(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0149090
(43) 공개일자 2021년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/20 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01) *C07K 14/715* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/2086 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7034537
(22) 출원일자(국제) 2020년04월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년10월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/026778
(87) 국제공개번호 WO 2020/206395
국제공개일자 2020년10월08일
(30) 우선권주장
62/830,212 2019년04월05일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
넥타르 테라퓨틱스
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미션 베이 불러바드 455 스위트 100
프레드 헛친슨 켄서 리서치 센터
미국 워싱턴 98109, 시애틀, 1100 페어뷰 애버뉴 엔.,
(72) 발명자
마르콘데스 안토니오 마리오 케리도
미국 94030 캘리포니아주 밀브레 파라마운트 드라이브 320
커크 피터 베네딕트
영국 오엑스14 4제이더블유 옥스퍼드셔 옥스퍼드셔 애빙던 드레이턴 하이 스트리트 55
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **세포 면역요법을 향상시키기 위한 방법**

(57) 요 약

(i) CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 개체에게 투여하는 단계, 및 (ii) 인터류킨-15 수용체 효능제(agonist), 예컨대 장시간 작용형(long-acting) 인터류킨-15 수용체 효능제를 개체에게 투여하는 단계에 의해, 암을 갖는 개체를 치료하는 것에 관한 방법 및 조성물이 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61K 39/001102 (2021.08)
A61K 39/001112 (2018.08)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
A61K 2039/55527 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자
미야자키 다카히로
미국 94107 캘리포니아주 샌프란시스코 킹 스트리트 660 넘버366
터틀 카메론 제이
미국 98109 워싱턴주 시애틀 노스 1번 애비뉴 2918
리들 스탠리 알
미국 98075 워싱턴주 사마미시 사우스이스트 268번 플레이스 1763
처우 캐시 케이
미국 98103 워싱턴주 시애틀 노스 프리몬트 애비뉴 3635 넘버205
프레쓸레 지몬 피
독일 85354 프라이징 요제프-슐레히 슈트라쎄 7

(30) 우선권주장
62/861,858 2019년06월14일 미국(US)
62/898,473 2019년09월10일 미국(US)
62/944,955 2019년12월06일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

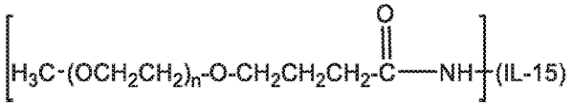
암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법으로서,

(i) 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포(CAR-T 세포)를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 대상체에게 투여하는 단계; 및

(ii) 하기 구조를 갖는 IL-15 수용체 효능제(agonist)를 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하는 방법:

[화학식 I]



(상기 식에서, IL-15는 인터류킨-15 모이어티(moiety)이고, (n)은 약 150 내지 약 3,000의 정수이고, ~NH~는 IL-15 모이어티의 아미노 기를 나타냄).

청구항 2

제1항에 있어서, 입양 세포 면역요법 조성물은 CD19-유도 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 CAR T 세포를 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii)는 순차적으로, 임의의 순서로, 또는 실질적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (i)은 단계 (ii) 전에 수행되는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (ii)는 단계 (i) 전에 수행되는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii) 모두는 실질적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii) 모두는 동일한 일자에 수행되는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 단계 (ii)는

(a) 단계 (i) 후에 1일차 내지 7일차 중 어느 하나(예를 들어, 단계 (i) 후에 1일차, 2일차, 3일차, 4일차, 5일차, 6일차, 7일차)에서 수행되거나,

(b) 단계 (i) 후에 8일차 내지 14일차 중 어느 하나(예를 들어, 단계 (i) 후에 8일차, 9일차, 10일차, 11일차, 12일차, 13일차, 14일차)에서 수행되거나,

(c) 단계 (i) 후에 7일차 또는 14일차에서 수행되는

방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 과정에 걸쳐 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 대상체에게 단회 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 과정에 걸쳐 L-15 수용체 효능제를 대상체에게 다회 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 입양 세포 면역요법 조성물이 주입에 의해 투여되고/되거나 IL-15 수용체 효능제가 주입에 의해 투여되는 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 혈액암인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 고형 종양인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 암은 림프종 또는 백혈병인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 암은 B-세포 림프종인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, IL-15 수용체 효능제는 화학식 I에서 (n)이 약 795 내지 약 1068의 범위인 화학식 I의 구조를 갖는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, (n)은 약 840 내지 약 1023의 범위인 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 평균적으로, (n)은 약 907의 값을 갖는(예를 들어, 상기 분자의 폴리(에틸렌) 글리콜 부분은 중량 평균 분자량이 약 40,000 달톤인) 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 단계 (i) 단독 또는 단계 (ii) 단독에 따라 수행되는 경우 관찰된 치료에 대한 반응보다 향상된 치료에 대한 유익한 반응을 가져오는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 치료에 대한 유익한 반응은 적합한 동물 모델에 기초하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 모델은 생체내 이종 B 세포 림프종 모델인 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 치료에 대한 유익한 반응은 종양 세포 주사 후 45일차에서 평가될 때, 종양 부피의 변화(즉, 종양 부하의 감소)의 % 및 골수 또는 종양 조직에서의 CAR-T 세포의 총수로부터 선택되는 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 입양 세포 면역요법 조성물은 CD-19-유도 유전자 변형된 자가 T 세포를 포함하는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)에서 약 10^7 내지 약 10^9개 세포/kg의 CAR-T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 약 0.2 x 10^6개 세포/kg 내지 약 6.0 x 10^8개 세포/kg, 적어도 약 2.0 x 10^6개 세포/kg 내지 약 2.0 x 10^8개 세포/kg, 적어도 약 0.2 x 10^6개 세포/kg 내지 약 5.0 x 10^6개 세포/kg, 적어도 약 0.1 x 10^8개 세포/kg 내지 약 2.5 x 10^8개 세포/kg, 또는 적어도 약 0.6 x 10^8개 세포/kg 내지 약 6.0 x 10^8개 세포/kg으로부터 선택되는 CAR-T 세포의 양을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.10 내지 50 μg/kg의 IL-15 수용체 효능제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 약 0.25 내지 25 μg/kg의 IL-15 수용체 효능제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 약 0.25 내지 15 μg/kg의 IL-15 수용체 효능제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (i)에서는, 입양 세포 면역요법 조성물을 단회 투여하는 단계를 포함하고, 단계 (ii)에서는, 단계 (i) 후에 1일차 내지 14일차 중 어느 하나에서 IL-15 수용체 효능제를 초기 투여한 후, 치료 과정에 걸쳐 매 21일마다 IL-15 수용체 효능제를 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 치료 과정은 IL-15 수용체 효능제의 1 내지 24회 사이클의 투여, 또는 IL-15 수용체 효능제의 3 내지 20회 사이클의 투여, 또는 IL-15 수용체 효능제의 4 내지 15회 사이클의 투여를 포함하는 방법.

청구항 32

키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포(CAR-T 세포)를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 대상체에게 투여함으로써 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서,

입양 세포 면역요법 조성물은 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 제공된 바와 같은 조성물 및 방법을 포함하고, 개선은 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같은 IL-15 수용체 효능제를 그리고/또는 제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 언급된 바와 같은 방법에 의해 대상체에게 추가로 투여함으로써 입양 세포 면역요법 조성물 단독 투여(즉, IL-15 수용체 효능제의 부재 하에서의 투여)를 포함하는 대상체의 치료에 비하여 향상된 치료에 대한 반응을 제공하는 것을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원들에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e) 하에, 2019년 4월 5일에 출원된 미국 가출원 제62/830,212호; 2019년 6월 14일에 출원된 미국 가출원 제62/861,858호; 2019년 9월 10일에 출원된 미국 가출원 제62/898,473호 및 2019년 12월 6일에 출원된 미국 가출원 제62/944,955호에 대해 우선권의 이익을 주장하며, 이들의 개시 내용은 각각 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 출원은 (특히) 면역요법 분야에 관한 것으로, 키메라 항원 수용체(CAR) 변형된 T 세포 및 인터류킨-15 수용체 효능제(agonist)를 개체에게 투여하는 단계에 의해, 암과 같은 질환을 갖는 개체를 치료하는 것을 포함한다.

배 경 기 술

[0005] 개선된 암 치료를 위한 새로운 요법은 지속적으로 개발되어 왔다. 암 치료의 가장 유망한 영역 중 하나는 면역-종양학(즉, 암 면역 요법)이다. 암 면역 요법은 암과 싸우기 위해 환자 자신의 면역계를 유도하는 면역 반응을 조절하도록 설계된 다양한 세트의 치료 전략을 지칭한다. 현재의 면역 요법적 접근법 중, 입양 세포 이식 요법(ACT로도 지칭됨)은 특정 유형의 암이 발병한 환자를 치료하는 데 있어서 가능성을 보여주었다. 입양 세포 요법은, 단순한 백신접종으로 달성될 수 있는 것보다 더 많은 수의 종양 반응성 이펙터 T 세포를 생성하기 위해, 종양 특이적 림프구의 분리 및 생체외 확장을 수반한다. 종양 특이적 T 세포는 암 환자에게 주입되어 환자의 면역계를 준비시켜 종양 세포를 사멸시킨다. 입양 세포 이식은 특히 전이성 흑색종에서 유효한 임상 결과를 보여주었다(Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, et al., *J Clin Oncol* 23(10): 2346-2357 (2005); Dudley, M. E., J. C. Yang, et al., *J Clin Oncol* 26(32): 5233-5239 (2008)). 입양 세포 이식은 입양 T 세포 요법에서 통상적인 것과 같이 자가 이식일 수 있거나, 동종이계 이식일 수 있다.

[0006] 입양 T 세포 요법의 한 가지 형태는 CAR T 세포 요법(키메라 항원 수용체 변형된 T 세포 요법)이다. CAR은 림프구 특이성 및 기능을 재프로그래밍할 수 있는 합성 수용체들의 부류이다(Sadelain, M., *et al., Nature*, 545, 25 May 2017, p. 423-431). CAR T 세포 요법은 종양 세포 표면 상에서 발현되는 표적 종양-관련 항원(TAA)에 대한 T 세포의 특이성을 재유도(redirect)하는 인공 수용체를 발현시키도록 형질도입된 생체외(*ex vivo*) 유전자 조작된 T 세포를 사용한다(June, C.H., et al., *Sci Transl Med* 2015; 7(280):280 ps7). 특이적 주요 조직적합성 복합체(MHC)라는 상황 하에서 동종 항원을 인식하는 T 세포 수용체 조작된 T 세포 및 천연-발생 T 세포와 달리, CAR T 세포에 의한 항원 인식은 MHC-비의존성이며, 그럼으로써 이러한 면역요법적 세포-기반 양식의 응용가능성을 확장시킨다. 제1 세대 CAR T 세포는 단일클론 항체의 단일쇄 가변 영역(scFv), T 세포 수용체 막관통 도메인, 및 CD3 제타(CD3ζ) 사슬의 세포내 신호전달 도메인을 포함하였다. 나중의 버전은 또한 하나 이상의 공동자극성 도메인, 및/또는 제어가능한 온-오프 스위치(on-off switch)를 이용하였다. CAR T 세포 요법은 개선된 특이성 및 안전성 프로파일을 갖는 유전자 조작된 T 세포를 제공하도록 시간이 지남에 따라 진보되어 왔다.

[0007] CAR T 세포 기반 요법은 미만성 대 B-세포 림프종을 치료하기 위한 것으로 미국에서 승인되어 있지만, 모든 환자가 CAR T 세포에 반응하는 것은 아니고, 반응의 지속성은 제한을 남기고 있다. CAR T 세포 요법에 대한 추가의 어려움은 이식된 세포의 불량한 생존이다. 재발성 또는 불응성 대 B-세포 림프종에서, 환자의 거의 60%는 재발하거나 진전에 실패하고, 실패 후의 예후는 암울하다(Nair, J., et al., *Best Practice & Research Clinical Haematology* 31 (2018) 293-298). 성공적인 CAR T 세포 요법 결과, 즉 6개월차에서 완전 관해율을 갖는 유리한 지속적인 반응은 CAR T 세포의 장기간 지속성에 적어도 부분적으로 의존한다. 림프종을 갖는 환자를 치료하는 데 있어서의 CAR T 세포 요법의 II상 시험에 대한 임상 결과가 초기에 치료에 반응하는 많은 환자에 대해서는 주목할 만한 효능을 갖는 것으로 보고되어 있지만, 반응의 지속성은 제한을 남기고 있다(Shah, N., *et al., Frontiers in Oncology*, 9 (March 2019) Art. 146). 추가적으로, CAR T 세포 요법에 뒤따라 보고된 급성 독성은 사이토카인 방출 증후군(CRS), 및 CAR-관련 뇌병증 증후군으로 지칭되는 신경독성을 포함한다(Neelapu, S.S., *et al., Nat Rev Clin Oncol* 2018; 15(10:47-62)). 덜 일반적으로 관찰되는 기타 다른 유해한 부작용은 혈구탐식성 림프구증가증(HLH)/대식세포-활성화 증후군(MAS), 아나필락시스, 및 종양 용해 증후군을 포함한다.

[0008] 지금까지 효과적인 CAR T 세포 기반 요법을 개발하는 데 실질적인 노력이 있어 왔을지라도, 현재 요법의 불리한

점 중 하나 이상에 대처하는 새롭고 더 효과적인 면역요법적 CAR T 세포 전략 및 관련 치료 계획(treatment regimen)의 제공에 대한 필요성이 남아 있다.

[0009] 따라서, 본 발명은, 예를 들어 (하기에 더 상세히 설명되는) 기타 다른 이점들 중에서도, 더 큰 지속성 및 개선된 효능을 갖는 종양-사멸 표현형을 향해 CAR T 세포 집단을 유도하는 새롭고 효율적인 CAR T 세포-기반 면역요법을 제공함으로써 이들 불리한 점 및 기타 다른 필요성에 대처하는 것을 모색한다.

발명의 내용

[0010] 제1 양태에서, 본 명세서에 더 상세히 기재될, 장기간 작용형(long-acting) IL-15 수용체 효능제의 투여와 병용하여, 암을 갖는 대상체에게 입양 세포를 이식하는 것을 포함하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 발명은 (예를 들어, CAR T 세포의 주입에 의한) 1회 이상의 사이클의 입양 세포 요법, 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여를 포함하며, 이들이 어떤 순서로든 순차적으로 투여되거나 실질적으로 동시에 투여되는 병용 치료 계획(combination treatment regimen)이 일부 대상체에서 암을 치료하는 데 특히 효과적일 수 있고/있거나 이식된 세포의 활성 및/또는 수를 증가, 향상 또는 연장시키거나, 어느 것이든 단독으로의 단일 면역요법적 접근에 비하여 향상되는, 바람직하게는 주목할 만하게 향상되는 정도까지, 암 세포에 대항하여 측정가능한 유익한 반응(예를 들어, 적용가능한 경우 안정화, 퇴행, 수축, 괴사 등)을 가져올 수 있다는 인식으로부터 적어도 부분적으로 기인한다.

[0011] 제2 양태에서, 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포(CAR T 세포)를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 대상체에게 투여하는 단계; 및 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 갖는 대상체의 치료를 위한 병용 면역요법이 본 명세서에 제공된다.

[0012] 제3 양태에서, 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한, 입양 세포 요법, 예컨대 CAR T 세포 요법의 치료적 유효성을 개선하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 암을 갖는 대상체에게 제공하는 단계; 및 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여는 입양 세포 요법에 대한 대상체의 반응을 개선하는 데 효과적이다.

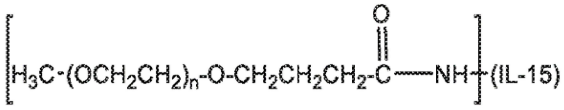
[0013] 하기의 구현예들은 전술된 각각의 양태에 동일하게 적용하는 것으로, 그리고 달리 언급되지 않는 한, 적용가능한 경우, 단일로 그리고 조합하여 둘 모두에 대해 고려되는 것을 의미한다.

[0014] 일부 구현예에서, 입양 세포 이식은 CD19-유도 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 하나 이상의 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 자연 살해(NK) 세포를 우선적으로 자극하고 증폭시키는 데 효과적이다. 또 다른 하나 이상의 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는, 예를 들어 억제 조절성 T 세포(T reg)를 실질적으로 유도하지 않고서, $CD8^+$ T 세포 생존 및 기억 형성을 지지한다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 IL-15 수용체 알파 특이성을 갖는다. 일부 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 전술한 특징들 중 하나 이상을 가지며, 즉, (i) NK 세포를 우선적으로 자극하고 증폭시키는 데 효과적이고, (ii) 예를 들어 억제 조절성 T 세포(T reg)를 실질적으로 유도하지 않고서, $CD8^+$ T 세포 생존 및 기억 형성을 지지하고, (iii) IL-15 수용체 알파 특이성을 갖는다.

[0016] 일부 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 하기 구조를 갖는다:

[0017] [화학식 I]

[0018] 

[0019] (상기 식에서, IL-15는 인터류킨-15 모이어티(moiety)이고, (n)은 약 150 내지 약 3,000의 정수이고, ~NH~는 IL-15 모이어티의 아미노 기를 나타냄).

[0020] 화학식 I의 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제와 관련된 하나 이상의 구현예에서, (n)은 약 795 내지 약 1068의 범위이다. 일부 추가의 구현예에서, (n)은 약 840 내지 약 1023의 범위이다. 하나 이상의 특정 구현예에서,

(n)은 평균적으로 약 907 또는 약 909의 값을 갖는다.

[0021] 명료함을 위하여, 용어 "투여하는"이 이 경우에 입양 세포 면역요법 조성물 또는 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 중 어느 하나의 전달을 지칭하기 위해 사용되는 투여 순서와 관련하여, 입양 세포와 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 동시에 또는 순차적으로 그리고 임의의 순서대로 투여될 수 있다. 더욱이, 병용물의 어느 성분의 치료이든 1회 사이클의 요법을 포함할 수 있거나 다회 사이클을 포함할 수 있다. 다시 말해, 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포, 예컨대 CD19-유도 CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물의 투여, 및 장기간 작용형 IL-15 효능제의 투여를 포함하는 요법의 초기 사이클 후에, 추가의 라운드의 요법은 입양 세포 이식, 예를 들어 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여와 병용된 CAR T 세포의 투여, 또는 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여를 동반하지 않는 입양 세포 요법, 예를 들어 CAR T 세포 요법, 또는 입양 세포 이식(예를 들어, CAR T 세포, 예컨대 CD19 CAR T 세포의 투여)을 동반하지 않는 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여를 포함할 수 있다.

[0022] 하나 이상의 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0023] 하나 이상의 비제한적인 구현예에서, 암은 액체 암, 예컨대 혈액암, 예를 들어 재발성 또는 불응성 악성종양이다.

[0024] 하나 이상의 관련된 비제한적인 구현예에서, 암은 림프종 또는 백혈병이다. 하나 이상의 관련된 구현예에서, 암은 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종으로부터 선택된다.

[0025] 일부 추가의 비제한적인 구현예에서, 암은 B-세포 악성종양이다. 일부 추가의 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다.

[0026] 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다.

[0027] 하나 이상의 대안적인 구현예에서, 암은 고형 암이다.

[0028] 본 명세서에 제공된 바와 같은 방법의 일부 추가의 구현예에서, 상기 방법은 입양 세포 면역요법 조성물 단독으로의 투여 또는 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 단독으로의 투여 중 어느 하나에 따라 투여가 수행될 때 관찰되는 치료에 대한 반응에 비해 향상된, 치료에 대한 유익한 반응을 가져온다.

[0029] 상기와 관련된 일부 구현예에서, 치료에 대한 유익한 반응은 적합한 동물 모델, 예컨대 생체내(*in vivo*) 이종 B 세포 림프종 모델에 기초한다.

[0030] 추가의 양태 및 구현예가 하기의 설명 및 청구범위에 기재되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] **도 1**은 E. 콜리(*E. coli*)로부터의 예시적인 재조합인간 IL-15의 아미노산 서열(서열 번호 1); 분자량이 12.9 kDa인, 115개의 아미노산을 함유하는 단일의 비-글리코실화된 폴리펩티드 사슬인, E. 콜리에서의 번역의 개시를 위하여 서열의 시작 지점에 메티오닌을 포함하는 예시적인 재조합 인간 IL-15(서열 번호 2); 및 IL-15의 예시적인 전구체 형태(서열 번호 3)를 제공한다.

도 2는 실시예에 기재된 바와 같이 건강한 공여자로부터 단리된 CD4 및 CD8 T 세포를 형질도입시키는 데 사용되는 적합한 CD19 CAR 렌티바이러스 작제물의 예시이다.

도 3a 및 도 3b는 유세포측정법에 의해 측정된 바와 같은 그리고 실시예 2에 추가로 기재된 바와 같은 인간 CD19 CAR T 세포에 의한 IL-15Rα의 발현을 예시한다. CD8 CAR T 세포에 의한 발현은 도 3a에 나타나 있으며(실선); CD4 CAR T 세포에 의한 IL-15Rα 발현은 도 3b에 나타나 있다(실선). 두 도면 모두는 또한 FMO 대조군(채워진 회색), 및 동종형(isotype) 대조군(파선)을 포함한다.

도 3c 및 도 3d는 유세포측정법에 의해 결정된 바와 같은, 그리고 실시예 2에 추가로 기재된 바와 같은, 20분 동안 상이한 농도의 MPBA-IL15(●) 또는 IL-15(■)에 의한 자극 후 CD8 CAR T 세포(도 3c) 또는 CD4 CAR T 세포(도 3d)에 대한 STAT5의 % 인산화 vs. 농도의 로그(ng/mL)를 나타낸 그래프이다.

도 3e 및 도 3f는 유세포측정법에 의해 결정된 바와 같은, 그리고 실시예 2에 추가로 기재된 바와 같은, CFSE로 표지되고 20분 동안 상이한 농도의 MPBA-IL15(●) 또는 IL-15(■)와 함께 인큐베이션된 CD8 CAR T 세포(도 3e) 및 CD4 CAR T 세포(도 3f)의 증식(% 분할률)을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 CAR T 세포 단독(■)으로, 그리고 상이한 투여량의 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15): 0.030 mg/kg(녹색 ◆), 0.10 mg/kg(자주색 ◆) 및 0.30 mg/kg(▼)과 병용하여 처리된 종양-보유 마우스에 대해 실시예 3에 기재된 바와 같이 생체내 이종 B 세포 림프종 모델에서 평가된 바와 같은 시간 경과(CAR T 세포 주입 후 일수)에 따른 평균 종양 방사휘도(radiance)(p/s/cm^2/sr)의 그래프이다. PBS 대조군은 원(●)으로 나타나 있다.

도 4b는 실시예 3에 기재된 바와 같이 전임상 뮤린 림프종 모델에서 CD19 CAR T 세포 병용 면역요법의 효능을 평가하기 위한 예시적인 치료 프로토콜(연구 A)을 나타낸다.

도 5a 및 도 5b는 CAR T 세포가 주입된(D0) 후, -1일차, 7일차 또는 14일차에서 출발하여, 그리고 이어서 매주마다 MPBA-IL15(0.3 mg/kg)이 투여된 림프종-세포 보유 마우스의 혈액 중의 CD8 CAR T 세포(도 5a) 또는 CD4 CAR T 세포(도 5b)의 수를 나타낸 그래프이다. 마우스를 매주 채혈하고, CD8 및 CD4 CAR T 세포를 유세포측정법에 의해 확인하였다. 플롯은 세포수/μl 혈액 vs. CAR T 세포 투여 후 일수를 제공한다. 연구군은 실시예 3에 기재된 바와 같이 MPBA-IL15만이 주입된 종양-보유 마우스(●), CAR T 세포만이 주입된 종양-보유 마우스(■), 및 -1일차(▲), 7일차(▼) 또는 14일차(◆)에서 출발하여 CAR T 세포 주입 후 최대 28일 동안 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포로 처리된 종양 보유 마우스를 포함하였다.

도 6은 실시예 3에 기재된 바와 같이 MPBA-IL15만(●), CAR T 세포만(■), 또는 -1일차(▲), 7일차(▼) 또는 14일차(◆)에서 출발하여, 그리고 이어서 매주마다 MPBA-IL15와 병용된 CAR T 세포의 주입 후 종양-보유 마우스에서의 생체내 이종 B 세포 림프종 모델에서 평가된 바와 같은 시간 경과(CAR T 세포 주입 후 일수)에 따른 평균 종양 방사휘도(p/s/cm2/sr)를 제공함으로써 종양 부하를 평가하는 그래프이다.

도 7a는 실시예 3에 기재된 바와 같이 생체내 이종 B 세포 림프종 모델에서 평가된 바와 같은, CAR T 세포만(청색선)으로, MPBA-IL15만(흑색선)으로, 또는 CAR T 세포에 의한 주입(0일차) 후 -1일차(자주색선), 7일차(적색선), 또는 14일차(녹색선)에서 출발하는 MPBA-IL15(0.3 mg/kg)와 병용된 CAR T 세포로 처리된 종양-보유 마우스의 % 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 7b는 실시예 3에 기재된 바와 같이 전임상 뮤린 림프종 모델에서 CD19 CAR T 세포 병용 면역요법의 효능을 평가하기 위한 예시적인 치료 프로토콜(연구 B)을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8c는 실시예 3에 기재된 바와 같이 D0에서 CAR T 세포가 주입된(CAR T 세포 단제요법), 또는 CAR T 세포의 주입에 더하여, D7에서 출발하여 MPBA-IL15의 매주 주사를 제공받은 Raji-림프종 세포-보유 NSG 마우스의 골수 유래의 CD8 CAR T 세포의 CAR T 세포의 총수, Ki67 발현, 및 PD1 및 TIM3 발현의 플롯을 각각 나타낸다. **도 8a**는 CAR T 세포만(●) 주입 후의 종양-보유 마우스의 골수 내의, 그리고 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포 요법(■)을 제공받은 종양 보유 마우스에서의 CD8 CAR T 세포의 총수를 나타낸 그래프이다. **도 8b**는 CAR T 세포 단제요법(●) 후의 종양-보유 마우스의 골수로부터의, 그리고 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포(■)를 제공받은 종양-보유 마우스로부터의 CD8 CAR T 세포에서의 Ki67 발현(% $KI67^+$)을 나타낸 그래프이다. **도 8c**는 CAR T 세포만(●)의 주입(단제요법) 후의 종양-보유 마우스의 골수로부터의, 그리고 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포 요법(■)을 제공받은 종양-보유 마우스로부터의 CD8 CAR T 세포에서의 PD1 및 TIM3 발현(% $PD1^+TIM3^+$)을 나타낸 그래프이다.

도 9a 내지 도 9c는 실시예 3에 기재된 바와 같이 D0에서 CAR T 세포가 주입된(CAR T 세포 단제요법), 또는 D7에서 출발하여 MPBA-IL15의 매주 주사를 추가로 제공받은 Raji-림프종 세포-보유 NSG 마우스의 골수 유래의 CD4 CAR T 세포의 CAR T 세포의 총수, Ki67 발현, 및 PD1 및 TM3 발현의 플롯을 각각 나타낸다. **도 9a**는 CAR T 세포만(●) 주입 후의 종양-보유 마우스의 종양-보유 마우스의 골수 내의, 그리고 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포 요법(■)을 제공받은 종양 보유 마우스에서의 CD4 CAR T 세포의 총수를 나타낸 그래프이다. **도 9b**는 CAR T 세포 단제요법(●) 후의 종양-보유 마우스의 골수로부터의, 그리고 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포 요법(■)을 제공받은 종양-보유 마우스로부터의 CD4 CAR T 세포에서의 Ki67 발현(% $KI67^+$)을 나타낸 그래프이다. **도 9c**는 CAR T 세포만(●)의 주입(단제요법) 후의 종양-보유 마우스의 골수로부터의, 그리고 MPBA-IL15와 병용하여 CAR T 세포 요법(■)을 제공받은 종양-보유 마우스로부터의 CD4 CAR T 세포에서의 PD1 및 TM3 발현(% $PD1^+TIM3^+$)을 나타낸 그래프이다.

도 10은 MPBA-IL-15 및 CAR T 세포로 이전에 처리되고, D38에서 Raji 종양 세포가 재시험투여된 후, 종양 부하

를 평가하기 위하여 매주 이미징을 수행한 무종양 마우스에 대한 대표적인 시점에 있어서의 생물발광 이미지를 제공한다. 이 도면은 마우스 림프종 모델에서 평가될 때, 예시적인 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제인 MPBA-IL-15, 및 CAR T 세포로 이전에 처리된 마우스가 Raji 종양 재시험투여를 거부할 수 있음을 예시한다.

도 11은 실시예 4에 기재된 바와 같이 전임상 뮤린 림프종 모델에서, 예시적인 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제인 MPBA-IL15와의 ROR1 CAR T 세포 병용 면역요법의 효능을 평가하기 위한 예시적인 치료 프로토콜을 나타낸다.

도 12a는 실시예 4에 기재된 뮤린 림프종 모델에서 다음과 같은 다양한 처리군 내의 마우스에 대한 종양 부피의 % 변화의 그래프이고: 대조 T 세포(직사각형), 대조 T 세포 및 MPBA-IL15(▲), ROR1 CAR T 세포(▼), 및 ROR1 CAR T 세포 및 MPBA-IL15(◆); **도 12b**는 ROR1 CAR T 세포 단제요법으로 처리된 개별 마우스에 대한 종양 부피의 % 변화 vs. 주사 후 주수의 그래프이고(군에 대해서는 18.5% 퇴행); **도 12c**는 ROR1 CAR T 세포 및 MPBA-IL-15 이중 병용 요법으로 처리된 개별 마우스에 대한 종양 부피의 % 변화 vs. 주사 후 주수의 그래프이다(군에 대해서는 44.4% 퇴행).

도 13a는 실시예 4에 기재된 처리군에 대하여, 비장 및 종양 각각에 대해 그 안에 살아있는 세포의 백분율로서 표현된 CD8 CAR T 세포 빈도의 플롯이고: 대조 T 세포(흑색), ROR1 CAR T 세포(적색), 및 ROR1 CAR T 세포 및 MPBA-IL15(청색); **도 13b**는 실시예 4에 기재된 다양한 처리군에 대하여, 비장 및 종양 각각에 대해 그 안에 살아있는 세포의 백분율로서 표현된 총 CD8 세포 빈도의 플롯이다.

도 14a, 도 14b, 도 14c, 및 도 14d는 예시적인 장기간 작용형 IL-15 효능제인 MPBA-IL-15가 폐에서의 ROR1 CAR T 세포 트래픽킹 및 지속성을 증강시킴을 예시하는, ROR1 폐 모델에서 다양한 처리군 내의 마우스로부터의 폐 조직의 이미지이다.

도 15a 및 도 15b는 실시예 5에 기재된 바와 같이 시험관내에서의 MPBA-IL15에 의한 처리 후의 CD8 CAR T 세포에서의 단백질 발현을 예시한다. **도 15a**는 방사선 조사된 K562-CD19^{+} 또는 K562-CD19^{-} 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 IFNɣ의 발현(단위: pg/ml)을 제공한다. **도 15b**는 방사선 조사된 K562-CD19^{+} 또는 K562-CD19^{-} 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 TNFα의 발현(단위: pg/ml)을 제공한다.

도 16a는 실시예 5에 기재된 바와 같이, 방사선 조사된 K562-CD19^{+} 또는 K562-CD19^{-} 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에 대한 (배수 증폭으로서의) CAR T-세포 증폭을 예시한다.

도 16b 및 도 16c는 실시예 5에 기재된 바와 같이, 방사선 조사된 K562-CD19^{+} 또는 K562-CD19^{-} 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 bcl-2(bcl-2 MFI로) 및 활성화 카스파제 3(% 카스파제 3^{+}로서)의 발현을 각각 제공한다.

도 17a 및 도 17b는 실시예 6에 상세히 기재된 바와 같이 CAR T 세포 단독으로 또는 MPBA-IL15와 병용하여 처리된 림프종-보유 마우스로부터의 CAR-T 세포에서의 bcl-2 발현을 예시한다. CD8 CAR T 세포(**도 17a**) 및 CD4 CAR T 세포(**도 17b**) 둘 모두에 대하여 주입 후 D8에서 결정된 바와 같은 CAR T 세포에서의 Bcl-2 발현이 히스토그램으로 나타나 있다(회색 = CAR T 세포만 처리된 마우스; 적색 및 청색 = CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스)).

도 18a 및 도 18b는 또한 실시예 6에 상세히 기재된 바와 같이 CAR T 세포 단독으로 또는 MPBA-IL15와 병용하여 처리된 림프종-보유 마우스로부터의 CAR-T 세포에서의 bcl-2 발현을 예시한다. CD8 CAR T 세포(**도 18a**) 및 CD4 CAR T 세포(**도 18b**) 둘 모두에 대하여 주입 후 D8에서 결정된 바와 같은 CAR T 세포에서의 Bcl-2 발현이 막대 그래프로 나타나 있다(흑색 = CAR T 세포만 투여된 마우스; 적색 = CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스)).

도 19a 내지 도 19d는 실시예 6에 나타낸 바와 같이 CAR T 세포 내의 기억 마커 CD45RA 및 CCR7의 발현을 예시한다. **도 19a**는 CAR T 세포만이 투여된 마우스의 CD8 CAR T 세포에서의 단백질 발현을 예시하고; **도 19b**는 CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스의 CD8 CAR T 세포에서의 단백질 발현을 예시하고; **도 19c**는 CAR T 세포만이 투여된 마우스의 CD4 CAR T 세포에서의 단백질 발현을 예시하고;

도 19d는 CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스의 CD4 CAR T 세포에서의 단백질 발현을 예시하며, 여기서는 $CD5RA^{-}CCR7^{-}$(주황색), $CD5RA^{+}CCR7^{-}$(녹색), 및 $CD5RA^{-}CCR7^{+}$(적색)에 대한 발현 데이터가 제공된다. 그래프는 평균 ± SEM을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥에서 달리 명확하게 지시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0033] 본 개시 내용의 특정의 특성을 기술하고 청구함에 있어서, 다음의 용어는 달리 지정되지 않는 한 이하에 기술된 정의에 따라 사용될 것이다.

[0034] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "PEG" 또는 "폴리에틸렌글리콜"은 임의의 수용성 폴리(에틸렌옥사이드)를 포함하는 것으로 의미된다. 달리 나타내지 않는 한, "PEG 중합체" 또는 폴리에틸렌글리콜은, 중합체가, 예를 들어 접합을 위해 별개의 말단 캡핑 모이어티 또는 작용기를 함유할 수도 있지만, 실질적으로 모든(바람직하게는 모든) 단량체 하위단위가 에틸렌옥사이드 하위단위인 것이다. 본 개시 내용에서 사용하기 위한 PEG 중합체는 2 가지의 구조, 즉 말단의 산소(들)가, 예를 들어 합성 전환 동안 대체되었는지 여부에 따라서 "$-(CH_2CH_2O)_n-$" 또는 "$-(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2-$" 중 하나를 포함할 것이다. PEG 중합체에 대해, 변수(n)는 통상적으로 약 3 내지 4000의 범위에 있고, 말단기 및 전반적인 PEG의 구조는 다를 수 있다. 그러나, 예시적인 또는 바람직한 PEG-포함 분자는 하나 이상의 특정 PEG 구조 및/또는 링커, 및/또는 분자량 범위를 포함할 수 있다.

[0035] 수용성 중합체, 예컨대 PEG와 관련하여 분자량은 수(공칭) 평균 분자량 또는 중량 평균 분자량 중 어느 하나로 표현될 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서에서 분자량에 대한 모든 언급은 중량 평균 분자량을 지칭한다. 수평균 분자량 및 중량 평균 분자량 둘 모두의 결정은 겔 투과 크로마토그래피 또는 기타 다른 액체 크로마토그래피 기법(예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피)을 사용하여 측정될 수 있다. 겔 투과 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피가 가장 일반적으로 사용된다. 분자량을 결정하기 위한 기타 다른 방법은, 수평균 분자량을 결정하기 위한 말단기 분석 또는 총괄 성질(colligative property)(예를 들어, 빙점 강하, 비점 상승, 또는 삼투압)의 측정, 또는 중량 평균 분자량을 결정하기 위한 광산란 기법, 초원심분리, MALDI TOF 또는 점도측정법의 사용을 포함한다. PEG 중합체는 통상적으로 다분산이다(즉, 중합체의 수평균 분자량 및 중량 평균 분자량이 동일하지 않다). 표적 분자, 예컨대 IL-15에 대한 공유 부착에 사용되고 본 명세서에 기재된 바와 같은 PEG 중합체는 일반적으로, 바람직하게는 약 1.2 미만, 더 바람직하게는 약 1.15 미만, 더욱 더 바람직하게는 약 1.10 미만, 예를 들어 약 1.05 미만, 또는 약 1.03 미만의 낮은 다분산도 값을 가진다.

[0036] "생리학적으로 분열가능한" 또는 "가수분해가능한" 또는 "분해가능한" 결합은 생리학적 조건에서, 그리고 임의의 적합한 가수분해 방법으로 물과 통상적으로 반응하는(즉, 가수분해됨) 상대적으로 불안정한 결합이다. 결합이 수 중에서 가수분해하는 경향은 소정의 분자 내에서 두 개의 원자를 연결하는 연결기의 일반적인 유형뿐만 아니라, 이들 원자에 부착된 치환기 및 분자의 전체 구조에 따라서도 달라질 수 있다. 적절한, 가수분해에 불안정적인 또는 약한 결합은 통상적으로 카복실산에스테르, 인산에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 티오에스테르 및 탄산염을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0037] "효소로 분해가능한 결합"은 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 결합을 의미한다.

[0038] "안정적인" 연결 또는 결합은 수 중에서 실질적으로 안정적이며, 즉 장기간의 시간에 걸쳐 임의의 주목할 만한 정도로 생리적 조건 하에서 가수분해를 겪지 않는 화학적 결합을 지칭한다. 가수분해에 안정적인 연결의 예는 일반적으로 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 사슬에서), 에테르, 아미드, 아민 등을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 일반적으로, 안정적인 연결은 생리적 조건 하에서 1일당 약 1 내지 2% 미만의 가수분해율을 나타내는 것이다. 대표적인 화학적 결합의 가수분해율은 대부분의 표준 화학 교재에서 찾을 수 있다.

[0039] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "IL-15 모이어티"는 인간 IL-15 활성을 갖는 펩티드 또는 단백질 모이어티를 지칭한다. 또한, 용어 "IL-15 모이어티"는 PEG 모이어티에 대한 접합 전의 IL-15 모이어티뿐만 아니라 반응성 PEG 모이어티, 예컨대 mPEG-석신이미딜 부타노에이트에 대한 접합(즉, 공유 부착)(예를 들어, 그와의 반응) 후의 IL-15 모이어티 이들 둘 모두를 포함한다. 하기에 추가로 상세히 설명되는 바와 같이, 당업자는 주어진 모이어티가 IL-15 활성을 갖는지의 여부를 결정할 수 있다. 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질이 예시적인 IL-15 모이어티이며, 그와 실질적으로 상동인 임의의 단백질 또는

폴리펩티드도 마찬가지이다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "IL-15 모이어티"는 의도적으로, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발에 의해 변형된, 또는 돌연변이를 통해 우연히 변형된 그러한 펩티드 및 단백질을 포함한다. 1 내지 6개의 추가의 글리코실화 부위를 갖는 IL-15 서열, 펩티드 또는 단백질의 카르복시 종결 말단에 적어도 하나의 추가의 아미노산을 갖는 서열(여기서, 추가의 아미노산(들)은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함함), 및 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 서열이 본 명세서에 포함된다. 이 용어는 천연적으로, 재조합적으로, 그리고 합성적으로 생성된 IL-15 모이어티를 포함하는 것을 의미한다. 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제에 대한 언급은 이의 약학적으로 허용가능한 염 형태를 포함하고자 한다.

[0040] 용어 "실질적으로 상동인" 또는 "실질적으로 동일한"은 특정 대상 서열, 예를 들어 돌연변이 서열이 하나 이상의 치환, 결실, 또는 부가에 의해 참조 서열과 달라짐을 의미하며, 이의 순효과(net effect)는 참조 서열과 대상 서열 사이에 불리한 기능적 차이점을 일으키지 않는다. 본 명세서의 목적상, 엄격한 조건 하에서의 95% 초과의 상동성(동일성), 동등한 생물학적 활성(하지만, 반드시 동등한 강도의 생물학적 활성은 아니어도 됨), 및 주어진 서열에 대한 동등한 발현 특성을 갖는 서열은 실질적으로 상동인(동일한) 것으로 여겨진다. 상동성을 결정하는 목적상, 성숙 서열의 절단은 무시되어야 한다. 본 발명에 사용하기 위한 예시적인 IL-15 폴리펩티드는 서열 번호 1과 실질적으로 상동인 서열을 포함한다. 서열 번호 2가 E. 콜리에서 번역의 개시에 필요한 서열의 시작 지점에 메티오닌을 갖는 것을 제외하고는, 서열 번호 2는 서열 번호 1과 거의 동일하다.

[0041] 용어 "단편"은 단백질 또는 폴리펩티드의 일부분 또는 단편의 아미노산 서열을 갖는 임의의 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들어 IL-15 모이어티, 및 단백질 또는 폴리펩티드의 생물학적 활성을 갖거나, 실질적으로 생물학적 활성을 갖는 임의의 단백질 또는 폴리펩티드, 예를 들어 IL-15를 의미한다. 단편은 단백질 분해적 분해에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩티드뿐만 아니라 당업계에서의 일상적인 방법에 의해 화학적 합성에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0042] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "암 치료"는 절대적인 용어로 의도되지 않으며, 예를 들어 종양의 크기 또는 암 세포의 수를 감소시키는 것, 암이 완화되는 것, 또는 암 세포의 크기 또는 수의 성장을 방지하는 것 등을 포함할 수 있다. 일부 상황에서, 본 개시 내용에 따른 치료는 개선된 예후로 이어진다.

[0043] 본 명세서에서 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법에서 사용되는 바와 같이, 어구 "치료를 필요로 하는 대상체"는 암으로 진단된 개체 또는 대상체를 지칭한다.

[0044] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "향상"은 예를 들어, 향상된 반응과 관련하여, 주어진 기준선 또는 참조 요법과 비교하여, 예를 들어 본 명세서에 개시된 바와 같은 치료에 반응하는 대상체 또는 종양 세포의 개선된 능력을 지칭한다. 예를 들어, 향상된 반응은, 치료에 대한 반응성의 임의의 하나 이상의 지시자를 기준으로, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반응성에서의 증가를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이 "향상"은 또한 예를 들어, 그러한 비교에 대한 주어진 기준과 비교하여, 치료에 유리하게 반응하는 대상체의 수를 향상시키는 것을 지칭할 수 있다.

[0045] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "불응성"은 치료에 반응하지 않는 질병, 예컨대 암을 지칭한다. 불응성 암은 치료 전 또는 치료 시작 시점에서 치료에 대해 저항성일 수 있거나, 또는 불응성 암은 치료 동안 저항성이 될 수 있다. 불응성 암은 또한 저항성 암으로 불린다.

[0046] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "재발성" 또는 "재발"은 개선 또는 반응성의 기간 후에, 예를 들어 요법, 예를 들어 암 요법의 이전 치료 후에 질병(예를 들어, 암)의 재출현 또는 질병, 예컨대 암의 징후 및 증상을 지칭한다.

[0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "CD19"는 분화 클러스터 19 단백질을 지칭하는데, 이는 백혈병 전구 세포 상에서 검출 가능한 항원 결정기이다. 인간 및 뮤린 아미노산 및 핵산 서열은 공개 데이터베이스, 예컨대 GenBank, UniProt 및 Swiss-Prot에서 찾아볼 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "CD19"는 돌연변이, 예를 들어, 전장 야생형 CD19의 점 돌연변이, 단편, 삽입, 결실, 및 스플라이스 변이체를 포함하는 단백질을 포함한다. CD19는 예를 들어, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 림프구 백혈병 및 비호지킨 림프종을 포함하는 대부분의 B 계통 암 상에서 발현된다.

[0048] 어구 "치료적으로 유효한", "치료적 유효량", "유효량" 또는 "유효한 양으로"는 원하는 생리학적 반응을 촉진하기에 충분한 양 또는 투여량, 예컨대 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여의 경우에, 예를 들어 CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물의 투여에 대해 향상된 반응을 촉진하기에 충분한 양을 지칭한다. 정

확한 양은, 예를 들어 치료 중인 특정 질환, 환자 집단, 개별 환자 고려사항, 투여될 치료용 조성물 및 특정 병용물의 성분 및 물리적 특성, 투여 중인 특정 입양 세포 이식 요법(예를 들어, CAR T 세포 조성물에 포함되는 특정 조성의 세포들, 및/또는 CAR T 세포에 의해 발현되는 키메라 항원 수용체(들)) 등과 같은 다수의 인자에 좌우될 것이며, 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0049] "실질적으로" 또는 "본질적으로"는 거의 전체적으로 또는 완전히, 예를 들어 주어진 양의 95% 이상을 의미한다.

[0050] 유사하게, 본 명세서에 사용되는 바와 같이 "약" 또는 "대략"은 주어진 양의 + 또는 - 5%를 의미한다.

[0051] "선택적인" 또는 "선택적으로"는 후속으로 설명되는 상황이 일어날 수 있지만 반드시 일어날 필요는 없음을 의미하며, 따라서 그러한 설명은 상기 상황이 일어나는 경우 및 그것이 일어나지 않은 경우를 포함한다.

[0052] "약학적으로 허용가능한 부형제" 또는 "약학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에게 유의적으로 독성학적 부작용을 전혀 야기하지 않고 본원에 기술된 조성물에 포함될 수 있는 성분을 지칭한다.

[0053] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "환자" 또는 "대상체"란, 본원에 제공된 바와 같은 화합물, 조성물 또는 이것들의 조합의 투여에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 질환, 예컨대 암을 앓고 있거나 그러한 질환에 걸리기 쉬운, 살아있는 유기체를 지칭하며, 인간과 동물을 둘 다 포함한다. 대상체로서는 포유동물(예컨대, 뮤린, 원숭이, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 인간(소아 및 성인 대상체 포함)이다.

[0054] 개요

[0055] CAR T 세포에 의한 입양 세포 요법 후에, 예를 들어 혈액학적 악성종양에서 효과적인 항-종양 반응을 유도하기 위한 유망한 요법이지만, 치료에 대한 초기의 유리한 반응 후에 환자는 빈번하게 재발한다. 예를 들어 지속성을 개선함으로써, 반응 지속성을 개선함으로써, 저항성을 극복하거나 대처함으로써, 안전성을 개선함으로써, 그리고/또는 환자 결과(효능)를 개선함으로써, 현재의 CAR T 세포 전략과 관련된 결점들 중 적어도 일부에 대처하기 위한 노력의 일환으로, 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 T 세포, 예컨대 CD19-유도 CAR T 세포, 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 특징을 갖는 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 암을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본 명세서에 제공되어 있다. 현재의 CAR T 세포 면역요법과 관련된 불리한 점을 고려해 볼 때, 치료에 대한 지속적이고 효과적인 반응을 제공하기 위해 추가의 향상이 필요하다. 따라서, 본 발명은 본 개시내용 및 지지 실시예로부터 명백해질 바와 같이, 예시적인 생체내 모델에서 예시된 바와 같이, CAR T 세포 요법 및 장기간 작용형 IL-15 효능제, 더 구체적으로는 바람직하게는 IL-15 수용체 α에 대한 수용체 결합을 유지하는 것의 투여를 포함하는 특히 유익한 치료용 면역-항암(immuno-oncology) 병용물의 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0056] 입양 키메라 항원 수용체 세포 이식 요법 및 조성물

[0057] 본 명세서에 제공되는 치료 방법은 인공 표적 종양-관련 항원(TAA) 결합 도메인(즉, 암 특이적-면역 반응을 자극시키기 위함)을 발현하도록 형질도입된 생체외 증폭된, 유전자적으로 조작된 T 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법은 특히 임상적 응용 및 연구를 위한 응용에 사용된다. 이론에 의해 구속되지 않지만, 입양 세포 이식, 예를 들어 CAR T 세포 이식, 및 본 명세서에 제공된 바와 같은 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 면역 활성화의 상보적 메커니즘으로 인해, 원하는 T 세포 반응의 자극하기 위해 IL-15 경로를 통해(즉, 입양 세포 이식과 함께, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여를 통해) 향상된 항종양 결과를 달성할 수 있는 것으로 생각된다.

[0058] 임의의 적합한 키메라 항원 수용체 T 세포(CAR T 세포) 요법이 본 명세서에 제공되는 방법에 사용될 수 있으며, 본 발명은 이 점과 관련하여 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Rosenberg, S., *et al.,* Adoptive Cell Transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2008 Apr; 8(4): 299-308] 및 문헌[Sadelain, M., *et al,* Current Opinion in Immunology, Vol 21 (2), 215-223 (2009)]을 참조하며; 또한 문헌[Kalos, M., *et al.*, *Sci Transl Med* 2011; 3: 95ra73]; 및 문헌[Grupp SA, *et al, N Engl J Med* 2013; 368:1509-1518]을 참조한다. 당업계에 알려진 바와 같은 임의의 적합한 CAR T 세포가 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법 및 요법에 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 CAR T 세포 및 요법의 비제한적인 예에는, 예를 들어 미국 특허 공개 번호 2017/0209492 및 2019/091308, 그리고 미국 특허 번호 8,911,993; 8,975,071; 9,328,156; 9,987,308 및 10,253,086에 기재된 것들이 포함된다.

[0059] 하나 이상의 구현예에서, CAR T 세포는 종양 항원에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함한다. 또 다른 일부 추가

의 구현예에서, 종양 항원은 CD19, CD20, CD22, 및 ROR1, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, CAR T 세포는 CD19에 결합하는 항원 결합 도메인을 포함하는 CD19-표적화된 T 세포이다. 예를 들어, 문헌[Turtle, C.J., et al., *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 12 May 2016 (online)]을 참조한다. 선행하는 문단에서 제공된 예시적인 간행물에 더하여, 추가의 예시적인 CD19 CAR T 세포, 예를 들어 정의된 $CD4^+$:$CD8^+$ 조성물의 CD19 CAR T 세포가, 예를 들어 문헌[Turtle, C.J., *J. Clin Invest.* 2016; 126(6): 2133-2138]에 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 방법 및 요법에 사용하기에 적합한 추가의 CAR T 세포는, 예를 들어 CD19-유도 티사겐레클류셀(KYMRIAH®) 및 CD19-유도 악시캅타겐 실로류셀(YESCARTA®)을 포함하며, 이들 둘 모두는 B 세포 악성종양의 치료에 있어서의 사용에 대해 미국 FDA에 의해 승인되어 있다. 또 다른 일부 다른 구현예에서, CAR T 세포는, 예를 들어 우세한 B-림프계 및 상피 암에서 발현되며, 마찬가지로 비소세포 폐암 및 삼중 음성 유방암의 하위세트에서 발현되지만, 정상 B 세포에서는 발현되지 않는 종양 관련 분자인 수용체 티로신 키나제-유사 고아 수용체 1(ROR1)을 발현한다. 본 명세서에 기재된 방법 및 요법에 유용한 ROR1-특이적 CAR T 세포는, 예를 들어 문헌[Hudecek, M., *Clinical Cancer Research*, June 2013, 19(12), 3153-3164]; 문헌[Hudecek, M., et al., *Blood* 2010, 116:4532-4541]; 및 문헌[Sprecht, J.M., et al., *Cancer Research*, 78 (13 Supplement):CT131, July 2018]에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 세포 작제물은 ROR1의 세포외 도메인의 Ig/Fz 부분을 표적화하고, 4-1BB/CD3ζ 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, ROR1 CAR T 제조 공정은 자가 말초 혈액 림프구를 이용하는데, 이것을 CD4 및 CD8 하위세트로 분리하고, 이들을 독립적으로 항-CD3/항-CD28 비드 및 IL-2와 배양하고, 이어서 ROR1 CAR을 인코딩하는 렌티바이러스 벡터에 의해 형질도입시킨다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, CAR T 세포 생성물은 1:1 비의 $CD4^+$ CAR T 세포와 $CD8^+$ CAR T 세포로 제형화된다.

[0060] CAR T 세포 요법은 일반적으로 CAR T 세포를 투여하여 암, 특히 종양 세포가 대상 종양 항원을 발현하는 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR T 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 또는 당업계에 알려진 바와 같은 방법에 의해 제조된다. 예를 들어, 단리 후에, 숙주 T 세포는 표적 종양-관련 항원 인식 도메인을 발현하도록 형질도입되고, 증폭되고, 대상체 내로 재주입된다. 예를 들어, 림프구제거 골수비소멸성(nonmyeloablative) 화학요법(NMC)을 이용하여 내인성 조절 T 세포를 억제하고, 주입된 CAR T 세포에 대해 최적화된 환경을 제공하기 위하여, 주입 전에, 환자 예비 컨디셔닝이 또한 실시될 수 있으며; 대안적으로, 시클로포스파미드 또는 임의의 기타 적합한 컨디셔닝제가 사용될 수 있다. 그러한 예비 컨디셔닝은 항상성 시토카인에 대해 이식된 세포와 경쟁하는 Treg(조절 T 세포) 및 림프구의 수를 제거하거나 실질적으로 감소시키기는 데 유용하다. 숙주 세포는 림프절, 예를 들어 서혜부, 장간막, 표재성 원위 보조(superficial distal auxiliary) 등; 골수; 비장; 또는 말초혈액과 같은 다양한 공급원뿐만 아니라, 종양, 예를 들어 종양 침윤성 림프구로부터 분리될 수 있다. 세포는 동종이계 또는 바람직하게는 자가일 수 있다. 생체외 자극을 위해, 숙주 세포는 무균적으로 제거되고, 본 기술분야에 알려진 바와 같은, 임의의 적합한 배지에 현탁된다. 형질도입 후, 세포는 임의의 다양한 프로토콜을 이용하여, 특히 항-CD3, B7, 항-CD28 등의 조합을 이용하여 자극 및 확장된다. 숙주 T 세포의 생체외 확장에 적합한 프로토콜은 문헌["*Focus on Adoptive T Cell Transfer Trials in Melanoma*" *Clinical and Developmental Immunology*, Vol 2010, Art. ID 260267]에 기재되어 있다.

[0061] 예를 들어, CAR T 세포의 입양 세포 이식은 (i) 포유류 대상체, 예컨대 인간으로부터 자가 림프구를 획득하고, (ii) 표적 종양-관련 항원(TAA) 인식 또는 결합 도메인을 발현하도록 자가 림프구를 유전자 조작하고, (iii) 유전자 조작된 림프구를 배양하여 증폭된 CAR T 세포를 생성하고, (iv) 증폭된 CAR T 세포를 대상체(즉, 환자)에게 투여함으로써 수행될 수 있다. 자가 입양 세포 요법은 또한 (i) TAA 결합 도메인을 발현하도록 자가 림프구를 유전자 조작하고; (ii) 유전자 조작된 림프구를 배양하여 증폭된 CAR T 세포를 생성하고; (iii) 비골수제거 림프구고갈 화학요법(nonmyeloablative lymphodepleting chemotherapy, NMC)을 대상체에게 투여하고; (iv) NMC의 투여 후에, 증폭된 CAR T 세포를 투여함으로써 수행될 수 있다. 자가 세포는 혈액으로부터 유래되거나 자가 항원 제시 세포 및 종양-유래 펩티드를 사용하여 클로닝될 수 있다.

[0062] CAR T 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 또는 당업계에 알려진 바와 같은 임의의 수단에 의해 제조될 수 있다. CAR 및/또는 CAR T 세포를 생성하기 위한 방법이 본 명세서에 기재되어 있으며, 또한 미국 특허 번호 6,319,494; 6,410,319; 7,446,179; 7,446,191; 7,514,537; 7,741,465; 및 9,987,308에; 미국 공개 출원 번호 2016/0185861, 2017/0137783 및 2019/0091308에, 그리고 PCT 공개 출원 번호 WO 2010/065818, WO 2010/025177, 및 WO 2007/059298에 기재되어 있으며, 이들 방법은 본 명세서에 참고로 포함된다. CAR T 세포를 생성하기 위한 추가의 방법이 문헌[Berger C. et al., *J. Clinical Investigation,* 118:1 294-308 (2008)] 및 문헌[Wang et

al. (Molecular Therapy - Oncolytics (2016) 3, 16015)]에 기재되어 있으며, 이들은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0063] CAR T 세포는 CAR의 결합 특이성에 기초하여 항원 인식을 재유도할 수 있다. CAR은, CAR T 세포가 종양 세포 표면 상의 그의 동종 항원에 결합될 때, 종양 세포에 영향을 주어서 환자 내의 종양 부하가 감소, 저하 또는 제거되도록 임의의 TAA에 대한 표적화를 제공할 수 있다. T 세포는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 바와 같은 임의의 방법을 사용하여 하나 이상의 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작될 수 있다. 일 구현예에서, 단리된 T 세포는 CAR 작제물을 인코딩하는 발현 벡터로 T 세포를 형질감염시킴으로써 CAR 작제물을 발현하도록 유전자 조작된다. T 세포 집단을 형질도입시켜 선택된 CAR 작제물을 발현하기 위한 방법은 당업계에 알려져 있으며, 문헌[Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 4th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012)]에 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0064] 일반적으로, CAR은 종양 세포 상의 TAA에 결합하는 세포외 인식 또는 결합 영역/도메인 또는 세포외 도메인(exodomain)(예를 들어, 항체의 단일쇄 단편 가변 영역(scFV)), 막관통 도메인, 및 선택적으로, 종양 세포를 공격하도록 T 세포 활성화에 대한 신호를 제공할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다.

[0065] 일반적으로, 본 명세서에 기재된 바와 같은 CAR은 암 또는 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현되는 분자(예를 들어, 단백질)에 대해 유도된다. 다수의 TAA가 당업계에 알려져 있으며, 비제한적인 예에는 인단백질, 막관통 단백질, 당단백질, 당지질, 및 성장 인자가 포함된다. 주어진 화합물이 본 명세서에 기재된 바와 같은 항원들 또는 표적들 중 임의의 것에 대한 CAR 인식 영역으로서의 사용에 적합한지의 여부를 결정하기 위한 검정은 당업자에 의해 일상적인 실험을 통해 결정될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 또는 당업계에 알려진 바와 같은 임의의 CAR이 본 명세서에 사용된 바와 같은 방법 및 세포 및 입양 세포 면역요법 조성물에 사용될 수 있다. 예시적인 CAR은 미국 특허 번호 7,446,190; 7,741,465; 9,499,629; 9,987,308; 및 10,253,086에 기재된 것들을 포함한다.

[0066] 일부 구현예에서, CAR 인식 도메인은 B-세포의 세포 표면 상에서 발현되는 항원을 표적화한다. 일부 구현예에서, CAR은 항-CD19 인식 또는 결합 도메인을 포함한다. 예시적인 CD19-CAR 작제물은 (i) CD19-유도 키메라 항원 수용체(CTL019) 렌티바이러스 벡터(CAR 항원-인식 모이어티의 유래가 되는 ScFv: FMC63; 공동자극성 도메인: 4-1BB), 문헌[Maude, SL., *et al. N Engl J Med* 2014; 371 (16): 1507-1517]; (ii) 항-CD-19 단일 가변 단편 + TCR 제타 및 CD28 신호전달 도메인을 도입시킨 CD19-유도 키메라 항원 수용체 γ-레트로바이러스 벡터(CAR 항원-인식 모이어티의 유래가 되는 ScFv: FMC63; 공동자극성 도메인: CD28), 문헌[Lee, DW *et al.*, *Lancet* 2015; 385 (9967)517-528]; 뮤린 단계 세포 바이러스-기반 스플라이스-gag 벡터; (iii) 문헌[Kochenderfer JN, *et al.*, *J Immunother* 2009; 32(7):689-702]에 기재된 바와 같은 항-CD19 CAR을 인코딩하는 MSGV-FMC63-28Z; (iv) CD-19 특이적 CD28/CD3ζ 이중-신호전달 CAR, 19-28z(문헌[Park, JH, *et al., Blood*, 30 June 2016, 127 (26), p. 3312-3320, Table 1]에 기재된 것들에 더하여, 문헌[Brentjens, RJ., *et al., Sci Trans Med*, 20 Mar 2013:5 (177):177])를 포함한다.

[0067] 인간 CD19 항원은 면역글로불린 수퍼패밀리에 속하는 95 kDa 당단백질이다. CD19는 정상 B 세포 및 신생물성 B 세포에 대한 바이오마커로서뿐만 아니라 여포성 수지상 세포에 대한 바이오마커로서도 사용된다. CD19는 전-B 세포 발달의 초기 단계로부터 최종 분화까지 발현되어, B 림프구 발달 및 기능을 조절한다. CD19의 발현은 B 세포 림프종, 예컨대 비호지킨 림프종을 포함한 대부분의 B 세포 종양 상에서 고도로 보존적이다. CD19는 또한, B 세포 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 포함한 대부분의 유형의 백혈병, 및 발덴스트룀 거대글로불린혈증(WM)에서 발현된다. B 세포 악성종양(림프종 및 백혈병)의 대부분은 정상 수준 내지 고수준으로 CD19를 발현한다. 일부 구현예에서, CAR은 항-CD19 결합 부분을 포함한다. 또 다른 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 및 CD19-유도 CAR T 세포의 병용물이, 제한 없이 비호지킨 림프종, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 및 발덴스트룀 거대글로불린혈증(WM)을 포함한 B 세포 악성종양의 치료에 사용된다. 일부 바람직한 구현예에서, CD19 CAR T 세포 요법은 CD-19-유도 유전자 변형된 자가 T 세포를 포함한다.

[0068] CD19 CAR T 세포 요법의 반응의 지속성에 대한 장벽이 종양 세포 표면으로부터의 표적 항원 CD19의 하향조절인 것으로 확인되어 있다(Shah, et al., Frontiers in Oncology (2019) Vol. 9, Article 146). 일부 구현예에서, CAR T 세포 요법은 CD19 및 하나 이상의 추가의 TAA에 대한 표적화를 포함하는 다중-표적화된 CAR T 세포 요법이다. 일부 구현예에서, CAR T 세포 요법은 CD19 인식 또는 결합 도메인뿐만 아니라 하나 이상의 추가의 TAA를 발현하는 세포 집단의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR T 세포 요법은 CD20, CD22, CD38,

CD123, CD70, 또는 CD30으로부터 선택되는 TAA에 대한 표적화를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR T 세포 요법은 2개 이상의 세포 집단을 포함하며, 각각의 집단은 상이한 CAR을 발현한다. 이들 세포 집단은 혼합물로서 투여될 수 있거나 순차적으로 공동투여될 수 있다. 바람직하게는, 다중-표적화된 CAR T 세포 요법은 항-CD19 CAR T 세포, 및 CD20, CD22, CD38, CD123, CD70, 또는 CD30으로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 TAA를 향해 유도되는 CAR T 세포의 투여를 포함한다. 일부 다른 구현예에서, CAR T 세포 요법은 ROR1인 TAA에 대한 표적화를 포함한다.

[0069] 일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의 세포내 공동자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 예시적인 공동자극성 도메인은 CD3ζ를 갖는 CD28, CD123 또는 4-1BB를 포함하지만 이로 한정되지 않는다.

[0070] T 세포와 같은 림프구의 확장은 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 임의의 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 공급자 림프구 및 인터류킨-2(IL-2), IL-7, IL-15, IL-21, 또는 이들의 조합의 존재 하에서 비특이적 T 세포 수용체 자극을 이용하여 확장될 수 있다. 비특이적 T 세포 수용체 자극은, 예를 들어, 자극량만큼의 마우스 단일클론성 항-CD3 항체(예를 들어, 미국 워싱턴주 시애틀 소재의 LS Bio에서 입수할 수 있음)를 포함할 수 있다. 대안적으로, T 세포는, 인터류킨-2 또는 인터류킨-15, 바람직하게는 인터류킨-2와 같은 T 세포 성장 인자 존재 하에서, 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2) 결합 펩티드와 같은 벡터로부터 선택적으로 발현될 수 있는, 하나 이상의 항원(이의 항원 부분, 예컨대 에피토프를 포함함)을 이용하여 시험관내 말초혈액 단핵세포(PBMC)의 자극에 의해 급속히 확장될 수 있다. 시험관내 유도된 T 세포는 HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상에서 펄싱된(pulsed) 암의 동일한 항원(들)을 이용한 재자극에 의해 급속히 확장된다. 대안적으로, T 세포는 방사선 조사된 자가 림프구 또는 방사선 조사된 HLA-$A2^+$ 동종이계 림프구 및 인터류킨-2으로 재자극될 수 있다.

[0071] 확장된 T 세포의 특이적 종양 반응성은, 본 기술 분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어 종양 세포와 함께 공동배양 후 시토카인 방출(예를 들어, 인터페론-감마)을 측정함으로써 시험될 수 있다. 예를 들어, 입양 세포 이식은 세포의 급속한 확장 전에, 배양된 T 세포를 $CD8^+$ T 세포에 대해 풍부화하는 단계를 포함할 수 있다. 인터류킨-2를 함유하는 배지에서 T 세포의 배양 후, T 세포는 $CD4^+$ 세포가 고갈되고, 예를 들어 CD8 마이크로비드 분리를 이용하여 $CD8^+$ 세포에 대해 풍부해진다. 일부 구현예에서, 자가 T 세포의 성장 및 활성화를 촉진하는 T 세포 성장 인자는 자가 T 세포와 함께 또는 자가 T 세포에 후속으로 대상체에게 투여된다. T 세포 성장 인자는 자가 T 세포의 성장 및 활성화를 촉진하는 임의의 적합한 성장 인자일 수 있다. T 세포 성장 인자의 적합한 예는 인터류킨(IL)-2, IL-7, IL-15, IL-12 및 IL-21을 포함하며, 이들은 단독으로, 또는 IL-2와 IL-7, IL-2와 IL-15, IL-7과 IL-15, IL-2, IL-7과 IL-15, IL-12와 IL-7, IL-12와 IL-15, 또는 IL-12와 IL2와 같은 다양한 조합으로 사용될 수 있다.

[0072] CAR T 세포에서의 키메라 항원 수용체의 발현은 형광-활성화된 세포 분류 분석에 의해 그리고 HLA-$A2^-$ 888 흑색종 계열이 아닌, HLA-$A2^+$ 526 흑색종 계열의 시험관내 인식에 의해 비형질도입된(UnTd) 세포 및 형질도입된(Td) 세포에서 비교될 수 있다(Rosenberg, S., *et al., Nat Rev. Cancer*, 2008 Apr; 84(4):299-308). 범용 유형의 T 세포 또한 문헌[*Qasim, W., et al., Sci. Transl. Med.* 9, eaaj2013 (2017)]에 기술된 것과 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 범용 CAR19 T 세포는 렌티바이러스성 형질도입과 조합되어 TALEN-매개 세포 엔지니어링을 이용하여 생성되고, 입양 세포 요법에 사용될 수 있다. 세포는 비인간 백혈구 항원-매치된 공여자 세포의 렌티바이러스성 형질도입, 및 T 세포 수용체 α 사슬 및 CD52 유전자좌의 동시 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)-매개된 유전자 편집에 의해 생성된다.

[0073] CAR T 세포를 투여하기 전에, 환자는 요법의 효능을 개선하기 위하여 화학요법(예를 들어, 사이클로포스파미드 및 플루다라빈; 이는, 예를 들어 미국 특허 번호 9,855,298에 기재된 바와 같음)에 의해 프리컨디셔닝될 수 있다. 이론에 의해 제한되지 않고서, 화학요법에 의한 프리컨디셔닝은 정상 림프구를 고갈시킴으로써 CAR T 세포의 증식에 대한 여지를 생성할 수 있고/있거나, 사이토카인 싱크를 제거하여 CAR T 세포 증식을 촉진시키는 항상성 사이토카인의 이용가능성을 증가시킬 수 있고/있거나, 면역억제 세포, 예컨대 조절성 T 세포(Treg) 및 골수계-유래 억제 세포의 수를 감소시킬 수 있다(Nair et al.). 임의의 적합한 화학요법 방법이 당업계에 알려진 바와 같이 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0074] 이어서 확장된 세포는 주입, 예를 들어 정맥내 또는 동맥내 주입 또는 기타 적합한 형태의 전달에 의해 숙주에게 투여되며, 이는 더 짧거나 긴 기간이 사용될 수도 있지만 통상적으로 약 30분 내지 약 60분 동안 지속된다. 기타 투여 경로는 복강내, 척추강내 및 림프관내 경로를 포함한다. 확장된 세포는 임의의 다양한 약학적으로 허

용가능한 첨가제, 결합제, 충전제, 담체, 보존제, 안정화제, 유화제, 버퍼 등을 선택적으로 포함할 수 있는 적합한 배지에 제공된다. 희석제 및 부형제는 물, 식염수, 및 글루코스를 포함한다. 대표적인 배지는, 예를 들어 공칭 pH 범위가 약 5.5 내지 8.0인 다중 전해질 주사, 1형(Multiple Electrolytes Injection, Type 1), USP; 인간 혈청 또는 우태아 혈청을 함유하는 조직 배양 배지; 또는 제노프리(xeno-free) 및 무혈청 배지, 예를 들어 PRIME-XV T 세포 확장 XSFM(Irvine Scientific)를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 구매가능한 배지는 예를 들어, RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), AIM V 세포 배양 배지(Thermo Fisher Scientific, Waltham MA), 및 X-VIVO 15(Lonza, Basel, Switzerland)를 포함한다.

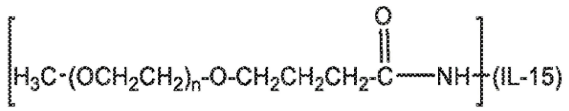
[0075] IL-15 수용체 효능제

[0076] 본 명세서에 기재된 방법은 하나 이상의 구현예에서 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여를 포함한다. 대상체에게 투여 후, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제가 비변형된 형태의 동일한 인터류킨-15 수용체 효능제 모이어티의 투여에 대한 경우보다 더 긴 시간 동안 생체내에서 IL-15 효능작용을 나타내는 한, 화합물은 본 발명에 따른 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제인 것으로 간주된다. 화합물을 방사성 표지화하고, 화합물을 생체내에 투여하고, 그의 제거율(clearance)을 결정하는 것을 수반하는 것들과 같은 통상적인 접근법이 화합물이 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제인지의(즉, 동일한 생체내 시스템에서 투여되는 비변형된 IL-15의 제거율보다 더 긴 제거율을 갖는지의) 여부를 평가하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, IL-15 수용체 효능제의 장기간 작용형 성질은 유세포측정법을 사용하여 마우스에서의 효능제의 투여 후 다양한 시점에서 림프구에서 STAT5 인산화를 측정하여 결정될 수 있다. 참조로서, 신호는 IL-15에 대해서는 약 24시간 전에 상실되지만, 본 명세서에 기재된 바와 같은 장기간 작용형 IL-15 효능제의 경우에는 더 긴 기간 동안 지속된다.

[0077] 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 약학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있으며, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제에 대한 언급은 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하고자 한다. 통상적으로 이러한 염은 약학적으로 허용가능한 산 또는 산 등가물과의 반응에 의해 형성된다. 이와 관련하여 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 일반적으로 비교적 무독성인, 무기 및 유기 산 부가 염을 지칭할 것이다. 이러한 염은 비히클 투여 또는 투여 형태 제조 절차 중 현장에서 제조될 수 있거나, 또는 본원에 기술된 바와 같은 장기간 작용형 인터류킨-15 수용체 효능제와 적합한 유기 또는 무기 산을 별도로 반응시켜, 이에 따라 형성된 염을 분리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염들은 브롬화수소산염, 염화수소산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 질산염, 아세트산염, 발레르산염, 올레산염, 팔미트산염, 스테아르산염, 라우르산염, 벤조산염, 젖산염, 인산염, 토실산염, 시트르산염, 말레산염, 푸마르산염, 숙신산염, 주석산염, 나프틸산염, 옥실산염, 메실산염, 글루코헵토산염, 락토비오산염 및 라우릴설폰산염 등을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Berge et al. (1977) *"Pharmaceutical Salts"*, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19] 참조). 그러므로 기술된 바와 같은 염은 무기산, 예컨대 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 설팜산, 인산 및 질산 등으로부터 유래할 수 있거나; 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 젖산, 말산, 주석산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄 디설폰산, 옥살산 및 이소티온산 등으로부터 제조될 수 있다.

[0078] 예시적인 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 하기 구조에 포함된다:

[0079] [화학식 I]

[0080] 

[0081] (상기 식에서, IL-15는 인터류킨-15 모이어티이고, (n)은 약 150 내지 약 3,000의 정수이고, ~NH~는 IL-15 모이어티의 아미노 기를 나타냄). 상기 IL-15 수용체 효능제는 본 명세서에서 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(즉, MPBA-IL15)로 지칭된다. 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 예시적인 제조가 실시예 1에 제공되어 있다.

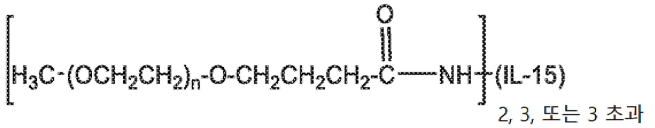
[0082] 화학식 I의 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제와 관련된 하나 이상의 구현예에서, (n)은 약 795 내지 약 1068의 범위이다. 일부 추가의 구현예에서, (n)은 약 840 내지 약 1023의 범위이다. 하나 이상의 특정 구현예에서, (n)은 평균적으로 약 907 또는 약 909의 값을 가지며, 이로써 폴리에틸렌 글리콜 사슬의 평균 분자량은 약 40,000 달톤이다.

[0083] 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)는 통상적으로는, 모노페길화(monoPEGylated) IL-15(즉, IL-15의 아미노 기에, 즉 IL-15의 라이신에서 또는 N-말단 알파 아민에서 공유 부착된 단일 메톡시PEG-N-부탄아미드 모이어티를 가짐)로 주로 이루어지고 소량의 디-페길화 및 더 고차의 페길화 IL-15 종으로 이루어진 분포로서 제조된다. 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 추가의 특징이, 예를 들어 국제 특허 공개 번호 WO 2018/213341에 기재되어 있다.

[0084] MPBA-IL15의 예시적인 조성은 모노페길화 종을 주로 포함하고, 약 10 몰% 미만의 PEG 이량체(즉, 2개의 메톡시PEG-N-부탄아미드 모이어티가 IL-15에 부착됨), 및 훨씬 더 낮은 양의 더 고차의 페길화 종(즉, 3개 이상의 메톡시PEG-N-부탄아미드 모이어티가 IL-15에 부착됨)을 포함한다. 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 조성은 일반적으로 (비변형된 IL-15(존재한다면) 및 기타 다른 IL-15 함유 종, 예를 들어 디페길화(diPEGylated) 및 더 고차의 IL-15를 포함한, 조성물 내의 모든 인터류킨-15 종에 기초하여) 적어도 약 80 몰%의 모노페길화 IL-15 종을 가질 것이다. MPBA-IL15의 조성은 바람직하게는 적어도 약 90 몰%의 모노페길화 IL-15 종, 및 약 10 몰% 미만의 기타 다른 IL-15 함유 종을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, MPBA-IL15 조성은 약 5 몰% 미만의 PEG 이량체(디페길화 IL-15, 2개의 메톡시PEG-N-부탄아미드 모이어티가 IL-15에 공유 부착됨), 및 약 5 몰% 미만의 모든 다른 더 고차의 페길화 종을 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, MPBA-IL15 조성은 적어도 약 85 몰%, 90 몰%, 95 몰%, 98 몰% 또는 99 몰%의 화학식 I의 모노페길화 종을 포함한다.

[0085] 예를 들어, 일부 바람직한 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 조성은, 집합적으로 고려될 때, 하기 화학식에 의해 포함되는 (조성물 내의 IL-15 함유 분자의) 약 20 몰%(mol%) 이하의 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 포함한다:

[0086] [화학식 II]



[0087]

[0088] (상기 식에서, n의 값은 모든 구현예에 대해 앞서 기재된 바와 같거나, 집합적으로 고려될 때, 화학식 II에 따른 (조성물 내의 IL-15 함유 분자의) 약 15 몰%(mol%) 이하의 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 포함하거나, 집합적으로 고려될 때, 화학식 II에 따른 (조성물 내의 IL-15 함유 분자의) 약 10 몰% 이하의 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 함유함).

[0089] 일부 구현예에서, MPBA-IL15 조성은 약 0.1 내지 15, 0.1 내지 10, 0.1 내지 5, 0.1 내지 1, 1 내지 20, 1 내지 15, 1 내지 10, 1 내지 5, 5 내지 20, 5 내지 15, 5 내지 10, 10 내지 20, 10 내지 15, 또는 약 15 내지 20 몰%의 화학식 II의 화합물을 포함한다.

[0090] 일부 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 조성은, 집합적으로 고려될 때, (조성물 내의 IL-15 함유 분자의) 약 1 내지 5 몰% 이하의 유리 IL-15 단백질을 포함한다.

[0091] 상기 화학식과 관련하여, “n” 은 (OCH_2CH_2) 단량체 하위단위의 평균수에 상응한다. MPBA-IL15는, 예를 들어, 평균 분자량이 약 6600 달톤 내지 약 132,000 달톤인 적합하게 활성화된 mPEG-부타노에이트 에스테르 시약을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, MPBA-IL15는 평균 분자량이, 예를 들어 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 45 kD, 50 kD 또는 60 kD로부터 선택되는 적합하게 활성화된 mPEG-부타노에이트 에스테르 시약을 사용하여 제조될 수 있다. 활성화된 중합체 시약은 IL-15의 아미노 기(예를 들어, 라이신 또는 N-말단)와 반응될 때, IL-15 모이어티와 폴리에틸렌 글리콜 모이어티(모이어티들) 사이에 안정한 아미드 결합을 형성하는 데 있어서 효과적이다.

[0092] 하나 이상의 구현예에서, n은 약 10,000 달톤(여기서, n은 약 227임), 또는 약 15,000 달톤(여기서, n은 약 340임), 또는 약 20,000 달톤(여기서, n은 약 454임), 또는 약 25,000 달톤(여기서, n은 약 568임), 또는 약 30,000 달톤(여기서, n은 약 681임), 또는 약 40,000 달톤(여기서, n은 약 909임), 또는 약 50,000 달톤(여기서, n은 약 1136임) 또는 심지어 약 60,000 달톤(여기서, n은 약 1364임) 또는 그 이상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 중량 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 상응하는 값을 갖는 정수이다.

[0093] MPBA-IL15를 제조하는 데 사용되는 예시적인 PEG 시약은 통상적으로 다분산도 값이 약 1.1 미만, 예를 들어 약 1.05일 것이다. 따라서, 공칭 평균 중량이 약 40,000 달톤인 mPEG-석신이미딜 부타노에이트와 같은 PEG 시약의

경우에, PEG 시약(및 생성되는 IL-15 접합체)은 분자량 범위가 약 35 킬로달톤 내지 약 47 킬로달톤, 또는 약 37 킬로달톤 내지 약 45 킬로달톤(41 kD ± 4 kDa)인 공유 부착된 PEG 모이어티를 가질 것이다. 일부 바람직한 구현예에서, mPEG 부타노에이트 활성화된 에스테르 시약은 공칭 평균 분자량이 약 40 킬로달톤이며, 즉 여기서 평균적으로, n은 약 907 내지 909이다.

[0094] IL-15 모이어티를 고려할 때, 용어 "IL-15 모이어티"는 접합 전의 IL-15 모이어티뿐만 아니라 접합 후의 IL-15 모이어티를 지칭한다. 그러나, 원래의 IL-15 모이어티가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 부착되어 있을 때, IL-15 모이어티는, MPBA-IL15의 제조 동안 형성되는 아미드 결합의 경우에서와 같이, 중합체(들)에 대한 결합과 관련된 하나 이상의 공유 결합의 존재로 인해 약간 변경됨이 이해될 것이다.

[0095] IL-15 모이어티는 비재조합 방법으로부터 그리고 재조합 방법으로부터 유래될 수 있으며, 본 발명은 이 점과 관련하여 제한되지 않는다. 또한, IL-15 모이어티는 인간 공급원, 동물 공급원(곤충을 포함함), 진균 공급원(효모를 포함함), 및 식물 공급원으로부터 유래될 수 있다.

[0096] IL-15 모이어티는, 예를 들어 Grabstein et al.(Grabstein et al. (1994) *Science* 264:965-968)에 의해 기재된 절차에 따라 수득할 수 있다. IL-15 모이어티는 또한, 예를 들어 Immunex Corporation의 유럽 특허 번호 0 772 624 B2에 기재된 것들과 같은 재조합 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 대안적으로, IL-15 모이어티는, 예를 들어 GenScript USA Inc.(미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) 및 Peprotech(미국 뉴저지주 록키힐 소재)로부터 상업적으로 구매할 수 있다.

[0097] 더 구체적으로는, IL-15 모이어티는 세균 발현 시스템(예를 들어, E. 콜리; 예를 들어, 문헌[Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. Biotechnol.* 21(3):295-311] 참조), 포유류 발현 시스템(예를 들어, 문헌[Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304] 참조), 효모 발현 시스템(예를 들어, 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*); 예를 들어, 문헌[Morel et al. (1997) *Biochem. J.* 328(1):121-129] 참조), 및 식물 발현 시스템(예를 들어, 문헌[Mor et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266] 참조)에서 발현될 수 있다. 이러한 발현은 외인성 발현(숙주 세포가 천연적으로 원하는 유전자 코딩을 함유하는 경우)을 통해 또는 내인성 발현을 통해 일어날 수 있다.

[0098] IL-15 모이어티의 추가의 제조 및/또는 정제 방법이 PCT 출원 번호 PCT/US2018/032817에 기재되어 있다.

[0099] IL-15 활성을 갖는 단백질을 발현하는 데 사용되는 시스템에 따라, IL-15 모이어티는 비글리코실화 또는 글리코실화될 수 있으며 어느 것이든 사용될 수 있다. 즉, IL-15 모이어티는 비글리코실화될 수 있거나 IL-15 모이어티는 글리코실화될 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, IL-15 모이어티는 비글리코실화된다.

[0100] IL-15 모이어티는 유리하게는, 아미노산의 측쇄 내의 원자에 대한 중합체의 용이한 부착을 제공하기 위하여, 예를 들어 라이신, 시스테인 및/또는 아르기닌과 같은 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하고/하거나 치환하도록 변형될 수 있다. IL-15 모이어티의 치환의 예가 미국 특허 번호 6,177,079에 기재되어 있다. 또한, IL-15 모이어티는 비-천연발생 아미노산 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 아미노산 잔기 및 비-천연발생 아미노산 잔기를 부가하기 위한 기법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0101] 예시적인 IL-15 모이어티는 본 명세서에, 서적에, 그리고 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 US 2006/0104945, 문헌[Pettit et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(4):2312-2318], 문헌[Wong *et al.*, (2013) *OncoImmunology* 2(11), e26442:1-3]에, 그리고 PCT 공개 출원 번호 WO 2018/213341에 기재되어 있다. 바람직한 IL-15 모이어티는 서열 번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 아미노산 서열, 및 그와 실질적으로 상동인 서열을 갖는 것들을 포함한다. 바람직한 IL-15 모이어티는 서열 번호 1에 상응하는 아미노산 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, IL-15 모이어티는 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나와 적어도 약 85% 또는 적어도 약 90% 동일성을 갖는 기능적 상동체이다. 일부 구현예에서, IL-15 모이어티는 서열 번호 1 내지 3 중 어느 하나와 적어도 약 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 기능적 상동체이다.

[0102] 일부 경우에, IL-15 모이어티는 "단량체" 형태일 것이며, 여기서는 상응하는 펩티드의 단일 발현이 개별 단위로 조직화된다. 다른 경우에, IL-15 모이어티는 "이량체"(예를 들어, 재조합 IL-15의 이량체)의 형태일 것이며, 여기서는 단백질의 2개의 단량체 형태가 서로 회합된다.

[0103] 또한, IL-15의 전구체 형태가 IL-15 모이어티로서 사용될 수 있다. IL-15의 예시적인 전구체 형태는 서열 번호 3의 서열을 갖는다.

[0104] 전술한 서열들 중 임의의 것의 절단 버전(truncated version), 하이브리드 변이체, 및 펩티드 모방체가 또한

IL-15 모이어티로서의 역할을 할 수 있다. 적어도 어느 정도의 IL-15 활성을 유지하는 임의의 전술한 것의 생물학적 활성 단편, 결실 변이체, 치환 변이체 또는 부가 변이체가 또한 IL-15 모이어티로서의 역할을 할 수 있다.

[0105] 임의의 주어진 펩티드, 단백질 모이어티 또는 접합체의 경우, 펩티드, 단백질 모이어티 또는 접합체가 어느 정도의 IL-15 활성을 갖는지의 여부를 결정하는 것이 가능하다. 시험관내 IL-15 활성을 결정하기 위한 다양한 방법이 당업계에 기재되어 있다. 예시적인 접근법은 pSTAT 검정에 기초한다. 간략하게 말하면, IL-15-의존성 CTLL-2 세포가 IL-15 활성을 갖는 시험 대상물에 노출되는 경우, 티로신 잔기 694(Tyr694)에서의 STAT5의 인산화를 포함하는 신호전달 캐스케이드 결과의 개시가 정량적으로 측정될 수 있다. 검정 프로토콜 및 키트는 알려져 있으며, 예를 들어 MSD Phospho(Tyr694)/Total STATa,b 전세포 용해물 키트(Whole Cell Lysate Kit)(미국 메릴랜드주 게이더스버그 소재의 Meso Scale Diagnostics, LLC)를 포함한다. 예를 들어, 이러한 접근법을 사용하여, 5분 또는 10분 중 적어도 하나에서 약 300 ng/mL 이하(더 바람직하게는 약 150 ng/mL 이하의) pSTAT5 EC_{50} 값을 나타내는 제안된 IL-15 모이어티가 본 발명과 관련하여 통상적으로 "IL-15 모이어티"로 간주된다. 그러나, 사용되는 IL-15 모이어티는 더 강력한 것이(예를 들어, 5분 또는 10분 중 적어도 하나에서 150 ng/mL 미만, 예컨대 5분 또는 10분 중 적어도 하나에서 약 1 ng/mL 미만, 훨씬 더 바람직하게는 0.5 ng/mL 미만의 pSTAT5 EC_{50} 값을 갖는 것이) 바람직하다.

[0106] 당업계에 알려진 기타 다른 방법이 또한 IL-15 기능을 평가하는 데 사용될 수 있으며, 이에는 전위측정, 분광광도법, 크로마토그래피, 및 방사측정 방법이 포함된다. 그러한 추가의 한 가지 유형의 검정에 대해서는, 예를 들어 문헌[Ring et al. (2012) Nat. Immunol. 13(12):1187-1195]을 참조한다.

[0107] 앞서 기재된 바와 같이, IL-15 모이어티 상의 아미노 기는 mPEG-석신이미딜 부타노에이트 시약과 반응하여 화학식 I에 의해 포함되는 IL-15 수용체 효능제를 제공하기 위한 부착 부위를 제공한다. 본 명세서에 제공되는 예시적인 IL-15 아미노산 서열을 고려해 볼 때, 각각이 접합에 이용가능할 수 있는 ε-아미노산을 갖는 7개의 라이신 잔기가 있음이 명백하다. 추가로, 메티오닌의 N-말단 아민이 또한 PEG 모이어티에 대한 부착점으로서의 역할을 할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 라이신 또는 N-말단 아민 위치 중 임의의 하나 이상에 부착될 수 있음이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 부착 부위는 Lys^{10} 및 Lys^{11}(한 예로서 서열 번호 2에 제시된 바와 같은 넘버링을 사용하는 경우, 또는 서열 번호 1을 사용하는 경우에는 Lys^{11} 및 Lys^{12}) 중 하나 이상에 존재한다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 N-말단 아민에 부착된다. 임의의 라이신 부위가 PEG 모이어티를 위한 부착 부위(예를 들어, 서열 번호 1의 Lys^{37} 또는 Lys^{42})로서 적합할 수 있음이 이해될 것이다. 일부 구현예에서, MPBA-IL15는 위치 이성질체들의 혼합물을 포함하며, 여기서는 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 공유 부착이 주로 N-말단에서 이루어진다(다시 말해, 위치 이성질체들의 일군 중, PEG 모이어티가 N-말단에 부착된 이성질체가 나머지 다른 위치 이성질체와 대비하여 최대량으로 존재한다).

[0108] MPBA-IL15는 모든 IL-15 수용체 하위단위(IL-15α, β 및 γ 하위단위)에 대한 결합을 통해 매일 투여할 필요 없이 지속적인 IL-15 생물학적 활성을 제공하는 면역요법제이다. 더 구체적으로는, MPBA-IL15는 IL-15 수용체 α 및 인터류킨-2(IL-2)/IL-15 βγ 하위단위에 결합하고, NK 세포 및 $CD8^+$ 기억 T 세포에 대한 약력학적(PD) 효과를 포함한 IL-15 생물학적 특성의 전체 스펙트럼을 유지하는 한편, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 이 분자의 수력학적 부피를 증가시키며, 이는 비변형된 rhIL-15와 대비하여 유효 반감기를 연장시키는 역할을 한다.

[0109] 설치류 및 비인간 영장류에서의 전임상 연구에서, MPBA-IL15는 CAR T 세포 요법과 병용될 때 본 발명자들이 특히 유리할 것으로 고려하는 특징을 갖는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, MPBA-IL-15는 (i) NK 세포 증식을 자극하고 증폭시키고, (ii) 억제 조절성 T 세포를 실질적으로 유도하지 않고서 CD8 T 세포 생존 및 기억 형성을 지지하고, (iii) 장기간 면역학적 기억의 형성을 향상시키고, 추가로, IL-R에 대한 수용체 결합을 보유하지만, 비변형된 IL-15의 친화도보다는 더 적은 친화도로 보유하는 것으로 밝혀졌다.

[0110] 본 명세서에 제공된 방법에 사용하기에 또한 적합할 수 있는 추가의 IL-15 수용체 효능제는, 예를 들어 N-803(이전 명칭 ALT-803, 돌연변이 IL-15/IL-15Rα 융합 단백질; 예를 들어, 문헌[Han, K., et al., *Cytokine*, 2011;56(3):804-810]; 문헌[Zhu, X., et al., *J Immunol.* 2009;183(6):3598-3607], 및 문헌[Xu, W., et al., *Cancer Res.* 2013;73(10):3075-3086] 참조), NIZ985(이종이량체성 IL-15, IL-15/가용성 IL-15Rα 이량체, 예를 들어 AACR; 문헌[Cancer Res 2019; 79 (13 Suppl)] 참조), AM0015(폴리에틸렌 글리콜 변형된 IL-15; 예를 들어, WO 2017/112528 참조), 및 OXS-3550(항-CD16 및 항-CD33 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역으로 구성되는 단일쇄 삼중특이적 scFv 재조합 융합 단백질 접합체 및 IL-15의 변형된 형태, CAS 등록 번호 2094086-30-1,

UNI: E5GE91Q5FX)과 같은 분자를 포함한다.

[0111] 방법

[0112] 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, MPBA-IL15의 특징들 중 적어도 하나 이상에 기초하여, 일 양태에서, MPBA-IL15의 투여 전에 암 환자에서 면역 반응을 유도하기에 효과적인 방법이 본 명세서에서 제공되며, 상기 방법은 종양 세포를 표적화하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 유전자적으로 형질전환된 자가 또는 동종이계(바람직하게는, 자가) 항-종양 T 세포, 예컨대 앞서 기재된 바와 같은 그리고 항-종양 활성을 갖는 CD19 CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물을 투여하는 단계, 및 이에 동반하여/이후에, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, 즉 MPBA-IL15를 투여하여 향상된 치료적 효과를 달성하는 단계에 의해 이루어진다. 바람직한 구현예에서, T-세포 면역요법은 CD19-유도 유전자 변형된 자가 T 세포를 포함한다. 예시적인 입양 세포 면역요법 조성물은 암과 관련된 항원(예를 들어, CD19)에 대해 유도된 항체의 세포외 가변 도메인, 힌지 및 막관통 도메인, 및 T 세포 또는 기타 다른 수용체의 세포내 신호전달 도메인, 예컨대 공동자극성 도메인을 포함하는 키메라 항원 수용체를 발현하도록 변형된 종양-반응성 T 세포를 포함한다. 예를 들어, 종양-반응성 T 세포는 CD19 분자에 대해 유도된 단일쇄 항체-유도 키메라 항원 수용체를 사용하여 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 조성물은 CAR-변형된 세포독성 종양 세포, 예를 들어 CD19 CAR-변형된 $CD8^+$ T 림프구를 포함하며, 또한 암과 관련된 항원, 예를 들어 CD19에 대해 유도된 키메라 항원 수용체를 갖도록 유전자 변형된 기타 다른 유형의 T 림프구(예를 들어, 헬퍼 T 림프구), 예를 들어 $CD4^+$ 또는 기타 다른 T 세포를 포함할 수 있으며, 본 발명은 이 점과 관련하여(즉, CAR T 세포, 예를 들어 CD19-유도 CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물의 특정 구성으로) 제한되지 않는다. 본 명세서에 제공되는 방법에 사용하기에 적합한 대표적인 CAR T 세포 조성물은 앞서의 섹션에 기재되어 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 입양 세포 면역요법 조성물 내에 포함된 세포는 먼저 그들의 배양 배지로부터 그들을 수집한 후, 세척하고, 치료-유효량으로 투여하기에 적합한 배지 및 용기 시스템 내에 세포를 농축시킴으로써 제형화된다. 적합한 주입 배지는, 예를 들어 특히, 생리 식염수, RPMI 1640(ThermoFisher), AIM V 무혈청 배지(ThermoFisher), 및 X-VIVO™ 배지(Media)(Lonza Walkersville), 물 중 5% 덱스트로스, 또는 링거 락테이트(Ringer's lactate)와 같은 임의의 등장성 배지 제형일 수 있다.

[0114] CAR T 세포, 예를 들어 CD19 CAR T 세포를 포함하는 입양 세포 면역요법 조성물은 통상적으로 치료 유효량으로, 즉 대상체에게 면역을 제공하기에 효과적인 양으로 투여된다. 면역이란, 림프구 반응이 유도되는 종양 또는 암과 관련된 하나 이상의 신체적 증상의 경감을 의미한다. 입양 세포 면역요법 조성물은 통상적으로 주입에 의해 투여되며, 이때 각각의 주입은 적어도 2개의 세포 내지 적어도 10^6 내지 10^{10}개 세포/kg, 바람직하게는 적어도 10^7 내지 약 10^9개 세포/kg의 범위, 또는 바람직하게는 적어도 10^6 내지 약 10^8개 세포/kg의 범위를 포함한다. 일부 특정한, 그러나 비제한적인 구현예에서, 각각의 주입은 적어도 약 0.2 x 10^6개 세포/kg 내지 약 6.0 x 10^8개 세포/kg, 적어도 약 2.0 x 10^6개 세포/kg 내지 약 2.0 x 10^8개 세포/kg, 적어도 약 0.2 x 10^6개 세포/kg 내지 약 5.0 x 10^6개 세포/kg, 적어도 약 0.1 x 10^8개 세포/kg 내지 약 2.5 x 10^8개 세포/kg, 또는 적어도 약 0.6 x 10^8개 세포/kg 내지 약 6.0 x 10^8개 세포/kg을 포함한다. 세포는 단회 주입에 의해 또는 다회 주입에 의해 투여될 수 있다. 일부 특정 구현예에서, 세포는 단회 투여 주입으로서 투여된다. 상이한 개체들은 반응성에 있어서 다양하기 때문에, 주입된 세포의 수뿐만 아니라, 주입 횟수 및 다회 주입의 투여 시간 범위가 일상적인 조사에 의해 결정되는 바와 같이, 보건 전문가에 의해 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, T-세포 면역요법의 투여에 앞서, 예를 들어 사이클로포스파미드(통상적으로, 정맥내) 및 플루다라빈(통상적으로, 정맥내)의 투여와 같은 림프구고갈 화학요법 계획의 투여가 이루어진다.

[0115] 본 명세서에 기재된 방법에 따라, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 CAR T 세포 면역요법의 결과를 향상시키기에 효과적인 양으로 투여된다. 확인을 위하여, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, MPBA-IL15에 관하여, 활성의 양 및 정도는 폭넓게 변동될 수 있으며, 입양 세포 면역요법 조성물의 투여와 결합될 때 여전히 효과적일 수 있다. 다시 말해, 충분히 연장된 기간 동안 단지 최소한의 IL-15 수용체 효능제 활성을 나타내는 MPBA-IL15의 양은 CAR T 세포 요법과 병용하여 투여될 때, 본 명세서에 기재된 방법이 임상적으로 의미있는 반응을 가능하게 하는 한 여전히 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제일 수 있다. 일부 경우에, (예를 들어) 상승적 상호작용 및 반응으로 인해, CAR T 세포 요법, 예를 들어 CD19 CAR T 세포 요법이 동반될 때 단지 최소한의 IL-15 수용체 효능제 활성이 요구될 수 있으며, 투여되는 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 및 소정 수의 CAR T 세

포 중 어느 하나 또는 둘 모두의 치료량은 어느 성분이든 단독으로 투여될 때의 치료적 유효량보다 더 낮을 수 있음이 이해될 것이다.

[0116] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 본 발명의 일 양태는 (특히) 입양 세포 면역요법 조성물 및 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제 중 어느 하나 또는 둘 모두에 의한 치료에 대해 반응성인 질환, 예컨대 암을 앓고 있는 환자를 치료하기에 유용한 방법을 제공한다. 예를 들어, 환자는 단독으로의 개별 작용제뿐만 아니라 병용물에 대해 반응성일 수 있지만, 병용물에 대해 더 반응성이다. 추가의 예로서, 환자는 개별 면역요법제들 중 하나에 대해서는 비반응성일 수 있지만, 병용물에 대해서는 반응성이다. 또 다른 추가의 예로서, 환자는 어느 것이든 단독으로의 개별 작용제에 대해서는 비반응성일 수 있지만, 병용물에 대해서는 반응성이다.

[0117] 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, MPBA-IL15는 당업계에 알려진 바와 같은 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 비경구 투여된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 동맥내, 종양내, 림프내, 복막내, 심장내, 수강내, 및 근육내 주사뿐만 아니라, 주입에 의한 것도 포함한다.

[0118] MPBA-IL15는 투여 또는 추가의 사용에 적합한 조성물을 형성하기 위하여 하나 이상의 적합한 부형제 또는 희석제와 배합될 수 있다. 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는, 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제가 동반되는 단회 용량 조성물 내에 포함될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제는, 예를 들어 문헌[Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th ed., Rowe, R.C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012]에 기재된 것들을 포함한다. 하나의 그러한 예시적인 제형은 pH 6.8의 인산염 완충액 및 트레할로스를 포함하는 용액 중 MPGA-IL15를 포함한다. 예를 들어, 예시적인 제형은 약 pH 6의 인산칼륨 완충액, 트레할로스, 및 폴리소르베이트 20의 용액 중에서 제형화된 MPBA-IL15를 포함한다.

[0119] 비경구 투여에 적합한 제형 유형은 특히, 즉시 주사가능한 용액, 사용 전에 용매와의 배합을 위한 건조 분말, 즉시 주사가능한 현탁액, 사용 전에 비히클과 배합하기 위한 건조 불용성 조성물, 및 투여 전에 희석을 위한 에멀젼 및 액체 농축물을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 정맥내 투여에 적합한 제형으로 제공되고, 정맥내 투여된다. 일부 다른 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 피하 투여에 적합한 제형으로 제공되고, 피하 투여된다. 일부 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 종양내 투여된다. 폐, 비강, 협측, 직장내, 설하 및 경피 투여와 같은 기타 다른 투여 방식이 또한 고려된다.

[0120] 일반적으로, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 치료적 유효량은 투여되는 단백질의 용량(IL-15 등가량)을 기준으로 약 5 mcg(μg) 내지 약 10 mg의 범위일 것이다. 주어진 용량은, 예를 들어 임상의가 적절한 종점(예를 들어, 치유, 퇴행, 부분 퇴행 등)이 달성됨을 결정할 때까지 주기적으로 투여될 수 있다.

[0121] 일부 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, MPBA-IL15의 치료적 유효 용량은 약 0.10 내지 70 mcg/kg(마이크로그램/킬로그램, μg/kg의 IL-15 등가량)의 범위이다. 다른 구현예에서, 치료적 유효 용량은 하루당 약 0.10 mcg/kg 내지 약 50 mcg/kg, 또는 약 0.30 내지 약 45 mcg/kg, 또는 약 0.25 mcg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg 또는 하루당 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg의 범위이다. 다른 구현예에서, 치료적 유효 용량은 약 1 내지 10 mcg/kg, 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg의 범위이다. 일부 구체적인, 그러나 비제한적인 구현예에서, 치료적 유효 용량은 약 0.25 mcg/kg, 0.3 mcg/kg, 0.5 mcg/kg, 1 mcg/kg, 2 mcg/kg, 3 mcg/kg, 5 mcg/kg, 6 mcg/kg, 7 mcg/kg, 10 mcg/kg, 15 mcg/kg, 20 mcg/kg, 25 mcg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.05 mg/kg, 또는 0.1 mg/kg이다.

[0122] 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 장기간 작용형 IL-15R 효능제의 치료적 유효 용량은 약 0.25 내지 25 μg/kg의 범위이다. 다른 구현예에서, 치료적 유효 용량은 (예를 들어, 하루당) 하루당 약 0.25 μg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 1.0 μg/kg 내지 약 20 μg/kg, 약 1.0 μg/kg 내지 약 15 μg/kg, 약 1.0 μg/kg 내지 약 10 μg/kg, 약 1.0 μg/kg 내지 약 5.0 μg/kg, 약 1 μg/kg 내지 약 1.5 μg/kg, 약 1.5 μg/kg 내지 약 20 μg/kg, 약 1.5 μg/kg 내지 약 15 μg/kg, 약 1.5 μg/kg 내지 약 10 μg/kg, 약 1.5 μg/kg 내지 약 5.0 μg/kg, 약 5.0 μg/kg 내지 약 20 μg/kg, 약 5.0 μg/kg 내지 약 15 μg/kg, 약 5.0 μg/kg 내지 약 10 μg/kg, 약 10 약 1.5 μg/kg 내지 약 20 μg/kg, 약 10 μg/kg 내지 약 20 μg/kg, 약 10 μg/kg 내지 약 15 μg/kg, 약 15 μg/kg 내지 약 20 μg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg 또는 하루당 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg의 범위이다. 다른 구현예에서, 치료적 유효 용량은 약 1 내지 10 μcg/kg, 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg의 범위이다. 일부 구체적인, 그러나 비제한적인 구현예에서, 치료적 유효 용량은 하루당 약 0.25 μg/kg, 0.3 μg/kg, 0.5 μg/kg, 1 μg/kg, 1.5 μg/kg, 2 μg/kg, 3 μg/kg, 5 μg/kg, 6 μg/kg, 7 μg/kg,

10 μg/kg, 15 μg/kg, 20 μg/kg, 25 μg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.05 mg/kg, 또는 0.1 mg/kg이다.

[0123] 입양 세포 면역요법 조성물의 투여의 경우에서와 같이, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 용량은, 예를 들어 대상체의 연령, 체중, 및 일반적인 상태뿐만 아니라 치료되는 질환의 중증도, 특정 입양 세포 면역요법 조성물, 및 보건 전문가의 판단에 따라 변동될 것이다.

[0124] 하나 이상의 구현예에서, 입양 세포 이식은 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여 전에 수행된다. 예를 들어, CAR T 세포의 입양 세포 이식-기반 세포 주입은 MPBA-IL15의 투여 전에, 즉시, 1시간 내, 2시간 내, 3시간 내, 4시간 내, 5시간 내, 6시간 내, 7시간 내, 8시간 내, 9시간 내, 10시간 내, 11시간 내, 12시간 내, 1일 내, 2일 내, 3일 내, 4일 내, 5일 내, 6일 내, 7일 내, 8일 내, 9일 내, 10일 내, 11일 내, 12일 내, 13일 내, 14일 내, 15일 내, 16일 내, 17일 내, 18일 내, 19일 내, 20일 내, 21일 내, 22일 내, 23일 내, 24일 내, 25일 내, 26일 내, 27일 내, 28일 내, 29일 내, 1개월 내, 3개월 내, 6개월 내 또는 이들의 임의의 조합으로 일어날 수 있다.

[0125] 대안적으로, 일부 구현예에서, 입양 세포 이식은 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여 후에 수행된다. 예를 들어, CAR T 세포의 입양 세포 이식-기반 세포 주입은 MPBA-IL15의 투여 직후, 이의 투여에 후속하여 1시간 내, 2시간 내, 3시간 내, 4시간 내, 5시간 내, 6시간 내, 7시간 내, 8시간 내, 9시간 내, 10시간 내, 11시간 내, 12시간 내, 1일 내, 2일 내, 3일 내, 4일 내, 5일 내, 6일 내, 7일 내, 8일 내, 9일 내, 10일 내, 11일 내, 12일 내, 13일 내, 14일 내, 15일 내, 16일 내, 17일 내, 18일 내, 19일 내, 20일 내, 21일 내, 22일 내, 23일 내, 24일 내, 25일 내, 26일 내, 27일 내, 28일 내, 29일 내, 1개월 내, 3개월 내, 6개월 내 또는 이들의 임의의 조합에서 일어날 수 있다.

[0126] 암을 갖는 대상체의 치료와 관련하여 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료", "치료하다", 및 "치료하는"은 암의 하나 이상의 증상을 경감, 둔화, 정지, 또는 역전시키거나 암이 실제로 제거되지 않더라도 암의 진행을 지연시키기 위한 병용물의 투여와 같이 대상체가 앓고 있는 암에 대한 개입의 전체 스펙트럼을 포함하는 것을 의미한다. 치료는, 예를 들어 증상의 중증도, 증상의 수, 또는 재발 빈도의 감소, 예를 들어 종양 성장의 억제, 종양 성장의 정지, 또는 기존의 종양의 퇴행을 포함할 수 있다.

[0127] 예를 들어, 암 또는 암-관련 질병의 개선은 완전 또는 부분 반응으로서 특징지어질 수 있다. "완전 반응"은 임의의 이전의 비정상적인 방사선학적 연구결과, 골수, 및 뇌척수액(CSF) 또는 비정상적인 단일클론 단백질 측정치의 정상화와 함께, 임상적으로 검출 가능한 질병의 부재를 지칭한다. "부분 반응"은 새로운 병변의 부재 하에서의 모든 측정 가능한 종양 부하(즉, 대상체에 존재하는 악성 세포의 수, 또는 종양 덩어리의 측정된 벌크 또는 비정상적인 단일클론 단백질의 양)에 있어서의 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%의 감소를 지칭한다. 용어 "치료"는 완전 반응 및 부분 반응 둘 모두를 고려한다.

[0128] 입양 세포 면역요법 조성물의 주입의 빈도 및 일정 및 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여와 관련하여, 당업자는 적절한 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 치료 사이클에서, 임상의는, 입양 세포 이식과 동시에, 또는 바람직하게는 입양 세포 이식 이후에 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제를 투여하는 것과 조합하여, CAR T 세포의 입양 세포 이식을 수행할 것이다. 예를 들어, 일부 치료 방식에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제는 CAR T 세포의 입양 세포 이식 후 약 7일 내(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일차 중 어느 한 날에)에 투여된다. 일부 경우에서, 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, 즉 MPBA-IL15는 입양 세포 이식 후 4일 내, 예를 들어 1, 2, 3 또는 4일차 중 어느 한 날에 투여된다. MPBA-IL15의 장기간 작용 성질에 기초하여, IL-15 수용체 효능제는 통상적으로 비교적 빈번치 않게(예컨대 3주에 한 번, 2주에 한 번, 8일 내지 10일에 한 번, 매주 한 번 등) 투여된다.

[0129] 요법의 진행과정과 연관된 예시적 시간 길이는 약 1주; 약 2주; 약 3주; 약 4주; 약 5주; 약 6주; 약 7주; 약 8주; 약 9주; 약 10주; 약 11주; 약 12주; 약 13주; 약 14주; 약 15주; 약 16주; 약 17주; 약 18주; 약 19주; 약 20주; 약 21주; 약 22주; 약 23주; 약 24주; 약 7개월; 약 8개월; 약 9개월; 약 10개월; 약 11개월; 약 12개월; 약 13개월; 약 14개월; 약 15개월; 약 16개월; 약 17개월; 약 18개월; 약 19개월; 약 20개월; 약 21개월; 약 22개월; 약 23개월; 약 24개월; 약 30개월; 약 3년; 약 4년 및 약 5년을 포함한다. 통상적으로, 예를 들어 CD19 CAR T 세포의 단회 라운드의 입양 세포 이식이 환자에게 제공된 후, 1회 이상의 용량의 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제인 MPBA-IL15가 제공되지만, 일부 경우에서 입양 세포 이식의 하나 이상의 추가의 사이클이 일어날 수 있다.

[0130] 본원에 기술된 치료 방법은, 통상적으로 환자의 케어를 관리하는 임상의가 해당 치료 방법이 유효하다고 여기는

동안(즉, 환자가 해당 치료에 반응하는 동안) 지속된다. 치료 방법이 유효한지를 나타내는 비제한적 매개변수는 하기의 것들, 즉 (무게 및/또는 부피 및/또는 시각적 외관의 관점에서의) 종양의 수축; 개별 종양 콜로니 수의 감소; 암 세포 수의 감소; 종양 제거; 비 진행 생존; (적용 가능하다면) 적합한 종양 마커에 의한 적당한 반응, 증가한 NK(자연 살해) 세포 수, 증가한 T 세포 수, 증가한 기억 T 세포 수, 증가한 중앙 기억 T 세포(central memory T cell) 수, 감소한 조절 T 세포(예컨대, $CD4^+$ Treg, $CD25^+$ Treg 및 $FoxP3^+$ Treg) 수 중 한 가지 이상을 포함할 수 있다.

[0131] 앞서 기재된 바와 같이, 입양 세포 조성물(예를 들어, CAR T 세포를 포함함)과 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제가 개별적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 입양 세포 이식의 준비 및 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제의 투여가, 초기 투여로서 또는 치료 과정에 걸쳐, 또는 투약법의 다양한 단계에서, 동시인 것이 바람직한 경우, (그리고 CAR T 세포 및 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제가 함께 소정의 제형 형태 내에서 서로 양립성이면) 그 동시 투여는 단일 투여 형태/제형의 주입(예를 들어, 면역 성분을 둘 다 함유하는 정맥투여 제형의 정맥내 투여)을 통해 달성될 수 있다.

[0132] 본 기재된 방법 및 조성물은 본 명세서에 제공된 방법에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 임의의 질환, 예컨대 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 방법은, 예를 들어 다른 질환 중에서도 특히, 고형 종양, 혈액학적 악성종양(액체 암), 또는 흑색종의 치료에 유용하다. 예시적인 질환은 암이며, 예컨대 흑색종, 신장암, 비소세포 폐암 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암), 방광암, 두경부암, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프혈관육종, 림프관내피육종, 활막종, 악성중피종, 유윙종(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장암종, 췌장암, 뇌암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암, 기저세포암, 선암, 땀샘암, 피지선암, 유두암, 유두상 선암, 낭선암, 수질암(medullary cancer), 기관지암, 신장세포암, 간세포암, 담도암, 융모암, 정상피종, 배아암, 빌름스 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 고환암, 폐암, 소세포 폐암, 뇌암, 방광암, 상피암, 신경교종, 별아교세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체부종양(pinealoma), 혈관모세포종, 청신경종, 희돌기신경교종(oligodendroglioma), 수막종, 흑색종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 망막모세포종 및 백혈병이다.

[0133] 일부 특정 구현예에서, 암은 고형암이다.

[0134] 또한 일부 추가의 구현예에서, 암은 예를 들어 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 뼈암, 대장암, 위암, 림프종, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 갑상선암, 신장암, 담도암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암, 및 부신피질암으로부터 선택된다.

[0135] 하나 이상의 추가의 구현예에서, 암은 흑색종, 신장암, 비소세포 폐암, 유방암, 방광암, 두경부암, 및 결장암으로부터 선택된다.

[0136] 하나 이상의 특정 구현예에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다. 삼중 음성 유방암은 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 및 ERBB2(HER2) 유전자 증폭을 결여한 매우 공격적인 종양이다.

[0137] 일부 다른 구현예에서, 암은 림프종 또는 백혈병이다.

[0138] 일부 추가의 구현예에서, 암은, 제한 없이, 비호지킨 림프종(NHL), 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL) 및 발덴스트룀 거대글로불린혈증(WM)으로부터 선택되는 B-세포 악성종양이며, 이때 환자 집단은 소아 환자 및 성인 환자 둘 모두를 포함한다.

[0139] 본 방법은 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, MPBA-IL15를 투여함으로써, 예를 들어 대상체의 반응을 개선함으로써, CAR T 세포, 예를 들어 CD19 CAR T 세포의 입양 세포 이식의 치료적 유효성을 향상시키는 데 유용하다. 향상된 반응은 치료 동안의 임의의 적합한 시점에서, 단회 라운드의 치료 후에, 2회 또는 3회의 치료 사이클 후에 등에서, 그리고 다수의 적합한 방법들 중 임의의 것에 의해 평가될 수 있으며, 이때 이러한 방법에는, 예를 들어 종양의 수축(부분 반응), 즉 종양 크기 또는 부피의 평가, 종양의 소실, 암 세포수의 감소, 질병 진행의 감소(암이 진행되지 않음), 및 적절한 경우 하나 이상의 종양 시험 마커의 분석이 포함된다. 이러한 비교는 인간 환자에서, 또는 적합한 동물 모델, 예컨대 암의 적합한 뮤린 모델에서 수행될 수 있다.

[0140] 또 다른 몇몇 추가의 구현예에서, 본원에 제공된 방법, 키트, 조성물 및 조합은 대상체 내에서 T 세포 및/또는 NK 세포 활성 및/또는 증식을 자극하는 데 유효하다. 몇몇 구현예에서, 본 방법은, 예를 들어 상응하는 암의 마우스 모델을 대상으로 대상체 내 $CD8^+$ T 세포 수의 증가에 대해 평가되었을 때 유효하다. 또 다른 몇몇 기타 구현예에서, 본 방법은, 예를 들어 상응하는 암의 암 마우스 모델을 대상으로 평가되었을 때, 대상체 내 NK 세포

수를 증가시키는 데 유효하다.

[0141] CAR-T 세포를 특성화하고 모니터링하고, NK 세포, $CD8^+$ T 세포, 및 $CD8^+$ 기억 세포를 포함하지만 이로 한정되지 않는 면역 세포 집단의 수 및 활성화에 대한 요법의 효과를 평가하기 위하여, 치료 전 및 치료 동안 둘 모두에서 대상체로부터 혈액 샘플을 수집할 수 있다. 유전자 변형된 CD19-유도 CAR-T 세포의 특성화 및 지속성의 모니터링이 치료 전 및 치료 동안 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)에 의해 말초 혈액에서 수행될 수 있으며, CAR-T 세포 표현형은 또한 유세포측정법에 의해 평가될 수 있다. 요법에 반응하여 사이토카인 수준의 변화를 결정하기 위하여 그리고 유전자 발현의 변화를 프로파일링하기 위하여, 혈액 샘플이 또한 치료 전 및 치료 동안 수집될 수 있다. 또한, 백혈구 샘플 또는 PBMC가 기타 다른 면역 기능의 평가를 위해 수집 및 사용될 수 있다.

[0142] 종양 세포의 특성화 및 면역 시스템 활성화를 위해 실현 가능한 경우, 치료 전, 치료 동안, 및 치료 후에 신선한 종양 골수 생검이 수집될 수 있다. 평가는 종양 미세환경에서의 종양-특이적 단백질 마커 및 면역 세포 집단의 변화에 대한 평가를 포함할 수 있다. 골수에서의 유전자 변형된 CD19 CAR-T 세포의 특성화 및 모니터링이 장기간 작용형 IL-15 수용체 효능제, 예를 들어 MPBA-IL15의 투여에 의한 치료 전과 후에 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR)에 의해 수행될 수 있다.

[0143] 종양 생검 수집이 또한 수행될 수 있다. 생검은 바람직하게는 이전 방사선에 노출된 적이 없는 병변에 대해 수행되어야 한다. 생검은 생검에 적합한 다른 병변이 없는 한, 비표적 병변으로부터 획득될 수 있다. 치료 전과 치료 후의 종양 조직 생검은 바람직하게는, 실현 가능하다면, 동일한 병변으로부터 채취되어야 한다. 또한, 대조 생검으로서의 역할을 하기 위하여 원거리의 비주사된 병변으로부터 생검이 채취될 수 있다. 종양 조직 생검은 마커들(CD3, CD4, CD8, 및 CD56을 포함하지만 이로 한정되지 않음)의 패널을 사용하여 유세포측정법 및/또는 면역조직화학(IHC)에 의해 침윤 면역 세포 집단을 특성화하는 데 사용될 수 있다.

[0144] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 병용 면역요법은 많은 ACT-기반 요법과는 대조적으로, 종양 부위에서의 또는 혈액 중에서의 외인적으로 전달된 CAR T 세포의 정도 및 지속성(즉, 체류)을 증가시키며, 이로써 증가된 항종양 효능을 제공하는 데 효과적이다.

[0145] 본 명세서에 언급된 모든 논문, 서적, 특허, 특허 공개 및 기타 다른 간행물은 전체가 참고로 포함된다. 본 명세서의 교시와 참고로 포함된 기술 사이에 불일치가 있는 경우에는, (특히 본 명세서에 첨부된 청구범위에서 사용된 용어에 대해) 본 명세서의 교시 및 정의의 의미가 우선할 것이다. 예를 들어, 참고로 포함된 출원 및 간행물이 동일한 용어를 상이하게 정의하는 경우, 해당 용어의 정의는 정의가 있는 문헌의 교시 내에서 보존될 것이다.

[0146] **실시예**

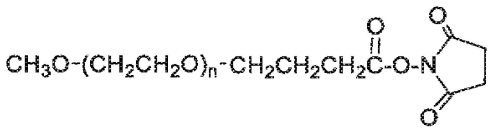
[0147] 다음의 실시예는 본 개시 내용의 범주를 설명하는 것으로 의도되며 제한하지 않는 것으로 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 본 발명(들)의 범주 내의 다른 양태, 이점 및 변형은 본 개시 내용이 속하는 기술분야의 당업자에게 명확할 것이다.

[0148] **재료 및 방법**

[0149] CAR T 세포: CD19/4-1BB/CD3ζ CAR을 발현하는 인간 CD19 CAR T 세포를 이전에 기재된 바와 같이 건강한 공여자로부터 생성하였다. 예를 들어, 문헌[Turtle, C.J., et al. *J. Clin Invest.* 2016; 126(6): 2123-2138] 및 미국 특허 번호 9,987,308을 참조한다. 간략하게 말하면, CD4 및 CD8 T 세포를 단리하고, CD19 CAR 렌티바이러스 벡터로 개별적으로 형질도입시키고(도 2), 형질도입된 세포를 정렬시키고, 이어서 14 내지 16일 동안 LCL(림프아구양 B 세포주) 세포를 사용하여 증폭시키고, 세포를 15일차에서 검정하였다.

[0150] 통상적인 기법을 사용하여 제조된 재조합 IL-15 ("rIL-15") 서열 번호 1(도 1에 제공된 바와 같음)을 하기 실시예에서 사용하였지만, 임의의 적합한 IL-15 모이어티가 유사하게 사용될 수 있다. E. 콜리 봉입체(inclusion body)로부터 발현되고 정제된 비-글리코실화된 재조합 인간 IL-15인 서열 번호 1은 115개의 아미노산을 함유하고 2개의 이황화물 가교를 가지며, 분자량이 약 12.9 kDa이다. rIL-15 서열은 천연 분비 인간 IL-15 상에는 존재하지 않는 부가된 N-말단 메티오닌을 포함한다.

[0151] 반응성 선형 중합체 시약, mPEG-석신이미딜 부타노에이트, 40 kDa("mPEG-SBA"), CAS No. 187848-51-7은 하기 구조를 갖는다:



[0152]

[0153] 상기 식에서, n은 공칭 평균 분자량이 약 40 킬로달톤인 중합체를 제공하는 단량체 하위단위들의 평균수에 상응하며, 즉, 여기서 평균적으로 n은 약 907 내지 909이다. PEG 시약은 다분산도 값이 약 1.1 미만, 예를 들어 약 1.05이며, 이로써 공칭 평균 분자량은 약 37 킬로달톤 내지 약 45 킬로달톤(41 kD ± 4 kDa)의 범위가 된다. mPEGSBA는 통상적으로 백색 내지 황백색(off-white) 분말의 형태이다. 사용하기에 적합한 추가적인 mPEG-석신이미딜 부타노에이트 시약은 중량 평균 분자량이, 예를 들어 약 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 45 kD, 50 kD 또는 60 kD인 것들을 포함한다. 이러한 활성화된 중합체 시약은 IL-15의 아미노 기(예를 들어, 라이신 또는 N-말단)와 반응될 때, IL-15 모이어티와 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 사이에 안정한 아미드 결합을 형성하는 데 있어서 효과적이다.

[0154] 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15는, 예를 들어 하기 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(이는 본 명세서에서 MPBA-IL15로 지칭될 수 있음)는 단일 mPEG-N-부탄아미드 모이어티가 IL-15의 라이신에 또는 N-말단 알파 아민에 공유적으로 부착된 모노페길화 IL-15로 주로 이루어지고 소량의 디-페길화 및 더 고차의 페길화 IL-15 종(CAS 등록 번호 2361317-09-9)으로 된 분포이다. 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 추가의 특징이, 예를 들어 국제 특허 공개 번호 WO 2018/213341(이의 내용은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0155] 효력의 생물학적 검정: MPBA-IL15의 효력을 pSTAT5/총 STAT5 멀티플렉스(multiplexed) 검정(미국 메릴랜드주 소재의 Meso Scale Discovery)을 사용하여, IL-15 α 하위단위를 발현하는 뮤린 T 림프구 세포주인 CTLL-2 세포에서의 STAT5의 인산화에 의해 결정하였다. CTLL-2 세포 상에서의 수용체 결합 후에, 하류 세포 신호전달이 인산화를 통해 STAT5를 활성화시켜 유전자 발현을 촉진시켜 세포 증식을 유도한다. 효능 검정을 위하여, 리간드 결합 시에 수용체 하류 STAT5 신호전달 분자의 인산화를 평가하여 단기간에 생물학적 반응을 측정하였다.

[0156] 참조 물질, 검정 대조군, 및 시험 샘플을 검정 배지를 사용하여 10배의 최종 농도로 연속 희석시키고, 이어서 37℃/5% CO_2에서 10분간의 인큐베이션 동안 고정된 수의 세포에 적용하였다. 포스포-STAT5 및 총 STAT5를 포스포-STAT5/총 STAT5 멀티플렉스 검정(미국 메릴랜드주 소재의 Meso Scale Discovery)을 사용하여 측정하였다. 용량-의존적 % 인단백질 반응 곡선을 4-파라미터 모델을 사용하여 비선형 회귀 분석에 의해 생성하였다. 평행선 분석(parallel line analysis, PLA) 소프트웨어를 사용하여 평행성(parallelism), 회귀의 중요성을 평가하고, 동일한 플레이트 내의 참조 물질과 관련된 샘플의 상대 효능을 계산하였다.

[0157] 역상(reverse phase) HPLC를 사용하여 MPBA-IL15의 순도를 평가하였는데, 이는, HALO 단백질 C4 분석용, 25℃의 컬럼 온도, 1.0 mL/분의 유량, 및 물/아세토니트릴/트리플루오로아세트산(TFA)의 선형 구배를 사용하고, 214 nm에서의 자외선(UV) 검출을 사용하는 역상 HPLC에 의해 이루어졌다.

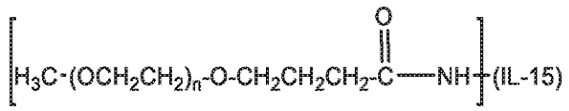
[0158] 크기 배제 HPLC를 사용하여 MPBA-IL15의 상대 순도를 평가하였는데, 이는 0.5 mL/분의 유량으로 25℃에서 작동하는 Shodex 단백질 KW-803 컬럼을 사용하여 이루어졌다. 214 nm에서의 UV 검출과 함께, 아세토니트릴 중 15 mM 인산나트륨(pH 7.2)을 사용하여 크로마토그래피 용리를 수행하였다.

[0159] 이온 교환 HPLC를 또한 사용하여 MPBA-IL15의 상대 순도를 평가하였는데, 이는 1.0 mL/분의 유량으로 40℃에서 작동하는 Agilent PL-SAX 컬럼을 사용하여 산성 및 염기성인 전하 변이체들을 분리함으로써 이루어졌다. NaCl: 이소프로필 알코올의 용액 및 214 nm에서의 UV 검출과 함께, 비스트리스 프로판(pH 6.8) : 이소프로필 알코올 및 비스트리스 프로판(pH 6.8)의 선형 구배를 사용하여 용리를 수행하였다.

[0160] **실시예 1**

[0161] **장시간 작용형 IL-15 수용체 효능제,**

[0162] **모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)$_{40KD}$인터류킨-15의 제조**

[0163] 

[0164] 제조예 1: rIL-15의 2.7 ml 용액(PBS 완충액(pH 7.4) 중 1.23 mg/ml)을 소형 반응 바이알에 옮겼다. 300 μl의 0.6M 붕산염 완충액(pH 8)을 첨가하여 pH를 pH 8까지 조정하였다. 질소 하에서 -20℃에서 저장된 mPEG-SBA, 40 kDa(공칭 평균 분자량)를 상온까지 가온하였다. (IL-15의 몰량 대비) 10배 과량의 mPEG-SBA-40K를 2 mM HCl 중에 용해시켜 10% PEG 시약 용액을 형성하였다. 10% PEG 시약 용액을 IL-15 용액에 신속하게 첨가하고, 충분히 혼합하였다. mPEG-SBA-40K의 첨가 후에, 반응 혼합물의 pH를 결정하고, 통상적인 기법을 사용하여 pH 8까지 조정하였다. (안정한 아미드 결합의 형성을 통한) IL-15에 대한 mPEG-SBA-40K의 커플링을 가능하게 하기 위하여, 반응 용액을 1.5시간 동안 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아두고서 실온에서의 접합을 촉진시켰다. 반응물을 글리신의 용액을 첨가함으로써 켄칭하였다.

[0165] 반응은 40%의 모노-접합체(즉, 단일 PEG 모이어티가 IL-15에 부착됨), 24%의 디-접합체(2개의 PEG가 IL-15에 부착됨) 및 6%의 트리-접합체(3개의 PEG가 IL-15에 부착됨) 종을 산출하였다. 대략 30%의 미반응된 IL-15가 반응 혼합물 중에 남아 있었지만, 반응 조건은 최적화되지 않았다.

[0166] Q Sepharose 고성능 컬럼을 사용하고 용리상으로서 인산나트륨 완충액을 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피로 모노-접합체를 분리/단리하였다. 정제된 모노-mPEG-SBA40K-IL-15 접합체(본 명세서에서 모노-mPEG-부탄아미드-40K-IL-15 또는 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)$_{40kD}$인터류킨-15, 또는 모노-mPEG$_{40K}$-C4-아미드-IL-15로도 지칭됨)를 HPLC 및 SDS-PAGE에 의해 특성화하였다. 실시예의 나머지 부분에 있어서, 정제된 모노-mPEG-SBA40K-IL-15는 접합체 1로 지칭된다.

[0167] SDS 겔에 의해 나타나는 바와 같이, 정제된 접합체는 고수준의 순도를 갖는 것으로 결정되었으며 검출 가능한 양의 미반응된 IL-15가 부재하였다. HPLC 플롯에 기초하여, 정제된 모노-mPEG-SBA-40K-IL-15 조성은 약 10%(몰량) 미만의 디- 또는 더 고차 수준의 접합체를 함유하였다.

[0168] 이러한 합성 접근법을 사용하여, 모노-mPEG-SBA-10K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-15K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-20K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-25K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-30K-IL-15; 모노-mPEG-SBA-45K-IL-15; 모노-mPEG-SBA-50K-IL-15; 및 모노-mPEG-SBA-60K-IL-15와 같은 접합체를 상이한 공칭 평균 분자량을 갖는(예를 들어, 공칭 평균 분자량이 각각 약 10 킬로달톤, 15 킬로달톤, 20 킬로달톤, 25 킬로달톤, 30 킬로달톤, 45 킬로달톤, 50 킬로달톤, 60 킬로달톤 등인) mPEG-SBA를 사용하여 제조한다.

[0169] 제조예 2: 완충액(50 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 10% 수크로스, pH 7.4) 중 rIL-15의 대략 2 mg/ml 용액을 2개의 상이한 반응 베셀(본 명세서에서 조성물 1 및 조성물 2로 지칭됨) 각각에 옮겼다. pH를 8.0까지 조정하기 위하여, pH 8의 붕산염 완충액(0.4M 또는 0.6M)을 첨가하였다. 2 mM HCl 중에 희석된 (IL-15의 몰량 대비) 10배 과량의 mPEG-SBA-40K(mPEG-SBA, 40 kDa)를 IL-15 용액 각각에 첨가하고, 충분히 혼합하였다. mPEG-SBA-40K의 첨가 후에, 반응 혼합물의 pH는 pH 8인 것으로 결정되거나, 필요하다면 추가의 붕산염 완충액을 사용함으로써 pH를 조정하였다. 반응물 중의 rIL-15의 최종 농도는 1 g/L를 목표로 하였으며, 필요하다면 추가의 희석제를 사용하였다(50 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 10% 수크로스를 함유하는 완충액(pH 7.4)을 조성물 1에 사용하였으며 물을 조성물 2에 사용하였음). mPEG-SBA-40K가 IL-15에 커플링할 수 있게 하기 위하여(즉, 주로 안정한 아미드 결합의 형성을 통해), 반응 용액을 45분 또는 60분 동안 혼합하여 각각 조성물 1 또는 조성물 2에 대한 실온에서의 접합을 촉진시켰다. 반응물을 30분 동안 pH 8.0에서 반응물에 초기에 첨가된 PEG의 몰량 대비 71배 과량의 글리신을 첨가함으로써 켄칭하였다. 조성물 1의 경우, 0.2 M 인산을 사용하여 pH 7.0까지 적정함으로써 pH를 조정하였다.

[0170] 생성된 조성물을 역상 HPLC(RP-HPLC), SDS-PAGE, 및 이온 교환 HPLC(IEX-HPLC)에 의해 특성화하였다. RP-HPLC 분석의 결과가 하기 표 1A에 제공되어 있다.

[0171] [표 1A]

	성분	평균 % 면적
조성물 1	IL-15	0.57
	모노-페길화 IL-15	82.66
	RRT1 = 피크 T1 (특성화되지 않음)	8.05
	RRT2 = 피크 T2 (특성화되지 않음)	5.17
	RRT3 = 피크 T3 (특성화되지 않음)	3.57
조성물 2	IL-15	0.36
	모노-페길화 IL-15	92.17
	RRT1 = 피크 T1 (특성화되지 않음)	2.26
	RRT2 = 피크 T2 (특성화되지 않음)	3.28
	RRT3 = 피크 T3 (특성화되지 않음)	1.93

[0172] RRT는 상대 체류 시간임.

[0173] SEC-HPLC 분석의 결과가 하기 표 1B에 제공되어 있다.

[0174] [표 1B]

	성분	평균 % 면적
조성물 1	HMW 종(트리-페길화 IL-15 또는 더 고차의 "고량체(highmer)")	5.56
	디-mPEG IL-15(디-페길화 IL-15)	15.46
	모노-mPEG IL-15(단량체)	78.98
조성물 2	HMW mPEG 종	5.25
	디-mPEG IL-15	6.62
	모노-mPEG IL-15	88.14

[0175] HMW = 3개 이상의 PEG가 인터류킨-15에 공유적으로 부착된 고분자량 mPEG-IL-15 접합체.

[0176] IEX-HPLC 분석의 결과가 하기 표 1B에 제공되어 있다.

[0177] [표 1C]

		평균 % 면적
조성물 1	염기성 영역	10.20
	주 피크	68.53
	산성 영역	21.29
조성물 2	염기성 영역	10.43
	주 피크	56.32
	산성 영역	33.26

[0178]

[0179] 제조된 조성물은 mPEG-SBA-40K 모노페길화 종을 주로 포함하였으며, 약 10 몰% 미만의 PEG 이량체(즉, 2개의 PEG 모이어티가 IL-15에 부착됨), 및 훨씬 더 낮은 양의 더 고차의 페길화 종(즉, 3개 이상의 PEG 모이어티가 IL-15에 부착됨)을 포함하였다. 달리 말하면, 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 조성은 일반적으로 (비변형된 IL-15 및 기타 다른 IL-15-함유 종, 예를 들어 디페길화 IL-15 및 더 고차의 IL-15를 포함한, 생성되는 조성물 내의 모든 인터류킨-15 종에 기초하여) 적어도 약 80 몰%의 모노페길화 IL-15 종을 가질 것이며, 바람직하게는 적어도 약 90 몰%의 모노페길화 IL-15 종 및 약 10 몰% 미만의 기타 다른 IL-15-함유 종을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15 조성은 약 5 몰% 미만의 PEG 이량체(디페길화 IL-15, 2개의 메톡시PEG-N-부탄아미드 모이어티가 IL-15에 공유 부착됨), 및 약 5 몰% 미만의 모든 다른 더 고차의 페길화 종을 포함한다.

[0180] 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 2개의 추가의 합성물을 제조하고 분석하였다. 분석 결과의 요약이 하기 표 1D에 제공되어 있다.

[0181] MPBA-IL15는 pH 6.8의 10 mM 인산칼륨, 260 mM 트레할로스 및 0.02% w/v 폴리소르베이트 20 중 (단백질 기준으로) 1 mg/mL의 농도로 MPBA-IL15를 함유하는 용액으로서 추가로 사용하기 위해 제형화될 수 있다.

[0182] [표 1D]

방법	분석물		로트 1	로트 2
RP-HPLC	주 피크	≥ 85%	98	97
	디-PEG	보고서 결과(%)	2	2.8
	유리 rhIL15	보고서 결과(%)	<1	0.57
SEC-HPLC	주 피크	≥ 90%	98	100
	디-PEG	보고서 결과(%)	2	<3
	HMW	보고서 결과(%)	ND	ND
IEX-HPLC	주 피크	≥ 60%	78	79
	염기성 영역	보고서 결과(%)	12	12.0
	산성 영역	보고서 결과(%)	10	8.7
유리 PEG RP-HPLC/ ELSD	≤5% wt/wt		0.9%	2% (1.57%)

약어: NT = 시험되지 않음; 디-PEG = 디페길화 종; HMW = 더 높은 분자량; ND = 미검출; LOQ = 정량 한계; NTU = 네펠로메트릭 탁도 단위

[0183]

[0184] 실시예 2

[0185] CAR T 세포의 인산화 및 증식에 대한 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 시험관내 연구

[0186] 시험관내에서의 인간 CD19 CAR T 세포에 대한 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 효과를 하기에 기재된 바와 같이 조사하였다.

[0187] 시험관내 연구를 위하여, CAR T 세포를 CD19 항원과 함께 그리고 이것 없이 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(0 내지 100 ng/mL)와 함께 인큐베이션하였다. STAT5 인산화 및 CFSE 희석을 유세포측정법에 의해 평가하였다.

[0188] IL15Rα 발현을 유세포측정법에 의해 측정하였으며, CD8 CAR T 세포에 대해서는 도 3a에 나타낸 바와 같고(CD8, 녹색 실선, 맨 우측), CD4 CAR T 세포에 대해서는 도 3b에 나타낸 바와 같다(CD4, 청색 실선, 맨 우측). 또한, FMO(회색으로 채워진 것) 및 동종형(파선) 대조군이 각각의 도면에 나타나 있다. CD8 및 CD4 CAR T 세포는 IL-15Rα를 발현한다.

[0189] CD8 CAR T 세포 및 CD4 CAR T 세포 둘 모두에 대해 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)에 반응하는 STAT5의 용량 의존적 인산화가 도 3c 및 도 3d에 각각 나타나 있다. CAR T 세포를 20분 동안 다양한 농도의 MPBA-IL15 또는 IL-15로 자극하였다. STAT-5 인산화 검정에서 IL-15 또는 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15 중 어느 하나에 반응하는 CD8 및 CD4 CAR T 세포에 대한 EC_{50} 값(ng/ml)이 하기에 요약되어 있다:

[0190] **[표 2]**

[0191]

STAT-5 인산화	EC50, ng/ml MPBA-IL15	EC50, ng/ml IL-15
CD8 CAR T 세포	0.96	0.13
CD4 CAR T 세포	0.84	0.16

[0192] CFSE로 표지되고 다양한 농도의 MPBA-IL15 또는 IL-15와 함께 4일 동안 인큐베이션된 CAR T 세포의 증식을 또한 유세포측정법에 의해 검정하였다. 결과가 도 3e(CD8 CAR T 세포) 및 도 3f(CD4 CAR T 세포)에 나타나 있다. EC50 값이 하기에 요약되어 있다.

[0193] **[표 3]**

[0194]

증식	EC50, ng/ml MPBA-IL15	EC50, ng/ml IL-15
CD8 CAR T 세포	36.82	2.76
CD4 CAR T 세포	48.78	4.88

[0195] 도 3c, 도 3d, 도 3e, 및 도 3f에 대하여, 정사각형은 IL-15에 상응하고, 원은 MPBA-IL15에 상응한다.

[0196] 전술된 바와 같이, 시험관내에서, 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15는 용량-의존적 방식으로 CD8 및 CD4 CD 19 CAR T 세포 둘 모두의 STAT5 인산화 및 항원-의존성 증식을 유도한다.

[0197] **실시예 3**

[0198] **전임상 뮤린 림프종 모델에서 CD19 CAR T 세포 면역요법의 효능에 대한 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 연구**

[0199] 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(예를 들어, 상기 실시예 1에 기재된 것)는 IL-15Rα에 대한 결합 친화도를 보유하고 감소된 제거율을 나타내어서, 지속적인 약력학적 반응을 제공한다. 생체내 이종 B 세포 림프종 모델에서의 인간 CD19 CAR T 세포에 대한 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 효과를 하기에 기재된 바와 같이 실험에서 조사하였다.

[0200] 일반적 방법: 생체내 연구를 위하여, NSG 마우스는 반딧불이(firefly) 루시퍼라제를 발현하도록 안정하게 형질도입된 5 x 10^5개의 Raji 림프종 세포를 일차(D)-7에서 정맥내 제공받은 후, D0에서 단독으로 또는 D-1, 7, 또는 14에서 출발하여 매주 투여되는 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(0.03, 0.10 또는 0.30 mg/kg이 정맥내 주입됨)와 병용하여 아-치료적(sub-therapeutic) 용량(0.8 x 10^6개)의 CAR T 세포(1:1 CD4:CD8)의 주입을 제공받았다. 무종양 마우스에 D38에서 Raji 세포를 재시험투여하였다. 마우스의 생물발광 이미징에 의해 종양을 매주 평가하였다. 결과가 도 10에 예시되어 있다.

[0201] 도 4a(다양한 처리군에 대한 평균 종양 방사휘도 vs. CAR T 세포 투여 후 일수)에 나타낸 바와 같이, CAR T 세포와 병용된 0.10 mg/kg 및 0.30 mg/kg의 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15에 의한 처리는 단독으로의 CAR T 세포 요법과 대비하여 NSG 마우스에서의 감소된 종양 부하 및 Raji 림프종의 근절로 이어진다. 이 연구(연구 A)에서, Raji-보유 NSG 마우스는 D0에서 아-치료적 용량의 CAR T 세포를 제공받은 후, D6에서 출발하여

그리고 이후에 매주(D13, D20, D27, D33 등) 0.030, 0.10 또는 0.30 mg/kg의 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15를 제공받았다. 치료 계획이 도 4b에 예시되어 있다.

[0202] 추가의 연구(연구 B)에서, Raji-보유 NSG 마우스는 D0에서 CAR T 세포 주입을 제공받았으며; 0.30 mg/kg의 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15를 D-1, D7 또는 D14에, 그리고 이후에 매주 투여받았다(5마리의 마우스/군). 도 7b를 참조한다. 마우스를 매주 채혈하고, CD8 및 CD4 CAR T 세포를 유세포측정법에 의해 확인하였다(각각 도 5a 및 도 5b). 종양 부하를 도 6에 나타낸 바와 같은 매주 생물발광 이미징(평균 종양 방사휘도 vs. CAR T 세포 투여 후 일수) 및 생존율(도 7a)에 의해 평가하였다.

[0203] 이러한 전임상 연구의 결과는 CAR T 세포와 병용된 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15가 Raji 림프종 보유 NSG 마우스의 혈액 중 증가된 CAR T 세포, 감소된 종양 부하 및 증가된 생존율을 가져온다는 것을 추가로 나타내었다.

[0204] 연구 A의 0.30 mg/kg 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15 투여량군 내의 마우스에 대해서는, 마우스를 CAR T 세포 주입 후 D8, 11, 14, 21 및 28에서 안락사시켰다. 골수 및 CAR T 세포로부터 단세포 현탁액을 제조하였으며; CD8 CAR T 세포 및 CD4 CAR T 세포 현탁액에 대해 각각 총 세포수(도 8a, 도 9a), Ki67 발현(도 8b, 도 9b), PD1 및 TIM3 발현(도 8c, 도 9c)을 유세포측정법에 의해 평가하였다. 그래프는 평균 ± SEM을 나타낸다.

[0205] 도 8a 및 도 9a에 나타낸 바와 같이, 예시적인 병용 면역요법에 의해 처리된 마우스는 골수 내의 CAR T 세포의 절대수의 증가를 갖는다. MPBA-IL-15와 병용된 CAR T 세포 요법은 Raji-보유 마우스의 골수 내의 CAR T 세포의 축적 및 증식의 증가 및 PD1 및 TIM3의 장기간 이중 발현의 감소를 가져왔다(도 8c, 도 9c).

[0206] 생체내에서, D-1, 7 또는 14에서 출발하는 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 주입은 혈액 중 피크 CAR T 세포수를 증가시켰다. CAR T 세포 및 D7에서 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15를 제공받은 마우스에서는 D14까지 골수로부터 Raji 세포가 제거되었지만(특히, 0.30 mg/kg 투여량군 참조), CAR T 세포를 단독으로 제공받은 마우스에서는 그렇지 않았다. CAR T 세포 또는 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15를 단독으로 제공받은 마우스와 대비하여 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15와 함께 CAR T 세포를 제공받은 마우스에서 월등한 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15 용량-의존적 종양 제어 및 생존율이 관찰되었다. 어떠한 방식으로든 제한하고자 하지 않지만, 이 실험 세트에 기초하여 이러한 전임상 모델에서의 병용 요법의 이익은 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 투여가 약 D7까지 개시되었을 때 더 큰 것으로 나타났다. 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15-처리된 마우스 내의 잔류 CAR T 세포는 CAR T 세포 주입 후 5주 넘어서 투여되는 Raji 종양 세포의 재시험투여를 거부하였다.

[0207] 이 림프종 모델에서, 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15 투여는 투여된 CD19 CAR T 세포의 항종양 효능 및 동태(kinetics)를 개선하는 것으로 밝혀졌다. 더 구체적으로는, 단독으로의 CAR T 세포와 대비하여 월등한 효능을 나타내는, CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 병용물은 종양 부하를 중요하게 감소시키고 지속적인 종양 제어를 발휘하였으며, 일부 경우에는, NSG 마우스에서 Raji 림프종을 근절시켰다. 대조적으로, CAR T 세포 단제요법군에서는 종양 진행이 관찰되었다. 도 4a를 참조한다.

[0208] 더 구체적으로는, 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(0.03 mg/kg)/CAR T 세포-처리된 마우스는 100%가 종양 주사 후 70일차에 생존한 반면, 이와 대비하여, 비히클 대조군을 제공받은 마우스는 14일차까지 생존하지 못하였으며, CAR T 세포로 단독으로 처리된 마우스는 59일차까지 생존하지 못하였다. 0.30 mg/kg의 용량의 MPBA-IL15로 처리된 마우스에 대한 결과가 도 4a(생물발광 이미징 결과) 및 도 7a(생존율)에 나타나 있다. 더욱이, 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15 및 CAR T 세포로 이전에 처리된 마우스는 Raji 종양 재시험투여를 거부할 수 있었는데, 이는 CAR T 세포 지속성 및 잠재적으로 장기간의 기억 CAR T 형성을 지지하며; 현저한 결과가 도 10에 나타나 있으며, CAR-T 세포 요법과 병용하여 투여될 때 장기간 작용형 인터류킨-15 효능제, 예컨대 MPBA-IL-15가 종양 부하를 중요하게 감소시킬 뿐만 아니라 Raji-림프종을 근절시키는 능력을 예시한다.

[0209] **실시예 4**

[0210] **전임상 뮤린 ROR1 폐종양 모델에서 ROR1 CAR T 세포 면역요법의 효능에 대한 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 연구**

[0211] $Kras^{LSL-G12D/+}p53^{f/f}$ 마우스의 코호트(군당 마리수 n = 5 또는 6)를 3 x 10^4 pfu의 Cre-ffluc-hROR1 렌티바이러스로 기관내 감염시켜 $ROR1^+$ 폐종양의 발생을 유도하였다. 감염 후 12주차 및 15주차에, 마우스를 림프구고갈을

위하여 100 mg/kg의 사이클로포스파미드로 처리하고, 6 x 10^6개의 ROR1 CAR T 세포 또는 대조 T 세포(1:1 비의 CD8:CD4)를 정맥내로 입양 이식하였다. ROR1(수용체 티로신 키나제-유사 고아 수용체 1)은 비소세포 폐암(NSCLC) 및 삼중 음성 유방암(TNBC)의 하위세트를 포함한 다수의 악성종양에서 발현된다. 마우스는 8일 동안 격일로 5 x 10^4 IU의 IL-2를 복막내로 제공받아서 이식된 T 세포의 생착을 지지하였다. T 세포 이식 당일에 시작하여, 마우스의 하위세트를 매 7일마다 0.33 mg/kg의 MPBA-IL15로 정맥내 처리하였다. 전임상 처리 프로토콜이 도 11에 나타나 있다.

[0212] 전체 폐에 걸쳐 일련의 1 mm 이미지를 획득하고 모든 이미지에 걸쳐 종양 면적을 합산하여 종양 부피를 정량함으로써 종양 부하를 정량하였다. 감염 후 17주차에, 모든 마우스를 안락사시키고, 폐 전체를 유세포측정법 및 면역조직화학에 의해 분석하였다. 순환 내의 오염 세포(contaminating cell)와 폐종양-침윤 세포를 구별하기 위하여, PE-접합된 항-CD45 항체를 안락사 5분 전에 마우스에 정맥내 주사하여 순환 내의 모든 면역 세포를 표지하여, 비혈관성 폐 실질 세포로서의 PE^- 세포의 규정을 가능하게 하였다. 폐를 종양으로의 CD8a 및 CD8 침윤에 대해 IHC 염색에 의해 분석하였으며; HALO 소프트웨어를 사용하여 염색을 정량하였다.

[0213] 결과가 도 12a(다양한 처리군 내의 마우스에 대한 종양 부피의 % 변화: 대조 T 세포(직사각형), 대조 T 세포 및 MPBA-IL15(▲), ROR1 CAR T 세포(▼), 및 ROR1 CAR T 세포 및 MPBA-IL15(◆)); 도 12b(종양 부피의 % 변화 vs. ROR1 CAR T 세포 단제요법으로 처리된 개별 마우스에 대한 감염후 주수(군에 대해서는 18.5% 퇴행)); 도 12c(종양 부피의 % 변화 vs. ROR1 CAR T 세포 및 MPBA-IL-15 이중 병용 요법으로 처리된 개별 마우스에 대한 감염후 주수(군에 대해서는 44.4% 퇴행)); 도 13a(다양한 처리군에 대하여, 비장 및 종양 각각에 대해 그 안에 살아있는 세포의 백분율로 표현된 CD8 CAR T 세포 빈도); 도 13b(다양한 처리군에 대하여, 비장 및 종양 각각에 대해 그 안에 살아있는 세포의 백분율로 표현된 CD8 세포 빈도); 및 도 14a, 도 14b, 도 14c, 및 도 14d(IHC 염색은 예시적인 장기간 작용형 IL-15 효능제인 MPBA-IL-15가 이러한 전임상 ROR1 폐암 모델에서의 폐에서 ROR1 CAR T 세포 트래픽킹(trafficking)을 증강시킴을 예시함)에 나타나 있다.

[0214] 전술한 실시예들은 MPBA-IL15의 투여가 암을 갖는 대상체의 치료에서 CD19 CAR T 세포의 항종양 효능 및 동태를 중요하게 개선하고, 암성 폐조직에서의 ROR1 CAR T 세포 트래픽킹 및 지속성을 증강시키며; 이로써 본 발명은 CAR T 세포 요법을 장기간 작용형 IL-15 효능제, 예컨대 MPBA-IL15와 병용 투여함으로써 암을 갖는 환자를 치료하기 위한 새롭고 특유하게 유리한 면역요법 접근법을 제공함을 예시한다.

[0215] **실시예 5**

[0216] **시험관내에서 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 CAR-T 세포수 및 세포내 단백질 발현**

[0217] CD8 CAR T 세포를 건강한 공여자로부터 발생시켰다. 15일차에서, CAR T 세포를 방사선 조사된 K562-$CD19^+$ 또는 K562-$CD19^-$ 세포와 공동배양하였다. 세포를 비처리하거나 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml의 농도의) 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15로 처리하였다. IFNɣ 및 TNFα 생성을 공동배양 후 24시간째에 Luminex에 의해 검정하였다. CAR T 세포수, 및 bcl-2 및 활성화 카스파제 3의 세포내 발현을 공동배양 5일 후에 결정하였다. bcl-2 및 활성화 카스파제 3의 발현은 유세포측정법에 의해 결정하였다. 결과가 도 15a, 도 15b 및 도 16a 내지 도 16c에 나타나 있다.

[0218] 도 15a는 방사선 조사된 K562-$CD19^+$ 또는 K562-$CD19^-$ 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 IFNɣ의 발현(단위: pg/ml)을 제공한다.

[0219] 도 15b는 방사선 조사된 K562-$CD19^+$ 또는 K562-$CD19^-$ 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 TNFα의 발현(단위: pg/ml)을 제공한다.

[0220] 도 16a는 방사선 조사된 K562-$CD19^+$ 또는 K562-$CD19^-$ 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에 대한 (배수 증폭으로서의) CAR T-세포 증폭을 예시한다.

[0221] 도 16b 및 도 16c는 방사선 조사된 K562-CD19^{+} 또는 K562-CD19^{-} 세포와 공동배양되고, MPBA-IL15로 비처리되거나 1 ng/ml, 10 ng/ml, 또는 30 ng/ml 농도의 MPBA-IL15로 처리된 CD8 CAR T 세포에서의 bcl-2(bcl-2 MFI로) 및 활성화 카스파제 3(% 카스파제 3^{+}로서)의 발현을 각각 제공한다.

[0222] 이들 결과로부터, 시험관내에서 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15에 의한 CAR T 세포의 처리는 항원-특이적 CD8 CAR T 세포 생성 및 증폭을 증가시키고, 생존율을 향상시킴을 알 수 있다.

[0223] **실시예 6**

[0224] **전임상 뮤린 림프종 모델에서 CAR T 세포와 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 병용물의 투여 후 CAR T 세포에서의 단백질 발현**

[0225] NSG 마우스는 Raji 림프종 세포를 D-7에서, CAR-T 세포를 D0에서 제공받고, D7에서 출발하여 그리고 상기 실시예 3에 더 상세히 기재된 바와 같이 매주 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(0.3 mg/kg)의 주사를 제공받았다. CAR T 세포 주입 후 D8, D11, D14, D21 및 D28에서 마우스를 안락사시켰다. 골수(마우스당 대퇴골 2군데 및 경골 2군데) 유래의 단세포 현탁액을 제조하였다. 단백질 발현(bcl-2, CD45RA 및 CCR7)을 유세포측정법에 의해 검정하였다.

[0226] CD8 CAR T 세포(도 17a) 및 CD4 CAR T 세포(도 17b) 둘 모두에 대하여 주입 후 D8에서 결정된 바와 같은 CAR T 세포에서의 Bcl-2 발현이 히스토그램으로 나타나 있다(회색 = CAR T 세포만 투여된 마우스, 적색 및 청색 = CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스).

[0227] CD8 CAR T 세포(도 18a) 및 CD4 CAR T 세포(도 18b) 둘 모두에 대하여 주입 후 D8에서 결정된 바와 같은 CAR T 세포에서의 Bcl-2 발현이 또한 막대 그래프로 나타나 있다(흑색 = CAR T 세포만 투여된 마우스, 적색 = CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스).

[0228] CAR T 세포에서의 기억 마커 CD45RA 및 CCR7의 발현이 도 19a 내지 도 19d에 예시되어 있으며, 도 19a는 CAR T 세포만이 투여된 마우스의 CD8 CAR T 세포에서의 단백질 발현에 관한 것이며; 도 19b는 CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스의 CD8 CAR T 세포에서의 단백질 발현에 관한 것이며; 도 19c는 CAR T 세포만이 투여된 마우스의 CD4 CAR T 세포에서의 단백질 발현에 관한 것이며; 도 19d는 CAR T 세포 및 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)가 투여된 마우스의 CD4 CAR T 세포에서의 단백질 발현에 관한 것이며, 여기서는 CD5RA^{-}CCR7^{-}(주황색), CD5RA^{+}CCR7^{-}(녹색), 및 CD5RA^{-}CCR7^{+}(적색)에 대한 발현 데이터가 제공된다. 그래프는 평균 ± SEM을 나타낸다.

[0229] 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)로 처리된 CAR-T 세포, 및 CAR-T 세포 요법 및 MPBA-IL15의 병용물로 처리된 마우스로부터 회수된 CAR-T 세포는 시험관내 및 생체내 둘 모두에서 증가된 증식 및 생존율을 입증하는데, 이는 부분적으로 bcl-2의 증가된 발현에 기인할 수 있다.

[0230] **실시예 7**

[0231] **임상 연구**

[0232] **B 세포 비호지킨 림프종을 갖는 환자에서 CD19-유도 CAR-T 요법과 병용된 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15의 1b/2상, 오픈-라벨, 다시설, 용량 점증 및 용량 증량 연구**

[0233] 이는 미만성 림프구성 B 세포 림프종(DLBCL)을 갖는 환자에서 CD19^{+}CAR-T와 병용된 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)인터류킨-15(MPBA-IL15)의 1b/2상, 오픈-라벨, 다시설, 용량 점증 및 용량 증량 연구이다. 이 연구는 스크리닝 기간, 치료 기간, 치료 종료(eot) 기간, 및 장기간 추적관찰 기간으로 세분된다.

[0234] 용량군 1에서의 MPBA-IL-15 출발 용량은 1.5 μg/kg이 될 것이다. 환자는 사이클 1의 1일차에서 출발하여 21일 사이클에서 IV MPBA-IL-15를 제공받을 것이다.

[0235] MPBA-IL-15 약물 제품은 멸균성의 백색 내지 황백색의 동결건조된 분말로서 제공된다. MPBA-IL-15 약물 제품은 대략 1.0 mg/mL의 재조합 인간 IL-15(rhIL-15)와 함께 pH 6.8에서 10 mM 인산칼륨, 260 mM 트레할로스, 0.02%(w/v) 폴리소르베이트 20 중에 제형화된다. MPBA-IL-15 약물 제품의 각각의 바이알은 1.1 mg의 rhIL-15 등가량을 함유한다. 이는 0.1 mg의 과충전량(overfill)을 포함하여, 재구성 후 1.0 mg의 라벨 요청량의 일관된 인출을 보장한다.

[0236] **치료 지속기간**

[0237] **용량 점증(1b상):** 안전성 선정 기준을 충족시키는 2개의 구매 가능한 CD19 유도 키메라 항원 수용체 T 세포(CD19 CAR-T, Kymriah™(티사젠레클류셀) 또는 Yescarta®(악시캅타겐 실로류셀)) 요법 중 하나를 제공받은 환자들은 정맥내(IV) MPBA-IL-15를 제공받을 것이다. 용량 점증 동안, MPBA-IL-15가 (배정된 코호트에 따라) CD19 CAR-T 주입의 단회 용량 후 대략 14일차 또는 7일차에 환자들에게 제공될 것이다. MPBA-IL-15에 의한 치료는 매 21일마다(즉, 매 3주마다[q3w]) 최대 8회 사이클(6개월)까지 또는 질병 진행의 증거, 허용 불가능한 독성, 환자 철회, 연구자 재량, 또는 연구 종단에 대한 스폰서 결정이 있을 때까지 실시될 것이다. 연구자의 판단에 기초하여 임상 이득을 나타내고 있는 환자는 의료 모니터 요원 승인에 의한 치료를 계속할 수 있다.

[0238] **용량 증량(2상):** CD19 CAR-T 제품들 중 어느 하나와 함께 MPBA-IL-15의 권장된 2상 용량(RP2D)의 결정 후에, RP2D 용량은 2상 동안 증량 코호트에서 추가로 연구될 것이다. MPBA-IL-15에 의한 치료는 매 21일마다(즉, 매 3주마다) 최대 8회 사이클(6개월)까지 또는 질병 진행의 증거, 허용 불가능한 독성, 환자 철회, 연구자 재량, 또는 연구 종단에 대한 스폰서 결정이 있을 때까지 실시될 것이다. 연구자의 판단에 기초하여 임상 이득을 나타내고 있는 환자는 의료 모니터 요원 승인에 의한 치료를 계속할 수 있다.

[0239] **1차 목적:**

[0240] 1b상:

[0241] (i) CD19 CAR-T 요법 후 MPBA-IL-15의 안전성 및 내약성을 평가하기 위함

[0242] (ii) CD19 CAR-T 투여 후 MPBA-IL-15의 최대 내약 용량(들)(MTD) 또는 RP2D 및 최적 투여 기간을 규정하기 위함

[0243] 2상:

[0244] 루가노 분류(Lugano Classification)에 기초하여 6개월차에 완전 반응률(CRR)을 평가함으로써 CD19 CAR-T 요법 후 MPBA-IL-15의 효능을 평가하기 위함(Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, *et al.* Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. *J Clin Oncol*. 2014;32(27):3059)

[0245] **2차 목적:**

[0246] 1b상 및 2상:

[0247] (i) CD19 CAR-T 요법과 병용된 MPBA-IL-15의 전체 반응률(ORR)을 평가하기 위함

[0248] (ii) CD19 CAR-T 요법과 병용된 MPBA-IL-15의 무진행 생존율(PFS)을 평가하기 위함

[0249] (iii) CD19 CAR-T 요법과 병용된 MPBA-IL-15의 전체 생존율(OS)을 평가하기 위함(2상만)

[0250] (iv) CD19 CAR-T 요법과 병용된 MPBA-IL-15의 반응의 지속기간(DOR)을 평가하기 위함

[0251] (v) CD19 CAR-T 요법과 병용된 NKTR-255의 약동학적 특성(PK)을 특성화하기 위함

[0252] (vi) CD19 CAR-T 요법과 병용된 NKTR 255의 약력학적(PD) 효과를 특성화하기 위함

[0253] (vii) 입양 이식된 T 세포 및 지속적인 T 세포의 표현형의 생체내 지속성의 지속기간을 포함한, CD19 CAR-T 세포의 PD 효과를 평가하기 위함

[0254] (viii) MPBA-IL-15의 면역원성을 평가하기 위함

[0255] **탐구 목적:**

[0256] (i) CD19 CAR-T 요법과 병용된 MPBA-IL-15의 무사건 생존율(EFS)을 평가하기 위함

[0257] (ii) 종양 및 혈액 중의 면역 세포와 항종양 활성 사이의 연관성을 평가하기 위함

[0258] (iii) 생체내에서 골수 또는 기타 다른 종양 부위 및 기능에 대한 입양 이식된 T 세포의 트래픽킹을 평가하기 위함

[0259] (iv) 기저선으로부터 사이토카인 수준 및 면역 세포 집단의 변화를 특성화하기 위함

[0260] **연구 집단:** 2가지 이상의 전신 요법 후에, 특정 불능의 미만성 림프구성 B 세포 림프종(DLBCL), 원발성 종격 대 B 세포 림프종(PMBCL; Yescarta만 투여), 고분화도 B 세포 림프종, 및 여포성 림프종으로부터 발생되는 DLBCL을 포함한 재발성/불응성(R/R) B 세포 비호지킨 림프종(B-NHL)을 치료하기 위하여 CD19 CAR-T 세포를 제공받은 18세 이상의 성인.

[0261] **환자수(계획):**

[0262] 1b상: 대략 55명의 환자가 등록될 것임

[0263] 2상: 대략 60명의 환자가 등록될 것임

[0264] **연구 현장의 수:**

[0265] 1b상: 대략 5곳의 북아메리카 현장

[0266] 2상: 대략 5곳의 북아메리카 현장

[0267] **연구 설계:**

[0268] 이 연구는 용량 점증(1b상) 및 용량 증량(2상) 부분으로 이루어진 1b/2상, 오픈-라벨, 다시설 연구이다.

[0269] **1b상(용량 점증)**

[0270] 안전성 선정 기준을 충족시키는 US FDA-승인 CD19 CAR-T 세포(Yescarta 또는 Kymriah)를 제공받은 환자들은 (배정된 코호트에 따라) CD19 CAR-T 주입의 단회 처리 후 대략 14일차 또는 7일차에 출발하여 IV MPBA-IL-15 q3w를 제공받을 것일 것이다. 용량 점증(1b상) 동안, 최대 5개의 코호트까지, 적어도 3명의 환자 각각에게는 CD19 CAR-T 세포 주입 후에 점증 용량의 MPBA-IL-15가 제공될 것이다. CD19 CAR-T와 함께 MPBA-IL-15에 대한 샘플 용량 점증 계획이 하기 표에 제공되어 있다. 각각의 MPBA-IL-15 점증 용량 코호트의 첫 번째 환자(감시(sentinel) 환자)는 동일한 코호트 내의 추가의 환자에게 투여되기 전에 MPBA-IL-15의 최초 투여 후 21일 동안 안전성 및 내약성에 대해 모니터링될 것이다.

[0271] **[표 4] MPBA-IL-15에 대한 샘플 용량 수준(1b상)***

MPBA-IL-15 용량 수준	MPBA-IL-15 용량
용량 수준 -2	*0.375 μg/kg*
용량 수준 -1	*0.75 μg/kg*
용량 수준 1 **(출발 용량)	**1.5 μg/kg**
용량 수준 2	3 μg/kg
용량 수준 3	4.5 μg/kg
용량 수준 4	6 μg/kg
용량 수준 5***	9 μg/kg

q3w: 매 3주마다

* 코호트 1 용량을 제외하고, 후속 코호트들에 대한 용량 수준은 임상 관찰에 기초하여 조정될 수 있다. 용량 점증은 MPBA-IL-15의 이전 용량을 2배로 초과하지 않을 것이다.

** 용량 제한 독성이 출발 용량에서 관찰된다면, MPBA-IL-15는 용량 수준 -1에 나타낸 바와 같이 점감될 수 있다.

*** 추가의 코호트(들) 또는 용량 수준은 안전성/PK 데이터의 검토 및 스폰서 의료 모니터 요원과 연구책임자 사이의 동의 후에 등록될 수 있다.

[0272]

[0273] MPBA-IL-15는 초기에 Yescarta 요법으로 출발하여 순차적 병용에서 시험될 것이다. 이 시험은 Yescarta 주입 후 14일차에 투여되는, 1.5 μg/kg IV의 MPBA-IL-15 출발 용량으로 개시될 것이다(코호트 A). Yescarta 후 14일(±3일)차에 투여되는 MPBA-IL-15(코호트 A)의 3개의 용량 수준에서의 안전성 및 내약성의 확립 후에, 다음 코호트인 Kymriah(CAR-T 주입 후 14일차; 코호트 B) 및 Yescarta(CAR-T 주입 후 7일차, 코호트 C)가 확인된 안전한 용량 수준으로 병렬로 개시될 것이다. 7일 계획이 출발 용량 수준에서 안전성 또는 내약성 문제가 관찰되었다면, 시험된 용량은 직전에 시험된 용량까지 점감될 수 있다. 7일 계획은 14일 계획에서의 각각의 개별 제품의

관찰된 안전성 및 내약성에 기초할 것이다. 용량 점증은 오로지 MTD 또는 RP2D가 확립될 때까지 7일 계획으로 MPBA-IL-15에 대해 계속할 것이다. 7일 계획이 내약성을 나타내지 않는 것으로 확인되면, 14일 계획에서의 MPBA-IL-15 용량 점증이 재개될 수 있다.

[0274] EWOC(escalation with overdose control, 과다용량 제어를 갖는 점증) 원칙을 사용하는 2-파라미터 베이즈 로지스틱 회귀 모델(Bayesian logistic regression model, BLRM)(Neuenschwander B, Branson M, Gsponer T. Critical aspects of the Bayesian approach to phase I cancer trials. *Stat Med.* 2008 Jun 15;27(13):2420-39)이 용량 수준 선택을 위하여 그리고 MTD의 결정을 위하여 이 연구의 점증 단계 동안 사용될 것이다. MTD는 적어도 6명의 환자가 소정 용량에서 평가되었고 목표 독성의 사후 확률이 그러한 용량에 대해 적어도 70%일 때 선언될 것이다. MTD는 섹션 5.8에 요약된 기준에 기초하여 결정될 것이다. MTD를 추가로 조사하기 위하여, 추가의 코호트들이 또한 오픈될 수 있다.

[0275] CD19 CAR-T와 병용된 MPBA-IL-15의 RP2D는 용량 점증으로부터의 최종 권장사항을 초과하지 않는 용량으로 선택될 것이며, MPBA-IL-15의 안전성, PK, PD, 및 최적의 생물학적 반응에 대한 모든 이용 가능한 데이터의 검토에 기초할 것이다. RP2D를 정교하게 하기 위하여 추가의 환자들이 등록될 수 있으며, 선택된 RP2D로 투여된 (용량 점증으로부터의 임의의 환자를 포함하여) 최대 6명의 환자는 RP2D를 결정하도록 요구될 것이다.

[0276] 1b상 동안 용량 점증에 관한 추가의 규칙은 하기와 같다:

[0277] - 환자내(intra-patient) 용량 점증은 허용되지 않을 것이다.

[0278] - MPBA-IL-15의 점증 용량을 갖는 새로운 코호트 내로의 등록은 이전 코호트 내의 마지막 환자의 최초 MPBA-IL-15 투여 이래로 용량 제한 독성(DLT) 창이 경과될 때까지 시작될 수 없다. DLT 창은 MPBA-IL-15 투여 후 21일차이다.

[0279] - 더 높은 용량으로의 점증은 FIH 연구(MPBA-IL-15-002)에서 그러한 용량 경험이 있는 경우에만 일어날 것이다.

[0280] - 용량 점증 코호트의 경우, 스폰서 의료 모니터 요원과 안전성 검토 위원회(Safety Review Committee, SRC)는 공동으로 다음 코호트로의 용량 점증 오픈 전에 안전성을 평가할 것이다.

[0281] - 주어진 코호트에 대한 MPBA-IL-15의 용량 수준은 시험된 이전 용량 수준에서 관찰되는 독성의 중증도, 지속시간, 및 빈도에 따라 감소될 수 있다.

[0282] CD19 CAR-T 주입에 후속되는 MPBA-IL-15의 RP2D를 선언하기 위한 결정은 MTD에 도달하지 않는 상태에서의 안전성, PK, PD 또는 최적의 생물학적 반응에 기초하여 출발 당일에 또는 임의의 주어진 용량 수준에서 일어날 수 있다.

[0283] **2상(용량 증량)**

[0284] 이 연구의 2상에서는, 일단 각각의 개별 CD19 CAR-T 제품에 대한 RP2D가 확립되면, 용량 증량 코호트 내로의 등록이 개시될 것이다. 2상을 위한 특정 CD19 CAR-T 제품 및 일정의 선택에 대한 결정은 1b상에서 CAR-T 주입에 후속되는 MPBA-IL-15의 안전성, PK, PD, 및 최적의 생물학적 반응에 대한 모든 이용 가능한 데이터의 검토에 기초할 것이다. 환자들은 CD19 CAR-T 주입 후 14일차 또는 7일차에 1b상에서 결정된 RP2D 및 일정에서 IV MPBA-IL-15를 제공받을 것이다. MPBA-IL-15에 의한 치료는 최대 8회 사이클(6개월) 동안 매 21일마다(즉, 매 3주마다) 반복될 것이다.

[0285] **주요 적격성 기준**

[0286] 적격성은 CD19 CAR-T 세포 제조를 위한 백혈구성분채집술(leukapheresis) 전 1개월 이내에 결정될 것이다. 집약적인 브리징 화학요법 또는 방사선 요법이 투여된다면, 적격성 기준은 림프구고갈 전에 재평가되어야 한다.

[0287] ● 사전동의서 용지(ICF)에 서명한 당일에 18세 이상의 남성 또는 여성 환자

[0288] ● 시판 CD19 CAR-T 세포 요법에 적격함

[0289] ● 특정 불능의 DLBCL, PMBCL(Yescarta만 투여), 고분화도 B 세포 림프종; 및 여포성 림프종으로부터 발생되는 DLBCL을 포함한 B-NHL의 확인된 진단

[0290] ● 안트라사이클린을 포함한 2가지 이상의 요법 후에 검출 가능한 질병으로서 정의되고 자가 조혈 줄기 세포 이식(ASCT)에 실패하였거나 ASCT에 부적격하거나 ASCT에 동의하지 않는 재발성 또는 불응성(R/R) 질병

[0291] ● 적어도 1개의 치수가 1.5 cm 이상으로서 정확하게 측정될 수 있는, 루가노 분류(Cheson, 2014, 상기 참조)에 의한 측정 가능한 플루오로데옥시글루코스(FDG) 친화(FDG-avid) 림프절 및/또는 림프절외 질병

[0292] ● 기대 수명 > 30일

[0293] ● 하기로 정의된 바와 같은 허용 가능한 기관 기능:

[0294] o 실내 공기에서 등급 1 이하의 호흡곤란 및 92% 이상의 산소 포화도로 정의된 충분한 폐 기능. 이들 파라미터가 충족되지 않는다면, 치료담당 의사의 재량으로, 폐 기능 시험(PFT)에 대해 FEV1이 예측치의 50% 이상이고, 일산화탄소에 대한 폐의 확산 능력(DLCO; 보정됨)이 예측치의 40% 이상인 환자들은 적격할 것이다.

[0295] o 좌심실 구혈률(LVEF)이 45% 이상이거나, LVEF 40 내지 44%이고 심장병 전문의에 의한 제거율로 정의된 충분한 심장 기능

[0296] o 하기로 정의된 충분한 신장 기능:

[0297] - 혈청 크레아티닌 ≤ 1.5 x 정상 상한치(ULN) 또는 eGFR ≥ 60 mL/분/1.73 m^2

[0298] o 하기로 정의된 충분한 간 기능:

[0299] - 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST) 및 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) ≤ 3 × ULN

[0300] - 빌리루빈 ≤ 2.0 mg/dL, 단, 길버트-뮬렝라흐(Gilbert-Meulengracht) 증후군을 갖는 환자는 제외하며; 길버트-뮬렝라흐 증후군을 갖는 환자는 그들의 총 빌리루빈이 3.0 x ULN 이하이고 직접 빌리루빈이 1.5 × ULN 이하인 경우에 포함될 수 있음

[0301] o 하기로 정의된, 수혈 없이 충분한 골수 예비능(bone marrow reserve):

[0302] - 절대 호중구 카운트(ANC) > 1000개/mm^3

[0303] - 절대 림프구 카운트(ALC) ≥ 300개/mm^3

[0304] - 혈소판 ≥ 50,000개/mm^3

[0305] 헤모글로빈 > 8.0 g/dL

[0306] **초기 및 후속 MPBA-IL-15 용량 전에 평가된 안전성 적격성**

[0307] 환자들은 하기 기준을 충족한다면 MPBA-IL-15 주입에 대해 적격할 것이다:

[0308] 1. CD19 CAR-T 주입을 제공받았음

[0309] 2. MPBA-IL-15 주입의 당일에 등급 1 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)(온도 ≥ 38.0℃)이 지속되지 않음

[0310] 3. MPBA-IL-15 주입 전 96시간 이내에 등급 4 CRS가 없음

[0311] 4. MPBA-IL-15 주입 당일에 등급 2 이상의 신경독성이 지속되지 않음

[0312] 5. MPBA-IL-15 주입 전 임의의 시간에 48시간 초과의 지속기간의 등급 3 이상의 신경독성이 이전에 없었음

[0313] 6. MPBA-IL-15 주입 전 48시간 이내에 토실리주맙 및/또는 덱사메타손에 의한 개입이 없었음

[0314] 7. 활동성의 심각한 비제어성 감염(들)이 없음

[0315] 8. 연구자의 평가에 따른 금기가 없음

[0316] 9. 환자들은 MPBA-IL-15의 모든 용량 전에 충분한 기관 기능을 가짐:

[0317] a) AST 및 ALT 수준 ≤ 3 × ULN;

[0318] b) 총 빌리루빈 수준 ≤ 3 × ULN

[0319] c) eGFR > 30 mL/분

[0320] d) DLCO > 40%

[0321] e) LVEF > 45%

[0322] **시험 제품, 용량 및 투여 방식**

[0323] 재구성된 MPBA-IL-15가 매 21일마다(즉, q3w) IV 투여될 것이다. 재구성된 MPBA-IL-15는 구매 가능한 또는 0.9% 주사용 생리 식염수 용액으로 추가로 희석되어야 한다. 최종 희석된 용액은 30 ± 5분에 걸쳐 주입될 것이다.

[0324] MPBA-IL-15 출발 용량은 매 21일마다 1.5 μg/kg이 될 것이다.

[0325] **안전성**

[0326] 하기의 지속적인 검토에 의해 안전성의 평가가 이루어질 것이다:

[0327] ● 심각한 AE(SAE) 및 면역-매개 AE(imAE)를 포함한 유해 사건(AE)의 발병률

[0328] ● 임상 실험실 검사(혈액 및 소변 샘플링)

[0329] ● 바이탈 사인

[0330] ● 심전도(ECG)

[0331] ● 신체 검사

[0332] ● 동시 투약물(concomitant medication)

[0333] DLT - 1b상만

[0334] **약동학적 특성**

[0335] MPBA-IL-15 PK 분석을 위한 혈액 샘플이 모든 환자로부터 수집될 것이다. 일련의 PK 샘플이 MPBA-IL-15의 매 사이클 후마다 다회의 일정이 잡힌 샘플링 시점에서 수집될 것이다. MPBA-IL-15의 혈장 농도가 검증된 방법(들)을 사용하여 각각의 PK 샘플에 대해 측정될 것이다. 최대 농도(C_{max}), 농도-시간 곡선 아래 면적(AUC), 제거율(CL), 분포 부피(Vd), 및 반감기(t1/2)와 같은 약동학적 파라미터가, 가능한 경우, 혈장 농도-시간 데이터로부터 추정될 것이다.

[0336] **바이오마커**

[0337] CD19 CAR-T와 병용된 MPBA-IL-15의 전신 및 종양 조직-기반(혈액 및 골수) PD 효과가 조사될 것이다.

[0338] 유전자 변형된 CD19 CAR-T 세포의 특성화뿐만 아니라 모니터링이 NKTR 255에 의한 치료 전 및 치료 동안에 정량적 중합효소 연쇄 반응(qPCR) 및 유세포측정법에 의해 말초 혈액 샘플뿐만 아니라 골수 샘플에서 수행될 것이다. NK 세포, $CD8^+$ T 세포, 및 $CD8^+$ 기억 세포를 포함하지만 이로 한정되지 않는 면역 세포 집단의 수 및 활성화에 대한 MPBA-IL-15의 효과를 평가하기 위하여, 전신 PD 분석을 위한 혈액 샘플이 치료 전 및 치료 동안에 모든 환자들로부터 수집될 것이다. MPBA-IL-15에 반응하여 사이토카인 수준의 변화를 결정하기 위하여 그리고 유전자 발현의 변화를 프로파일링하기 위하여, 혈액 샘플이 또한 치료 전 및 치료 동안 수집될 것이다.

[0339] 종양 세포의 특성화 및 면역 시스템 활성화를 위해 실현 가능한 경우, 이벤트 일정에 따라 치료 전, 치료 동안, 및 치료 후에 신선한 골수 생검이 수집될 것이다. 평가는 종양 미세환경에서의 종양-특이적 단백질 마커 및 면역 세포 집단의 변화의 평가를 포함할 것이다. 이용 가능하다면 문서보관된 종양 조직 샘플이 수집될 것이며, 동일한 방법으로 분석될 수 있다.

[0340] **효능:**

[0341] 전신(두개저(base of skull)로부터 대퇴 중간부(mid-thigh)까지)의 18F-FDG-양성자 방출 단층촬영(PET)/컴퓨터 단층촬영(CT)이 기저선 평가를 위한 스크리닝 동안 그리고 측정 가능한 질병에 대한 적격성(SUV_{max})을 확립하기 위하여 행해질 것이다. 루가노 분류(Cheson, 2014, 상기 참조)에 따른 효능 평가를 위한 추적관찰 FDG-PET/CT가 4주차, 3개월차(사이클 5 직전), 그리고 이어서, 대상체가 이 연구를 중단할 때까지, 이뿐만 아니라 실현 가능하다면 질병 진행의 시점에 이를 때까지 매 12주마다 수행될 것이다. 실현 가능하다면, 대략 기저선에서, CD19 CAR-T 주입 후 처음 4주 내에, 그리고 14주차에서; 그리고 연구자의 재량으로 치료 종료(EOT) 시점에서 종양 생검이 획득될 것이다.

[0342] **통계학적 방법:**

[0343] **안전성:**

[0344] 안전성 평가는 AE, 임상 실험실 검사, 바이탈 사인, 신체 검사, 및 ECG(중앙 판독(central read))를 포함할 것이다. DLT의 발병률은 각각의 용량 점증 코호트에 대해 평가될 것이다. 등급 3 이상의 모든 치료-유발 유해 사건(TEAE)이 이 연구의 1b상 및 2상에서 별도로 각각의 용량 코호트에 대한 기관계 부류 및 우선 용어에 따라 요약될 것이다. TEAE는 발병률, 중증도, 및 연구 약물(들)과의 관련성에 따라 요약될 것이다. 면역-매개 AE(imAE)는 별도로 요약될 것이다.

[0345] 등급 3 이상의 임상 실험실 및 바이탈 사인 비정상은 이 연구의 1b상 및 2상에서 각각의 용량 코호트에 대해 기술적으로 요약될 것이다.

[0346] **효능:**

[0347] 6개월차에서의 CRR, 및 ORR의 효능 평가는 정확한 방법에 기초하여 95% 신뢰 구간(CI)과 함께 계산될 것이다. PFS, DOR 및 OS의 분석을 위하여 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법이 사용될 것이다. 독립 검토 위원회(IRC) 평가에 기초한 6개월차에서의 CRR은 1차 효능 종점일 것이며, 변형된 치료-의향(intent-to-treat) 집단을 사용하여 요약될 것이다. 연구자의 평가에 기초한 6개월차에서의 CRR이 또한 평가될 것이다.

[0348] 모든 효능 종점에 대한 1차 분석은 이 연구의 용량 증량 파트로부터의 환자들뿐만 아니라 이 연구의 용량 점증 파트로부터의 RP2D로 치료된 환자들에 기초할 것이다.

[0349] **약동학적 특성 및 바이오마커:**

[0350] 약동학적 파라미터가 표로 작성될 것이며, 기술 통계량을 사용하여 요약될 것이다. 바이오마커에 대한 기술적 요약(descriptive summary)은 매 관찰 시점에서마다 계산될 것이다. 투여 전으로부터 매 관찰 시점까지의 바이오마커의 변화가 또한 기술적 요약을 사용하여 평가될 것이다.

도면

도면1

서열 목록

서열 번호 1 (rhIL-15)

```
        10          20          30          40          50          60
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH

        70          80          90         100         110
DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS
```

서열 번호 2

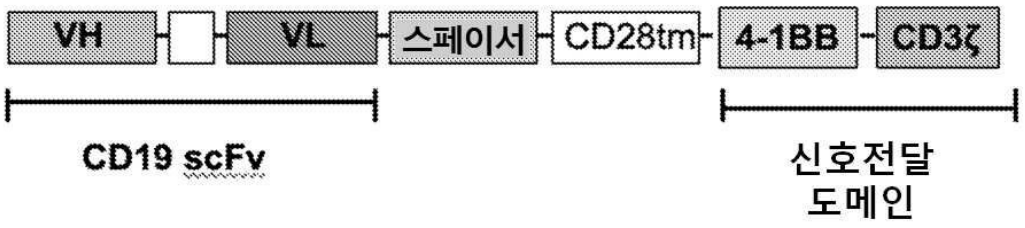
```
-1          10          20          30          40          50          60
 M NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPSCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH

           70          80          90         100         110
   DTVENLIILA NNSLSSNGNV TESGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS
```

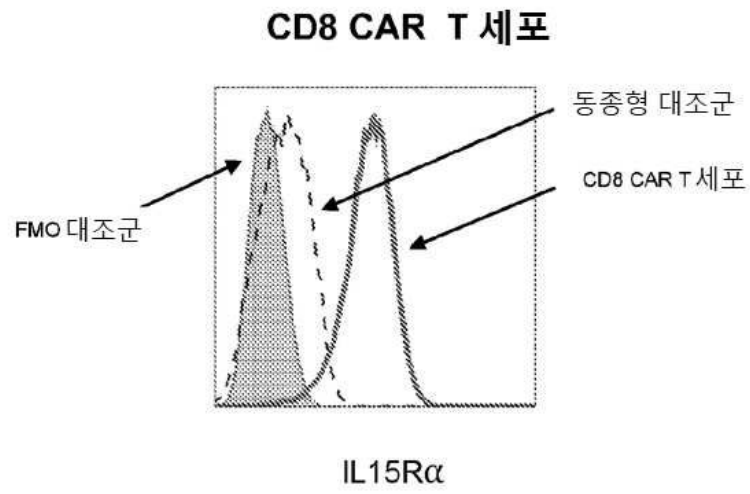
서열 번호 3

```
        10          20          30          40          50          60
MRISKPHLRS ISIQCYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFS AGLPKTEANW VNVISD
```

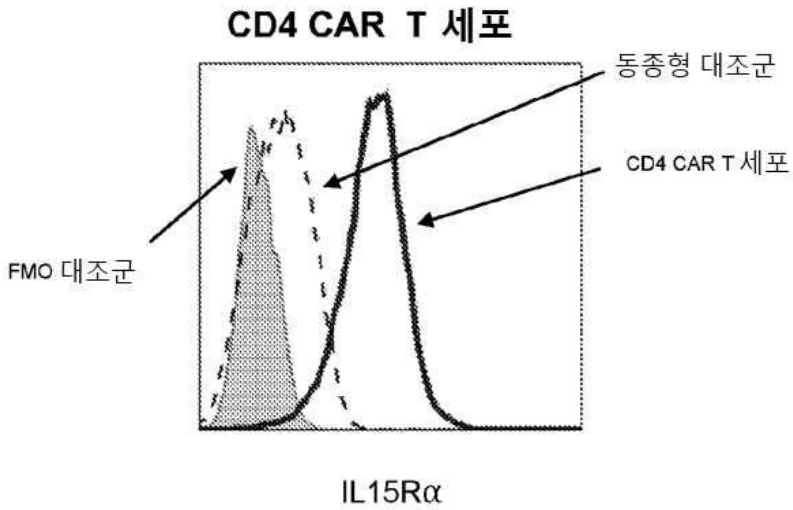
도면2



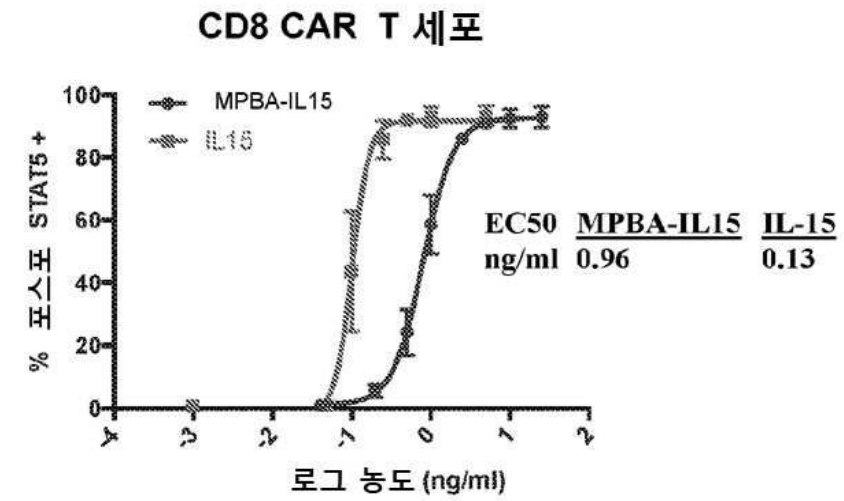
도면3a



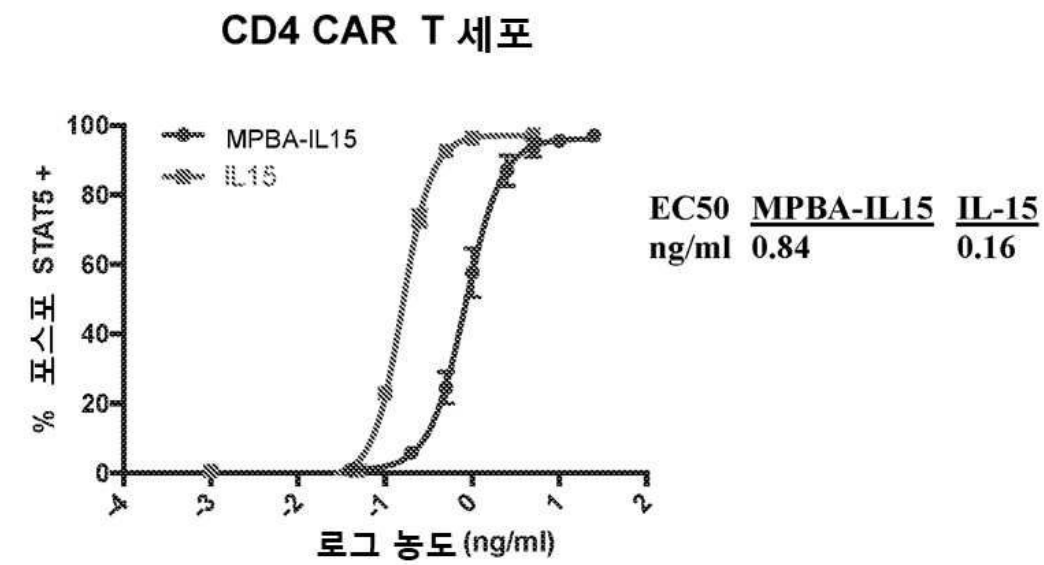
도면3b



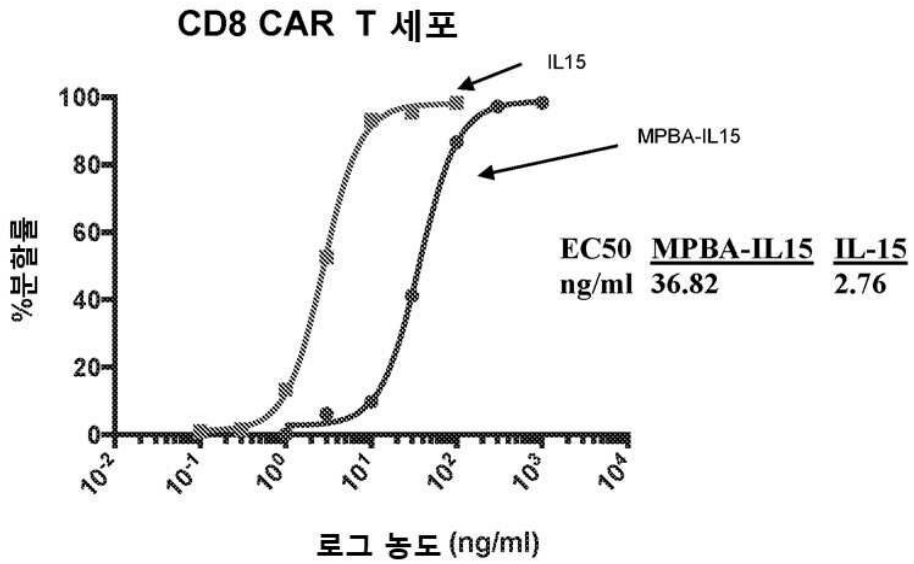
도면3c


CD8 CAR T 세포
MPBA-IL15
IL15
% 포스포 STAT5 +
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
로그 농도 (ng/ml)
EC50 MPBA-IL15 IL-15
ng/ml 0.96 0.13

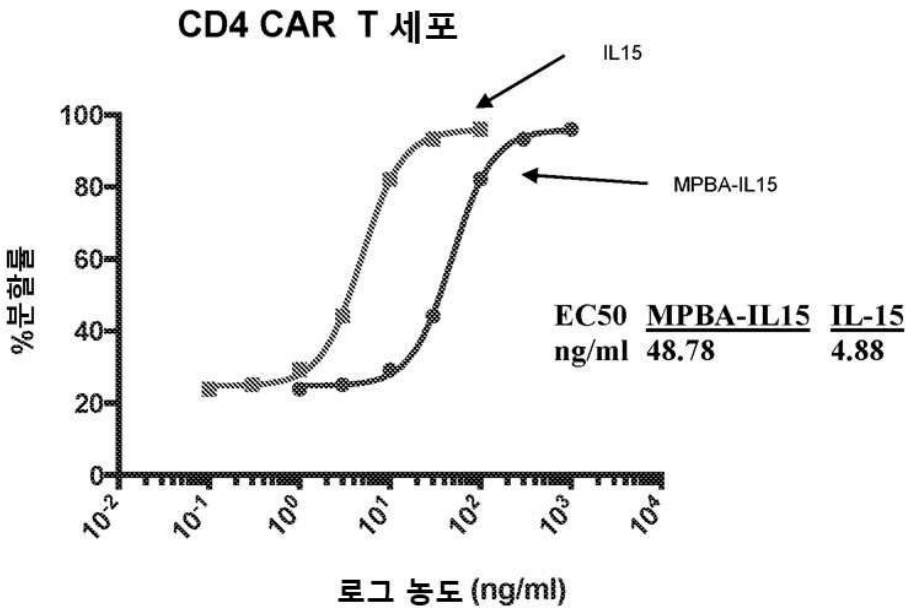
도면3d


CD4 CAR T 세포
MPBA-IL15
IL15
% 포스포 STAT5 +
100
80
60
40
20
0
-4
-3
-2
-1
0
1
2
로그 농도 (ng/ml)
EC50 MPBA-IL15 IL-15
ng/ml 0.84 0.16

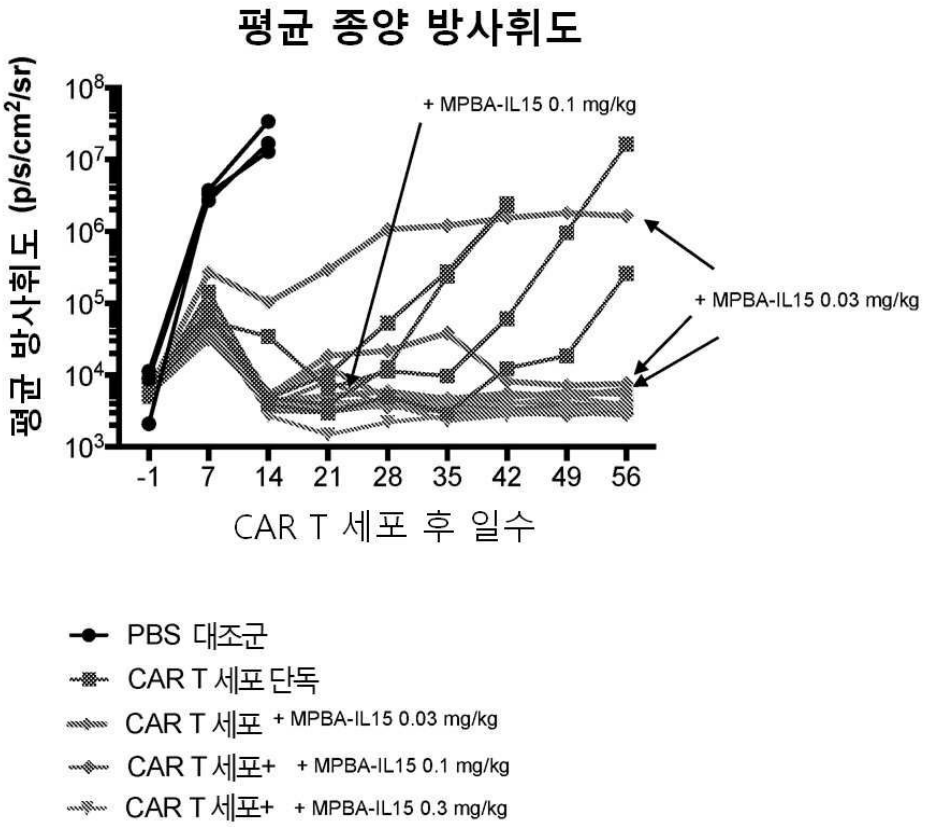
도면3e


CD8 CAR T 세포
IL15
MPBA-IL15
EC50 MPBA-IL15 IL-15
ng/ml 36.82 2.76
%분할률
100
80
60
40
20
0
10-2
10-1
100
101
102
103
104
로그 농도 (ng/ml)

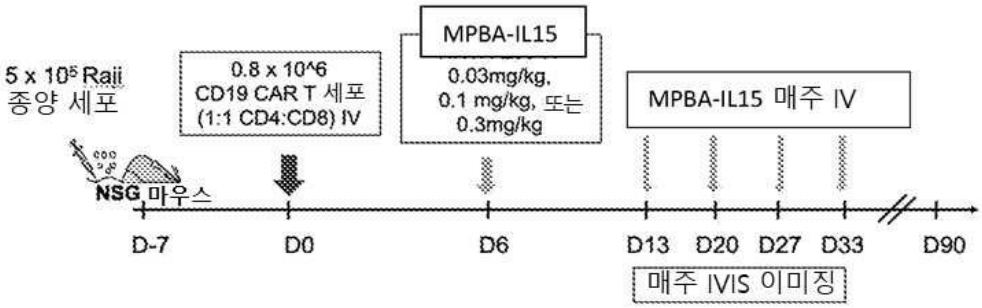
도면3f


CD4 CAR T 세포
IL15
MPBA-IL15
EC50 MPBA-IL15 IL-15
ng/ml 48.78 4.88
%분할률
100
80
60
40
20
0
10-2
10-1
100
101
102
103
104
로그 농도 (ng/ml)

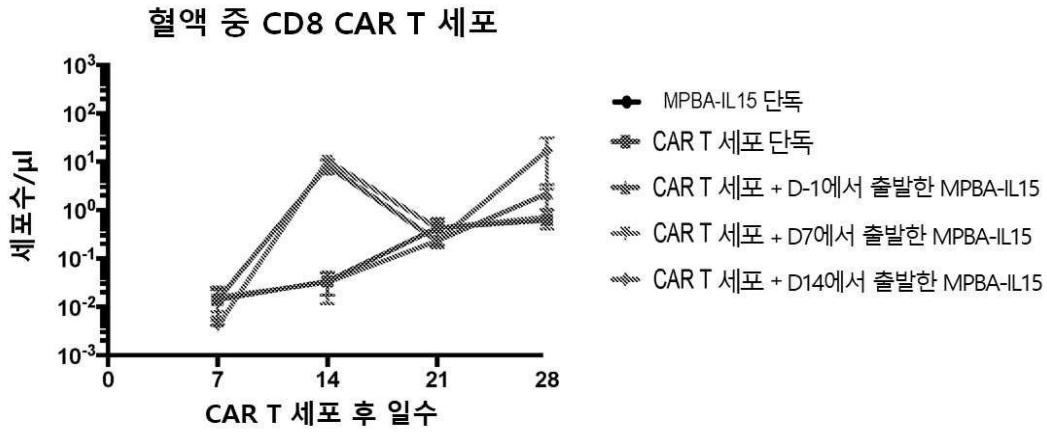
도면4a


평균 종양 방사휘도
평균 방사휘도 (p/s/cm²/sr)
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
+ MPBA-IL15 0.1 mg/kg
+ MPBA-IL15 0.03 mg/kg
-1
7
14
21
28
35
42
49
56
CAR T 세포 후 일수
PBS 대조군
CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15 0.03 mg/kg
CAR T 세포+ + MPBA-IL15 0.1 mg/kg
CAR T 세포+ + MPBA-IL15 0.3 mg/kg

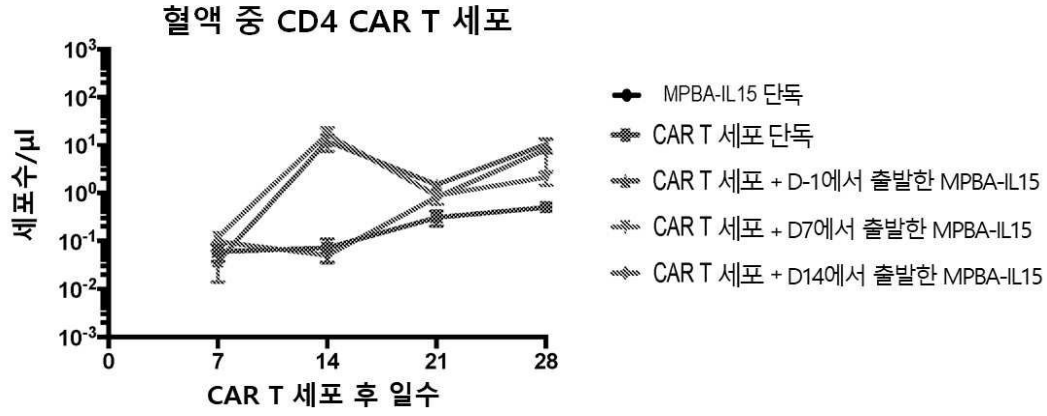
도면4b


5 x 10⁵ Raji
종양 세포
0.8 x 10^6
CD19 CAR T 세포
(1:1 CD4:CD8) IV
MPBA-IL15
0.03mg/kg,
0.1 mg/kg, 또는
0.3mg/kg
MPBA-IL15 매주 IV
NSG 마우스
D-7
D0
D6
D13
D20
D27
D33
D90
매주 IVIS 이미징

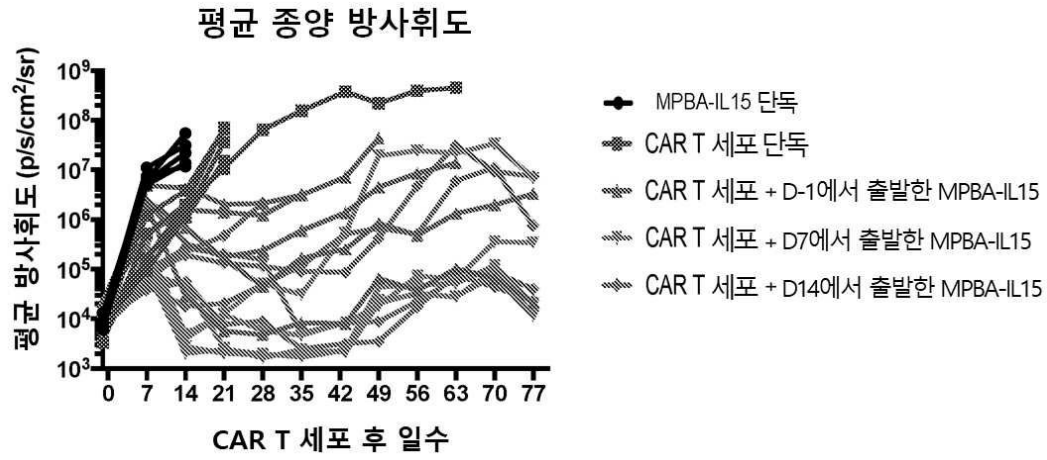
도면5a



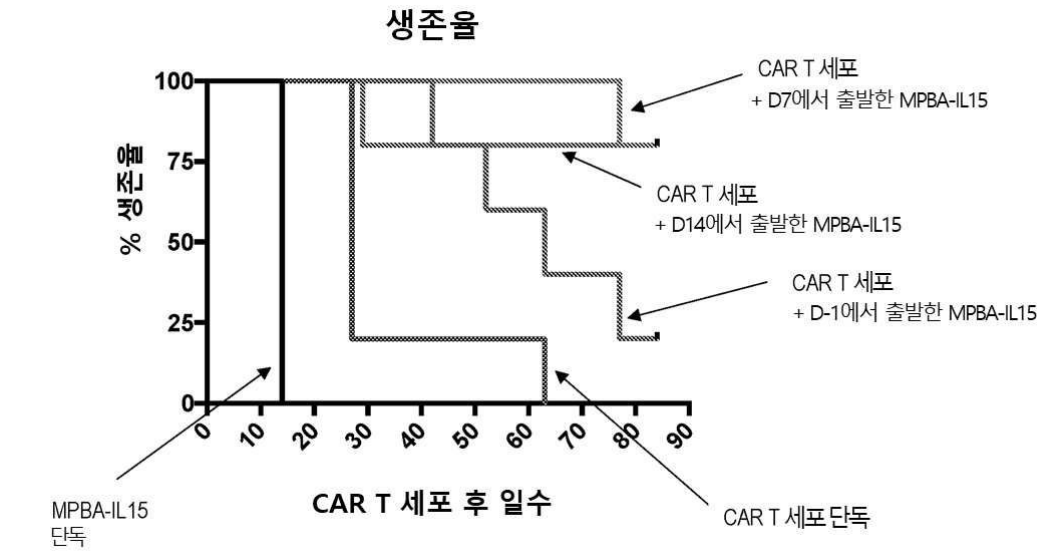
도면5b



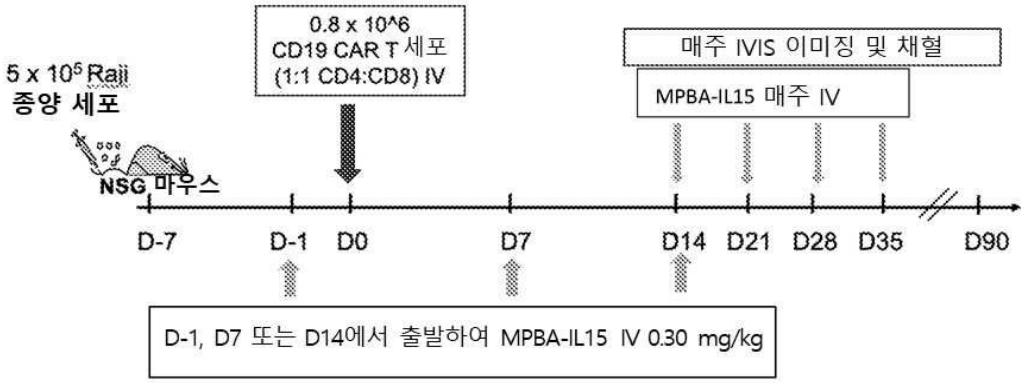
도면6



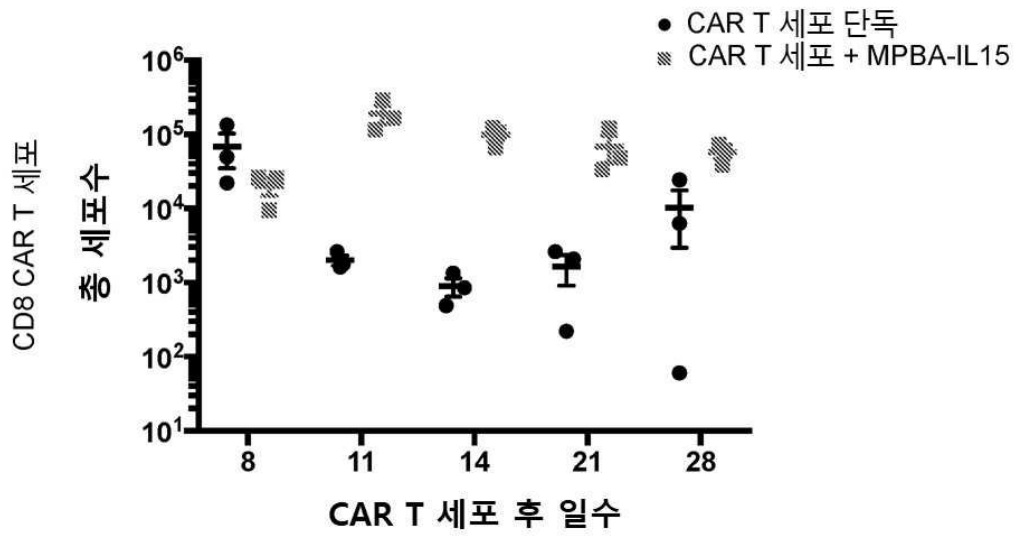
도면7a


생존율
100
75
50
25
0
% 생존
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
CAR T 세포 후 일수
CAR T 세포
+ D7에서 출발한 MPBA-IL15
CAR T 세포
+ D14에서 출발한 MPBA-IL15
CAR T 세포
+ D-1에서 출발한 MPBA-IL15
MPBA-IL15
단독
CAR T 세포단독

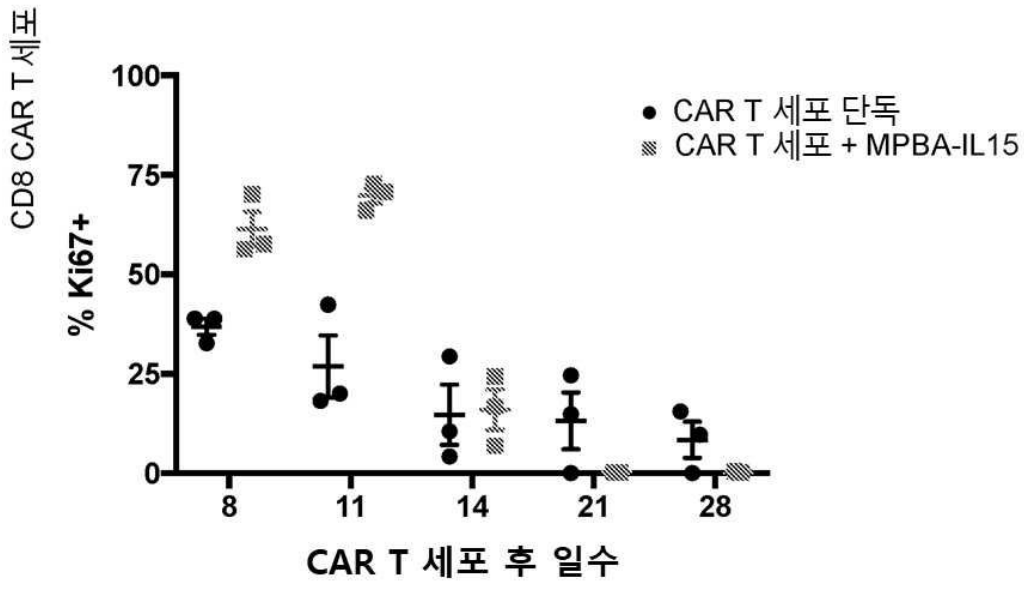
도면7b


5 x 10⁵ Raji
종양 세포
NSG 마우스
0.8 x 10^6
CD19 CAR T 세포
(1:1 CD4:CD8) IV
매주 IVIS 이미징 및 채혈
MPBA-IL15 매주 IV
D-7
D-1
D0
D7
D14
D21
D28
D35
D90
D-1, D7 또는 D14에서 출발하여 MPBA-IL15 IV 0.30 mg/kg

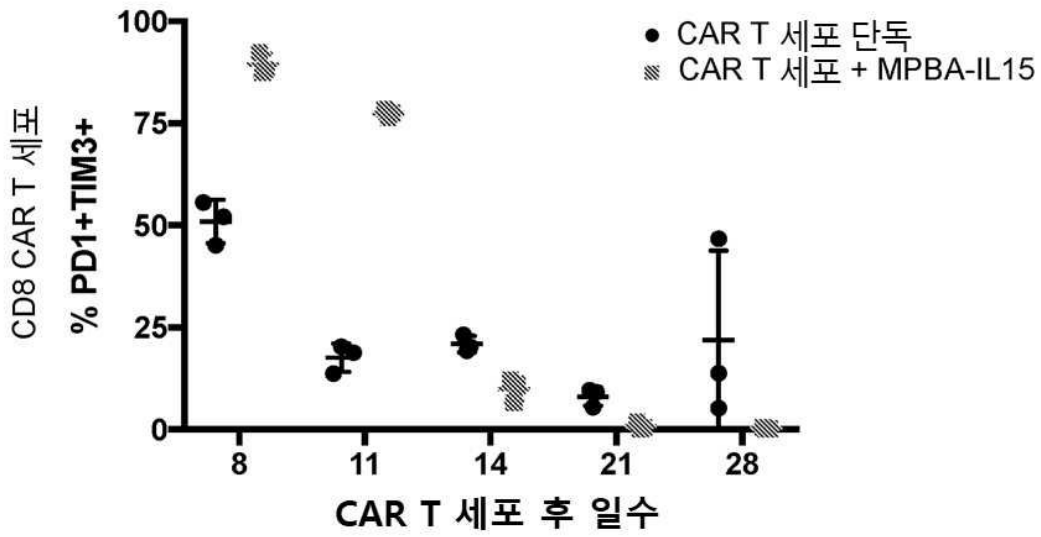
도면8a


CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15
CD8 CAR T 세포
총 세포수
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
10^1
8
11
14
21
28
CAR T 세포 후 일수

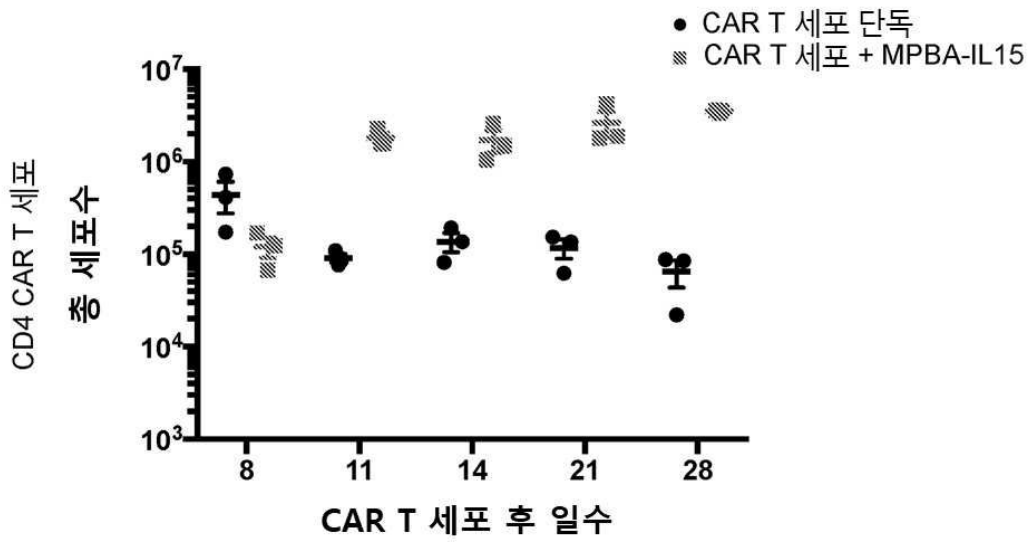
도면8b


CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15
CD8 CAR T 세포
% Ki67+
100
75
50
25
0
8
11
14
21
28
CAR T 세포 후 일수

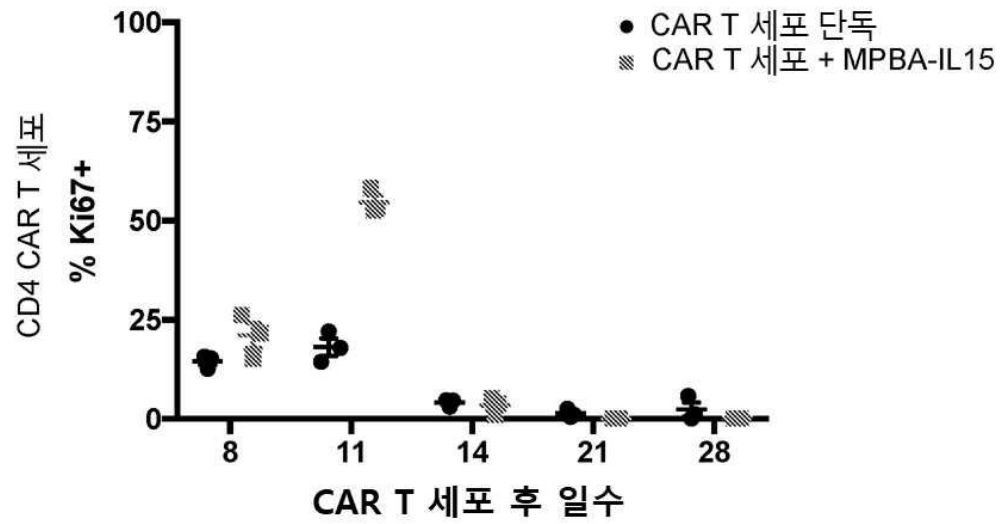
도면8c


CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15
CD8 CAR T 세포
% PD1+TIM3+
100
75
50
25
0
8
11
14
21
28
CAR T 세포 후 일수

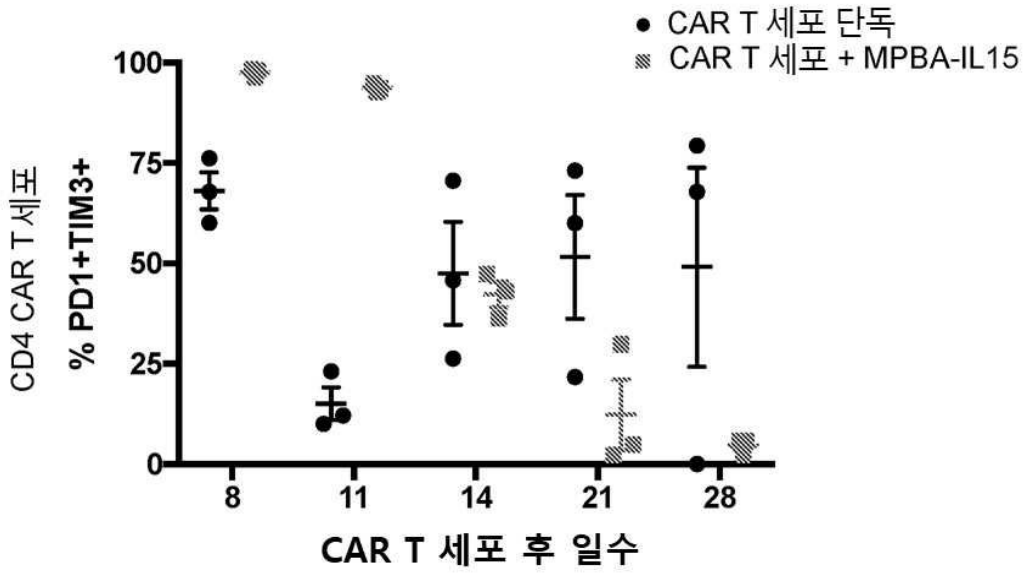
도면9a


CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15
CD4 CAR T 세포
총 세포수
10^7
10^6
10^5
10^4
10^3
8
11
14
21
28
CAR T 세포 후 일수

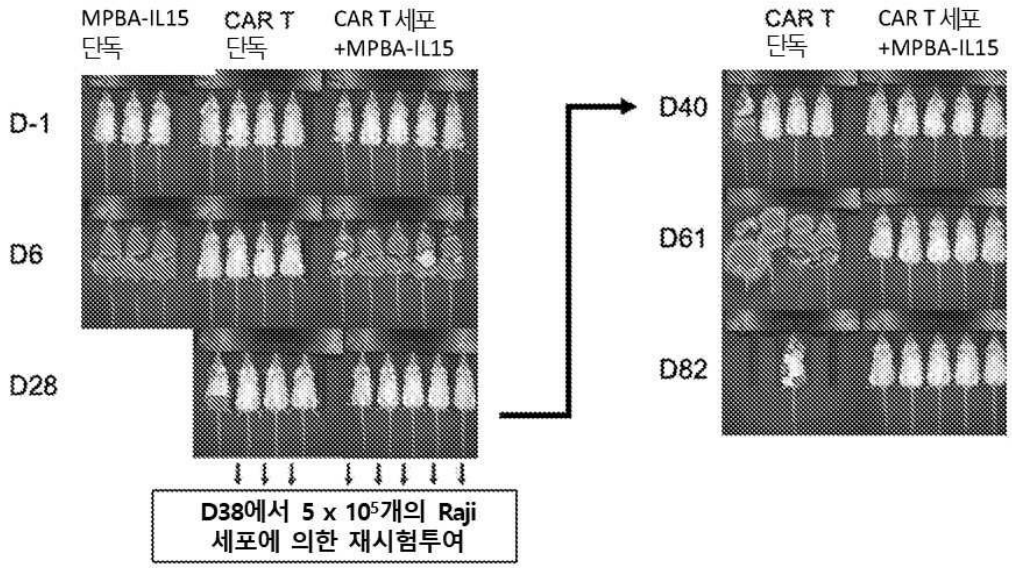
도면9b


CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15
CD4 CAR T 세포
% Ki67+
100
75
50
25
0
8
11
14
21
28
CAR T 세포 후 일수

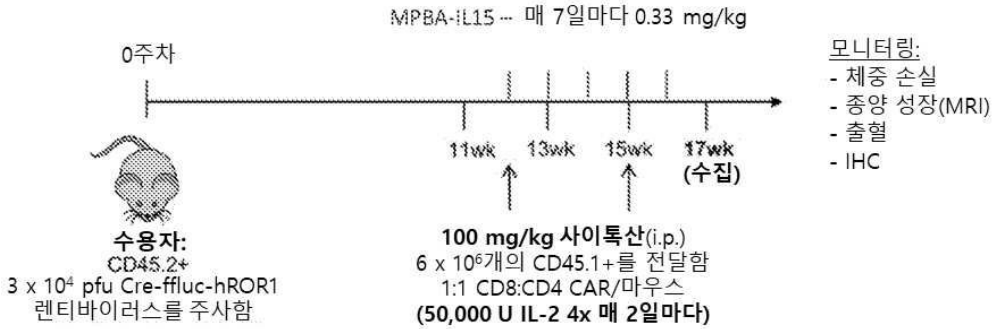
도면9c


CAR T 세포 단독
CAR T 세포 + MPBA-IL15
CD4 CAR T 세포
% PD1+TIM3+
100
75
50
25
0
8
11
14
21
28
CAR T 세포 후 일수

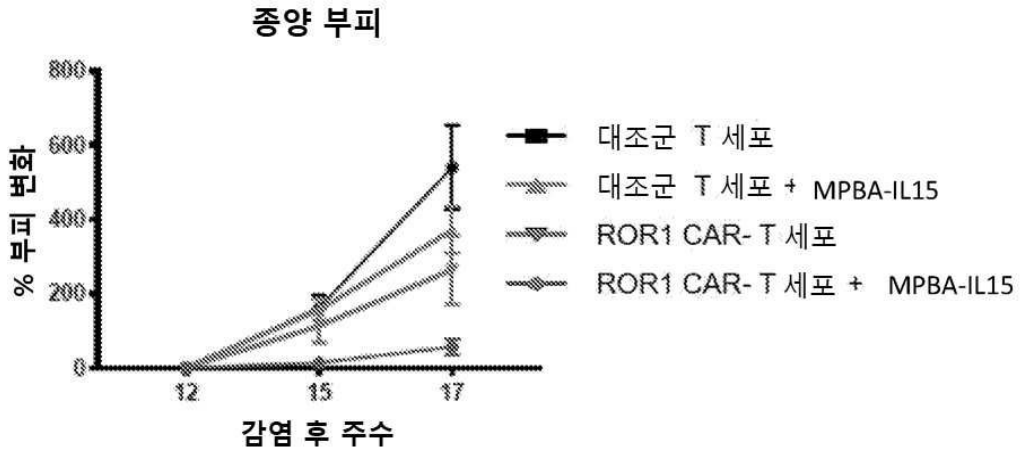
도면10



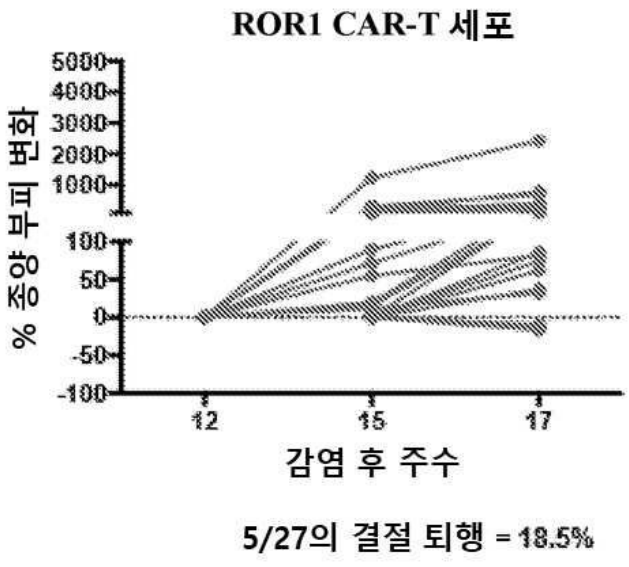
도면11



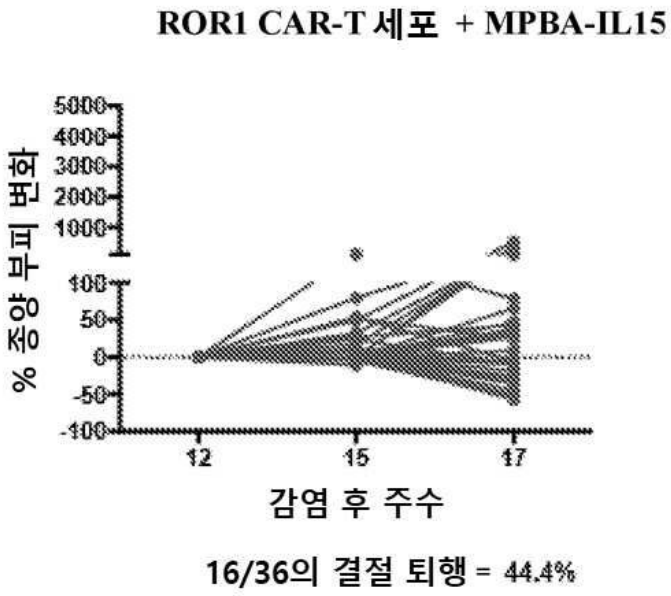
도면12a



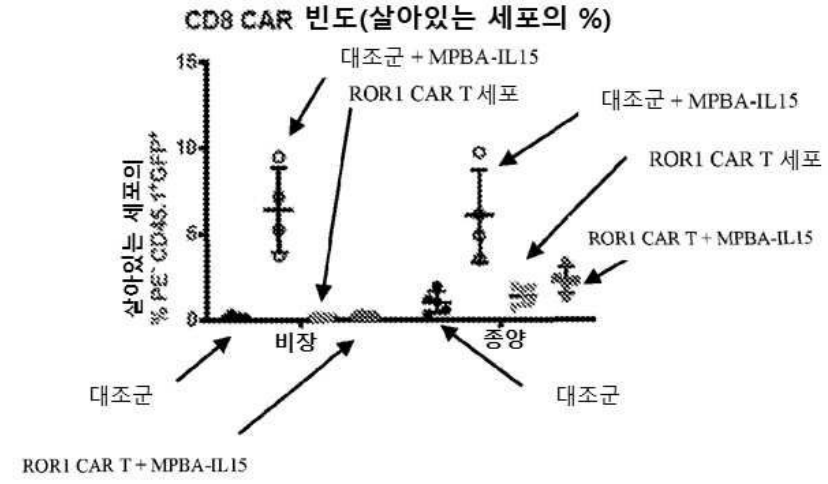
도면12b


ROR1 CAR-T 세포
% 종양 부피 변화
5000
4000
3000
2000
1000
100
50
0
-50
-100
12
15
17
감염 후 주수
5/27의 결절 퇴행 = 18.5%

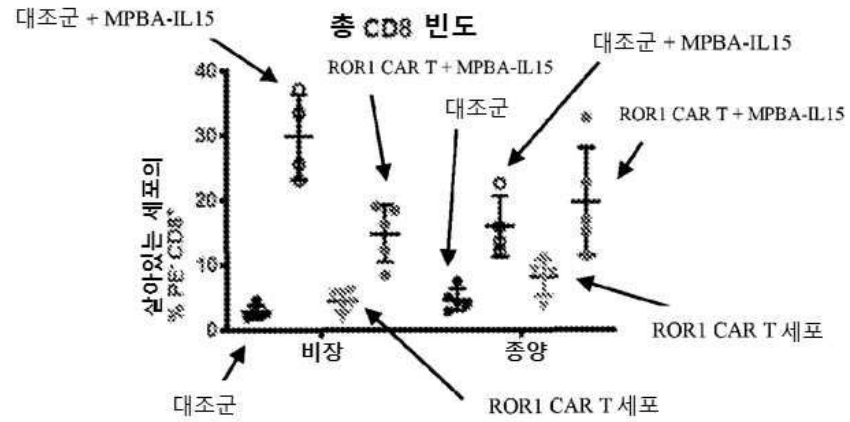
도면12c


ROR1 CAR-T 세포 + MPBA-IL15
% 종양 부피 변화
5000
4000
3000
2000
1000
100
50
0
-50
-100
12
15
17
감염 후 주수
16/36의 결절 퇴행 = 44.4%

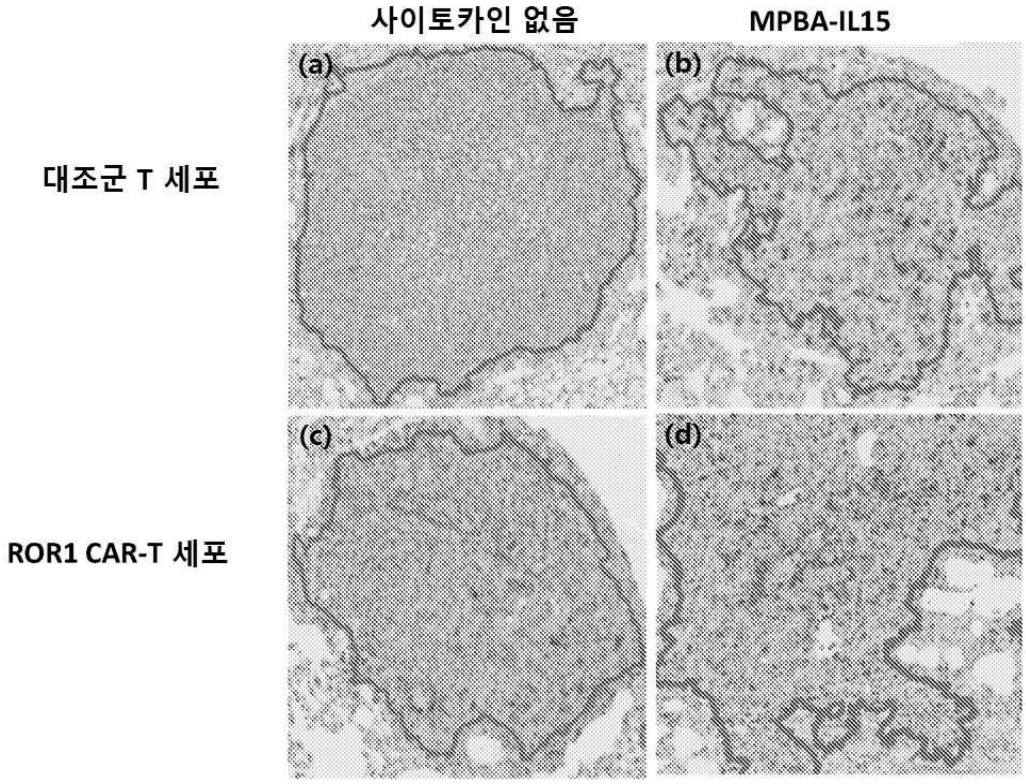
도면13a


CD8 CAR 빈도(살아있는 세포의 %)
대조군 + MPBA-IL15
ROR1 CAR T 세포
대조군 + MPBA-IL15
ROR1 CAR T 세포
ROR1 CAR T + MPBA-IL15
살아있는 세포의
비장
종양
대조군
대조군
ROR1 CAR T + MPBA-IL15

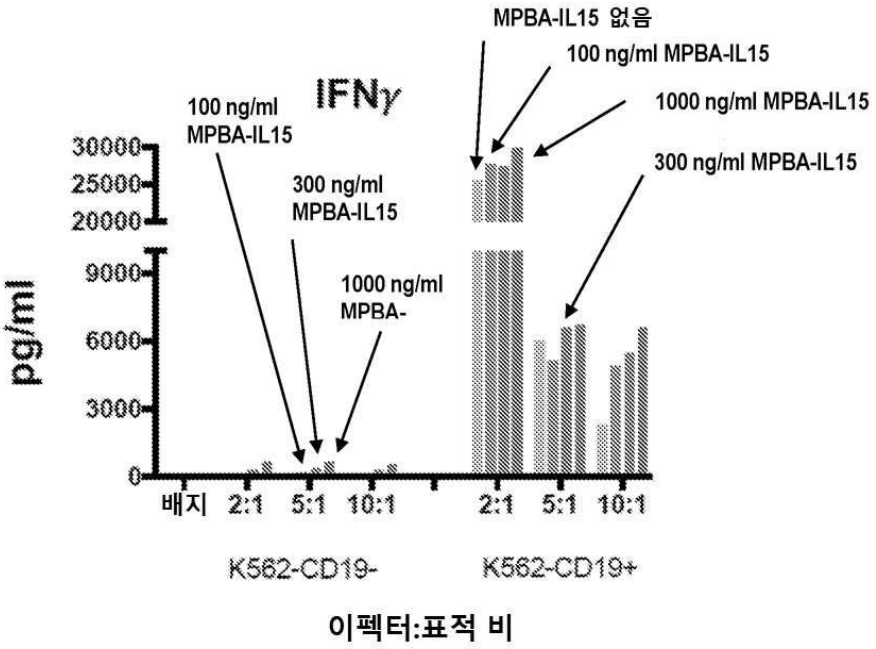
도면13b


대조군 + MPBA-IL15
총 CD8 빈도
ROR1 CAR T + MPBA-IL15
대조군 + MPBA-IL15
대조군
ROR1 CAR T + MPBA-IL15
살아있는 세포의
비장
종양
ROR1 CAR T 세포
대조군
ROR1 CAR T 세포

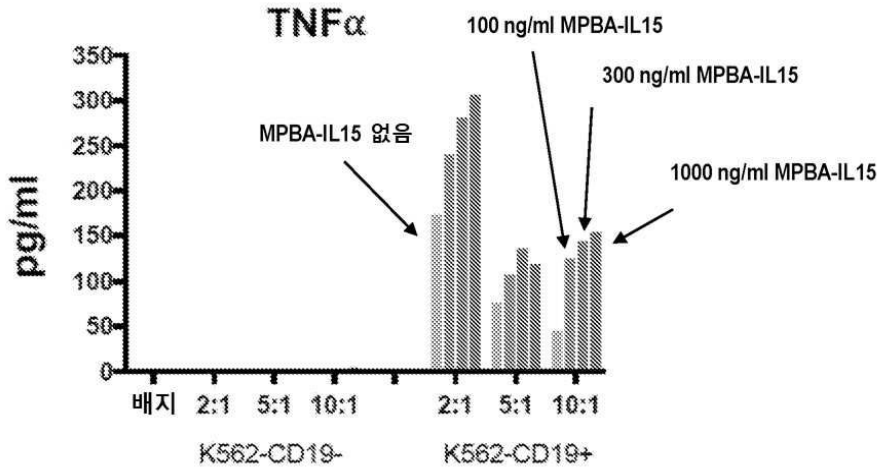
도면14


사이토카인 없음
MPBA-IL15
대조군 T 세포
ROR1 CAR-T 세포
(a)
(b)
(c)
(d)

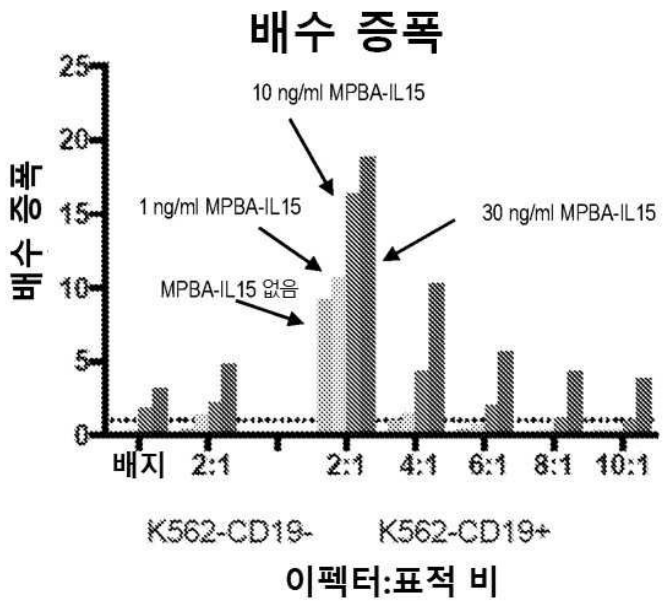
도면15a


IFNγ
MPBA-IL15 없음
100 ng/ml MPBA-IL15
1000 ng/ml MPBA-IL15
300 ng/ml MPBA-IL15
100 ng/ml MPBA-IL15
300 ng/ml MPBA-IL15
1000 ng/ml MPBA-
pg/ml
30000
25000
20000
9000
6000
3000
0
배지
2:1
5:1
10:1
2:1
5:1
10:1
K562-CD19-
K562-CD19+
이펙터:표적 비

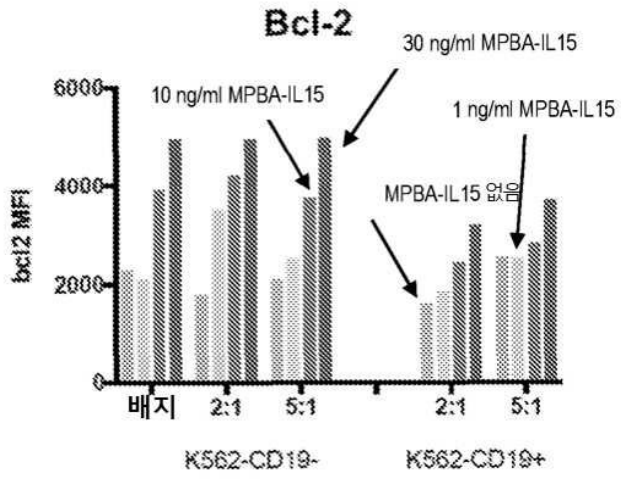
도면15b


TNFα
100 ng/ml MPBA-IL15
300 ng/ml MPBA-IL15
1000 ng/ml MPBA-IL15
MPBA-IL15 없음
pg/ml
350
300
250
200
150
100
50
0
배지
2:1
5:1
10:1
2:1
5:1
10:1
K562-CD19-
K562-CD19+
이펙터:표적 비

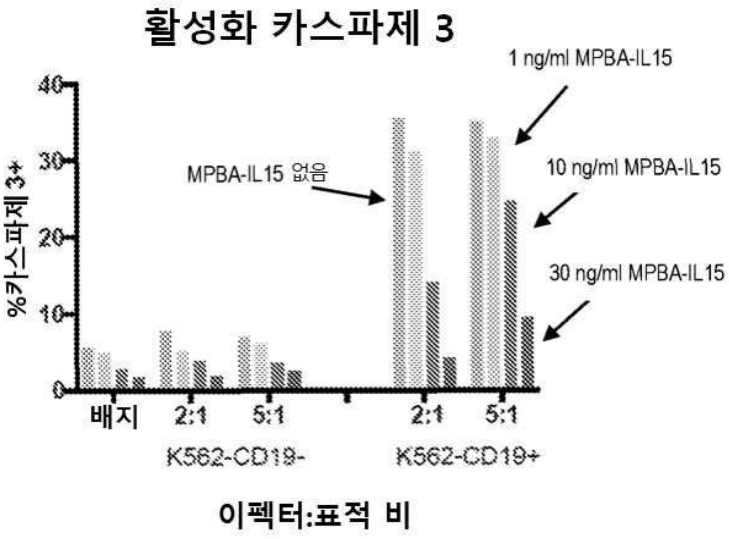
도면16a


배수 증폭
10 ng/ml MPBA-IL15
1 ng/ml MPBA-IL15
30 ng/ml MPBA-IL15
MPBA-IL15 없음
배수 증폭
25
20
15
10
5
0
배지
2:1
2:1
4:1
6:1
8:1
10:1
K562-CD19-
K562-CD19+
이펙터:표적 비

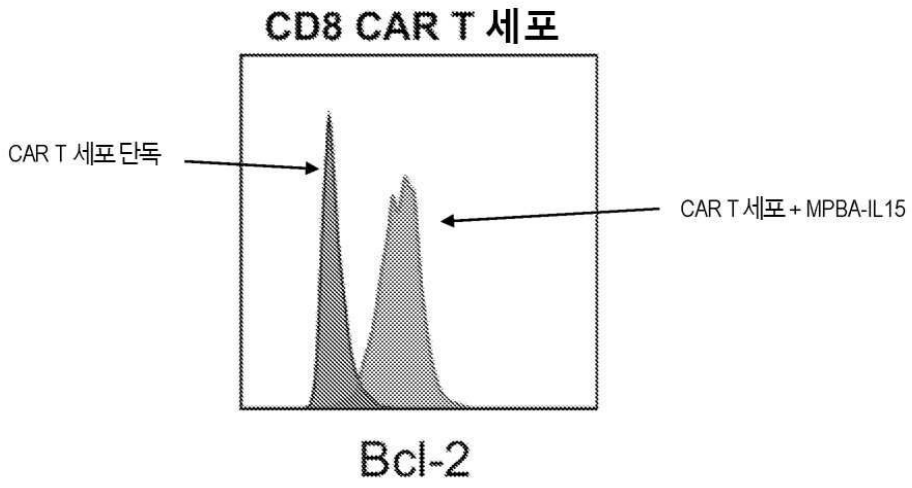
도면16b


Bcl-2
30 ng/ml MPBA-IL15
10 ng/ml MPBA-IL15
1 ng/ml MPBA-IL15
MPBA-IL15 없음
bcl2 MFI
6000
4000
2000
0
배지
2:1
5:1
2:1
5:1
K562-CD19-
K562-CD19+
이펙터:표적 비

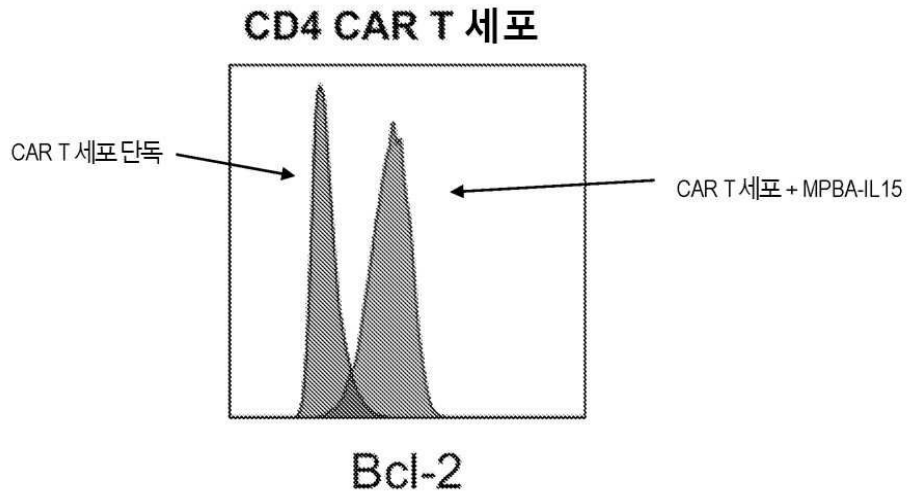
도면16c


활성화 카스파제 3
1 ng/ml MPBA-IL15
MPBA-IL15 없음
10 ng/ml MPBA-IL15
30 ng/ml MPBA-IL15
%카스파제 3+
40
30
20
10
0
배지
2:1
5:1
2:1
5:1
K562-CD19-
K562-CD19+
이펙터:표적 비

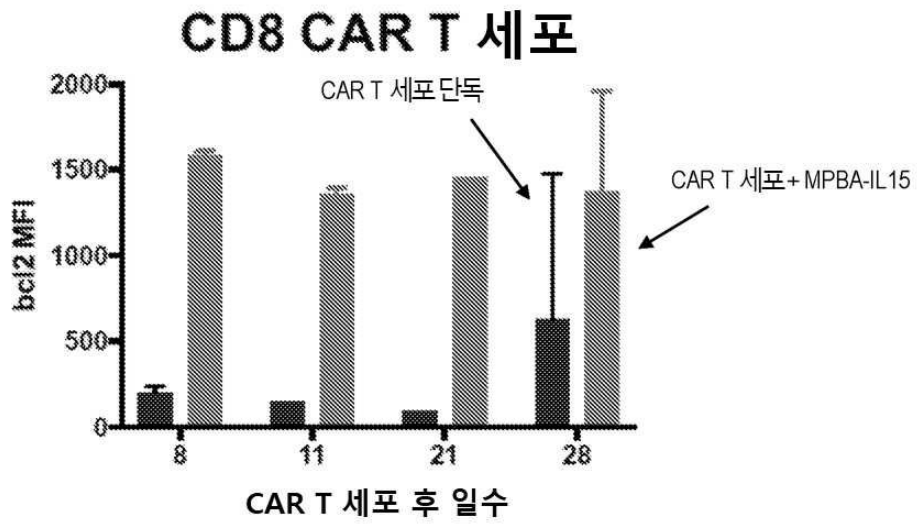
도면17a



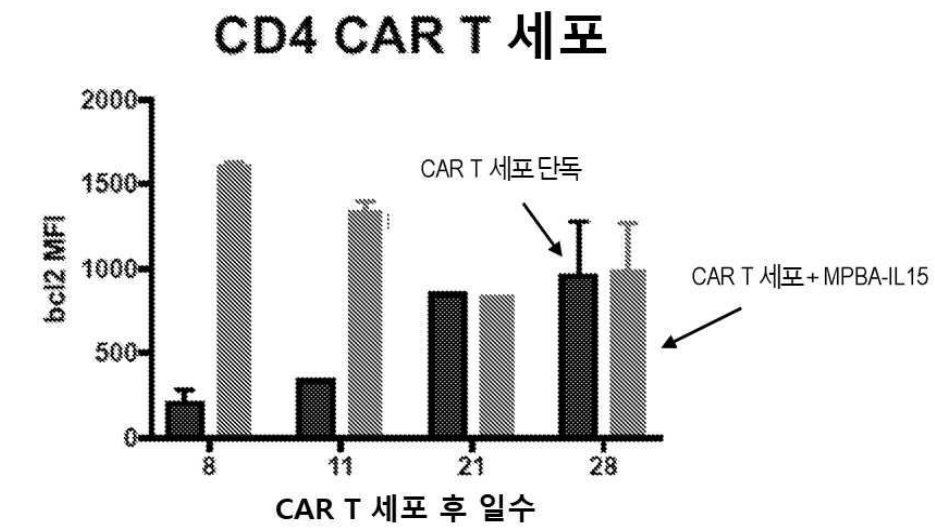
도면17b



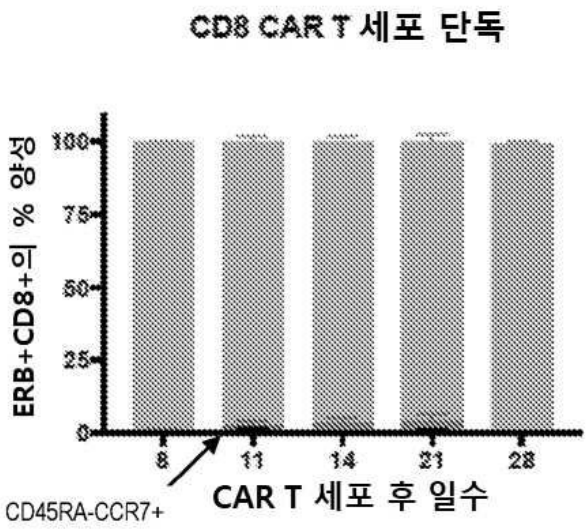
도면18a



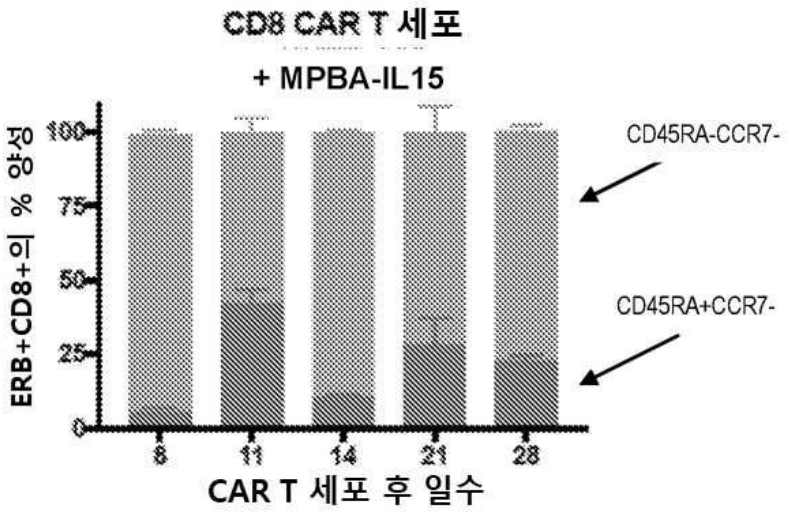
도면18b


CD4 CAR T 세포
2000
1500
1000
500
0
bcl2 MFI
CAR T 세포단독
CAR T 세포+MPBA-IL15
8
11
21
28
CAR T 세포 후 일수

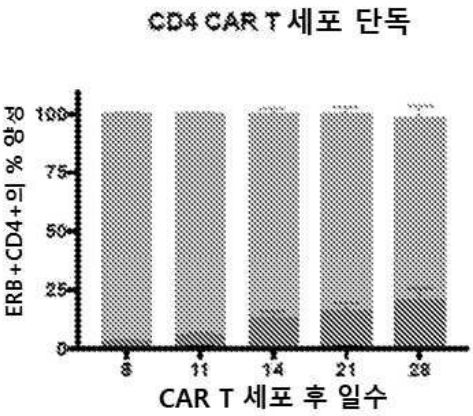
도면19a


CD8 CAR T 세포 단독
ERB+CD8+의 % 양성
100
75
50
25
0
8
11
14
21
28
CD45RA-CCR7+
CAR T 세포 후 일수

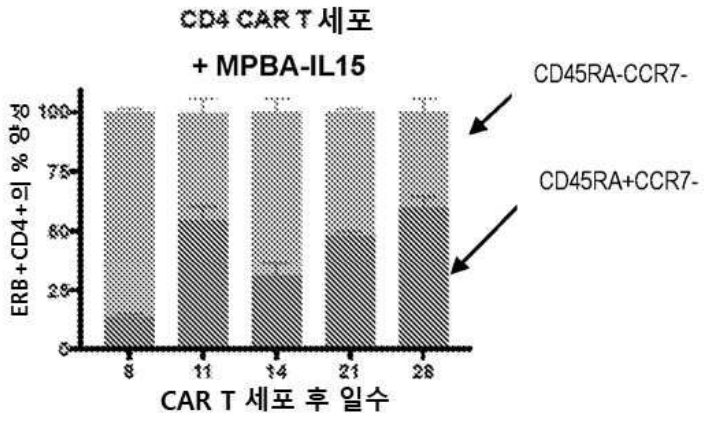
도면19b



도면19c



도면19d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Nektar Therapeutics

Fred Hutchinson Cancer Research Center

Marcondes, Mario

Kirk, Peter Benedict

Miyazaki, Takahiro

Turtle, Cameron J.

Riddell, Stanley R.

Chou, Cassie K.

Frassle, Simon P.

<120> Method for Enhancing Cellular Immunotherapy

<130> SHE0552.PCT

<140> Not Yet Assigned

<141> Filed Herewith

<150> US 62/830,212

<151> 2019-04-05

<150> US 62/861,858

<151> 2019-06-14

<150> US 62/989,473

<151> 2019-09-10

<150> US 62/944,955

<151> 2019-12-06

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 1

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile

1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His

20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln

35 40 45

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu

50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val

65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile

85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn

100 105 110

Thr Ser

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 2

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val

20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu

35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn

65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn

85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile

100 105 110

Asn Thr Ser

115

<210> 3

<211> 56

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic polypeptide

<400> 3

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr

1 5 10 15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His

20 25 30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala

35 40 45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp

50 55