík alebo uhľovodíky, vrátane trichlórfluórmetánu, dichlórdifluórmetánu, dichlór-tetrafluórmetánu, dichlórdifluórmetánu, dichlór-tetrafluóretanolu a 1,1,1,2-tetrafluóretánu alebo ich kombinácie. Povrchovo aktívne látky sa môžu pridávať k farmaceutickej kompozícii na redukciu adhézie suchého prášku obsahujúceho proteíny k stenám dodávacieho prístroja, z ktorého sa aerosól dávkuje. Vhodné povrchovo aktívne látky na takéto použitie zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, sorbitan trioleát, sójový lecitín a olejová kyselina. Prístroje vhodné na pulmonálne zavádzanie suchej práškovej formy kompozície proteínu ako nevodná suspenzia sú komerčne dostupné. Príklady takýchto prístrojov zahrňujú inhalátor odmeriavajúci dávku Ventolin (Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC) a inhalátor Intal (Fisons, Corp., Bedford, MA). Pozri tiež aerosólové dodávacie prístroje opísané v U.S. patentoch 5 522 378, 5 775 320 5 934 272 a 5 960 792, tu zahrnuté ako odkazy.

Keď pevná alebo suchá prášková forma farmaceutickej kompozície má byť dodávaná ako suchá prášková forma, výhodným dodávacím prístrojom je inhalátor suchého prášku. Suchá prášková forma farmaceutickej kompozície sa výhodne pripravuje ako suchý práškový aerosól dispergovaním v prúdiacom vzduchu alebo v inom fyziologicky prijateľnom plynnom prúde bežným spôsobom. Príklady komerčne dostupných inhalátorov suchého prášku vhodných na použitie podľa spôsobov tu uvedených zahrňujú Spinhaler práškový inhalátor (Fisons Corp., Bedford, MA) a Ventolin Rotahaler (Glaxo, Inc. Research Triangle Park, NC). Pozri tiež dodávacie zariadenia suchého prášku opísané v WO 93/00951, WO 96/09085, WO 96/32152 a U.S. patenty 5 458 135, 5 785 049 a 5 993 783, tu zahrnuté ako odkazy.

Farmaceutická kompozícia vo forme suchého prášku obsahujúca IL-2 alebo jeho varianty sa môže rekonštituovať na vodný roztok na následné dodávanie ako vodný roztok aerosólu s použitím nebulizátora, inhalátora odmeriavajúceho dávku alebo iného vhodného dodávacieho prístroja. V prípade nebulizátora vodný roztok držaný vo vnútri fluidnej nádržky sa premení na vodný sprej, ktorého len malá časť opúšťa nebulizátor kvôli dodaniu kompozície subjektu v akomkoľvek čase. Zostávajúci sprej sa odvedie späť do fluidnej nádržky vo vnútri nebulizátora, kde sa znova aerosilizuje na vodný sprej. Tento proces sa opakuje dovtedy, kým fluidná nádržka nie je úplne vyčerpaná alebo do vtedy, kým podávanie aerosolizovaného spreja nie je ukončené. Takéto nebulizátory sú komerčne dostupné a zahrňujú, napríklad nebulizátor Ultravent (Mallinckrodt Inc., St. Luis, MO) a nebulizátor Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood, CO). Pozri tiež nebulizátor opísaný v WO 63/00951, a zariadenie na dodávanie aerosolizovanej vodnej formulácie opísané v U.S. patente č. 5 544 646, tu zahrnutý ako odkaz.

Akákoľvek IL-2 farmaceutická kompozícia sa môže použiť v spôsoboch podľa vynálezu. Takéto farmaceutické kompozície sú známe v odbore a zahrňujú, ale nie sú na ne obmedzené, tieto zverejnené U.S. patenty č. 4 745 180; 4 766 106; 4 816 440; 4 894 226; 4 931 544 a 5 078 997, všetky sú tu zahrnuté ako odkazy. Kvapalné, lyofilizované alebo sprejovo sušené kompozície obsahujúce IL-2 alebo jeho varianty, ktoré sú známe zo stavu techniky sa môžu pripraviť ako vodný alebo nevodný roztok alebo suspenzia alebo ako suchá prášková forma na ďalšie podávanie subjektu pulmonálnou inhaláciou. Každá z týchto kompozícií bude obsahovať IL-2 alebo jeho varianty ako terapeuticky alebo profylakticky aktívnu zložku. Výrazom „terapeuticky alebo profylakticky aktívna zložka“ sa myslí IL-2 alebo jeho varianty špecificky inkorporované do kompozície za účelom vyvolať požadovaný terapeutický účinok s ohľadom na liečenie, prevenciu alebo diagnostikovanie ochorenia alebo potiaží u subjektu, keď sa farmaceutická kompozícia podáva subjektu. Výhodne farmaceutická kompozícia zahŕňa vhodné stabilizujúce činidlá, napučiavadlá alebo oboje na minimalizovanie problémov spojených so stratou stability proteínu a biologickej aktivity počas lyofilizácie, sprejovom sušení alebo

aerosolizácie, vrátane spôsobov pulmonálneho podávania podľa vynálezu.

Vo výhodnom uskutočnení vynálezu, farmaceutické kompozície použiteľné v spôsoboch podľa vynálezu sú kompozície obsahujúce stabilizovaný monomérny IL-2 alebo jeho varianty, kompozície obsahujúce multimérny IL-2 alebo jeho varianty, kompozície obsahujúce stabilizovaný lyofilizovaný alebo sprejovo sušený IL-2 alebo jeho varianty a vysoko absorbovateľné formy takýchto kompozícií, ako sa tu uvádza.

Farmaceutické kompozície obsahujúce monomérny IL-2 alebo jeho varianty sú zverejnené v závislej prihláške s názvom „Stabilizované kvapalné polypeptidy obsahujúce farmaceutické kompozície“ (Stabilized Liquid Polypeptide-containing Pharmaceutical Compositions) podanej 4. októbra 1999 s číslom 60/157696, ktorej uvedenie je tu zahrnuté ako odkaz. Výrazom „monomérny“ IL-2 sa myslia molekuly proteínu, ktoré sú prítomné v podstate vo svojej monomérnej forme, nie v agregovanej forme, vo farmaceutických kompozíciách tu opísaných. Preto kovalentné alebo hydrofóbne oligoméry alebo agregáty IL-2 nie sú prítomné. Stručne, IL-2 alebo jeho varianty v týchto kvapalných kompozíciách je formulovaný s určitým množstvom aminokyselinovej bázy, ktorá znižuje možnosť tvorby agregátov IL-2 alebo jeho variantov počas skladovania. Aminokyselinová báza je aminokyselina alebo kombinácia aminokyselín, kde ktorákoľvek aminokyselina je prítomná aj vo forme ako voľná báza alebo ako soľ. Výhodné aminokyseliny sú vybrané zo skupiny pozostávajúcej z arginínu, lyzínu, kyseliny asparágovej alebo kyseliny glutámovej. Tieto kompozície ďalej obsahujú pufr na udržiavanie pH kvapalnej kompozície s rozsahom prijateľným na udržanie stability IL-2 alebo jeho variantov, kde pufr je v podstate kyselina bez svojej soli, kyselina vo svojej soli alebo zmes kyseliny a jej soli. Výhodne je kyselina vybraná zo skupiny obsahujúcej kyselinu jantárovú, kyselinu citrónovú, kyselinu fosforečnú alebo kyselinu glutámovú.

Aminokyselinová báza v týchto kompozíciách slúži na stabilizáciu IL-2 jeho variantov proti vzniku agregátov počas skladovania kvapalnej farmaceutickej kompozície, s použitím kyseliny v podstate bez svojej soli,



kyseliny vo svojej soli alebo zmesi kyseliny a jej soli ako pufru, pričom výsledkom je kvapalná kompozícia, ktorej osmolarita je blízka izotonická. Ku kvapalným farmaceutickým kompozíciám sa môžu dodatočne pridať ďalšie stabilizujúce činidlá, obzvlášť metionín, neiónové povrchovo aktívne látky ako je polysorbát 80 a EDTA, na ďalšie zvýšenie stability polypeptidu. Takéto kvapalné farmaceutické kompozície sú stabilizované ako je spomínané, prídavkom aminokyselinovej bázy v kombinácii s kyselinou v podstate bez jej soli, kyselinou s jej soľou alebo zmesou kyseliny a jej soli, výsledkom čoho je kompozícia so zvýšenou stabilitou pri skladovaní pri porovnaní s kvapalnou kompozíciou formulovanou bez prítomnosti kombinácie týchto dvoch komponentov.

Tieto kvapalné farmaceutické kompozície obsahujúce stabilizovaný monomérny IL-2 alebo jeho varianty sa môžu použiť buď ako vodná forma alebo pripraviť ako pevná alebo suchá prášková forma na použitie v spôsoboch podľa predkladaného vynálezu, ako je uvedené vyššie.

Príklady farmaceutických kompozícií obsahujúcich multimérny ľudský IL-2 alebo jeho varianty sú zverejnené v U.S. patente č. 4 604 377, zverejnenie, ktorého je tu zahrnuté ako odkaz. Výrazom multimérny sa myslia molekuly proteínu prítomné vo farmaceutickej kompozícii v mikroagregovanej forme, ktorej molekulové asociácie pozostávajú z 10-50 molekúl. Tieto multiméry sú prítomné ako voľne viazané, fyzikálne spojené IL-2 molekuly. Lyofilizovaná forma týchto kompozícií je komerčne dostupná pod obchodným názvom Proleukin (Chiron Corporation). Lyofilizované formulácie zverejnené v tomto odkaze zahrňujú selektívne oxidovaný, mikrobiálne produkovaný rekombinantný ľudský IL-2 („rhIL-2“), v ktorom rekombinantný IL-2 je primiešaný k vo vode rozpustnému nosiču ako je manitol, ktorý poskytuje objem a dostatočnému množstvu dodecylsulfátu sodného na zabezpečenie rozpustnosti rekombinantného IL-2 vo vode. Tieto kompozície sú vhodné na rekonštitúciu vo vodnej injekcii pri parenterálnom podaní a stabilné a dobré tolerované ľudskými pacientmi. Po rekonštituovaní si IL-2 a jeho varianty zachovávajú multimérny stav. Takéto lyofilizované alebo kvapalné kompozície obsahujúce multimérny

IL-2 alebo jeho varianty sú zahrnuté v spôsoboch podľa predkladaného vynálezu.

Keď farmaceutické kompozície obsahujúce IL-2 alebo jeho varianty sú spracované do pevnej alebo suchej práškovej formy na ďalšie dodávanie ako aerosól, môže byť žiaduce aby bol prítomný nosičový materiál, ktorý slúži ako činidlo na zväčšenie objemu alebo stabilizujúce činidlo. Takto predkladaný vynález zahŕňa stabilizované lyofilizované alebo sprejovo sušené farmaceutické kompozície obsahujúce IL-2 alebo jeho varianty na použitie v spôsoboch podľa predkladaného vynálezu. Tieto kompozície môžu ďalej obsahovať aspoň jedno činidlo na zväčšenie objemu, aspoň jedno činidlo v množstve dostatočnom na stabilizáciu proteínu počas sušiacoho procesu alebo obe činidlá. Výrazom „stabilizovaný“ sa myslí IL-2 proteín alebo jeho varianty, ktoré si zachovávajú monométnu alebo multimétnu formu a taktiež aj iné kľúčové vlastnosti ako je kvalita, čistota a účinnosť po lyofilizácii alebo sprejovom sušení za získania pevnej alebo suchej práškovej formy kompozície.

Výhodné nosičové materiály používané ako činidlá na zväčšenie objemu zahŕňajú glycín, manitol, alanín, valín alebo ich kombinácie, najvýhodnejší je glycín. Činidlo na zväčšenie objemu je prítomné vo formulácii v rozmedzí od 0 % do približne 10 % (w/v), v závislosti od použitého činidla. Keď je činidlom na zväčšenie objemu glycín, je prítomný v rozmedzí od približne 0 % do približne 4 %, výhodne približne 0,25 % do približne 3,5 %, výhodnejšie približne 0,5 % do 3,0 %, ešte výhodnejšie približne 1,0 % do približne 2,0 %, najvýhodnejšie približne 2,0 %. Keď je činidlom na zväčšenie objemu manitol, je prítomný v rozmedzí od približne 0 % do približne 5,0 %, výhodne približne 1,0 % do približne 4,5 %, výhodnejšie približne 2,0 % do približne 4,0 %, najvýhodnejšie približne 4,0 %. Keď je činidlom na zväčšenie objemu alanín alebo valín, sú prítomné v rozmedzí od približne 0 % do približne 5,0 %, výhodne približne 1,0 % do približne 4,0 %, výhodnejšie približne 1,5 % do približne 3,0 %, najvýhodnejšie približne 2,0 %.

Výhodné nosičové materiály používané ako stabilizátory zahŕňajú akýkoľvek cukor alebo cukrový alkohol alebo akúkoľvek aminokyselinu.

Výhodnými cukrami sú sacharóza, trehalóza, rafinóza, stachyóza, sorbitol, glukóza, laktóza, dextróza alebo ich kombinácie, výhodne sacharóza. Keď je stabilizátorom cukor, je prítomný v rozmedzí od približne 0 % do približne 9,0 (w/v), výhodne približne 0,5 % do približne 5,0 %, výhodnejšie približne 1,0 % do približne 3,0 %, najvýhodnejšie približne 1,0 %. Keď je stabilizátorom aminokyselina, je prítomná v rozmedzí od približne 0 % do približne 1,0 (w/v), výhodne približne 0,3 % do približne 0,7 %, najvýhodnejšie približne 0,5 %.

Takéto stabilizované alebo sprejovo sušené kompozície môžu ľubovoľne obsahovať metionín, kyselinu etyléndiamíntetraoctovú (EDTA) alebo jednu z jej solí ako je disodná soľ EDTA alebo iné chelatačné činidlo, ktoré chráni IL-2 alebo jeho varianty proti oxidácii metionínom. Použitie týchto činidiel týmto spôsobom je opísané v patentovej prihláške U.S. č. 60/157696, tu zahrňte ako odkaz. Metionín je prítomný v stabilizovanej alebo sprejovo sušené farmaceutickej kompozícii v koncentráciách od približne 0 do približne 10,0 mM, výhodne približne 1,0 do približne 9,0 mM, výhodnejšie približne 2,0 do približne 8,0 mM, ešte výhodnejšie približne 3,0 do približne 7,0 mM, ešte viac výhodnejšie približne 4,0 do približne 6,0 mM, najvýhodnejšie približne 5,0 mM. EDTA je prítomná koncentráciách od približne 0 do približne 10,0 mM, výhodne približne 0,2 mM do približne 8,0 mM, výhodnejšie približne 0,5 mM do približne 6,0 mM, ešte výhodnejšie približne 0,7 mM do približne 4,0 mM, ešte viac výhodnejšie približne 0,8 mM do približne 3,0 mM, ešte viac výhodnejšie približne 0,9 mM do približne 2,0 mM, najvýhodnejšie približne 1,0 mM.

Stabilizované alebo sprejovo sušené kompozície sa môžu formulovať s použitím puľrovacieho činidla, ktoré udržiava pH farmaceutickej kompozície v prijateľnom rozmedzí, keď je v kvapalnej fáze, tak aj počas formulačného procesu alebo po rekonštitúcii vysušenej formy kompozície. Výhodne je pH v rozmedzí od približne 4,0 do približne pH 8,5, výhodnejšie je približne pH 4,5 do približne pH 7,5, ešte výhodnejšie približne pH 5,0 do približne pH 6,5, výhodnejšie ešte približne pH 5,6 do približne pH 6,3, a najvýhodnejšie približne pH 5,7 do približne pH 6,2. Vhodné pH zahŕňa približne 4,0, približne 4,5, približne 5,0, približne 5,1, približne 5,2, približne 5,3, približne 5,4, približne

5,5, približne 5,6, približne 5,7, približne 5,8, približne 5,9, približne 6,0, približne 6,1, približne 6,2, približne 6,3, približne 6,4, približne 6,5, približne 6,6, približne 6,7, približne 6,8, približne 6,9, približne 7,0, približne 7,1, približne 7,2, približne 7,3, približne 7,4, približne 7,5, až do 8,5. Najvýhodnejšie pH je približne 5,8.

Vhodné pufovacie činidlá zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, citrátový pufo, fosforečnanový pufo, sukcinátový pufo, výhodnejšie citrát sodný/kyselina citrónová. Alternatívne môže byť použitý imidazol alebo histidín alebo iná báza/kyselina, ktorá udržiava pH v rozmedzí od približne pH 4,0 do približne 8,5. Pufo sa vyberajú s ohľadom na kompatibilitu so sušiacim procesom a nemajú vplyv na kvalitu, čistotu, účinnosť a stabilitu počas spracovania a skladovania.

Podľa jedného uskutočnenia vynálezu, stabilizované lyofilizované alebo sprejovo sušené farmaceutické kompozície obsahujú IL-2 alebo jeho varianty, glycín v rozmedzí od približne 0 % do približne 2,0 %, sacharózu v rozmedzí od približne od približne 0 % do približne 9,0 %, metionín v koncentrácii od približne 0 mM do približne 10 mM a EDTA v koncentrácii od približne 0 mM do približne 10 mM, ktorá pufruje pH od približne pH 5,0 do približne pH 8,0 s 10,0 mM citrátom sodným/kyselinou citrónovou ako pufo. Vo výhodnom uskutočnení stabilizované lyofilizované alebo sprejovo sušené farmaceutické kompozície obsahujúce IL-2 alebo jeho varianty ďalej obsahujú 2,0 % glycínu, 1,0 % sacharózy, 5,0 mM metionínu, 1,0 mM EDTA a viac ako 0 % do približne 1,0 % polysorbátu 80, pH je pufované od približne 6,0 do približne pH 7,0 s 10 mM citrátom sodným/kyselinou citrónovou. Koncentrácia IL-2 alebo jeho variantov v týchto kompozíciách je približne 0,01 mg/ml do približne 1,0 mg/ml, výhodne približne 0,2 mg/ml do približne 0,8 mg/ml, výhodnejšie približne 0,3 mg/ml do približne 0,6 mg/ml, najvýhodnejšie približne 0,3 mg/ml do približne 0,5 mg/ml.

Ktorákoľvek z farmaceutických kompozícií obsahujúca IL-2 alebo jeho varianty zamýšľaná na použitie v spôsobe podľa vynálezu sa môže formulovať s aspoň jednou povrchovo aktívnou látkou v množstve dostatočnom na

zvýšenie absorpcie inhalovaných častôčiek obsahujúcich IL-2 alebo jeho varianty, kvôli získaniu vysoko absorbovateľnej kompozície na použitie pri pulmonálnej inhalácii podľa tu opísaných spôsobov. Výrazom „vysoko absorbovateľná“ sa myslí farmaceutická kompozícia obsahujúca IL-2 alebo jeho varianty a aspoň jednu povrchovo aktívnu látku, použitá v spôsoboch pulmonálneho podávania podľa predkladaného vynálezu, ktorej biologická dostupnosť je približne 1,5- až 20-násobne, výhodne približne 1,6- až približne 17-násobne, výhodnejšie približne 1,7- až približne 15-násobne, ešte výhodnejšie približne 1,8- až približne 13-násobne, ešte viac výhodnejšie približne 1,9- až približne 11-násobne a najvýhodnejšie približne 2,0- až približne 10-násobne väčšia v porovnaní s formuláciou obsahujúcou IL-2 alebo jeho varianty bez prítomnosti povrchovo aktívnej látky. Takto použitá povrchovo aktívna látka spôsobuje zvýšenie biologickej dostupnosti inhalovaného IL-2 alebo jeho variantov ako je uvedené nižšie.

Akákolvek povrchovo aktívna látka, ktorá zvyšuje absorpciu farmaceutickej kompozície obsahujúcej IL-2 alebo jeho varianty spôsobom tu opísaným sa môže použiť na získanie vysoko absorbovateľných farmaceutických kompozícií obsahujúcich proteíny. Vhodné povrchovo aktívne látky zvyšujúce absorpciu inhalovaného IL-2 alebo jeho variantov zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, polyoxyetylén-sorbitolestery ako sú polysorbát 80 (Tween 80) a polysorbát 20 (Tween 20); polyoxypropylén-polyoxyetylénestery ako je Poloxamer 188; polyoxyetylénalkoholy ako je Brij 35; zmes polysorbátových povrchovo aktívnych látok s fosfolipidmi ako je fosfatidylcholín a deriváty (dipalmitoyl, dioleoyl, dimyristyl alebo zmesi derivátov ako sú 1-palmitoyl, 2-oleoyl, atď.), dimyristolglycerol a ostatné členy fosfolipidglycerolovej skupiny, lyzofosfatidylcholín a jeho deriváty; zmes polysorbátov s lyzolecitínom alebo cholesterolom; zmes polysorbátových povrchovo aktívnych látok s sorbitanovými povrchovo aktívnymi látkami (ako sú sorbitan monoleát, dioleát, trioleát alebo iné z tejto triedy); poloxamérové povrchovo aktívne látky; žľčovými solami a ich derivátmi ako sú cholát sodný, deoxycholát sodný, glykodeoxycholát sodný, taurocholát sodný, atď.; micely IL-2 alebo jeho variantov zmiešané so žľčovými soľami a fosfolipidmi; Brij povrchovo aktívne látky (ako Brij 35-

PEG923, laurylalkohol atd.). Pridané množstvo povrchovo aktívnej látky je v rozmedzí od približne 0,005 % do približne 1,0 % (w/v), výhodne približne 0,005 % do približne 0,5 %, výhodnejšie približne 0,01 % do približne 0,4 %, ešte výhodnejšie približne 0,03 % do približne 0,3 %, najvýhodnejšie približne 0,05 % do približne 0,2 %.

V jednom uskutočnení sa vysoko absorbovateľná farmaceutická kompozícia skladá z monoméneho IL-2 s aspoň jednou povrchovo aktívnej látky ako je uvedené hore v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie inhalovaného IL-2. Táto kompozícia je podobná vysoko absorbovateľnej farmaceutickej kompozícií obsahujúcej stabilizovaný monoméry IL-2 alebo jeho varianty, ale bez prítomnosti aminokyselinovej bázy.

Skôr uvedené ľubovoľné stabilizujúce činidlá alebo činidlá na zväčšenie objemu a povrchovo aktívna látka sa môžu pridať k farmaceutickej kompozícii prednostne pri príprave pevnej alebo práškovej formy. V takomto prípade, tieto činidlá sa formujú súčasne s a ako časť častíc obsahujúcich IL-2 alebo jeho varianty. Keď sa príprava uskutoční týmto spôsobom, IL-2 alebo jeho varianty sú prítomné v každej jednotlivej častici v hmotnostných percentách v rozmedzí od približne 0,01 % do približne 100 %, výhodne od približne 0,1 % do približne 10 %. Zvyšok častice tvorí najmä stabilizátor, ale tiež zahŕňa pufor a ostatné zložky spomenuté vyššie. Prípadne, ak ktorékoľvek z týchto činidiel nie je prítomné vo farmaceutickej kompozícii môže sa pripraviť oddelene v suchej práškovej forme a potom byť zmiešané so suchou práškovou formou farmaceutickej kompozícii pred prípravou konečnej práškovej formy kompozície ako aerosólu.

V súlade so spôsobom podľa predkladaného vynálezu, vodný alebo nevodný roztok alebo suspenzia alebo pevná alebo suchá prášková forma kompozície obsahujúca IL-2 alebo jeho varianty sa podáva subjektu vo forme aerosólu alebo iného prípravku vhodného na pulmonálne podávanie. Výrazom „subjekt“ sa myslí akékoľvek zviera. Výhodne je subjektom cicavec, najvýhodnejšie je človek. Zvlášť dôležitými cicavcami okrem ľudí sú psi, mačky, kravy, kone, ovce a ošípané, ale nie sú na ne obmedzené.

Podávanie kompozície na liečebné účely môže byť jednak profylaktické alebo terapeutické. Keď sa podáva profylakticky, substancia sa podáva v predstihu pred akýmkoľvek symptómom. Profylaktické podávanie substancie slúži na prevenciu alebo zmenšenie akýchkoľvek nasledujúcich symptómov. Terapeutické podanie substancie sa uskutočňuje na začiatku (alebo krátko po) prejavení sa symptómov. Takéto podanie slúži na zmenšenie akýchkoľvek aktuálnych symptómov.

Predkladaný vynález taktiež poskytuje spôsob na zvýšenie biologickej dostupnosti IL-2 alebo jeho variantov podávaných pulmonálnou inhaláciou. Spôsob zahŕňa prípravu vysoko absorbovateľných kompozícií tu opísaných ako je aerosól alebo iné vhodné prípravky a podávanie aerosólu a iných vhodných prípravkov subjektu pulmonálnou inhaláciou. Výrazom „biologická dostupnosť“ sa myslí miera absorpcie IL-2 alebo jeho variantov pľúcnymi tkanivami do krvného riečiska po pulmonálnom podaní IL-2 alebo jeho variantov v porovnaní s množstvom IL-2 alebo jeho variantov v krvnom riečisku po intravenóznei injekcii (absolútna biologická dostupnosť) alebo subkutánnej injekcii (relatívna biologická dostupnosť). Biologická dostupnosť inhalovaného IL-2 alebo jeho variantov sa môže zvýšiť po prídavku povrchovo aktívnej látky k farmaceutickej kompozícii obsahujúcej IL-2 alebo jeho varianty pred jej podaním subjektu.

Na účely podľa predkladaného vynálezu, biologická dostupnosť farmaceutických kompozícií obsahujúcich IL-2 je stanovená použitím intratracheálnej (IT) techniky (Niven a kol. (1194) Pharm. Res. 12: 1142-1149; Niven a kol. (1995) Pharm. Res. 12: 1889-1895). Takto sa roztok obsahujúci IL-2 formuláciu vstrekuje z injekčnej striekačky cicavcovi buď priamo do trachei (IT), priamo do žily (IV) alebo subkutánne (SC). Krv sa potom odoberá v intervaloch a analyzuje sa prítomnosť IL-2. Biologická dostupnosť sa vypočíta ako plošný obsah pod krivkou po normalizovanej dávke (AUC) pričom ide o pomer po IT (alebo SC) proti IV podaniu (absolútna biologická dostupnosť) alebo IT proti SC podaniu (relatívna biologická dostupnosť), detaily sú opísané v príkladoch nižšie.

IL-2 prítomný vo farmaceutických kompozíciách tu opísaných na použitie v spôsoboch podľa vynálezu môže byť natívny alebo získaný rekombinantnými technikami, a môže byť z akéhokoľvek zdroja, vrátane cicavcov, napr. myš, krysa, králik, primát, ošípaná a človek. Výhodne takéto polypeptidy pochádzajú z humánneho zdroja, a výhodnejšie ide o rekombinantné ľudské proteíny z mikrobiálnych hostiteľov.

Farmaceutické kompozície použiteľné v spôsoboch podľa vynálezu môžu zahŕňať biologicky aktívne varianty IL-2. Takéto varianty by si mali udržiavať požadovanú biologickú aktivitu natívneho polypeptidu, takže farmaceutická kompozícia obsahujúca variant polypeptidu má taký istý terapeutický účinok ako farmaceutická kompozícia obsahujúca natívny polypeptid keď sa podáva subjektu. Teda variant polypeptidu bude slúžiť ako terapeuticky aktívna zložka vo farmaceutickej kompozícii spôsobom podobným, ktorý sa pozoroval pre natívny polypeptid. Zo stavu techniky sú dostupné spôsoby na určenie či variant polypeptidu si uchováva požadovanú biologickú aktivitu a teda slúži ako terapeuticky aktívna zložka vo farmaceutickej kompozícii. Biologická aktivita sa môže merať s použitím testov špecifických určených na meranie aktivity natívneho polypeptidu alebo proteínu, vrátane testov opísaných v predkladanom vynáleze. Navyše, protilátky zvýšené proti biologicky aktívnemu natívnemu polypeptidu sa môžu testovať na ich schopnosť viazať variant polypeptidu, kde účinná väzba indikuje polypeptid majúci konformáciu podobnú natívnemu polypeptidu.

Vhodné biologicky aktívne varianty natívneho alebo prirodzene sa vyskytujúceho IL-2, môžu byť fragmenty, analógy alebo deriváty tohto polypeptidu. Výrazom „fragment“ sa myslí polypeptid skladajúci sa len z časti intaktnej polypeptidovej sekvencie a štruktúry, a môže byť C-terminálnou deléciou alebo N-terminálnou deléciou natívneho polypeptidu. Výrazom „analóg“ sa myslí analóg buď natívneho polypeptidu alebo fragmentu natívneho polypeptidu, kde analóg zahŕňa natívnu polypeptidovú sekvenciu a štruktúru, ktorá má jednu alebo viac aminokyselinových substitúcií, inzercií alebo delécií. „Muteíny“ ako sú tu opísané a peptidy, ktoré majú jeden alebo viac peptidov



(peptidové mimiká) sú tiež zahrnuté v termíne analóg (pozri medzinárodná prihláška č. WO 91/04282). Výrazom „derivát“ sa myslí vhodná modifikácia natívneho polypeptidu, ktorý je skúmaný, fragmentu natívneho polypeptidu alebo ich príslušných analógov, ako je glykozylácia, fosforylácia, polymérna konjugácia (s polyetylénglykolom) alebo iná adícia cudzích skupín, pokiaľ požadovaná biologická aktivita natívneho polypeptidu sa zachová. Spôsoby prípravy polypeptidových fragmentov, analógov a derivátov sú známe zo stavu techniky.

Napríklad aminokyselinové sekvencie variantov polypeptidov sa môžu pripraviť mutáciou v klonovanej DNA sekvencii kódujúcej natívny polypeptid, ktorý sa skúma. Spôsoby mutagenézy a modifikácie nukleotidových sekvencií sú dobre známe zo stavu techniky. Pozri napr. 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 a kol. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook a kol. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory manual* (Cold Spring Harbor, New York); U.S. patent č. 4 873 192; a tam citované odkazy; sú tu zahrnuté ako odkazy. Vodidlom k vhodným aminokyselinovým substitúciám, ktoré neovplyvňujú biologickú aktivitu skúmaného polypeptidu sa dajú nájsť v modeli od Dayhoff a kol. (1978) v *Atlas of Protein Sequence a Structure* (Natl. Biomed. Res. Found, Washington, D.C.), tu zahrnuté ako odkaz. Konzervatívne substitúcie, ako je výmena jednej aminokyseliny za inú s podobnými vlastnosťami, sú výhodné. Príklady konzervatívnych substitúcií zahŕňajú, ale nie sú na ne obmedzené, Gly $\leftrightarrow$ Ala, Val $\leftrightarrow$ Ile $\leftrightarrow$ Leu, Asp $\leftrightarrow$ Glu, Lys $\leftrightarrow$ Arg, Asn $\leftrightarrow$ Gln a Phe $\leftrightarrow$ Trp $\leftrightarrow$ Tyr.

Pri konštrukcii variantov skúmaných IL-2 polypeptidov, modifikácie sa tvoria z takých variantov, ktoré majú požadovanú aktivitu. Samozrejme, akékoľvek mutácie v DNA kódujúcej varianty polypeptidov nesmú ponechávať sekvencie mimo čítací rámec a výhodne nevytvárajú komplementárne úseky, ktoré produkujú sekundárnu mRNA štruktúru. Pozri Európska patentová prihláška EP 75 444.

Biologicky aktívne varianty IL-2 budú všeobecne mať aspoň 70 %, výhodne aspoň 80 %, výhodnejšie približne 90 % až 95 % alebo viac, najvýhodnejšie približne 98 % alebo viac identických aminokyselinových sekvencií s aminokyselinovými sekvenciami referenčnej polypeptidovej molekuly, ktorá plní úlohu bázy na porovnanie. Biologicky aktívny variant natívneho polypeptidu, ktorý sa skúma, sa môže líšiť od natívneho polypeptidu 1 až 15 aminokyselinami, 1 až 10, 6 až 10, a 5, 4, 3, 2 alebo dokonca 1 aminokyselinovým zvyškom. Výrazom „identita sekvencie“ sa myslia rovnaké aminokyselinové zvyšky, ktoré sa nachádzajú vo vnútri variantu polypeptidu a polypeptidovej molekuly, ktorá slúži ako referenčná, keď špecifikovaný, súvislý segment aminokyselinovej sekvencie variantu je zarovnaný a porovnaný s aminokyselinovou sekvenciou referenčnej molekuly. Percento identity sekvencií medzi dvoma aminokyselinovými sekvenciami je vypočítané určujúcim číslom pozícií aminokyselinových zvyškov, ktoré sa vyskytujú v oboch sekvenciách dávajúcich počet spárených pozícií, deleno počet spárených pozícií celkového množstva pozícií v segmente podrobujúcom sa porovnávaniu s referenčnou molekulou, a násobenie výsledku 100 dáva percento sekvenčnej identity.

Na účely optimálneho usporiadania dvoch sekvencií, susedný segment aminokyselinovej sekvencie variantu môže mať ďalšie aminokyselinové zvyšky alebo deletované aminokyselinové zvyšky vzhľadom na aminokyselinové sekvencie referenčnej molekuly. Susedné segmenty použité na porovnanie s referenčnou aminokyselinovou sekvenciou budú obsahovať aspoň dvadsať (20) susedných aminokyselinových zvyškov, a môže ich byť 30, 40, 50, 100 alebo viac zvyškov. Korekcie na zvýšenie identity sekvencie súvisiace s zahnutím medzier vo variantoch aminokyselinových sekvencií sa môžu uskutočňovať priradením penalty medzier. Spôsoby usporiadania sekvencií sú dobre známe zo stavu techniky pre obe aminokyselinové sekvencie a pre nukleotidové sekvencie kódujúce aminokyselinové sekvencie.

Teda určenie percenta identity medzi akýmikoľvek dvoma sekvenciami môže byť uskutočnené použitím matematického algoritmu. Jeden výhodný, ale neobmedzujúci príklad matematického algoritmu používaný na porovnávanie

sekvencií je algoritmus Myersa a Millera (1988) CABIOS 4: 11-17. Takýto algoritmus je použitý v ALIGN programe (verzia 2.0), ktorý je súčasťou GCG softvérového balíka na určovanie poradia sekvencií. A PAM120 tabuľka hmotností zvyškov, dĺžka penalty medzier 12 a penalty medzier 4 môže byť použitá s ALIGN programom, keď sa porovnávajú aminokyselinové sekvencie. Iný výhodný, ale neobmedzujúci príklad matematického algoritmu na použitie pri porovnávaní dvoch sekvencií je algoritmus Karlina a Altschula (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264, modifikovaný Karlinom a Altschulom (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877. Takýto algoritmus je inkorporovaný do NBLAST a XBLAST programov od Altschul a kol. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403. BLAST nukleotidové hľadanie sa môže realizovať s NBLAST programom, skóre = 100, wordlength = 12, za získania nukleotidovej sekvencie homológnej k nukleotidovej sekvencie kódujúcej skúmaný polypeptid. BLAST proteínové hľadanie sa môže realizovať XBLAST programom, skóre = 50, wordlength = 3, za získania aminokyselinovej sekvencie homológnej ku skúmanému polypeptidu. Na získanie poradia s medzerami na porovnávacie účely, sa môže použiť BLAST s medzerami ako je opísané v Altschul a kol. (1997) Nucleic Acids Res. 25 : 3389. Prípadne PSI-Blast sa môže použiť na uskutočnenie opakovaných hľadání, ktoré detekujú vzdialený vzťah medzi molekulami. Pozri Altschul a kol. (1997) supra. Keď sa používajú BLAST, BLAST s medzerami a PSI-Blast programy, môžu sa použiť štandardné parametre jednoduchých programov (napr. XBLAST a NBLAST). Pozri <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Tiež pozri ALIGN program (Dayhoff (1978) v Atlas of Protein Sequence and Structure 5: Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.) a programy vo Wisconsin Sequence Analysis Package, Verzia 8 (dostupná od Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), napríklad, GAP program, kde sú využité štandardné parametre programov.

Berúc do úvahy percento identity aminokyselinových sekvencií, niektoré pozície aminokyselinových zvyškov sa môžu líšiť ako výsledok konzervatívnych aminokyselinových substitúcií, ktoré ale neovplyvňujú vlastnosti funkcií proteínu. V týchto prípadoch, percento identity sekvencií môže byť upravené vzostupne na objasnenie podobnosti v konzervatívne substituovaných

aminokyselinách. Takéto úpravy sú dobre známe zo stavu techniky. Pozri, napríklad, Myers a Miller (1988) *Computer Applic. Biol. Sci.* 4: 11-17.

Presná chemická štruktúra polypeptidu závisí od mnohých faktorov. Pretože ionizovateľné amino a karboxylové skupiny sú prítomné v molekule, určité polypeptidy sa môžu získať ako kyslé alebo bázické soli alebo v neutrálnej forme. Všetky takéto prípravy, ktoré uchovávajú biologickú aktivitu, keď sú umiestnené vo vhodných environmentálnych podmienkach sú zahrnuté v definícií polypeptidov ako sa tu používa. Ďalej, primárne aminokyselinové sekvencie polypeptidu môžu byť zväčšené derivatizáciou s použitím cukrových zvyškov (glykozyláciou) alebo inými doplnkovými molekulami ako sú lipidy, fosfáty, acetylové skupiny a podobne. Môžu byť zväčšené konjugáciou so sacharidmi. Určitý aspekt takého zväčšenia je uskutočnený cez post-transnacionálny spracovávaci systém produkujúceho hostiteľa; ostatné takéto modifikácie sú uvádzané *in vitro*. Pri akejkoľvek udalosti, takéto modifikácie zahŕňajú definície polypeptidov ako sú uvedené tu, pokiaľ aktivita polypeptidu nie zničená. Očakáva sa, že takéto modifikácie môžu kvantitatívne alebo kvalitatívne ovplyvňovať aktivitu, buď zvýšením alebo znížením aktivity polypeptidu, v rôznych skúškach. Ďalej, jednotlivé aminokyselinové zvyšky v reťazci môžu byť modifikované oxidáciou, redukciou, alebo inou derivatizáciou a polypeptidy sa môžu štiepiť za získania fragmentov, ktoré si uchovávajú aktivitu. Takéto zmeny, ktoré neničia aktivitu, nemenia aktivitu sekvencie polypeptidu podľa definície skúmaného polypeptidu ako sa tu používa.

Stav techniky poskytuje významný smer ohľadne prípravy a použitia polypeptidových variantov. V príprave IL-2 variantov, odborník v danej oblasti môže ľahko určiť, ktoré modifikácie natívneho proteínu nukleotidovej alebo aminokyselinovej sekvencie budú viesť k variantom, ktoré sú vhodné na použitie ako terapeuticky aktívne zložky farmaceutickej kompozície používané v spôsoboch podľa predkladaného vynálezu.

Varianty IL-2 na použitie v spôsoboch a kompozíciách podľa predkladaného vynálezu môžu byť z akéhokoľvek zdroja, ale výhodne je IL-2 rekombinantný. Výrazom „rekombinantný IL-2“ sa myslí interleukín-2, ktorý má

porovnateľnú biologickú aktivitu s IL-2 s natívnymi sekvenciami a ktorý je pripravený rekombinantnými DNA technikami ako je opísané, napr. Taniguchi a kol. (1983) *Nature* 302: 305-310 a Devos (1983) *Nucleic Acids Research* 11: 4307-4323 alebo mutačne zmenený IL-2 ako je opísaný Wangom a kol. (1984) *Science* 224: 1431-1433. Všeobecne, gén kódujúci IL-2 je klonovaný a potom exprimovaný v transformovaných organizmoch, výhodne mikroorganizmoch a najvýhodnejšie *E.coli*, ako je tu opísané. Hostiteľský organizmus exprimuje cudzie gény na produkciu IL-2 za expresných podmienok. Syntetický rekombinantný IL-2 sa môže pripraviť v eukaryotoch, ako sú kvasinky alebo ľudské bunky. Proces rastu, zberu, rozrušenia a extrakcie IL-2 z buniek je v podstate opísaný napríklad U.S. v patentovej prihláške č. 4 604 377; 4 738 927; 4 656 132; 4 569 790; 4 748 234; 4 530 787; 4 530 787; 4 572 798; 4 748 234 a 4 931 543 tu zahrnuté ako odkaz v ich úplnosti.

Pre príklady variantov IL-2 proteínov, pozri európska patentová prihláška č. 136 489; európska patentová prihláška č. 83101035.0 podaná 3. februára 1983 (zverejnená 19. októbra 1993 pod číslom 91539); európska patentová prihláška č. 82307036.2, podaná 22. decembra 1982 (zverejnená 14. septembra 1983 pod číslom 88195); rekombinantné IL-2 muteíny sú opísané v európskej patentovej prihláške č. 83306221.9, podanej 13. októbra 1983 (zverejnená 30. mája 1984 pod číslom 109748), ktorá je ekvivalentom k belgickému patentu č. 893 016 a U.S. patentu č. 4 518 584; muteíny sú opísané v U.S. patentoch č. 4 752 585 a WO 99/60128; a IL-2 muteín použitý v príkladoch tu opísaný v U.S. patente č. 4 931 543; všetky sú tu zahrnuté ako odkazy. Ďalej IL-2 môže byť modifikovaný s polyetylén glykolom na zvýšenie rozpustnosti a úpravu farmakokinetického profilu (pozri U.S. patent č. 4 766 406, tu zahrnutý ako odkaz v jeho úplnosti).

Nasledujúce príklady sú len na ilustráciu ale nie na obmedzenie.

### **Príklady uskutočnenia vynálezu**

IL-2 je účinný mitogén, ktorý stimuluje proliferáciu T buniek. Má široké terapeutické použitie pri liečení metastáz rakoviny, ako adjuvant pri terapii rakoviny a ako konjuktívne činidlo pri infekčných ochoreniach. S rozvojom mnohých klinických skúšok použitia IL-2 pri terapii, sa rozpoznala nevyhnutnosť jeho neinvazívneho podávania.

Niekoľko farmaceutických formulácií obsahujúcich rekombinantný ľudský IL-2 („rhIL-2“) bolo ocenených pre ich potenciálnu účinnosť pri pulmonálnom podávaní. Testované formulácie zahŕňujú Proleukin, lyofilizovanú rhIL-2 formuláciu práve predávanú Chiron Corp. na liečenie pacientov s metastatickým karcinómom obličiek alebo metastatickým melanómom. Taktiež je v 3. fáze skúšok na liečenie pacientov s HIV infekciou. Obsahuje 0,05 - 2,0 mg/ml rhIL-2, 2,3 - 7 % manitolu, 5,0 - 20,0 mM fosforečnanu sodného, približne 130 - 230 µg SDS/ml rhIL-2 pri pH 5,5 - 8,0 po rekonštitúcii s vodou pre injekcie (WFI). IL-2 vo formulácii existuje v mikroagregovanej forme s priemernou asociáciou molekúl 10 - 50. Agregácia môže ovplyvňovať absorpciu pľúcami.

Novo vyvinutá stabilizovaná kvapalná IL-2 formulácia sa testuje a je opísaná v U.S. patentovej prihláške č. 60/157696. Kvapalná IL-2 formulácia je určená ako monoméry rhIL-2 v týchto štúdiách. Na rozdiel od formulácie Proleukinu, molekula rhIL-2 v týchto kvapalných formuláciách existuje v stabilizovanej monomérynej forme. Táto formulácia obsahuje 0,03 - 3,0 mg/ml rhIL-2, 150 - 300 mM bázy L-arginínu, 50 - 150 mM kyseliny jantárovej, 0,5 - 5,0 mM disodnej soli EDTA, 1,0 - 10,0 mM metionínu a 0,05 - 0,2 % polysorbátu 80 (Tween 80) pri pH 5,0 - 8,0. Predpokladá sa, že stabilizovaná monoméryna formulácia IL-2 sa lepšie absorbuje hlboko do pľúc povrchom než multiméryna formulácia Proleukinu. Okrem toho aminokyseliny a polysorbát 80 používaný vo formuláciách môže priniesť výhody pri pulmonálnom dodávaní ako je zvýšenie absorpcie IL-2 cez tkanivo pľúc.

Tieto IL-2 formulácie sú cenné pre ich relatívnu pulmonálnu biologickú dostupnosť v porovnaní so subkutánnou injekciou za použitia intratracheálneho krysieho modelu. Krysám Sprague-Dawley sa podávali dve IL-2 formulácie intratracheálnou instiláciou (IT) alebo subkutánnou (SC) injekciou. Pre každé IT podanie zvieratá najskôr boli anestetizované izofluránom alebo zmesou CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> a držané v sternálnej alebo zvislej polohe. Všetky IT podané dávky IL-2 sa instilovali buď katétrom alebo ihlou zakončenou balónikom s použitím 1-ml jednorazovej injekčnej striekačky. Po IT dávkovaní zvieratá boli ponechané vo zvislej polohe priemerne 20 sekúnd, aby sa umožnilo rozpustenej dávke usadiť sa v pľúcach. Vzorky krvi týchto krýs sa zozbierali vo vopred určených časových intervaloch a heparinizovali sa. Plazma zo vzoriek krvi sa separovala a analyzovala imunologickým testom na určenie koncentrácie IL-2.

Štyri štúdie sledovali zvýšenie systémovej biologickej dostupnosti Proleukinu a monomérskej formulácie IL-2 po intratracheálnom, subkutánnom alebo intravenóznom dodaní u krýs. Monomérske formulácie sa menia podľa toho či je prítomný polysorbát 80 (Tween 80) a/alebo arginín v kompozícii. Profil koncentrácie IL-2 v plazme zo štúdií zobrazujú obrázky 1 - 4. Farmakokinetické parametre sú zhrnuté v tabuľkách 1 - 4, jednotlivo. Frakcie dávok absorbované systémovo boli vypočítané pre každú formuláciu ako normalizovaná dávka AUC pomer IT proti SC podaniu (relatívna biologická dostupnosť). V štúdiách s bez zodpovedajúceho SC podania pre niektoré monomérske formulácie, relatívna biologická dostupnosť sa vypočítala s použitím AUC pri SC podaní podobnej monomérskej formulácie založenej na predchádzajúcej skúsenosti, že SC AUC týchto monomérsnych formulácií sú podobné.

Tabuľka 1 - PK parametre po IT alebo SC podaní formulácie Proleukinu u 8 krýs (4/pohlavie)<sup>a</sup>.

Spôsob podania	Priemerná BW (g)	Dávka zvierat'u (µg)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>½</sub> (h)	AUC (0-inf.) (ng-h/ml)	R.B. (IT/SC) (%)
IT	319	750	19	2	3,7	80	14
SC	327	150	43	1	1,1	118	

<sup>a</sup> Symboly použité v tabuľke: IT - intratracheálne podanie, SC - subkutánne podanie, BW - telesná hmotnosť, C<sub>max</sub> - zistená maximálna IL-2 koncentrácia v plazme, T<sub>max</sub> - čas pre C<sub>max</sub>, t<sub>½</sub> - polčas pre clearanciu, AUC - plocha pod krivkou IL-2 v plazme oproti času, R.B. - relatívna biologická dostupnosť vypočítaná v percentách pričom AUC pre IT je delené AUC pre SC po normalizovanej dávke a vynásobené 100.

Tabuľka 2 - PK parametre po IT alebo SC podaní stabilizovanej monomérskej rhIL-2 formulácie (s polysorbátom 80) u 8 krýs (4/pohlavie)<sup>a</sup>.

Spôsob podania	Priemerná BW (g)	Dávka zvierat'u (µg)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>½</sub> (h)	AUC (0-inf.) (ng-h/ml)	R.B. (IT/SC) (%)
IT	311	375	202	1,5	0,6	482	146
SC	320	75	26	0,5	1,3	66	

<sup>a</sup> Symboly použité v tabuľke: IT - intratracheálne podanie, SC - subkutánne podanie, BW - telesná hmotnosť, C<sub>max</sub> - zistená maximálna IL-2 koncentrácia v plazme, T<sub>max</sub> - čas pre C<sub>max</sub>, t<sub>½</sub> - polčas pre clearanciu, AUC - plocha pod krivkou IL-2 v plazme oproti času, R.B. - relatívna biologická dostupnosť vypočítaná v percentách pričom AUC pre IT je delené AUC pre SC po normalizovanej dávke a vynásobené 100.



Tabuľka 3 - PK parametre po IT, SC alebo IV podaní monomérskej rhIL-2 formulácie s alebo bez polysorbátu 80 (Tween 80) u 8 krýs (4/pohlavie)<sup>a</sup>.

Tween (SC/IV)	Spôsob podania A.B.	Priemerná BW (g)	Dávka zvieratú ( $\mu$ g)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUC (0-inf) (ng-h/ml)	R.B. (IT/SC) (%) (%)	
+	IT	~320	375	190	0,5	327	90 <sup>b</sup>	
-	IT	~320	375	51	0,2	88	24	10
-	SC	~320	150	72	0,5	145		
-	IV	~320	150	4238	0	1532		

<sup>a</sup> Symboly použité v tabuľke: IT - intratracheálne podanie, SC - subkutánne podanie, BW - telesná hmotnosť, Cmax - zistená maximálna IL-2 koncentrácia v plazme, Tmax - čas pre Cmax,  $t_{1/2}$  - polčas pre clearanciu, AUC - plocha pod krivkou IL-2 v plazme oproti času, R.B. - relatívna biologická dostupnosť vypočítaná v percentách pričom AUC pre IT je delené AUC pre SC po normalizovanej dávke, A.B. - absolútna biologická dostupnosť vypočítaná v percentách pričom AUC pre SC je delené AUC pre IV a vynásobené 100.

<sup>b</sup> Výpočet relatívnej biologickej dostupnosti monomérskej formulácie s polysorbátom 80 s použitím AUC pre SC monomérskej formulácie bez polysorbátu 80.

Tabuľka 4 - PK parametre po IT, SC alebo IV podaní monomérskej rhIL-2 formulácie (s polysorbátom 80 a arginínom), monomérska formulácia bez polysorbátu 80 a monomérska formulácia bez arginínu u 4 samčích krýs<sup>a</sup>.

Formulácia A.B. (SC/IV)	Spôsob podania	Priemerná BW (g)	Dávka zvieratu (µg)	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUC (0-inf.) (ng-h/ml)	R.B. (IT/SC) (%)	(%)
monomérska <sup>b</sup>	IT	~400	400	441	0,5	697	185	15
monomérska	SC	~400	~200	156	0,5	188		
monomérska	IV	~400	~200	14068	0	1250	-	
bez Tweenu 80 <sup>c</sup>	IT	~400	400	176	0,17	298	79 <sup>d</sup>	
bez arginínu <sup>e</sup>	IT	~400	400	637	0,17	530	141 <sup>d</sup>	

<sup>a</sup> Symboly použité v tabuľke: IT - intratracheálne podanie, SC - subkutánne podanie, BW - telesná hmotnosť, Cmax - zistená maximálna IL-2 koncentrácia v plazme, Tmax - čas pre Cmax,  $t_{1/2}$  - polčas pre clearanciu, AUC - plocha pod krivkou IL-2 v plazme oproti času, R.B. - relatívna biologická dostupnosť vypočítaná v percentách pričom AUC pre IT je delené AUC pre SC po normalizovanej dávke, A.B. - absolútna biologická dostupnosť vypočítaná v percentách pričom AUC pre SC je delené AUC pre IV a vynásobené 100.

<sup>b</sup> Formulácia obsahujúca 0,1 % polysorbátu 80 a 230 mM arginínu.

<sup>c</sup> Formulácia obsahujúca 230 mM arginínu.

<sup>d</sup> Výpočet relatívnej biologickej dostupnosti monomérskej formulácie bez polysorbátu 80 a bez arginínu s použitím AUC pre SC monomérskej formulácie.

<sup>e</sup> Formulácia obsahujúca 0,1 % polysorbátu 80.

Vyššie uvedené údaje týkajúce sa absorpcie IL-2 týmito podaniami môžu byť sumarizované nasledovne. Relatívna biologická dostupnosť Proleukinu po IT dávkovaní v porovnaní s SC dávkovaním bola 14 % (Tabuľka 1). Monomérsny IL-2 obsahujúci polysorbát 80 sa absorboval podstatne lepšie ako Proleukin po IT dávkovaní. Absolútna biologická dostupnosť SC k IV bola 15 % (Tabuľka 4), zatiaľ čo relatívna biologická dostupnosť IT k SC je priemerne 140 % (Tabuľka

2, 3, 4), poukazujúc na to, že pri IT dávkovaní bolo absorbovanie rovnako dobré alebo lepšie ako pri SC dávkovaní. Monomérny IL-2 obsahujúci polysorbát 80 ale nie arginín sa absorboval približne rovnako ako monomérny IL-2 obsahujúci polysorbát 80 aj arginín (Tabuľka 4). Monomérny IL-2 bez polysorbátu 80 sa absorboval lepšie ako Proleukin, ale nie tak dobre ako monomérny IL-2 obsahujúci polysorbát 80. Absolútna biologická dostupnosť bola 10 % (Tabuľka 3) a relatívna biologická dostupnosť bola 52 % (Tabuľka 3 a 4).

Piata štúdia bol smerovaná k ďalšiemu skúmaniu účinkov nižších koncentrácií polysorbátu 80 (Tween 80) a iných povrchovo aktívnych látok (0,1 % Poloxamer 188 (predávaný pod menom Pluronic F68 firmou BASF) a PEG 4600 (polyetylénglykol majúci priemernú molekulovú hmotnosť 4600 zakúpený od Aldrich) na biologickú dostupnosť intratracheálne (IT) podaného Proleukinu a monomérneho rhIL-2.

V tejto piatej štúdii, ako v predchádzajúcich štúdiách, samčie krysy Sprague-Dawley sa rozdelili do ošetrovaných skupín (4 krysy/skupina). Každéj kryse sa podala jedna 400 µg dávka rhIL-2. IT dávka sa podávala s použitím rovnakého postupu ako je opísané vyššie u ostatných 4 štúdiách. Vzorky krvi všetkých krýs sa odoberali vo vopred určených časových intervaloch a heparinizovali. Plazma zo vzoriek krvi sa oddelila a analyzovala imunologickou skúškou na koncentráciu IL-2.

Monoméne formulácie sa menili podľa typu alebo množstva povrchovo aktívnej látky použitej s 230 mM arginínu prítomného v testovaných monomérnych formuláciách. Formulácie Proleukinu sa líšili podľa toho či bol prítomný polysorbát 80 (Tween 80) v množstve 0,1 % alebo nie. Žiadny arginín nebol použitý vo formuláciách Proleukinu.

Profily IL-2 koncentrácie v plazme zo štúdií zobrazuje obrázok 5. Plocha pod krivkou koncentrácia - čas pre IT dávkovanie (AUC) pre každú koncentráciu je uvedená v Tabuľke 5. Relatívna biologická dostupnosť formulácií Proleukinu a monomérnych formulácií sa vypočítala v percentách s použitím AUC pre špecifické formulácie v porovnaní s AUC pre monoméne

formulácie s polysorbátom 80 (Tween 80) ako referenčnou formuláciou a sú uvedené v Tabuľke 5.

Tabuľka 5 - Porovnanie intratracheálnej biologickej dostupnosti medzi formuláciami s 400 µg rhIL-2/zviera

Formulácia	AUC (ng-h/ml)	Relatívna biologická dostupnosť (% k monomérmu IT)
Monomérna (0,1 % Tween 80)*	664	100
Monomérna (0,03 % Tween 80)	503	76
Monomérna (0,01 % Tween 80)	637	96
Monomérna (0,001 % Tween 80)	668	101
Monomérna (0,1 % Poloxamer 188)	724	109
Monomérna (0,1 % PEG 4600)	596	90
Proleukin (žiadny Tween 80)	28,4	4
Proleukin (0,1 % Tween 80)	86,2	13

\* Referenčná formulácia na výpočet relatívnej biologickej dostupnosti.

Vyššie uvedené údaje ukazujú, že prítomnosť polysorbátu 80 môže mať úlohu pri systémovej absorpcii Proleukinu podaného IT. Údaje tiež ukazujú, že biologická dostupnosť bola podobná ako pre monomérmu rhIL-2 formulovaný s Poloxamerom 188, PEG 4600, 0,1 % polysorbátu 80 a 0,001 % polysorbátu 80. Biologická dostupnosť monomérmu formulácie obsahujúcej 0,1 % polysorbátu 80 a arginín bola vyššia pri porovnaní s formuláciou Proleukinu obsahujúcou 0,1 % polysorbátu 80.

Všetky publikácie a patentové prihlášky tu spomenuté v špecifikáciách sú indikatívne pre toho, kto má skúsenosti v odbore, a ktorého sa vynález týka. Všetky publikácie a patentové prihlášky sú tu zahrnuté ako odkaz v rovnakom rozsahu ako individuálne publikácie alebo patentové prihlášky a boli špecificky a jednotlivo spomenuté ako odkaz.

Hoci predchádzajúci vynález bol opísaný detailne kvôli ilustrácii príkladmi pre účely pochopenia, je zrejmé, že určité zmeny a modifikácie môžu byť uskutočnené v rámci oblasti nasledujúcich patentových nárokov.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie interleukínu (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na podávanie IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, pričom tento spôsob zahŕňa

a) získanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný monomérny IL-2 alebo jeho varianty,

b) výrobu tohto prostriedku ako vodného, alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo nevodnej suspenzie, alebo ako suchej práškovej formy;

a

c) podanie tohto roztoku, suspenzie a suchej práškovej formy tohto prostriedku uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

2. Použitie podľa nároku 1, kde uvedený prostriedok je v kvapalnej forme.

3. Použitie podľa nároku 1, kde uvedený prostriedok je v suchej forme, pričom táto suchá forma je vybraná zo súboru pozostávajúceho z lyofilizovanej formy a sprejovo sušenej formy.

4. Použitie podľa nároku 1, kde uvedený roztok alebo suspenzia sú podávané z rozprašovača, alebo dávkovacieho inhalátora .

5. Použitie podľa nároku 1, kde uvedená suchá prášková forma je podávaná z dávkovacieho inhalátora , alebo inhalátora suchého prášku.

6. Použitie podľa nároku 5, kde uvedená suchá prášková forma sa

skladá z častíc majúcich stredný priemer menej ako 10  $\mu\text{m}$ .

7. Použitie podľa nároku 6, kde uvedené častice majú stredný priemer v rozmedzí 1 až 5  $\mu\text{m}$ .

8. Použitie podľa nároku 1, kde uvedeným prostriedkom je vysoko absorbovateľný prostriedok, ďalej obsahujúci aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie prostriedku po pľúcnej inhalácii tohto prostriedku.

9. Použitie podľa nároku 8, kde uvedená povrchovo aktívna látka je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z polysorbátu 20 a z polysorbátu 80.

10. Použitie podľa nároku 9, kde uvedenou povrchovo aktívnou látkou je polysorbát 80.

11. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie pri spôsobe podávania IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, pričom tento spôsob zahŕňa:

a) získanie vysoko absorbovateľného farmaceutického prostriedku obsahujúceho monomérny IL-2 alebo jeho varianty, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.

b) výrobu tohto prostriedku ako vodného, alebo alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo alebo nevodnej suspenzie alebo ako suchej práškovej formy; a

c) podanie tohto roztoku, suspenzie a suchej práškovej formy

tohto prostriedku uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

12. Použitie podľa nároku 11, kde uvedený prostriedok je v kvapalnej forme.

13. Použitie podľa nároku 11, kde uvedený prostriedok je v suchej forme pričom táto suchá forma je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z lyofilizovanej formy a sprejovo sušenej formy.

14. Použitie podľa nároku 11, kde uvedený roztok alebo suspenzia sú podávané z rozprašovača alebo dávkovacieho inhalátora.

15. Použitie podľa nároku 11, kde uvedená suchá prášková forma je podávaná z dávkovacieho inhalátora alebo inhalátora suchého prášku.

16. Použitie podľa nároku 15, kde uvedená suchá prášková forma je zložená z častíc majúcich stredný priemer menej ako 10  $\mu\text{m}$ .

17. Použitie podľa nároku 16, kde uvedené častice majú stredný priemer v rozmedzí 1 až 5  $\mu\text{m}$ .

18. Použitie podľa nároku 11, kde uvedená povrchovo aktívna látka je vybraná zo súboru pozostávajúceho z polysorbátu 20 a polysorbátu 80.

19. Použitie podľa nároku 18, kde uvedenou povrchovo aktívnou látkou je polysorbát 80.



20. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie pri spôsobe podávania IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, pričom tento spôsob zahŕňa

a) získanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho multimérny IL-2 alebo jeho varianty,

b) výrobu uvedeného prostriedku ako vodného, alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo alebo nevodnej suspenzie alebo ako suchej práškovej formy; a

c) podanie uvedeného roztoku, suspenzie alebo suchej práškovej formy tohto prostriedku subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

21. Použitie podľa nároku 20, kde uvedený prostriedok je v kvapalnej forme.

22. Použitie podľa nároku 20, kde uvedený prostriedok je v suchej forme, pričom uvedená suchá forma, je vybraná zo súboru pozostávajúceho z lyofilizovanej formy a sprejovo sušenej formy.

23. Použitie podľa nároku 20, kde uvedený roztok alebo suspenzia sú podávané z dávkovacieho inhalátora.

24. Použitie podľa nároku 20, kde uvedená suchá prášková forma je podávaná z dávkovacieho inhalátora, alebo inhalátora suchého prášku.

25. Použitie podľa nároku 24, kde uvedená suchá prášková forma je zložená z častíc majúcich stredný priemer menej ako 10  $\mu\text{m}$ .

26. Použitie podľa nároku 25, kde uvedené častice majú stredný priemer v rozsahu od 1 do 5  $\mu\text{m}$ .

27. Použitie podľa nároku 20, kde uvedený prostriedok je vysoko absorbovateľný prostriedok obsahujúci ďalej aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie prostriedku po pľúcnej inhalácii tohto prostriedku.

28. Použitie podľa nároku 27, kde uvedená povrchovo aktívna látka je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z polysorbátu 20 a polysorbátu 80.

29. Použitie podľa nároku 28, kde uvedenou povrchovo aktívnou látkou je polysorbát 80.

30. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie pri spôsobe podávania IL-2 subjektu, ktorý to potrebuje, pričom tento spôsob zahŕňa

a) získanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný lyofilizovaný, alebo sprejovo sušený IL-2, alebo jeho varianty ;

b) výrobu uvedeného prostriedku ako vodného, alebo nevodného roztoku, vodnej, alebo alebo nevodnej suspenzie alebo ako suchej práškovej formy; a

c) podanie uvedeného roztoku, suspenzie alebo suchej práškovej formy tohto prostriedku subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

31. Použitie podľa nároku 30, kde uvedený roztok alebo suspenzia sú podávané z rozprašovača alebo dávkovacieho inhalátora .

32. Použitie podľa nároku 30, kde uvedená suchá prášková forma je podávaná z dávkovacieho inhalátora alebo inhalátora suchého prášku.

33. Použitie podľa nároku 32, kde uvedená suchá prášková forma je zložená z častíc majúcich stredný priemer menší ako 10  $\mu\text{m}$ .

34. Použitie podľa nároku 33, kde uvedené častice majú stredný priemer v rozsahu od 1 do 5  $\mu\text{m}$ .

35. Použitie podľa nároku 30, kde uvedený prostriedok je vysoko absorbovateľný prostriedok obsahujúci ďalej aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii kompozície.

36. Použitie podľa nároku 35, kde uvedená povrchovo aktívna látka je vybraná zo súboru pozostávajúceho z polysorbátu 20 a polysorbátu 80.

37. Použitie podľa nároku 36, kde uvedenou povrchovo aktívnou látkou je polysorbát 80.

38. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na spôsob zvýšenia biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento spôsob zahŕňa podávanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný monomérny IL-2 alebo jeho varianty uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

39. Použitie podľa nároku 38, kde uvedený prostriedok ďalej obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii uvedeného prostriedku .

40. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na spôsob zvýšenia biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento spôsob zahŕňa podávanie vysoko absorbovateľného farmaceutického prostriedku obsahujúceho monoméry IL-2 alebo jeho varianty uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.

41. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na spôsob zvýšenia biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento spôsob zahŕňa podávanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho multiméry IL-2 alebo jeho varianty uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii prostriedku.

42. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na spôsob zvýšenia biologickej dostupnosti IL-2 podávaného subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento spôsob zahŕňa podávanie farmaceutického prostriedku obsahujúceho stabilizovaný, lyofilizovaný, alebo sprejovo sušený IL-2 alebo jeho varianty uvedenému subjektu prostredníctvom pľúcnej inhalácie, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku

po pľúcnej inhalácii prostriedku.

43. Stabilizovaný alebo sprejovo sušený farmaceutický prostriedok **vyznačujúci sa tým, že** obsahuje:

interleukín-2 (IL-2) ako terapeuticky účinnú zložku;

aspoň jedno činidlo na zväčšenie objemu prítomné v množstve od asi 0 % do asi 5 %;

aspoň jeden cukor vybraný zo súboru pozostávajúceho zo sacharózy, trehalózy, rafinózy, stachyózy, sorbitolu alebo aspoň z jednej aminokyseliny vybranej zo skupiny pozostávajúcej z arginínu a lyzínu, kde tento cukor je prítomný od asi 0 % do asi 9 %, a kde táto aminokyselina je prítomná od asi 0 % do asi 1 %; a

pufor na udržanie tohto prostriedku pri pH v rozsahu od asi 4,0 do asi pH 8,5 keď je tento prostriedok rekonštituovaný ako kvapalina.

44. Farmaceutický prostriedok **vyznačujúci sa tým, že** obsahuje interleukín-2 (IL-2), alebo jeho varianty ako terapeutické činidlo, pričom tento prostriedok obsahuje aspoň jednu povrchovo aktívnu látku v množstve dostatočnom na zvýšenie absorpcie tohto prostriedku po pľúcnej inhalácii uvedeného prostriedku.

45. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 44, **vyznačujúci sa tým, že** uvedená povrchovo aktívna látka je vybraná zo súboru pozostávajúceho z polysorbátu 20 a polysorbátu 80.

46. Použitie interleukínu-2 (IL-2) na výrobu liečiva na použitie na spôsob podávania interleukínu-2 (IL-2) alebo jeho variantov subjektu, ktorý to potrebuje, pričom tento spôsob zahŕňa podávanie prostriedku podľa nároku

44 prostredníctvom pľúcnej inhalácie.

47. Použitie podľa nároku 46, kde uvedený prostriedok je podávaný z rozprašovača, alebo dávkovacieho inhalátora.

48. Použitie podľa nároku 46, kde uvedený prostriedok je podávaný z dávkovacieho inhalátora alebo inhalátora suchého prášku.

49. Použitie podľa nároku 48, kde uvedený prostriedok je v suchej práškovej forme pozostávajúcej z častíc so stredným priemerom menším ako 10  $\mu\text{m}$ .

50. Použitie podľa nároku 49, kde uvedené častice majú stredný priemer v rozsahu od 1 do 5  $\mu\text{m}$ .