

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532791

(P2004-532791A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 C O 7 6
A 6 1 K 9/19	A 6 1 K 9/19	4 C O 8 4
A 6 1 K 47/04	A 6 1 K 47/04	
A 6 1 K 47/18	A 6 1 K 47/18	
A 6 1 K 47/22	A 6 1 K 47/22	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-505024 (P2002-505024)	(71) 出願人	392010599
(86) (22) 出願日	平成13年6月27日 (2001.6.27)		バイエル・コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月26日 (2002.12.26)		BAYER CORPORATION
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020675		アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州152
(87) 国際公開番号	W02002/000243		05 ピッツバーグ、バイエルロード10
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)		0
(31) 優先権主張番号	09/605,577	(74) 代理人	100060782
(32) 優先日	平成12年6月28日 (2000.6.28)		弁理士 小田島 平吉
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ワング, ウエイ
			アメリカ合衆国カリフォルニア州9450
			2アラメダ・ライラクストリート923
		(72) 発明者	ナヤー, ラジブ
			アメリカ合衆国カリフォルニア州9480
			3リッチモンド・コーチドライブ5357

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化させたインターロイキン2

(57) 【要約】

ヒトインターロイキン - 2 またはその変種および安定化量のヒスチジンを含んでなる安定な薬学的調剤。好ましい調剤はグリシンおよびスクロース並びに単一アミノ酸置換を有するムテイン、すなわち N 8 8 R を含む。好ましい調剤は水性希釈剤を用いる再形成で約 5 ~ 6 . 5 の範囲の pH を有する溶液を生ずるような凍結乾燥形態である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒスチジンで安定化させたヒトインターロイキン - 2 またはその変種を含んでなる安定な薬剤学的組成物。

【請求項 2】

水中で急速に再形成されうる凍結乾燥形態の請求項 1 の調剤。

【請求項 3】

約 5 . 0 ~ 約 6 . 5 の範囲の pH を有する水性形態の請求項 1 の調剤。

【請求項 4】

グリシンを含む請求項 1 の調剤。

【請求項 5】

スクロースを含む請求項 1 の調剤。

【請求項 6】

グリシンおよびスクロースを含む請求項 1 の調剤。

【請求項 7】

IL - 2 がムテインである請求項 1 の調剤。

【請求項 8】

IL - 2 が単一アミノ酸置換を有するムテイン、すなわち N 8 8 R である請求項 7 の調剤。

【請求項 9】

水による再形成が以下のもの：

IL - 2	0 . 1 - 5 m g / m l
ヒスチジン	0 . 0 8 - 1 . 6 重量%
NaCl	0 - 0 . 9 重量%
スクロース	1 - 1 0 重量% および
グリシン	0 - 3 重量%

を 5 ~ 6 . 5 の pH において含んでなる安定な凍結乾燥組成物。

【請求項 10】

IL - 2 が単一アミノ酸置換を有するムテイン、すなわち N 8 8 R である請求項 9 の調剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

分野： 本発明は一般的に薬剤学的調剤 (pharmaceutical formulation) の分野に関する。より具体的には、本発明は T 細胞 (PHA - 芽細胞) を選択的に活性化可能でありそして、非常に好ましくは、ナチュラルキラー (「NK」) 細胞の減じられた活性化を示す IL - 2 ムテインを含む安定化させた治療上活性なインターロイキン - 2 調剤に関する。好ましい性質を有する安定化させた組成物は以下に記載されている IL - 2 の変種を含む。

【0002】

背景： 1999 年 11 月 25 日に公告された関連出願 PCT / US 99 / 10643 で論じられたように、インターロイキン 2 (IL - 2) は T 細胞、B 細胞、および単球を包含する免疫系の多様な細胞を活性化する有効な免疫刺激剤である。IL - 2 はまた、T 細胞の有効で且つ決定的な成長因子でもある。これらの活性に基づき、IL - 2 を癌を処置するその能力に関して試験した。ヒト IL - 2 は転移性腎臓癌および転移性黒色腫の処置のための FDA が認可した薬品である。適格な患者における IL - 2 の使用は IL - 2 療法に伴う重い毒性のために制限され、適格な患者の最良でも 20 % だけが実際に療法を受けることが推定される。IL - 2 療法に伴う毒性は重い発熱、悪心、嘔吐、脈管漏出およびひどい低血圧を包含する。しかしながら、これらの毒性にもかかわらず、IL - 2 はその認可された適応症に関して有効である。減じられた毒性を有する IL - 2 の変種は出

10

20

30

40

50

願 WO 99 / 60128 の主題である。

【0003】

IL-2 および他の治療用蛋白質調剤の安定化に関する重要な情報が入手可能である。最近認可されたヒト IL-2 調剤 (プロロイキン (Proluekin)^R IL-2、チロン・コーポレーション (Chiron Corporation)) はマンニトール、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および燐酸塩緩衝液を含む凍結乾燥調剤である。IL-2 を含む他の調剤された治療用蛋白質は下記の参考文献に記載されている。

【0004】

Fernandes et al., 1986, Pharmaceutical compositions of microbially produced interleukin-2 (米国特許第 4,604,377 号) は、安定剤 (マンニトール) および溶解剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムまたはデオキシコレート硫酸ナトリウム、を 1mg の IL-2 当たり約 100 ~ 約 250 μ g で含有する凍結乾燥調剤を記載している。最近入手可能なプロロイキン^R IL-2 製品用の調剤はこの参考文献に記載されていると信じられる。

【0005】

Patel, 1994 Stabilization of protein formulations (米国特許第 5,358,708 号) は、メチオニン、ヒスチジンまたはそれらの混合物を組み入れることによる延長した貯蔵寿命を有するインターフェロン、顆粒球-大食細胞コロニー-刺激因子またはインターロイキンの水性調剤を記載している。インターロイキン-2 を包含する数種のインターロイキン類に言及しているが、IL-2 調剤を用いて行われた研究では特許権者は使用した安定剤試験の条件下ではヒスチジンがメチオニンより安定剤として有効性が少ないことを見いだした。

【0006】

Shaked, et al., 1991, Pharmaceutical compositions of recombinant interleukin-2 and formulation process (米国特許第 5,037,644 号) は、凍結乾燥または液体形態のいずれかである調剤を記載している。調剤の賦形剤は非イオン性重合体状洗剤、例えばトライトン (Triton) X405、トライトン X305、PEG (4000) モノステアレート、ツイーン (Tween) 80 およびツイーン 20 を約 0.001% ~ 約 5% の濃度で、増量 / 安定剤、例えばスクロース、フルクトース、デキストロース、マルトース、グルコース、デキストラン、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、ガラクトール、キシリトール、ラクトース、トレハロース、ヒト血清アルブミンおよび牛血清アルブミン、並びに緩衝剤、例えばグリシン、クエン酸塩または燐酸塩を約 10mM ~ 50mM の濃度範囲で、約 3 ~ 約 7 の範囲の pH で含む。ポリオール糖増量剤の濃度 (重量 / 容量) は約 0.025% ~ 約 10% の範囲である。

【0007】

Roskam et al., 1995, Drugs containing a glycosylated interleukin-2 (米国特許第 5,417,970 号) は加水分解されたゼラチン (またはヒト血清アルブミン) およびアラニンを含む pH 6.5 を有する凍結乾燥調剤を記載している。

【0008】

Hora et al., 1992, Pharmaceutical composition for interleukin-2 containing physiologically compatible stabilizers (米国特許第 5,078,997 号) は、液体であるかまたは凍結乾燥調剤を記載している。調剤は例えばアルギニン、カルニチン、ベタイン、ピリドキシンポリピニルピロリドン、カプリン酸の塩類、糖類、糖アルコール類、血清アルブミン、およびクエン酸塩の如き安定剤の 1 種または組み合わせを緩衝液の pH 5.0 - 8.5 で含有することができる。安定剤の濃度は、アルギニンに関しては 0.2 ~ 3.0% (重量 / 容量) の間であり、カルニチンに関しては 0

．2～3．0%（重量／容量）の間であり、スクロースに関しては2～6%（重量／容量）の間であり、そしてクエン酸塩に関しては0．01～0．3Mの間である。

【0009】

Yasushi et al., 1987 Stable composition of interleukin-2 and albumin（米国特許第4,645,830号）は、ヒト血清アルブミン（0．1 - 50 mg / ml）を還元性賦形剤、例えばグルタチオン、チオクト酸、N - アセチルシステイン、またはアスコルビン酸（0．05 - 20 mg / mlの濃度）と共にまたはそれらなしに3～5．5の間のpHで含有する安定な水性調剤を記載している。アルブミン調剤はモノアミノ脂肪族アミノ酸、環式アミノ酸、単糖、糖アルコールまたはモノアミノ脂肪族アミノ酸を含有できる（5～50 mg / mlの濃度）。

10

【0010】

Lee et al., 1989 Pharmaceutical plasma protein formulations in low ionic strength media; sodium chloride and/or potassium chloride, lysine hydrochloride, and histidine（米国特許第4,877,608号）は、塩化ナトリウム、塩化カリウムまたはそれらの混合物、リシン塩酸塩、および緩衝剤としてのヒスチジンを含んでなる低イオン強度媒体中の安定な因子VIIIIおよび他の血漿蛋白質調剤を記載している。

【0011】

Nayar, 1998 stabilized albumin-free recombinant Factor VIIII preparation having a low sugar content（米国特許第5,763,401号および5,874,408号）は、グリシン、ヒスチジン、スクロースおよびNaClを含むアルブミンを含まない安定化させたFVIIII調剤を記載している。

20

【0012】

（特にWO 99 / 60128の好ましいIL - 2 ムテイン（N88R）のための）安定なIL - 2 調剤を見いだす試みにおいて、我々は非常に安定であり且つ生物学的活性および有用なヒトIL - 2 のための製薬学的に許容可能な調剤を今回見いだした。我々の発見は、我々が信じていることが以下に記載されているように安定性の原因となる基本的機構であることの提唱に基づいている。

30

【0013】

発明の要旨

本発明は、ヒスチジンで安定化させたIL - 2 またはその変種（ムテイン類）の薬剤学的組成物または調剤である。好ましくは、組成物は低いイオン強度（例えば< 0．1）の溶液を生ずる混合物を含んでなりそして他の安定剤、例えば糖類およびアミノ酸類、好ましくはスクロースおよびグリシン、を含む。調剤は0～0．9重量%のNaClを含むことができる。組成物はアルブミンを含まずそして凍結乾燥形態での調剤は水を用いて急速（< 1分間）に再形成することができる。組成物は生理学的に許容可能なpH条件下で、好ましくは約5．0～約6．5の範囲のpHにおいて、界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムを使用せずに溶解する。再形成された溶液はほぼ等張性であり且つ皮下および静脈内の両方で投与することができる。非常に好ましい態様では、組成物のIL - 2 は単一アミノ酸置換を有するムテイン、好ましくはWO 99 / 60128に記載された変種、である。

40

【0014】

非常に好ましい組成物は1 - 5 mg / mlの蛋白質濃度を有しそして以下のもの：

IL - 2	0．1 - 0．5 重量%
ヒスチジン	0．08 - 1．6 重量%
NaCl	0 - 0．9 重量%
スクロース	1 - 10 重量% および

50

グリシン 0 - 3 重量%

を水性形態で（重量 / 重量基準で）5 ~ 6 . 5 の pH において含んでなる。

【0015】

我々の調剤の詳細およびそれをどのようにして発見したかを以下に記載する。

【0016】

具体的態様

ここで使用される用語 IL - 2 は、活性な野生型 IL - 2 およびその生物学的に活性な変種またはムテイン類、例えば WO 99 / 60128 に記載されているもの、の両方を包含する。以下の実施例では、我々はアミノ酸蛋白質 88 の位置でアルギニン（R）に突然変異したアスパラギン（N）を有するヒト IL - 2 の組み換えムテインである IL - 2（N88R）として知られる IL - 2 を使用した。このムテインはチャニーズ・ハムスターの卵巣（CHO）細胞から発現されそしてグリコシル化されたおよびグリコシル化されていない両方の形態の混合物を含んでなっていた。それは以上で関連出願として引用された WO 99 / 60128 に記載されている。

10

【0017】

本発明が達成した目的は、許容可能な安定性を有するアルブミンを含まない好ましい IL - 2 ムテイン用の凍結乾燥薬用量形態を同定する必要性であった。IL - 2 に関する生物学的検定法は安定性の非感受性（insensitive）測定値であったため、我々は安定性指示検定法として逆相 HPLC による可溶性 IL - 2 の定量化を使用した。ここで使用される用語「安定な」または「安定化させた」は、40 における 4 カ月間にわたる貯蔵後に逆相 HPLC による可溶性 IL - 2 量が元の可溶性量の 90 % より少ない量に減少しないことを意味する（以下の表 3 および 4 参照）。使用された追加の安定性指示検定法は凝集指数、UV / VIS 分光光度法による凝集体の測定およびサイズ排除 HPLC による可溶性凝集体の測定を包含した。安定な生成物の他に、凍結乾燥物質の急速な（1 分間以内の）再形成（reconstitute）が非常に好ましい。最後に、製造用凍結乾燥機中で容易に凍結乾燥させうる許容可能な安定性を有する凍結乾燥薬用量形態の調剤が所望されていた。

20

【0018】

予備調合試験中に行われた水性安定性試験は、IL - 2（N88R）が液体状態で容易に凝集しそして凝集が pH - 依存性であったことを示した。2 種の予備調剤安定性試験、すなわち IL - 2（N88R）の pH グラフおよび種々の緩衝賦形剤の存在下における安定性試験、を行った。これらの試験の目的は、IL - 2（N88R）に関する適当な pH 範囲および水性安定性（減じられた凝集能力）のための適当な緩衝賦形剤を同定することであった。pH グラフを作成する際には、IL - 2 溶液を種々の pH 条件を用いて製造しそして加速温度条件（40）において貯蔵した。試料を種々の時間間隔で分析しそして凝集速度を計算した。図 1 に示されているように、低い凝集速度に関する最適な pH 範囲は pH 5 . 0 ~ 6 . 5 の間であると同定された。ヒスチジン、酢酸塩、およびクエン酸塩がこの pH 範囲における IL - 2（N88R）用の薬剤学的緩衝剤として同定されそして 1 mg / ml の IL - 2（N88R）および 150 mM（0 . 9 重量%）の NaCl を含有する IL - 2（N88R）溶液中 20 mM の濃度で評価された。これらの試料を 25 から 95 に毎分 1 で加熱しそして沈澱を UV 分光光度法により 350 nm で監視した。図 2 に示されているように、我々にとっては驚異的であるが、沈澱の開始温度における増加により示されるようにヒスチジンは pH 5 . 5 において IL - 2（N88R）を他の緩衝賦形剤より IL - 2 を有意に安定化させた。クエン酸塩、酢酸塩、およびヒスチジンの存在下における開始温度はそれぞれ 62、64、および 70 であった。例えばこれらのような試験は、ヒスチジンを緩衝剤としてだけでなく水性条件下で IL - 2 用の安定剤としても使用できることを示した。

30

40

【0019】

凍結乾燥薬用量形態の開発のために、当業者により使用されている他の賦形剤を試験した。これらは増量剤並びに凍結防止剤、例えばグリシン、スクロース、およびマンニトール

50

、を含む。凝集は水性安定性試験中に分子に関する不安定性機構の1つであるため、2種の界面活性剤もIL-2(N88R)用の安定剤として評価した。これらの試験の結果は以下の実施例でまとめられている。それらは、我々にとって驚異的であるが、ヒスチジンが他の賦形剤、例えばクエン酸塩、と比べてIL-2に対する選択的な安定化効果を有することを示した。

【0020】

実施例1

種々のpHにおける液体IL-2(N88R)の安定性を40において試験した。結果は、IL-2(N88R)の沈澱速度がpH5.0~6.5の間で最低であったことを示した(図1)。従って、pH5.5が液体状態における最適な調剤pHとしてそして凍結乾燥調剤の製造用に選択された。

10

【0021】

実施例2

我々はIL-2(N88R)の安定性に対する種々の緩衝剤の可能な影響を試験した。我々が試験した緩衝剤はクエン酸塩、酢酸塩、およびヒスチジンを含んでなっていた。これらの緩衝剤は1mg/mlのIL-2(N88R)および150mM(0.9重量%)のNaClを含有するIL-2(N88R)溶液中20mMで使用された。これらの安定性試験を、UV/VIS分光光度法により監視しながら、25から95に毎分1で加熱した。ヒスチジンは酢酸塩およびクエン酸塩と比べて、沈澱温度を高めることによりそして沈澱速度を減ずることによりIL-2(N88R)を有意に安定化させた(図2)。

表1は、これらの3種の緩衝剤の存在下におけるIL-2(N88R)の開始沈澱温度を示す。開始沈澱温度は350nmにおける光学密度(OD₃₅₀)がある水準(OD₃₅₀の場合には0.2および1.0)に達する温度として任意に設定された。ヒスチジンの存在下におけるIL-2(N88R)の沈澱温度は他の2種の緩衝剤の存在下におけるものより数度ほど高かった。この実施例は、ヒスチジンが液体状態のIL-2(N88R)用の緩衝剤として使用されることに加えて特異的な安定剤でありえることを示した。

20

【0022】

【表1】

表1: 種々の緩衝液中のIL-2(N88R)の沈澱温度(OD₃₅₀=0.2およびOD₃₅₀=1.0)

30

緩衝剤	沈澱温度, °C (OD ₃₅₀ = 0.2の場合)	沈澱温度, °C (OD ₃₅₀ = 1.0の場合)
クエン酸塩	62 °C	64 °C
酢酸塩	64 °C	66 °C
ヒスチジン	70 °C	76 °C

40

【0023】

実施例3

ヒスチジンの安定化効果をさらに評価する試みでは、凍結乾燥されたIL-2(N88R)を種々の水性調剤から製造した(表2参照)。調剤のほとんどは2重量%のグリシンを増量剤としてそして1重量%のスクロースを安定剤として含有した。5重量%のマニトールを調剤中でIL-2の商業製品であるプロロイキン^Rに対する比較剤として使用した。両方とも0.1重量%の2種の界面活性剤であるツィーン80およびブルロニック(P

50

luronic) F68を蛋白質表面吸着及び凝集の防止に関して評価した。全ての調剤はヒスチジンまたはクエン酸塩を緩衝剤として5.5に調節されたpHで含有していた。pH5.5におけるヒスチジンの安定化効果をクエン酸塩のものと区別するためにクエン酸塩が含まれた。これらの凍結乾燥調剤を40において貯蔵しそしてUV/VIS分光光度法、SEC-HPLC、およびRP-HPLCを包含する多くの分析方法により分析した。

【0024】

表3は、凝集に関するUV/VIS分光光度法により評価した多くの調剤中のIL-2(N88R)の安定性、サイズ排除HPLC(SEC-HPLC)による可溶性凝集体の量、および逆相HPLC(RP-HPLC)による蛋白質の回収率を示す。試料を凍結乾燥後に分析しそして40の加速貯蔵温度において4カ月間にわたり貯蔵した。凍結乾燥工程はIL-2(N88R)の正味凝集指数を凍結乾燥前状態から変化させず、IL-2(N88R)が蛋白質凝集/沈澱に関して凍結乾燥工程に耐えたことを示唆している。40における4カ月間にわたる貯蔵後に、クエン酸塩(B)、プルロニックF-68(D)またはマンニトール(E)を含有する調剤に関して正味凝集指数における有意な増加が観察された。これらの結果は、クエン酸塩もしくはマンニトール、ツィーン-80またはプルロニックF-68の含有が貯蔵中に固体状態のIL-2(N88R)凝集を防止しなかったことを示した。調剤AおよびFは凝集指数における有意な変化を示さず、1または5mg/mlのIL-2(N88R)と一緒にヒスチジン、グリシン、およびスクロースの含有が安定な生成物を生じたことを示唆している。

10

20

【0025】

しかしながら、有意な量の可溶性凝集体がツィーン-80を含有する調剤中では凍結乾燥前でも見いだされ(表3)、ツィーン-80は可溶性IL-2(N88R)凝集体の生成を促進するが、不溶性凝集体の生成は抑制されうることを示している。プルロニックF-68(調剤D)も可溶性凝集体の有意な生成をもたらしたが、界面活性剤はIL-2(N88R)と相容性でないかもしれない。2%のグリシン、1%のスクロース、および20mM(0.31重量%)のヒスチジン(A、F)を含有した調剤だけは40における4カ月間にわたる凍結乾燥調剤の貯蔵後に可溶性凝集体の検出可能な生成を示さず、ここでもIL-2(N88R)がヒスチジンにより安定化されたことを示唆している。

【0026】

凍結乾燥および貯蔵後の可溶性IL-2(N88R)の合計回収率はRP-HPLCにより測定された(表3)。凍結乾燥後のIL-2(N88R)の回収率はマンニトールを含有する調剤以外の全ての調剤に関して約96%より高かった。40における4カ月間にわたるこれらの調剤の貯蔵後に、2%のグリシン、1%のスクロース並びに1および5mg/mlのIL-2(N88R)を含有する20mM(0.31重量%)のヒスチジンを含有する調剤AおよびF中では約92%のIL-2(N88R)が回収された。これらのデータ(調剤AおよびFに関する90%より高いIL-2(N88R)の回収率)も、界面活性剤が蛋白質を不安定化させるがヒスチジンがIL-2(N88R)を安定化させることを示唆している。

30

【0027】**【表2】**

40

表2：凍結乾燥IL-2(N88R)調剤の組成

調剤ID	A	B	C	D	E	F
IL-2(N88R), mg/mL	1	1	1	1	1	5
グリシン, 重量%(w/w)	2	2	2	2	0	2
スクロース, 重量%(w/w)	1	1	1	1	0	1
マンニトール, 重量%(w/w)	0	0	0	0	5	0
クエン酸ナトリウム, 重量%(w/w)	0	0.6	0	0	0	0
ヒスチジン, 重量%(w/w)	0.31	0	0.31	0.31	0.31	0.31
ツィーン80, 重量%(w/w)	0	0	0.1	0	0	0
フルロニック F68, 重量%(w/w)	0	0	0	0.1	0	0
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

10

20

【 0 0 2 8 】

【 表 3 】

表3：凍結乾燥および40°Cにおける4か月間にわたる凍結乾燥調剤の貯蔵中のIL-2(N88R)の安定性

調剤ID	A	B	C	D	E	F
凝集指数(%)						
凍結乾燥前	4.4	5.2	1.5	4.7	5.6	1.6
凍結乾燥後	5.2	5.1	0.7	1.5	3.8	1.6
40°Cにおける4か月間	2.9	13.9	2.4	14.3	20.8	3.3
SEC-HPLCによる可溶性凝集体(%)						
凍結乾燥前	ND ^a	ND	4.4%	ND	ND	NA ^b
凍結乾燥後	ND	ND	7.2%	ND	ND	NA
40°Cにおける4か月間	ND	4.2%	32.9%	15.9%	12.2%	NA
RP-HPLCによる回収率(%)						
凍結乾燥前	100	100	100	100	100	100
凍結乾燥後	96.5	95.7	96.4	99.4	91.7	97.8
40°Cにおける4か月間	92.5	82.9	71.9	84.3	79.1	91.7

30

40

^aND = 検出できない^bNA = 入手できない

【 0 0 2 9 】

実施例 4

野生型IL-2も調剤Aと同じ組成の水性調剤から凍結乾燥した。野生型IL-2に関する40°Cにおける安定性データはIL-2(N88R)のものに匹敵した(表4)。

【 0 0 3 0 】

【 表 4 】

50

表4：凍結乾燥および凍結乾燥調剤の貯蔵中の野生型IL-2(N88R)の安定性

条件	凝集指数(%)	可溶性凝集体(%)	回収率(%)
凍結乾燥前	4.2	ND*	100
凍結乾燥後	5.1	ND	93.6
40°Cにおける4ヵ月間	4.3	ND	93.0

*ND = 検出できない

10

【0031】

論評

ヒトIL-2は6の螺旋構造(A-F)を形成する133個のアミノ酸類を有する。これらの螺旋の4個は四螺旋束モチーフ(tetra-helix bundle motif)と称するものを形成する。cys^{5 8}およびcys^{1 0 5}の間の分子内ジスルフィド結合は螺旋間の伸びたループ上に位置する。遊離cys^{1 2 5}はアミノ酸類117-133を組み入れる螺旋F上に位置する。

【0032】

ヒスチジンがIL-2の特異的な安定剤であるとい驚異的な発見は、ヒスチジンがIL-2と水性および凍結乾燥状態の両方で分子を安定化させるような特異的な方法で相互作用しうることを示唆している。IL-2の不安定性の主要機構の1つは、チオール-ジスルフィド交換反応によるオリゴマー類の生成から生ずる凝集である。従って、そのヒスチジンが実際にIL-2中のチオール-ジスルフィド交換反応を抑制または減少させようと仮説をたてることができる。野生型IL-2、IL-2(N88R)並びにことによると他のIL-2変種分子は1個のジスルフィド結合および遊離スステイン(Cys^{1 2 5})を有するため、Cys^{1 2 5}上の遊離-SH基はチオール/ジスルフィド交換経路を介してジスルフィド結合と容易に反応することができ、それにより凝集/沈澱事象を生ずる。

20

【0033】

チオール/ジスルフィド交換の機構は最近ではBulaj et al.により記載されている(ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. Biochemistry 1998 Jun 23; 37(25): 8965-72)。モデルペプチド類および蛋白質の研究では、反応速度は静電力並びに蛋白質の二次構造に感受性であることが示された。チオール中の硫黄原子周辺の電子分布はチオールのpK_aを変更しうる近くの電荷および結合内誘導効果(through-bond inductive effect)の存在により影響を受けうる。例えば、チオール/ジスルフィド交換中のチオールの増加した反応性は近くの正電荷の存在または近くのアルファ-螺旋構造からのペプチド双極の貢献のいずれかによるそのpK_aの低下に起因しうる。対照的に、チオール基近くの負電荷はチオールのpK_aを上昇させ且つより低いチオール/ジスルフィド反応速度を生じうる。この提唱された機構は他の研究によっても支持され、そこでは付近の正に荷電された基による高反応性チオレートイオンの安定化が蛋白質チロシンホスファターゼ(Zhang and Dixon, 1993 Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402, Biochemistry 1993 Sep 14; 32(36): 9340-5)および蛋白質ジスルフィドイソメラーゼ(Kortemme et al., Electrostatic interactions

30

40

50

in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase. Biochemistry 1996 Nov 19; 35(46): 14503-11) に関して示された。

【0034】

チオール/ジスルフィド交換反応のこれらの性質に基づき、ヒスチジンがIL-2(N88R)の安定化における速度論的または熱力学的役割のいずれかを演ずるような安定化機構を想像することができる。ジスルフィド架橋Cys⁵⁸-Cys¹⁰⁵近くには5個のグルタミン酸基(57、60、61、62、および106)がある。これらの負に荷電された基に対するヒスチジンの特異的な結合がチオール/ジスルフィド交換反応に関する速度論的妨害を生ずることができ、またはジスルフィド架橋近くのヒスチジンの結合がIL-2分子を熱力学的に安定化させて凝集反応傾向が少ない立体配座にすることができた。さらに、His-Guイオン性相互作用は3個の関係する硫黄原子間の中間的な遷移状態の生成であるチオール/ジスルフィド交換における速度決定段階をさらに減ずるであろう立体障害を生成しうる。ジスルフィド結合は蛋白質表面上の伸びたループ上に置かれているため、グルタミン酸基に対するヒスチジンの接近可能性は非常にあつらえむきである。

10

【0035】

上記の実施例を前提にして、ここに開示された発明の変更が当業者により行われるであろうことが予期される。従って、上記の実施例は単なる説明としてみなすべきでありそしてここに開示された発明は請求項によってのみ限定されるべきであることが意図される。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1はIL-2水溶液に関する最適なpH範囲を示すグラフである。

【図2】

図2は蛋白質溶液を1 /分で25 から95 に加熱することにより誘発されるIL-2凝集に関するヒスチジン対酢酸塩およびクエン酸塩の安定化効果を比較する。

【 図 1 】

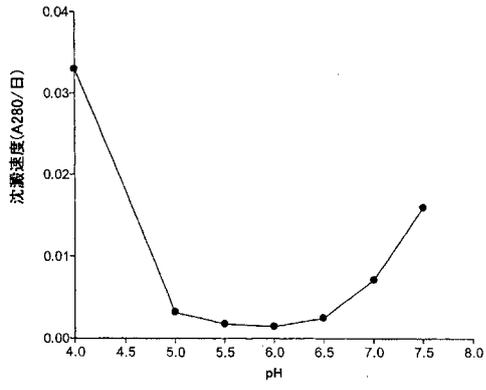


Figure 1.

【 図 2 】

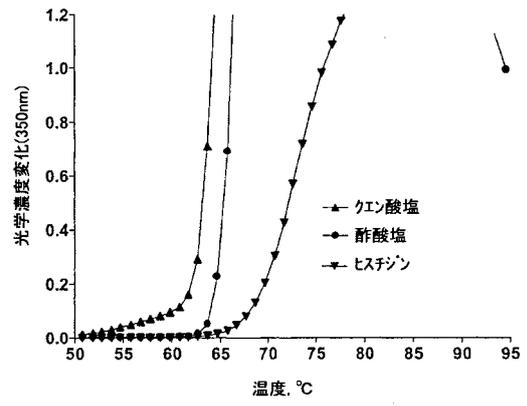


Figure 2.

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00243 A2

- (51) International Patent Classification: **A61K 38/00**
- (21) International Application Number: PCT/US01/20675
- (22) International Filing Date: 27 June 2001 (27.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
09/605,577 28 June 2000 (28.06.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **BAYER CORPORATION** [US/US]; 800 Dwight Way, P.O. Box 1986, Berkeley, 94701-1986 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **WANG, Wei** [US/US]; 923 Lilac Street, Alameda, CA 94502 (US); **NAYAR, Rajiv** [CA/US]; 5357 Couch Drive, Richmond, CA 94803 (US); **SHEARER, Michael, A.** [US/US]; 2402 Homestead Court, Fairfield, CA 94533 (US).
- (74) Agent: **SHAW, Melissa**; Bayer Corporation, 800 Dwight Way, P.O. Box 1986, Berkeley, CA 94701-1986 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/00243 A2

(54) Title: STABILIZED INTERLEUKIN 2

(57) Abstract: A stable pharmaceutical preparation comprising Human interleukin-2 or a variant thereof and a stabilizing amount of histidine. A preferred formulation includes glycine and sucrose and a variant of IL-2 having a single mutation, N88R. The preferred formulation is in lyophilized form which, on reconstitution with an aqueous diluent, results in a solution having a pH ranging from about 5.0 to 6.5.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

STABILIZED INTERLEUKIN 2

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field: The invention is generally related to the field of pharmaceutical formulations. More specifically, the invention is directed to a stabilized, therapeutically active Interleukin-2 formulation capable of selectively activating T cells (PHA-blasts) and, very preferably, including an IL-2 mutein demonstrating reduced activation of Natural Killer ("NK") cells. The stabilized compositions having the preferred properties include variants of IL-2 described below.

Background: As discussed in a related application PCT/US 99/10643 published November 25, 1999, Interleukin 2 (IL-2) is a potent immune stimulator, activating diverse cells of the immune system, including T cells, B cells, and monocytes. IL-2 is also a potent and critical growth factor of T cells. It was by virtue of these activities that IL-2 was tested for its ability to treat cancer. Human IL-2 is a FDA approved drug for the treatment of metastatic renal carcinoma and metastatic melanoma. The use of IL-2 in eligible patients is restricted due to the severe toxicity associated with IL-2 therapy; it is estimated that at best only 20% of eligible patients actually receive therapy. The toxicities associated with IL-2 therapy include severe fever, nausea, vomiting, vascular leak and serious hypotension. Despite these toxicities, however, IL-2 is effective for its approved indications. Variants of IL-2 having reduced toxicity are the subject matter of application WO 99/60128.

Significant information on stabilization of IL-2 and other therapeutic protein formulations is available. The currently approved Human IL-2 preparation (Proleukin® IL-2, Chiron Corporation) is a freeze-dried preparation which includes mannitol, sodium dodecyl sulfate (SDS) and a phosphate buffer. Other formulated therapeutic proteins, including IL-2, are described in the following references.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

Fernandes et al., 1986, Pharmaceutical compositions of microbially produced interleukin-2 (US patent No. 4,604,377) describes a freeze-dried formulation containing a stabilizer (mannitol) and a solubilizing agent such as sodium dodecyl sulfate or sodium deoxycholate sulfate at about 100 to about 250 ug per mg of IL-2. The formulation for the currently available Proleukin® IL-2 product is believed to be described in this reference.

Patel, 1994 Stabilization of protein formulations (US patent No. 5,358,708) describes aqueous formulations of an interferon, a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or an interleukin having extended storage lifetimes by incorporating methionine, histidine or mixtures thereof. Although reference is made to several interleukins, including IL-2, in work done with an IL-4 formulation the patentees found histidine to be less effective as a stabilizer than methionine, under conditions of the stabilizer test used.

Shaked, et al., 1991, Pharmaceutical compositions of recombinant interleukin-2 and formulation processes (US patent No. 5,037,644) describes formulations which are either in freeze-dried or liquid form. The excipients of the formulation include a non-ionic polymeric detergent such as Triton X405, Triton X305, PEG (4000) monostearate, Tween 80 and Tween 20 at concentrations of about 0.001% to about 5%, a bulking/stabilizing agent such as sucrose, fructose, dextrose, maltose, glucose, dextran, mannitol, sorbitol, inositol, galactitol, xylitol, lactose, trehalose, human serum albumin and bovine serum albumin, and a buffering agent such as glycine, citrate, or phosphate in a concentration range from about 10 mM to about 50 mM with a pH ranging from about 3 to about 7. The concentration (wt/vol) of the polyol sugar bulking agent ranges from about 0.025% to about 10%.

Roskam et al., 1995, Drugs containing a glycosylated interleukin-2 (US patent No. 5,417,970) describes a freeze-dried formulation containing hydrolyzed gelatin (or human serum albumin) and alanine with a pH 6.5.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

Hora et al., 1992, **Pharmaceutical composition for interleukin-2 containing physiologically compatible stabilizers** (US patent No. 5,078,997) describes formulations which are either liquid or freeze-dried. Formulations may contain one or a combination of stabilizers such as arginine, carnitine, betaine, pyridoxine polyvinylpyrrolidone, salts of capric acid, sugars, sugar alcohols, serum albumin, and citrate at pH 5.0-8.5 buffer. The concentration of stabilizers is between 0.2 and 3.0% (w/v) for arginine, between 0.2 and 3.0% (w/v) for carnitine, between 2 and 6% (w/v) for sucrose, and 0.01 and 0.3M for citrate.

Yasushi et al., 1987 **Stable composition of interleukin-2 and albumin** (US patent No. 4,645,830) describes a stable aqueous formulation that contains human serum albumin (0.1 - 50 mg/ml) with or without a reducing excipient such as glutathione, thioctic acid, N-acetylcysteine, or ascorbic acid (concentration of 0.05 - 20 mg/ml) at pH between 3 to 5.5. The albumin formulation may contain a monoamino aliphatic amino acid, a cyclic amino acid, a monosaccharide, a sugar alcohol or monoamino aliphatic amino acid (concentration of 5 to 50 mg/ml).

Lee et al., 1989 **Pharmaceutical plasma protein formulations in low ionic strength media; sodium chloride and/or potassium chloride, lysine hydrochloride, and histidine** (US patent No. 4,877,608) describes stable factor VIII and other plasma protein formulations in low ionic strength media which comprises: sodium chloride, potassium chloride or mixtures thereof; lysine hydrochloride; and histidine as the buffering agent.

Nayar, 1998 **stabilized albumin-free recombinant Factor VIII preparation having a low sugar content** (US patent No. 5,763,401 and 5,874,408) describes an albumin free stabilized FVIII formulation including glycine, histidine, sucrose and NaCl.

In attempting to find a stable IL-2 formulation (especially for the preferred IL-2 mutein (N88R) of WO 99/60128), we have now found a very stable and pharmaceutically

WO 02/00243

PCT/US01/20675

acceptable formulation for biologically active and useful Human IL-2. Our discovery is based on addressing what we believe is the basic mechanism responsible for stability, as described below.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is a graph illustrating the optimum pH range for an aqueous IL-2 solution.

Figure 2 compares the stabilizing effect of histidine to acetate and citrate on IL-2 aggregation induced by heating the protein solution at 1 C°/min from 25 °C to 95 °C.

SUMMARY OF INVENTION

The present invention is a pharmaceutical composition or formulation of IL-2 or variants (mutains) thereof stabilized with histidine. Preferably, the composition comprises a mixture resulting in a solution of low ionic strength (e.g. <0.1) and includes other stabilizers such as sugars and amino acids, preferably sucrose and glycine. The formulation may include from 0 to 0.9 wt. % NaCl. The composition is albumin-free and the formulation in lyophilized form can be rapidly reconstituted (< 1 minute) with water. The composition solubilizes under physiologically acceptable pH conditions, preferably at a pH ranging from about 5.0 to about 6.5, without the use of surfactants such as sodium dodecyl sulfate. The reconstituted solution is near isotonicity and can be administered both subcutaneously and intravenously. In a very preferred embodiment, the IL-2 of the composition is a mutain having a single amino acid substitution, preferably the N88R variant described in WO 99/60128.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

The very preferred composition has a protein concentration of 1-5 mg/ml and comprises the following in aqueous form (on a wt/wt basis):

IL-2	0.1-0.5 wt%
Histidine	0.08-1.6 wt%
NaCl	0-0.9 wt%
Sucrose	1-10 wt%
Glycine	0-3 wt%, at a
pH of	5 to 6.5.

Details of our formulation and how it was discovered are described below.

SPECIFIC EMBODIMENTS

As used herein, the term IL-2 includes both active wild type IL-2 and its biologically active variants or muteins such as those described in WO 99/60128. In the examples below we used an IL-2 known as IL-2(N88R) which is a recombinant mutein of human IL-2, with asparagine (N) at amino acid position 88 mutated to arginine (R). This mutein was expressed from Chinese hamster ovary (CHO) cells and comprised a mixture of both glycosylated and non-glycosylated forms. It is described in WO 99/60128 cited above as a related application.

The objective that led to this invention was the need to identify a lyophilized dosage form for the preferred IL-2 mutein that was albumin-free with acceptable stability. Since, the bioassay for IL-2 was an insensitive measure of stability, we used quantitation of soluble IL-2 by reverse phase HPLC as the stability indicating assay. As used herein, the terms "stable" or "stabilized" mean reduction of soluble IL-2 quantity by reverse-phase HPLC to no less than 90% of original soluble quantity after storage for four months at 40 °C (see tables 3 and 4 below). Additional stability-indicating assays employed included Aggregation Index, a measure of aggregation by UV/VIS spectrophotometry and determination of soluble aggregates by size-exclusion HPLC. In addition to a stable product, rapid reconstitution (less than 1 minute) of the lyophilisate is highly preferred.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

Finally, the formulation in a lyophilized dosage form with acceptable stability which could be easily lyophilized in production freeze dryers was desired.

Aqueous stability studies carried out during preformulation investigations indicated that IL-2(N88R) readily aggregates in the liquid state and the aggregation was pH-dependent. Two preformulation stability studies were conducted: a pH profile of IL-2(N88R) and stability in the presence of different buffer excipients. The objectives of these studies were to identify a suitable pH range for IL-2(N88R) and a suitable buffering excipient for aqueous stability (reduced aggregation potential). In generating the pH profile, IL-2 solutions were prepared with different pH conditions and stored under accelerated temperature conditions (40 °C). Samples were analyzed at different time intervals and rates of aggregation calculated. As shown in Figure 1, the optimal pH range for low aggregation rates was identified between pH 5.0 and 6.5. Histidine, acetate, and citrate were identified as pharmaceutical buffering agents for IL-2(N88R) in this pH range and were evaluated at a concentration of 20 mM in IL-2 (N88R) solutions containing 1 mg/ml IL-2 (N88R) and 150 mM (0.9 wt%) NaCl. These samples were heated from 25 °C to 95 °C at 1 °C per minute and precipitation was monitored by UV spectrophotometry at 350 nm. As shown in figure 2, to our surprise, histidine significantly stabilized IL-2(N88R) over the other buffer excipients at pH 5.5 as indicated by an increase in the onset temperature of precipitation. The onset temperatures in the presence of citrate, acetate, and histidine were 62 °C, 64 °C, and 70 °C, respectively. Studies such as these demonstrated that histidine could be used not only as a buffering agent but also a stabilizer for IL-2 under aqueous conditions.

For development of a lyophilized dosage form, other excipients that are used by those familiar with the art were investigated. These included bulking agents and cryoprotectants such as glycine, sucrose, and mannitol. Two surfactants were also evaluated as stabilizers for IL-2(N88R), since aggregation was one of the instability mechanisms for the molecule during the aqueous stability studies. The results of these studies are summarized in the examples below. They show that to our surprise histidine has selective stabilizing effects on IL-2 over other excipients, such as citrate for example.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

EXAMPLE 1

The stability of liquid IL-2(N88R) at different pHs was examined at 40°C. The results showed that IL-2(N88R) precipitation rate was lowest between pH 5.0 to 6.5 (Figure 1). Therefore, pH 5.5 was chosen as the optimal formulation pH in liquid state and for preparation of lyophilized formulations.

EXAMPLE 2

We examined the potential effect of different buffering agents on the stability of IL-2(N88R). The buffering agents we examined included citrate, acetate, and histidine. These buffering agents were used at 20 mM in IL-2(N88R) solutions containing 1 mg/ml IL-2(N88R) and 150 mM (0.9 wt%) NaCl. These stability samples were heated from 25 °C to 95 °C at 1 °C per minute while being monitored by UV/VIS spectrophotometry. Histidine significantly stabilized IL-2(N88R) by increasing the precipitation temperature and by decreasing the precipitation rate in comparison with acetate and citrate (Figure 2). Table 1 shows the onset precipitation temperatures of IL-2(N88R) in the presence of these three buffering agents. The onset precipitation temperature was arbitrarily defined as the temperature at which the optical density at 350 nm (OD_{350}) reaches a certain level (0.2 and 1.0 in the case of OD_{350}). The precipitation temperature of IL-2(N88R) in the presence of histidine was several degrees higher than those in the presence of the other two buffering agents. This example demonstrated that histidine may be a specific stabilizer in addition to being used as a buffering agent for IL-2(N88R) in the liquid state.

Table 1: Precipitation Temperature ($OD_{350}=0.2$ and $OD_{350}=1.0$) of IL-2(N88R) in Different Buffers

Buffering Agents	Precipitation Temperature, °C (when $OD_{350} = 0.2$)	Precipitation Temperature, °C (when $OD_{350} = 1.0$)
Citrate	62 °C	64 °C
Acetate	64 °C	66 °C
Histidine	70 °C	76 °C

EXAMPLE 3

In an effort to evaluate further the stabilizing effect of histidine, lyophilized IL-2(N88R) was prepared from different aqueous formulations (see Table 2). Most of the formulations contained 2 wt% glycine as a bulking agent and 1 wt% sucrose as a stabilizer. Mannitol at 5 wt% was used in a formulation as a comparator to Proleukin[®], a commercialized product of IL-2. Two surfactants, Tween 80 and Pluronic F68 both at 0.1 wt%, were evaluated for prevention of protein surface adsorption and aggregation. All the formulations contained either histidine or citrate as a buffering agent with a pH adjusted to 5.5. Citrate was included to distinguish the stabilizing effect of histidine from that of citrate at pH 5.5. These lyophilized formulations were stored at 40°C and were analyzed by a number of analytical methods that included UV/VIS spectrophotometry, SEC-HPLC, and RP-HPLC.

Table 3 shows the stability of IL-2(N88R) in a number of formulations as assessed by UV/VIS spectrophotometry for aggregation, amount of soluble aggregates by size-exclusion HPLC (SEC-HPLC), and percent recovery of the protein by reverse-phase HPLC (RP-HPLC). Samples were analyzed after lyophilization and stored at an accelerated storage temperature of 40°C for four months. The lyophilization process did not change the net aggregation index of IL-2(N88R) from the pre-lyophilization state, suggesting that IL-2(N88R) tolerated the lyophilization process with respect to protein

WO 02/00243

PCT/US01/20675

aggregation/precipitation. After storage at 40°C for four months, a significant increase in net aggregation index was observed for the formulation containing citrate (B), Pluronic F-68 (D) or mannitol (E). These results indicated that inclusion of either citrate or mannitol, Tween-80 or Pluronic F-68 did not offer any protection of IL-2(N88R) aggregations in the solid state during storage. Formulations A and F did not show a significant change in the aggregation index, suggesting that inclusion of histidine, glycine, and sucrose with 1 or 5 mg/ml IL-2(N88R) resulted in a stable product.

However, significant amounts of soluble aggregates were found in the formulation containing Tween-80 even before lyophilization (Table 3), indicating that Tween-80 promotes formation of soluble IL-2(N88R) aggregates, although formation of insoluble aggregates may be inhibited. Since Pluronic F-68 (formulation D) also caused significant formation of soluble aggregates, surfactants may not be compatible with IL-2(N88R). Only the formulations that contained 2% glycine, 1% sucrose, and 20 mM (0.31 wt%) histidine (A, F) did not show any detectable formation of soluble aggregates after storage of the lyophilized formulation at 40°C for four months, suggesting again that IL-2(N88R) was stabilized by histidine.

The total recovery of soluble IL-2(N88R) after lyophilization and storage was determined by RP-HPLC (Table 3). The recovery of IL-2(N88R) after lyophilization was greater than about 96% for all formulations except for the formulation containing mannitol. After storage of these formulations at 40°C for 4 months, approximately 92% of IL-2(N88R) was recovered in formulations A and F containing 2% glycine, 1% sucrose and 20 mM (0.31 wt%) histidine containing 1 and 5 mg/ml IL-2(N88R). These data (greater than 90% recovery of IL-2 (N88R) for formulations A and F) again suggest that histidine stabilizes IL-2(N88R) while surfactants destabilize the protein.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

Table 2: Composition of Lyophilized IL-2(N88R) Formulation

Formulation ID	A	B	C	D	E	F
IL-2(N88R), mg/mL	1	1	1	1	1	5
Glycine, wt% (w/w)	2	2	2	2	0	2
Sucrose, wt% (w/w)	1	1	1	1	0	1
Mannitol, wt% (w/w)	0	0	0	0	5	0
Sodium Citrate, wt% (w/w)	0	0.6	0	0	0	0
Histidine, wt% (w/w)	0.31	0	0.31	0.31	0.31	0.31
Tween 80, wt% (w/w)	0	0	0.1	0	0	0
Pluronic F68, wt% (w/w)	0	0	0	0.1	0	0
pH	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5

Table 3: Stability of IL-2(N88R) during Lyophilization and Storage of the Lyophilized Formulation at 40 °C for 4 months.

Formulation ID	A	B	C	D	E	F
Aggregation Index (%)						
Before lyophilization	4.4	5.2	1.5	4.7	5.6	1.6
After lyophilization	5.2	5.1	0.7	1.5	3.8	1.6
4 months at 40 °C	2.9	13.9	2.4	14.3	20.8	3.3
Soluble Aggregates (%) by SEC-HPLC						
Before lyophilization	ND ^a	ND	4.4%	ND	ND	NA ^b
After lyophilization	ND	ND	7.2%	ND	ND	NA
4 months at 40 °C	ND	4.2%	32.9%	15.9%	12.2%	NA
Recovery (%) by RP-HPLC						
Before lyophilization	100	100	100	100	100	100
After lyophilization	96.5	95.7	96.4	99.4	91.7	97.8
4 months at 40 °C	92.5	82.9	71.9	84.3	79.1	91.7

^aND = not detectable^bNA = not available

WO 02/00243

PCT/US01/20675

EXAMPLE 4

Wild-type IL-2 was also lyophilized from an aqueous formulation of the same composition as formulation A. The stability data for the wild-type IL-2 at 40 °C was comparable to those for IL-2(N88R) (Table 4).

Table 4: Stability of Wild-type IL-2(N88R) Formulation during Lyophilization and Storage of the Lyophilized Formulation

Conditions	Aggregation Index (%)	Soluble Aggregates (%)	Recovery (%)
Before lyophilization	4.2	ND ^a	100
After lyophilization	5.1	ND	93.6
4 months at 40 °C	4.3	ND	93.0

^aND = not detectable

DISCUSSION

Human IL-2 has 133 amino acids that form six helical structures (A-F). Four of these helices form what is termed a tetra-helix bundle motif. The intramolecular disulfide bond between cys⁵⁸ and cys¹⁰⁵ is located on the extended loops between the helices. The free cys¹²⁵ is located on helix F that incorporates amino acids 117-133.

The surprise finding that histidine is a specific stabilizer of IL-2 suggests that histidine may interact with IL-2 in a specific manner which results in stabilizing the molecule in both the aqueous and lyophilized states. One of the major mechanisms of instability of IL-2 is aggregation that results from the formation of oligomers due to thiol-disulfide exchange reactions. Hence, one can hypothesize that histidine may in fact inhibit or reduce the thiol-disulfide exchange reactions in IL-2. Since wild type IL-2, IL-2(N88R) and possibly other IL-2 variant molecules that have one disulfide bond and a free cysteine (Cys¹²⁵), the free -SH group on Cys¹²⁵ could easily react with the disulfide bond via the thiol/disulfide exchange pathway thereby resulting in aggregation/precipitation events.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

The mechanism of thiol/disulfide exchange has been described recently by Bulaj et al. (Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* 1998 Jun 23;37(25):8965-72). In studies of model peptides and proteins, the reaction rate has been shown to be sensitive to electrostatic forces as well as to the secondary structure of the proteins. The electron distribution around a sulfur atom in a thiol can be influenced by the presence of nearby charges and through-bond inductive effects which can alter the pK_a of the thiol. For example, increased reactivity of the thiols in the thiol/disulfide exchange can be attributed to the lowering of its pK_a due to the presence of either nearby positive charges or peptide dipole contributions from a nearby alpha-helical structure. In contrast, negative charges near the thiol group can raise the pK_a of the thiol and lead to lower thiol/disulfide reaction rates. This proposed mechanism is also supported by other studies, where stabilization of the highly reactive thiolate ions by neighboring positively-charged residues has been demonstrated for protein tyrosine phosphatase (Zhang and Dixon, 1993 Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pK_a of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* 1993 Sep 14;32(36):9340-5) and protein disulfide isomerase (Kortemme et al., Electrostatic interactions in the active site of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 1996 Nov 19;35(46):14503-11).

Based on these properties of the thiol/disulfide exchange reaction, one can envision a stabilization mechanism where histidine plays either a kinetic or a thermodynamic role in the stabilization of IL-2(N88R). There are five glutamic acid residues (57, 60, 61, 62, and 106) near the disulfide bridge Cys⁵⁸ - Cys¹⁰⁵. Specific binding of histidine to these negatively-charged residues could lead to a kinetic barrier for the thiol/disulfide exchange reaction or the binding of histidine near the disulfide bridge could thermodynamically stabilize the IL-2 molecule into a conformation that is less prone to aggregation reactions. In addition, the His-Glu ionic interactions may also create steric hindrance that would further reduce the rate-determining step in the thiol/disulfide exchange which is the formation of an intermediate transition state between the three participating sulfur atoms. The accessibility of histidine to the

WO 02/00243

PCT/US01/20675

glutamic acid residues is very likely because the disulfide bond is located on an extended loop on the protein surface.

Given the above examples it is expected that variations of the inventions disclosed herein will occur to those skilled in the art. Accordingly, it is intended that the above examples should be construed as illustrative only and that the inventions disclosed herein should be limited only by the following claims.

WO 02/00243

PCT/US01/20675

WE CLAIM

1. A stable pharmaceutical composition comprising human interleukin-2 or a variant thereof stabilized with histidine.
2. The preparation of claim 1 in lyophilized form which can be rapidly reconstituted in water.
3. The preparation of claim 1 in aqueous form having a pH ranging from about 5.0 to about 6.5.
4. The preparation of claim 1 including glycine.
5. The preparation of claim 1 including sucrose.
6. The preparation of claim 1 including glycine and sucrose.
7. The preparation of claim 1 where the IL-2 is a mutein.
8. The preparation of claim 7 where the IL-2 is a mutein having a single amino acid substitution, N88R.
9. A stable, lyophilized composition which, upon aqueous reconstitution, comprises the following:

IL-2	0.1-5 mg/ml
Histidine	0.08-1.6 wt%
NaCl	0-0.9 wt%
Sucrose	1-10 wt% and
Glycine	0-3 wt% at a
pH of	5 to 6.5
10. The preparation of claim 9 where the IL-2 is a mutein having a single amino acid substitution, N88R.

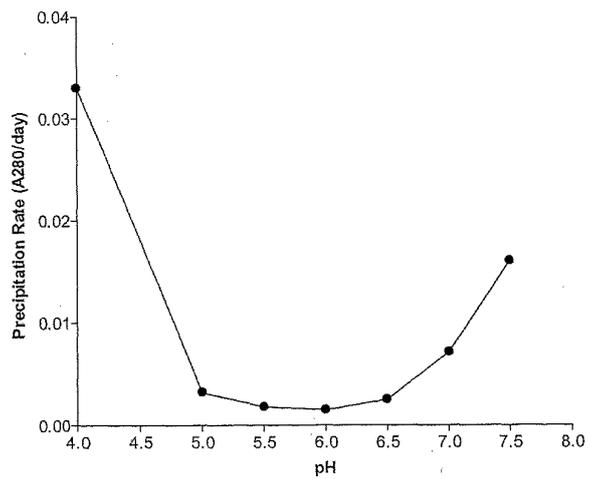


Figure 1.

WO 02/00243

2/2

PCT/US01/20675

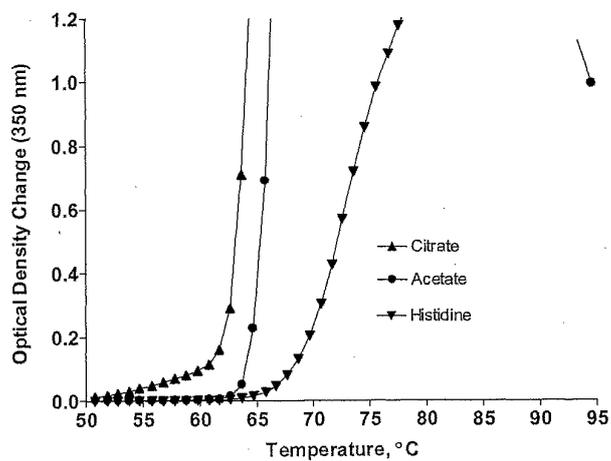


Figure 2.

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/000243 A3

- (51) International Patent Classification: A61K 38/20, 47/22, 47/18, 47/26
- (21) International Application Number: PCT/US01/20075
- (22) International Filing Date: 27 June 2001 (27.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/605,577 28 June 2000 (28.06.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER CORPORATION [US/US]; 100 Bayer Road, Pittsburgh, PA 15205 (US).
- (72) Inventors and Inventors/Applicants (for US only): WANG, Wei [US/US]; 923 Lilae Street, Alameda, CA 94502 (US). NAVAR, Rajiv [CA/US]; 5357 Couch Drive, Richmond, CA 94803 (US). SHEARER, Michael A. [US/US]; 2402 Homestead Court, Fairfield, CA 94533 (US).
- (74) Agent: SHAW, Melissa; Bayer Corporation, 800 Dwight Way, P.O. Box 1986, Berkeley, CA 94701-1986 (US).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:
— of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only
— of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only
— of inventorship (Rule 4.17(vi)) for US only
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 2 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/000243 A3

(54) Title: STABILIZED INTERLEUKIN 2

(57) Abstract: A stable pharmaceutical preparation comprising Human interleukin-2 or a variant thereof and a stabilizing amount of histidine. A preferred formulation includes glycine and sucrose and a variant of IL-2 having a single mutation, N88R. The preferred formulation is in lyophilized form which, on reconstitution with an aqueous diluent, results in a solution having a pH ranging from about 5.0 to 6.5.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US 01/20675
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K38/20 A61K47/22 A61K47/18 A61K47/26		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 229 016 A (SHIONOGI & CO ; BIOGEN NV (NL)) 15 July 1987 (1987-07-15) page 2, line 58 ---	1-3
Y	US 4 645 830 A (YASUSHI MIKURA ET AL) 24 February 1987 (1987-02-24) cited in the application column 2, line 50, paragraph 59 ---	1-10
Y	US 5 917 021 A (LEE LIHSYNG STANFORD) 29 June 1999 (1999-06-29) column 4 -column 7 ---	1-10
Y	US 5 358 708 A (PATEL SUMAN T) 25 October 1994 (1994-10-25) cited in the application the whole document ---	1-10
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Earlier documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/>
Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* documents which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but after than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 21 October 2002		Date of mailing of the international search report 25/10/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentstrasse 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayrak, S

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Patent Application No. PCT/US 01/20675
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 60128 A (LEMBACH KENNETH J ; SHANAFELT ARMEN B (US); JESMOK GARY (US); BAYER) 25 November 1999 (1999-11-25) cited in the application claim 6; example 7 -----	8

Form PCT/ISA/213 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No PCT/US 01/20675				
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date			
EP 0229016	A	15-07-1987	JP 1920142	C	07-04-1995			
			JP 6045551	B	15-06-1994			
			JP 62164631	A	21-07-1987			
			AT 82857	T	15-12-1992			
			CA 1288340	A1	03-09-1991			
			DE 3782828	D1	14-01-1993			
			DE 3782828	T2	29-04-1993			
			DE 229016	T1	14-01-1988			
			EP 0229016	A2	15-07-1987			
			ES 2043609	T3	01-01-1994			
			GR 3006807	T3	30-06-1993			
			KR 9612064	B1	12-09-1996			
			US 4645830	A	24-02-1987	JP 1710735	C	11-11-1992
						JP 3078847	B	17-12-1991
JP 60222424	A	07-11-1985						
JP 61197527	A	01-09-1986						
JP 1707178	C	27-10-1992						
JP 3061652	B	20-09-1991						
JP 60215631	A	29-10-1985						
AT 66612	T	15-09-1991						
AU 579359	B2	24-11-1988						
AU 4083985	A	17-10-1985						
CA 1285478	A1	02-07-1991						
CN 85101301	A, B	23-07-1986						
DE 3583880	D1	02-10-1991						
DK 148885	A	10-10-1985						
EP 0158487	A2	16-10-1985						
ES 542028	D0	16-12-1985						
ES 8603271	A1	16-04-1986						
IE 58161	B1	28-07-1993						
IL 74823	A	31-07-1989						
KR 9205048	B1	26-06-1992						
NZ 211702	A	29-11-1988						
PH 22897	A	19-01-1989						
PT 80247	A, B	01-05-1985						
US 4812557	A	14-03-1989						
ZA 8502302	A	26-11-1986						
US 5917021	A	29-06-1999	US 5656730	A	12-08-1997			
US 5358708	A	25-10-1994	NONE					
WO 9960128	A	25-11-1999	AU 4078499	A	06-12-1999			
			BG 104929	A	28-09-2001			
			BR 9910504	A	09-01-2001			
			CA 2327349	A1	25-11-1999			
			CN 1309705	T	22-08-2001			
			EP 1076704	A1	21-02-2001			
			HU 0101948	A2	28-09-2001			
			JP 2002515247	T	28-05-2002			
			NO 20005762	A	11-01-2001			
			PL 344407	A1	05-11-2001			
			SI 20643	A	28-02-2002			
			SK 17242000	A3	10-07-2001			
			TR 200003354	T2	21-03-2001			
			WO 9960128	A1	25-11-1999			

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/26	A 6 1 K 47/26	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 7

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 シーラー, マイケル・エイ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 5 3 3 フェアフィールド・ホームステッドコート 2 4 0 2

Fターム(参考) 4C076 AA29 CC26 CC27 DD08 DD23 DD43 DD51 DD60Q DD67 FF04

FF36 FF63

4C084 AA03 BA44 DA14 MA01 MA05 MA44 NA03 ZB222 ZB262