



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0033265
(43) 공개일자 2020년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/19 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/26 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/19 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7002789

(22) 출원일자(국제) 2018년07월24일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년01월29일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2018/096775

(87) 국제공개번호 WO 2019/019998

국제공개일자 2019년01월31일

(30) 우선권주장

201710611317.2 2017년07월25일 중국(CN)

(71) 출원인

지양수 헨그루이 메디슨 컴퍼니 리미티드

중국, 지양수 222047, 리안원강, 이코노믹 앤드
테크놀로지컬 디벨롭먼트 존, 7 곤룬산 로드

상하이 헨그루이 파마수티컬 컴퍼니 리미티드

중국, 상하이 200245, 민항 디스트릭트, 웬징 로드
279

(72) 발명자

우, 텅팅

중국, 200245 상하이 민항 디스트릭트, 웬징 로드
279번

리, 하오

중국, 200245 상하이 민항 디스트릭트, 웬징 로드
279번

리우, 순

중국, 200245 상하이 민항 디스트릭트, 웬징 로드
279번

(74) 대리인

안소영

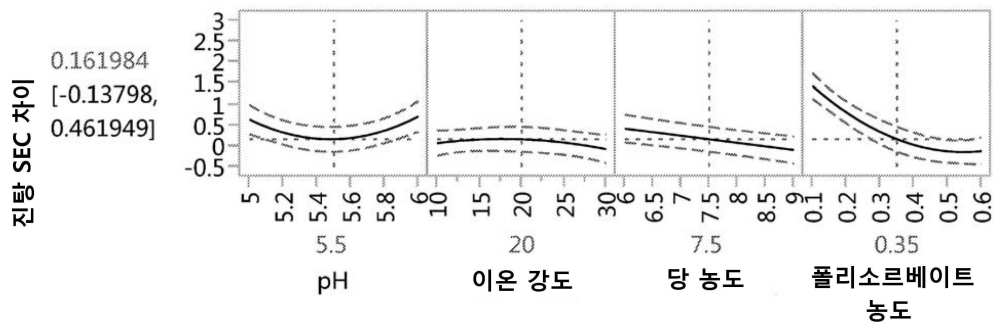
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 IL-15 단백질 복합체 약학 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 개시는 IL-15 단백질 복합체 및 시트레이트 완충액 용액을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 더불어, 약학 조성물은 또한 당 및 비이온성 계면활성제를 포함할 수 있다. 본 개시의 약학 조성물은 2 내지 8℃에서 수개월 동안 저장된 후에도 높은 안정성을 입증한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/1793 (2013.01)

A61K 38/2086 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 47/12 (2013.01)

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 31/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

IL-15 단백질 복합체 및 완충액을 포함하는 약학 조성물로서,

IL-15 단백질 복합체는 IL-15 및 다음:

IL-15 수용체,

IL-15 수용체의 세포외 영역을 포함하는 단편, 및

IL-15 수용체의 세포외 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 하나로 구성되며;

완충액은 시트레이트 완충액, 석시네이트 완충액 및 히스티딘 완충액으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 시트레이트 완충액이고, 보다 바람직하게는 시트르산-시트르산 나트륨 완충액이며,

약학 조성물 중 IL-15 단백질 복합체의 농도는 약 1 mg/ml 내지 10 mg/ml인 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

약학 조성물 중 IL-15 단백질 복합체의 농도는 약 1 mg/ml 내지 5 mg/ml이고, 바람직하게는 약 0.9 mg/ml 내지 1.1 mg/ml이며, 보다 바람직하게는 1 mg/ml인 것인 약학 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

약학 조성물의 pH는 약 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 5.5, 보다 바람직하게는 약 5.15 내지 5.25, 가장 바람직하게는 5.2인 것인 약학 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

완충액의 농도는 약 5 mM 내지 30 mM, 바람직하게는 약 5 mM 내지 20 mM, 보다 바람직하게는 약 10 ± 2 mM이고, 가장 바람직하게는 10 mM인 것인 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

완충액의 pH는 약 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 5.5, 보다 바람직하게는 약 5.15 내지 5.25, 가장 바람직하게는 5.2인 것인 약학 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

이당류를 추가로 포함하며, 바람직하게는 이당류는 트레할로오스 및 수크로오스로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 트레할로오스인 것인 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

이당류의 농도는 약 60 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 약 75mg/ml ± 5 mg/ml, 보다 바람직하게는 75

mg/ml인 것인 약학 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

계면활성제를 추가로 포함하며, 계면활성제는 바람직하게는 폴리소르베이트이며, 보다 바람직하게는 폴리소르베이트 20인 것인 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

계면활성제의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 바람직하게는 약 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.5 mg/ml인 것인 약학 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 1 mg/ml 내지 10 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체,

(b) 5 mM 내지 30 mM의 시트레이트 완충액,

(c) 60 mg/ml 내지 90 mg/ml의 트레할로오스, 및

(d) 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20

을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.0 내지 6.0이고;

바람직하게는, 약학 조성물은:

(a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체,

(b) 10 mM $\pm$ 2 mM의 시트레이트 완충액,

(c) 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml의 트레할로오스, 및

(d) 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20

을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.15 내지 5.25인 것인 약학 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지는 IL-15 및 서열번호 2의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지는 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성되며,

바람직하게는, IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 IL-15 및 서열번호 2의 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성되는 것인 약학 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물의 제조 방법으로서, 상기 방법은

IL-15 단백질 복합체를 완충액과 혼합하는 단계를 포함하며,

여기에서 약학 조성물 중 IL-15 단백질 복합체의 농도는 약 1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 바람직하게는 약 1 mg/ml 내지 5 mg/ml, 가장 바람직하게는 약 0.9 mg/ml 내지 1.1 mg/ml, 보다 바람직하게는 1 mg/ml인 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

완충액은 시트레이트 완충액이고,

완충액의 농도는 바람직하게 약 5 mM 내지 30 mM, 보다 바람직하게는 약 10 mM 내지 20 mM이며,

완충액의 pH는 약 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 5.5, 보다 바람직하게는 약 5.15 내지 5.25, 가장 바람직하게는 5.2인 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

IL-15 단백질 복합체는 IL-15 및 다음:

IL-15 수용체,

IL-15 수용체의 세포의 영역을 포함하는 단편, 및

IL-15 수용체의 세포의 영역을 포함하는 융합 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 하나로 구성되는 것인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지는 IL-15 및 서열번호 2의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지는 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성되며,

바람직하게는, IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 IL-15 및 서열번호 2의 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성되는 것인 방법.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

트레할로오스 및 폴리소르베이트 20을 첨가하는 단계를 추가로 포함하며,

트레할로오스의 농도는 약 60 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 약 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml, 가장 바람직하게는 75 mg/ml이고,

폴리소르베이트 20의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 바람직하게는 약 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 가장 바람직하게는 약 0.5 mg/ml인 것인 방법.

청구항 17

동결건조 제형으로서,

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물을 형성하기 위해 재구성되는 것을 특징으로 하는 동결건조 제형.

청구항 18

IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형의 제조 방법으로서, 상기 방법은

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물을 동결건조하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

동결건조 단계는 사전 동결 단계, 1차 건조 단계 및 2차 건조 단계를 연속적으로 포함하는 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항의 방법에 의해 제조된, IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형.

청구항 21

IL-15 단백질 복합체를 포함하는 재구성된 용액의 제조 방법으로서, 상기 방법은

제20항의 동결건조 제형을 재구성하는 단계를 포함하며, 여기에서 재구성을 위해 사용된 용매는 바람직하게는 주사용수인 방법.

청구항 22

제21항의 방법에 의해 제조된, IL-15 단백질 복합체를 포함하는 재구성된 용액.

청구항 23

제22항에 있어서,

IL-15 단백질 복합체의 농도는 약 0.9 mg/ml 내지 1.1 mg/ml, 바람직하게는 약 1 mg/ml인 것인 재구성된 용액.

청구항 24

제22항에 있어서,

재구성된 용액의 pH는 약 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 5.5, 보다 바람직하게는 약 5.15 내지 5.25, 가장 바람직하게는 5.2인 것인 재구성된 용액.

청구항 25

제22항에 있어서,

시트르산-시트르산 나트륨 완충액을 포함하며, 여기에서 완충액의 농도는 약 5 mM 내지 30 mM, 바람직하게는 약 10 mM 내지 20 mM, 보다 바람직하게는 10 mM인 것인 재구성된 용액.

청구항 26

제22항에 있어서,

이당류를 추가로 포함하며, 바람직하게는 이당류는 트레할로오스 및 수크로오스로 이루어지는 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는 트레할로오스인 것인 재구성된 용액.

청구항 27

제26항에 있어서,

이당류의 농도는 약 60 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 약 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml, 보다 바람직하게는 75 mg/ml인 것인 재구성된 용액.

청구항 28

제22항에 있어서,

계면활성제를 추가로 포함하며, 바람직하게는 계면활성제는 폴리소르베이트, 보다 바람직하게는 폴리소르베이트 20인 것인 재구성된 용액.

청구항 29

제28항에 있어서,

계면활성제의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 바람직하게는 약 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.5 mg/ml인 것인 재구성된 용액.

청구항 30

IL-15 관련 질환 또는 상태의 치료를 위한 약제의 제조에 있어서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물 또는 제17항 또는 제20항에 따른 동결건조 제형 또는 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 재구성된 용액의 용도.

청구항 31

제30항에 있어서,

IL-15 관련 질환 또는 상태는 감염성 질환, 암, 혈액 질환, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

암은 바람직하게는 흑색종(melanoma), 결장직장암(colorectal cancer), 피부암(skin cancer), 림프종(lymphoma), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 위암(stomach cancer) 및 유방암(breast cancer)으로 이루어지는 군으로부터 선택되며;

감염성 질환은 바람직하게는 천연두 바이러스(variola virus) 감염, HIV 감염, 세균 감염, 진균 감염 및 HBV 감염으로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

혈액 질환은 바람직하게는 빈혈(anemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 및 T-세포 거대 과립 림프구성 백혈병(T-cell large granular lymphocytic leukemia)으로 이루어지는 군으로부터 선택되며;

자가면역 질환은 바람직하게는 다발성 경화증(multiple sclerosis), 건선(psoriasis), 류머티스 관절염(rheumatoid arthritis), 위염(gastritis) 및 점막염(mucositis)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서,

약학 조성물 또는 동결건조 제형 또는 재구성된 용액은 소분자 억제제 또는 항체 약물과 함께 조합하여 투여되며;

소분자 억제제는 바람직하게는 표적화 화학요법 약물 또는 방사성요법 약물, 보다 바람직하게는 알킬화제이고;

항체 약물은 바람직하게는 단일클론성 항체 약물, 보다 바람직하게는 항-CD20, 항-PD1, 항-PDL1, 항-Her2, 항-EGFR, 항-c-MET 항체인 것인 용도.

청구항 33

세포 면역요법을 위한 약제의 제조에 있어서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 약학 조성물 또는 제17항 또는 제20항에 따른 동결건조 제형 또는 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 재구성된 용액의 용도로서,

세포 면역요법은 수지상 세포 면역요법(Dendritic Cell Immunotherapy), 사이토카인 유도 살해 세포 면역요법(Cytokine Induced Killer Cell Immunotherapy), 수지상 세포-사이토카인 유도 살해 세포 면역요법(Dendritic Cell-Cytokine Induced Killer Cell Immunotherapy), 증가된 사이토카인 유도 살해 세포 면역요법(Enhanced Cytokine Induced Killer Cell Immunotherapy), 자연 살해 세포 면역요법(Natural Killer Cell Immunotherapy), 병용된 항원 자극 T 세포 면역요법(Combined Antigen Stimulated T Cell Immunotherapy), 이중특이적 항원 결합 T 세포 면역요법(Bispecific antigen binding T cell immunotherapy), T 세포 수용체 조작된 T-세포 면역요법(T cell receptor-engineered T-Cell Immunotherapy) 및 키메라 항원 수용체 T-세포 면역요법(Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 종양 세포에 대한 면역요법인 용도.

청구항 34

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 약학 조성물, 또는 제17항 또는 제20항의 동결건조 제형, 또는 제22항 내지 제29항 중 어느 한 항의 재구성된 용액을 함유하는 용기(들)를 포함하는 제품.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 약학적 제제 분야에 속하는 것으로, 특히 본 발명은 IL-15 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물 및

[0001]

약제로서의 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 인터류킨-15(Interleukin-15, IL-15)는 1994년에 Grabstein 등에 의해 발견된, 약 12 내지 14 kD의 사이토카인이다. 이것은 생체 내에서의 정상적인 면역 반응, 예컨대 T 세포, B 세포 및 자연 살해(natural killer, NK) 세포의 증식을 촉진하는 역할을 할 수 있다.
- [0003] IL-15는 사이토카인의 작은 4개의 α -나선 번들 패밀리의 구성원이다. IL-15는 그것의 수용체에 대한 결합에 의해 생물학적 활성을 나타낸다. IL-15 수용체는 3개의 수용체 서브유닛으로 구성된다: IL-15 수용체 알파(IL-15R α), IL-2 수용체 베타(IL-2R β , IL-15R β 또는 CD122로도 알려짐) 및 γ c(CD132로도 알려짐). IL-15R α 는 IL-15에 결합할 수 있으며 결합된 IL-15의 생물학적 기능에 필수적인 Sushi 도메인을 함유한다.
- [0004] 최근에, IL-15가 그것의 수용체 IL-15R α 에 결합하여 복합체를 형성하면 IL-15의 생물학적 활성이 현저하게 향상되는 것으로 밝혀졌다. 연구는 IL-15 및 이의 가용성 수용체 IL-15R α 에 의해 형성된 복합체는 기억(memory) CD8⁺T 림프구 및 NT/NKT 세포의 증식을 자극하는데 있어서 IL-15 단독에 비해 현저하게 우수함을 보여주었다. IL-15/IL-15R α 복합체는 항원에 의해 자극된 CD44^{high}CD8⁺ 기억 T 세포를 포함하는 CD122^{high} 세포의 증식을 현저하게 증폭시키고 유도한다. IL-15/IL-15R α 복합체가 기억 CD8⁺T 세포의 증식을 자극하고 생존을 유지하는 능력은 IL-15 단독의 능력보다 10배 더 높으며, 그 메커니즘은 트랜스-제시(trans-presentation)의 효과와 관련이 있을 수 있다.
- [0005] 종양 면역요법 분야에서 IL-15의 양호한 기대로 인해, NIH는 먼저 IL-15를 이용한 종양의 치료에 관한 연구를 수행하였고, 임상 I상 연구를 향한 연구를 진전시키려는 시도를 하였다. 그러나 IL-15에 대한 몇몇 문제, 예를 들어 작은 분자량 및 생체 내에서의 짧은 반감기로 인해, IL-15의 반복된 투여 용량을 제어하는 것이 어렵고, 진신 면역학적 부작용을 유발하기가 쉬웠다. 따라서, 생체 내에서 IL-15의 반감기를 개선하고, 생체 내에서 이의 생물학적 활성을 촉진 또는 향상시키는 것이 시급하다. 많은 국내외 기업 또는 연구소가 IL-15 면역요법에 대한 연구에 참여하였으며, 예를 들어 특허 CN100334112C(Shanghai Haixin Biotechnology Co., Ltd.)는 미생물 감염의 치료에 사용하기 위한 IL-15-hIgG4Fc 동중-이량체(homo-dimeric) 단백질에 관한 것이다. 본 출원의 복합체 분자 내로 IL-15와 IL-15R α 사이의 이황화 결합의 도입은 분자 안정성 및 생물학적 활성을 향상시킬 수 있고, 또한 제조 공정을 단순화할 수 있다.
- [0006] 그러나 거대분자 단백질 약물은 고분자량 및 복잡한 구조로 인해, 분해, 중합 또는 바람직하지 못한 화학적 변형에 취약하다는 것과 같이 안정적이지 않다. 단백질 약물을 투여에 적합하게 하고, 보관, 수송 및 후속 사용 중에 안정성을 유지하며, 또한 더 나은 효과를 발휘하도록 하기 위하여, 단백질 약물의 안정적인 제형화에 대한 연구가 특히 중요하다.
- [0007] 현재, 많은 기업이 IL-15 단백질 복합체를 개발하였으며, 예를 들어 CN103370339A, CN100334112, CN101735982, W02007001677, US20070160578, W02016/095642 등을 참조한다. 그러나, 새로운 구조를 가진 IL-15 단백질 복합체의 경우, 투여에 보다 적합한 IL-15 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물(제형)을 개발할 필요성이 여전히 있다.

발명의 내용

- [0008] 본 발명은 IL-15 단백질 복합체 및 완충액을 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 여기서 IL-15 단백질 복합체는 IL-15 및 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 하나로 구성된다:
- [0009] - IL-15 수용체,
- [0010] - IL-15 수용체의 세포외 영역을 포함하는 단편, 및
- [0011] - IL-15 수용체의 세포외 영역을 포함하는 융합 단백질.
- [0012] 완충액은 히스티딘 완충액, 석시네이트 완충액, 포스페이트 완충액 및 시트레이트 완충액으로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 시트레이트 완충액, 보다 바람직하게는 시트르산-시트르산 나트륨 완충액이다.
- [0013] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물 중의 IL-15 단백질 복합체의 농도(즉, 완충액에 제형화된 IL-15 단백질 복합체의 농도)는 약 1 mg/ml 내지 50 mg/ml, 바람직하게는 약 1 mg/ml 내지 20 mg/ml, 가장 바람직하게는 1 mg/ml

내지 10 mg/ml이다. 비제한적 예로서, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml을 포함한다.

- [0014] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물 중의 IL-15 단백질 복합체 농도는 소량 투여 형태로, 약 0.9 mg/ml 내지 1.1 mg/ml, 바람직하게는 약 1 mg/ml이다.
- [0015] 대안적인 구현예에서, 완충액의 농도는 약 5 mM 내지 30 mM, 바람직하게는 약 10 mM 내지 20 mM이고, 및 비제한적 예로서, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 보다 바람직하게는 약 10 mM $\pm$ 2 mM 및 가장 바람직하게는 10 mM을 포함한다.
- [0016] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물 중의 완충액의 pH 값은 약 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 5.5이고, 및 비제한적 예로서, 약 5.0, 약 5.1, 약 5.15, 약 5.2, 약 5.25, 약 5.3, 약 5.35, 약 5.4, 약 5.45, 약 5.5, 보다 바람직하게는 약 5.15 내지 5.25 및 가장 바람직하게는 약 5.2를 포함한다.
- [0017] 추가로, 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은 당류를 추가로 포함한다. 본 개시에서 "당류(saccharide)"는 글루코오스, 수크로오스, 트레할로오스, 락토오스, 프룩토오스, 말토오스, 텍스트란, 글리세롤, 에리스리톨, 글리세롤, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨, 만니톨, 멜리비오스, 멜레지토스, 멜리트리오스, 만노트리오스, 스타키오스, 말토오스, 락툴로스, 말톨로스, 소르비톨, 말티톨, 락티톨, 이소-말톡소오스 등으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있는, 단당류, 이당류, 삼당류, 다당류, 당 알코올, 환원당, 비환원당 등을 포함하는, 종래의 조성물 $(CH_2O)_n$ 및 이의 유도체를 포함한다. 바람직한 당류는 비환원 이당류이고, 보다 바람직하게는 트레할로오스 또는 수크로오스이다. 본 개시에서, "트레할로오스(trehalose)"는 바람직하게는 α , α -트레할로오스 2수화물이다.
- [0018] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물 중의 당의 농도는 약 60 mg/ml 내지 약 90 mg/ml, 바람직하게는 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml이고, 비제한적 예는 70 mg/ml, 71 mg/ml, 72 mg/ml, 73 mg/ml, 73 mg/ml, 74 mg/ml, 75 mg/ml, 76 mg/ml, 77 mg/ml, 78 mg/ml, 79 mg/ml, 80 mg/ml, 가장 바람직하게는 75 mg/ml을 포함한다.
- [0019] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은 계면활성제(들)를 추가로 포함한다. 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴록사머, 트리톤, 도데실 설푼산 나트륨, 라우릴 설푼산 나트륨, 옥틸글리코시드 나트륨, 라우릴-설포베타인, 미리스틸-설포베타인, 리놀레일-설포베타인, 스테아릴-설포베타인, 라우릴-사르코신, 미리스틸-사르코신, 리놀레일-사르코신, 스테아릴-사르코신, 리놀레일-베타인, 미리스틸-베타인, 세틸-베타인, 라우라미도프로필-베타인, 코카라미도프로필-베타인, 올레이아미도프로필-베타인, 미리스틸아미도프로필-베타인, 팔미타미도프로필-베타인, 이소스테아라미도프로필-베타인, 미리스틸아미도프로필-다이메틸아민, 팔미타미도프로필-다이메틸아민, 이소스테아라미도프로필-다이메틸아민, 메틸코코일 나트륨, 메틸 올레일타우르산 나트륨, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 에틸렌과 프로필렌 글리콜의 공중합체 등으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 계면활성제는 바람직하게는 폴리소르베이트 80 또는 폴리소르베이트 20, 보다 바람직하게는 폴리소르베이트 20이다.
- [0020] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물 중의 계면활성제의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 바람직하게는 약 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml이고, 비제한적인 예는 0.4 mg/ml, 0.42 mg/ml, 0.44 mg/ml, 0.46 mg/ml, 0.48 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.52 mg/ml, 0.54 mg/ml, 0.56 mg/ml, 0.58 mg/ml, 0.6 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.5 mg/ml을 포함한다.
- [0021] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은:
- [0022] (a) 1 mg/ml 내지 10 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체,
- [0023] (b) 5 mM 내지 30 mM의 시트레이트 완충액,
- [0024] (c) 60 mg/ml 내지 90 mg/ml의 트레할로오스, 및
- [0025] (d) 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20
- [0026] 을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.0 내지 6.0이다.
- [0027] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml 내지 5 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체, (b) 10 내지 20 mM의 시트레이트 완충액, (c) 60 mg/ml 내지 90 mg/ml의 트레할로오스 및 (d) 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.0 내지 5.5이다.

- [0028] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은:
- [0029] (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체,
- [0030] (b) 10 mM $\pm$ 2 mM의 시트레이트 완충액,
- [0031] (c) 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml의 트레할로오스, 및
- [0032] (d) 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20
- [0033] 을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.15 내지 5.25이다.
- [0034] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은:
- [0035] (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체,
- [0036] (b) 10 mM의 시트레이트 완충액,
- [0037] (c) 75 mg/ml의 트레할로오스, 및
- [0038] (d) 0.5 mg/ml의 폴리소르베이트 20
- [0039] 을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.15 내지 5.25, 바람직하게는 pH 5.2이다.
- [0040] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체 3, 및 (b) 10 mM의 시트레이트 완충액을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.0 내지 5.5이다.
- [0041] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 내지 5 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체 3, (b) 10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, (c) 60 mg/ml의 수크로오스 및 (d) 0.4 mg/ml의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.5이다.
- [0042] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체 3, (b) 10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 및 (c) 60 mg/ml의 트레할로오스를 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.5이다.
- [0043] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체 3, (b) 10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 및 (c) 90 mg/ml의 트레할로오스를 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.5이다.
- [0044] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체 3, (b) 10 mM $\pm$ 2 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, (c) 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml의 트레할로오스, 및 (d) 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.15 내지 5.25이다.
- [0045] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체 3, (b) 10 mM $\pm$ 2 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, (c) 75 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml의 트레할로오스, 및 (d) 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.15 내지 5.25이다.
- [0046] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물은: (a) 1 mg/ml의 IL-15 단백질 복합체, (b) 10 mM의 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, (c) 75 mg/ml의 트레할로오스, 및 (d) 0.5 mg/ml의 폴리소르베이트 20을 포함하며, 약학 조성물의 pH는 약 5.2이다.
- [0047] 대안적인 구현예에서, 약학 조성물에 포함된 IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성(identity)을 가지는 IL-15 및 서열번호 2의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가지는 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성된다.
- [0048] 바람직한 구현예에서, IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 IL-15 및 서열번호 2의 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성된다.
- [0049] 일부 구현예에서, 약학 조성물은 2 내지 8℃에서 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 12개월, 적어도 18개월 또는 적어도 24개월 동안 안정적이다. 일부 구현예에서, 약학 조성물은 40℃에서 적어도 7일, 적어도 14일 또는 적어도 28일 동안 안정적이다.
- [0050] 본 발명은 또한 IL-15 단백질 복합체 및 완충액을 갖는 약학 조성물의 제조를 포함하는, 상기 기술된 약학 조성물의 제조 방법을 제공한다. 약학 조성물에서, IL-15 단백질 복합체의 농도는 약 1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 바람

직하계는 약 1 mg/ml 내지 5 mg/ml, 가장 바람직하계는 약 0.9 mg/ml 내지 1.1 mg/ml, 보다 바람직하계는 1 mg/ml이다.

[0051] 완충액은 바람직하계는 시트레이트 완충액이고, 완충액의 농도는 바람직하계는 약 5 mM 내지 30 mM, 보다 바람직하계는 약 5 mM 내지 20 mM, 가장 바람직하계는 약 10mM $\pm$ 2 mM이고, 완충액의 pH는 약 5.0 내지 6.0이며, pH는 바람직하계는 약 5.0 내지 5.5, 가장 바람직하계는 약 5.15 내지 5.25이다. 본 개시에서 약학 조성물이 제조되는 완충액의 pH는 약학 조성물의 최종 pH와 실질적으로 동일하다.

[0052] IL-15 단백질 복합체는 IL-15 및 다음으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 임의의 하나로 구성된다:

[0053] - IL-15 수용체,

[0054] - IL-15 수용체의 세포외 영역을 포함하는 단편, 및

[0055] - IL-15 수용체의 세포외 영역을 포함하는 융합 단백질.

[0056] 구체적으로, IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 IL-15 및 서열번호 2의 폴리펩타이드에 대해 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성된다.

[0057] 바람직하계는, IL-15 단백질 복합체는 서열번호 1의 IL-15 및 서열번호 2의 IL-15 수용체의 융합 단백질로 구성된다.

[0058] 대안적인 구현예에서, 상기 기술된 약학 조성물의 제조 방법은 트레할로오스 및 폴리소르베이트 20을 첨가하는 단계를 추가로 포함하고, 바람직하계는 트레할로오스의 농도는 약 60 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하계는 75 $\pm$ 5 mg/ml, 가장 바람직하계는 75 mg/ml이며, 폴리소르베이트 20의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 바람직하계는 약 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 가장 바람직하계는 약 0.5 mg/ml이다.

[0059] 본 발명은 또한, 상기 기술된 약학 조성물을 동결건조하는 단계를 포함하는, IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형의 제조 방법을 제공한다.

[0060] 대안적인 구현예에서, IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형의 제조 방법에 포함되는 동결건조 단계는 사전 동결 단계, 1차 건조 단계 및 2차 건조 단계를 연속적으로 포함한다. 동결건조 단계는 제형을 동결시키고 이어서 1차 건조에 적합한 온도에서 물을 승화(sublimating)시킴으로써 수행된다. 이러한 조건하에서, 생성물 온도는 제형의 공융점(eutectic point) 또는 분해온도보다 낮다. 적합한 압력, 전형적으로 약 50 내지 250 mTorr 범위의 압력하에서, 1차 건조를 위한 온도 범위는 전형적으로 약 -30 내지 25℃이다(생성물이 1차 건조 중에 동결된 것으로 가정함). 건조에 필요한 시간은 제형의 크기 및 유형, 샘플을 담고 있는 용기(예를 들어, 유리 바이알) 및 액체의 부피에 좌우된다. 시간은 수 시간 내지 수 일(예를 들어, 40 내지 60시간)의 범위일 수 있다. 2차 건조는 약 0 내지 40℃에서 수행될 수 있고, 이는 주로 용기의 유형과 크기 및 사용되는 단백질의 유형에 좌우된다. 2차 건조를 위한 시간은 생성물에서의 원하는 잔류 습도 수준에 의해 결정되고, 전형적으로 적어도 약 5시간이 필요하다. 전형적으로, 낮은 압력하에서 동결건조된 제형은 약 5% 미만, 바람직하계는 약 3% 미만의 수분 함량을 가진다. 압력은 1차 건조 단계에서 적용된 압력과 동일할 수 있다. 바람직하계는, 2차 건조 중에 적용된 압력은 1차 건조 중의 압력보다 낮다. 동결건조를 위한 조건은 제형 및 바이알의 크기에 따라 달라질 수 있다. 본 개시의 사전 동결은 진공도(vacuum of degree)에 관계없이 5℃ 내지 -40℃ 또는 내지 -50℃, 바람직하계는 -45℃에서 동결하는 것을 의미한다. 1차 건조를 위한 온도는 바람직하계는 -25℃이고; 진공도는 0.01 mBar 내지 0.2 mBar, 가장 바람직하계는 0.08 mBar이다. 2차 건조를 위한 온도는 20℃ 내지 30℃, 가장 바람직하계는 25℃이고, 진공도는 0.01 mBar 내지 0.2 mBar, 가장 바람직하계는 0.08 mBar이고, 0.005 mBar 내지 0.02 mBar로 감소되며, 가장 바람직하계는 0.01 mBar이다.

[0061] 본 개시는 또한 상기 기술된 IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형의 제조 방법에 의해 제조된 IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형을 제공한다.

[0062] 본 개시는 또한 상기 기술된 동결건조 제형을 재구성하는 단계를 포함하는, 상기 기술된 약학 조성물을 포함하는 동결건조 제형의 재구성된 용액의 제조 방법을 제공하며, 여기서 재구성을 위해 사용되는 용매는 바람직하계는 주사용수(water for injection)이다.

[0063] 본 발명은 또한 상기 기술된 재구성된 용액의 제조 방법에 의해 제조된 IL-15 단백질 복합체를 포함하는 재구성된 용액을 제공한다.

- [0064] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액에서, IL-15 단백질 복합체의 농도는 약 0.9 mg/ml 내지 1.1 mg/ml, 바람직하게는 약 1 mg/ml이다.
- [0065] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액에서, 약학 조성물은 약 5.0 내지 6.0, 바람직하게는 약 5.0 내지 5.5, 보다 바람직하게는 약 5.15 내지 5.25, 가장 바람직하게는 5.2의 pH를 가진다.
- [0066] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액은 시트르산-시트르산 나트륨 완충액을 포함하고, 완충액의 농도는 약 5 mM 내지 30 mM, 바람직하게는 약 10 mM 내지 20 mM, 보다 바람직하게는 10 mM이다.
- [0067] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액은 이당류를 추가로 포함하며, 바람직하게는 이당류는 트레할로오스 및 수크로오스로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 가장 바람직하게는 트레할로오스이다.
- [0068] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액에서, 당의 농도는 약 60 mg/ml 내지 90 mg/ml, 바람직하게는 약 75 ± 5 mg/ml, 보다 바람직하게는 75 mg/ml이다.
- [0069] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액은 계면활성제를 추가로 포함하며, 계면활성제는 바람직하게는 폴리소르베이트, 보다 바람직하게는 폴리소르베이트 20이다.
- [0070] 대안적인 구현예에서, 재구성된 용액에서, 계면활성제의 농도는 약 0.1 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 바람직하게는 약 0.4 mg/ml 내지 0.6 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.5 mg/ml이다.
- [0071] 본 개시는 또한 IL-15 단백질 복합체를 포함하는 동결건조 제형에 관한 것이며, 동결건조 제형은 상기 기술된 약학 조성물을 형성하기 위해 재구성된다.
- [0072] 개시는 추가로 본원에 기술된 임의의 약학 조성물을 함유하는 용기를 포함하는 제품 또는 키트를 제공한다. 일부 구현예에서, 유리 바이알은 중성 붕규산 유리로 만들어진 주사용 바이알이다.
- [0073] 개시는 추가로 IL-15 관련 질환 또는 상태의 치료를 위한 약제의 제조에서의 상기 기술된 약학 조성물 또는 동결건조 제형 또는 동결건조 제형의 재구성된 용액의 용도를 제공한다.
- [0074] 대안적인 구현예에서, 상기 기술된 용도에서 기술된 질환 또는 상태는 감염성 질환, 암, 혈액 질환, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 암은 바람직하게는 흑색종(melanoma), 결장직장암(colorectal cancer), 피부암(skin cancer), 림프종(lymphoma), 신장 세포 암종(renal cell carcinoma), 간암(liver cancer), 폐암(lung cancer), 위암(stomach cancer), 유방암(breast cancer)으로 이루어지는 군으로부터 선택되며; 감염성 질환은 바람직하게는 천연두 바이러스(variola virus) 감염, HIV 감염, 세균 감염, 진균 감염 및 HBV 감염으로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 혈액 질환은 바람직하게는 빈혈(anemia), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 골수 이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 및 T-세포 거대 과립 림프구성 백혈병(T-cell large granular lymphocytic leukemia)으로 이루어지는 군으로부터 선택되며; 자가면역 질환은 바람직하게는 다발성 경화증(multiple sclerosis), 건선(psoriasis), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 위염(gastritis) 및 점막염(mucositis)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.
- [0075] 대안적인 구현예에서, 상기 용도에 따르면, 약학 조성물 또는 동결건조 제형 또는 동결건조 제형의 재구성된 용액은 소분자 억제제 또는 항체 약물과 함께 조합하여 투여되며; 소분자 억제제는 바람직하게는 표적화 화학요법 약물 또는 방사성요법 약물, 보다 바람직하게는 알킬화제이고; 항체 약물은 바람직하게는 단일클론성 항체 약물, 보다 바람직하게는 항-CD20, 항-PD1, 항-PDL1, 항-Her2, 항-EGFR, 항-c-MET 항체이다.
- [0076] 본 개시는 또한 세포 면역요법을 위한 약제의 제조에서의 상기 기술된 약학 조성물 또는 동결건조 제형 또는 동결건조 제형의 재구성된 용액의 용도를 제공하며, 특히 세포 면역요법은 DC(수지상 세포(Cendritic Cell) 면역요법), CIK(사이토카인 유도 살해(cytokine Induced Killer) 세포 면역요법), DC-CIK(수지상 세포-사이토카인 유도 살해 세포 면역요법), ECIK(증가된 사이토카인 유도 살해 세포 면역요법), NK(자연 살해(Natural Killer) 세포 면역요법), CAS-T(병용된 항원 자극(Combined Antigen Stimulated) T 세포 면역요법), BiAb-T(이중특이적 항원 결합(Bispecific antigen binding) T 세포 면역요법), TCR-T(T 세포 수용체 조작된(T Cell receptor engineered) T-세포 면역요법), CAR-T(키메라 항원 수용체(Chimeric Antigen Receptor) T-세포 면역요법)와 같은 종양 세포에 대한 면역요법이다.
- [0077] 개시는 추가로 대상체에게 상기 기술된 약학 조성물 또는 동결건조 제형 또는 동결건조 제형의 재구성된 용액을 투여하는 단계를 포함하는, IL-15 관련 질환 또는 상태의 치료 방법을 제공한다.
- [0078] 상기 기술된 IL-15 관련 질환 또는 상태의 치료 방법의 대안적인 구현예에서, 질환 또는 상태는 감염성 질환,

암, 혈액 질환, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0079] 암은 바람직하게는 흑색종, 대장암, 피부암, 림프종, 신장 세포 암종, 간암, 폐암, 위암 및 유방암으로 이루어지는 군으로부터 선택되며; 감염성 질환은 바람직하게는 천연두 바이러스 감염, HIV 감염, 세균 감염, 진균 감염 및 HBV 감염으로 이루어지는 군으로부터 선택되고; 혈액 질환은 바람직하게는 빈혈, 급성 골수성 백혈병, 골수 이형성 증후군 및 T-세포 거대 과립 림프구성 백혈병으로 이루어지는 군으로부터 선택되며; 자가면역 질환은 바람직하게는 다발성 경화증, 건선, 류머티스 관절염, 위염 및 점막염으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0080] IL-15 관련 질환 또는 상태를 치료하는 상기 언급된 방법의 대안적인 구현예에서, 약학 조성물 또는 동결건조 제형 또는 동결건조 제형의 재구성된 용액은 소분자 억제제 또는 항체 약물과 함께 조합하여 투여되며; 소분자 억제제는 바람직하게는 표적화 화학요법 약물 또는 방사성요법 약물, 보다 바람직하게는 알킬화제이고; 항체 약물은 바람직하게는 단일클론성 항체 약물, 보다 바람직하게는 항-CD20, 항-PD1, 항-PDL1, 항-Her2, 항-EGFR, 항-c-MET 항체이다.

[0081] 본원에 기술된 다양한 구현예의 특징 중 하나, 일부, 또는 전부는 개시의 다른 구현예를 형성하기 위해 조합될 수 있음을 이해하여야 한다. 개시의 이들 및 다른 측면은 당업자에게 명백할 것이다. 개시의 이들 및 다른 구현예는 다음의 상세한 설명에 의해 추가로 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 D0에서의 순도 값과 비교할 때, 진탕 후 SEC의 순도 값의 차이를 나타내는 맞춤 곡선 도표이다.

도 2는 비환원 CE-SDS를 사용하는 것에 의한, D0에서의 순도 값과 비교할 때 진탕 후의 순도 값의 차이를 나타내는 맞춤 곡선 도표이다.

도 3은 진탕 후 SEC 및 비환원 CE-SDS에 대한 값의 차이를 보여주는 등고선 맵이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] I. 용어

[0084] 본 개시를 보다 쉽게 이해하기 위하여, 특정 기술적 및 과학적 용어가 하기에 구체적으로 정의된다. 본원에서 사용되는 모든 다른 기술적 및 과학적 용어는 본원에서 달리 명시적으로 정의되지 않는 한, 본 개시가 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 사람에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다.

[0085] "완충액(buffer)"은 그것의 산-염기 콘주게이트 성분의 작용에 의해 pH의 변화에 저항성이 있는 완충액을 지칭한다. 적절한 범위 내에서 pH를 조절하는 완충액의 예로는 아세테이트, 석시네이트, 글루코네이트, 히스티딘, 옥살레이트, 락테이트, 포스페이트, 시트레이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글리실글리신 및 기타 유기 산 완충액을 포함한다.

[0086] "히스티딘 완충액(histidine buffer)"는 히스티딘 이온을 함유하는 완충액이다. 히스티딘 완충액의 예로는 히스티딘-염산염, 히스티딘-아세테이트, 히스티딘-포스페이트, 히스티딘-설페이트 완충액 등을 포함하며, 히스티딘-염산염 완충액이 바람직하다. 히스티딘-염산염 완충액은 히스티딘 및 염산에 의해, 또는 히스티딘 및 히스티딘 염산염에 의해 제조된다. "시트레이트 완충액(citrate buffer)"은 시트레이트 이온을 포함하는 완충액이다. 시트레이트 완충액의 예로는 시트르산-시트르산 나트륨, 시트르산-히스티딘, 시트르산-시트르산 칼륨, 시트르산-시트르산 칼슘, 시트르산-시트르산 마그네슘 등을 포함한다. 바람직한 시트레이트 완충액은 시트르산-시트르산 나트륨 완충액이다.

[0087] "석시네이트 완충액(succinate buffer)"은 석시네이트 이온을 포함하는 완충액이다. 석시네이트 완충액의 예로는 석신산-석신산 나트륨, 석신산 히스티딘, 석신산-석신산 칼륨, 석신산-석신산 칼슘을 포함한다. 바람직한 석시네이트 완충액은 석신산-석신산 나트륨 완충액이다.

[0088] "포스페이트 완충액(phosphate buffer)"은 포스페이트 이온을 포함하는 완충액이다. 포스페이트 완충액의 예로는 수소 인산 2나트륨-2수소 인산 나트륨, 수소 인산 2나트륨-2수소 인산 칼륨을 포함한다. 바람직한 포스페이트 완충액은 수소 인산 2나트륨-2수소 인산 나트륨 완충액이다.

[0089] "아세테이트 완충액(acetate buffer)"은 아세테이트 이온을 포함하는 완충액이다. 아세테이트 완충액의 예로는 아세트산-아세트산 나트륨, 아세테이트 히스티딘, 아세트산-아세트산 칼륨, 아세트산-아세트산 칼슘, 아세트산-

아세트산 마그네슘을 포함한다. 바람직한 아세테이트 완충액은 아세트산-아세트산 나트륨 완충액이다.

[0090] "트레할로오스(trehalose)"는 " α , α -트레할로오스 2수화물"로도 알려져 있다.

[0091] "약학 조성물(pharmaceutical composition)"은 본원에 기술된 하나 이상의 IL-15 단백질 복합체 및 다른 화학적 성분, 예컨대 생리학적/약학적으로 허용 가능한 담체 및 부형제를 포함하는 혼합물을 의미한다. 약학 조성물의 목적은 안정한 저장, 수송을 용이하게 하고, 활성 성분의 흡수 및 생물학적 활성을 촉진시키기 위해 유기체로의 투여를 촉진하는 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같은, "약학 조성물" 및 "제형"은 상호 배타적이지 않다.

[0092] 본 개시에 따르면, 달리 명시되지 않는 한, 약학 조성물의 용액 형태의 용매는 물이다.

[0093] "동결건조 제형(lyophilized formulation)"은 액체 또는 용액 형태의 약학 조성물 또는 제형의 진공 동결건조에 의해 얻어지는 제형 또는 약학 조성물을 의미한다.

[0094] 본 개시의 약학 조성물은 안정한 효과를 달성할 수 있다: 약학 조성물에 포함되는 단백질 복합체는 저장 중에 그것의 물리적 안정성 및/또는 화학적 안정성 및/또는 생물학적 활성을 실질적으로 유지한다. 바람직하게는, 약학 조성물은 저장 중에 생물학적 활성뿐만 아니라 그것의 물리적 안정성 및 화학적 안정성을 실질적으로 유지한다. 저장 기간은 일반적으로 약학 조성물의 미리 결정된 보관 수명(self life)을 기준으로 선택된다. 현재 단백질의 안정성을 측정하기 위한 많은 분석 기법이 있으며, 이는 선택된 온도에서 선택된 기간 동안 저장된 후에 안정성을 측정하기 위해 사용될 수 있다.

[0095] 안정한 단백질 약학 제형은 다음의 조건하에서 유의한 변화가 관찰되지 않는 제형이다: 냉각 온도(2 내지 8°C)에서 적어도 3개월, 바람직하게는 6개월, 보다 바람직하게는 1년, 보다 더 바람직하게는 최대 2년 동안 저장된다. 더불어, 안정한 액체 제형은 25°C 내지 40°C의 온도에서 1개월, 3개월 또는 6개월 동안 저장된 후 바람직한 특징을 나타내는 것들을 포함한다. 전형적으로, 허용 가능한 안정성 기준은 다음과 같다: SEC-HPLC에 의해 측정된 바와 같이, 전형적으로 약 10% 이하, 바람직하게는 약 5% 이하의 단백질 복합체 단량체가 분해된다; 육안 검사에 의해, 약학 제형은 무색이거나 투명 내지 약간 유백색이다; 제형의 농도, pH 및 오스몰 농도에 $\pm 10\%$ 이하의 변화가 발생한다; 일반적으로, 약 10% 이하, 바람직하게는 약 5% 이하의 절단이 관찰된다; 일반적으로 약 10% 이하, 바람직하게는 약 5% 이하의 응집체가 형성된다.

[0096] 단백질 복합체는 상기 단백질 복합체가 색 및/또는 투명도의 육안 검사에 의해, 또는 UV 광 산란, 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 및 동적 광산란(DLS)을 통해 측정함으로써 응집, 침전 및/또는 변성에서 현저한 증가를 나타내지 않을 때, 약학 제형에서 "물리적 안정성을 유지"하는 것으로 간주된다. 단백질 형태의 변화는 단백질의 3차 구조를 결정하는 형광 분광법에 의해, 및 단백질의 2차 구조를 결정하는 FTIR 분광법에 의해 평가될 수 있다.

[0097] 단백질 복합체는 상기 단백질 복합체가 현저한 화학적 변형을 나타내지 않을 때, 약학 제형에서 "화학적 안정성을 유지"하는 것으로 간주된다. 화학적 안정성은 단백질의 화학적으로 변경된 형태를 검출하고 정량화함으로써 평가될 수 있다. 단백질의 화학적 구조를 빈번하게 변화시키는 분해 과정은 가수분해 또는 절단(크기 배제 크로마토그래피 및 SDS-PAGE와 같은 방법에 의해 평가됨), 산화(질량 분석 또는 MALDI/TOF/MS와 조합된 펩타이드 분광법에 의해 평가됨), 탈아미드화(이온 교환 크로마토그래피, 모세관 등전점, 펩타이드 분광법, 이소아스파르트산 측정과 같은 방법에 의해 평가됨) 및 이성질체화(예를 들어, 이소아스파르트산의 함량을 측정함에 의해, 펩타이드 분광법에 의해 평가됨)를 포함한다.

[0098] 단백질 복합체는 주어진 시간에 단백질 복합체의 생물학적 활성이 약학 제형이 처음 제조되었을 때에 나타냈던 생물학적 활성의 미리 결정된 범위 내에 여전히 있을 때, 약학 제형에서 "생물학적 활성을 유지"하는 것으로 간주된다. 단백질 복합체의 생물학적 활성은, 예를 들어 항원 결합 검정에 의해 결정될 수 있다.

[0099] 본 개시에서 사용된 아미노산에 대한 3-문자 코드 및 1-문자 코드는 J.biol.chem, 243, p3558 (1968)에 기재되어 있다.

[0100] "IL-15 단백질 복합체(IL-15 protein complex)"는 IL-15 단백질 및 IL-15 수용체(및 IL-15 수용체 기능성 단편을 함유하는 단백질)에 의해 형성되는 단백질 복합체이며, 여기서 IL-15 수용체 기능성 단편은 IL-15 수용체 세포 외 영역 또는 IL-15수용체 세포 외 영역을 함유하는 융합 단백질을 함유한 단편을 포함한다. "IL-15 단백질 복합체 3"은 W02016/095642에 기술된 단백질 복합체 3으로, IL-15R α -Sushi+(S40C)-Fc에 결합된 돌연변이된 IL-15(L52C)에 의해 형성된 단백질 복합체이며, 여기서 IL-15는 L52C 돌연변이를 가지고, IL-15R α 세포외 영역

은 S40C 돌연변이(IL-15R α-Sushi)를 가지며, IL-15R α-Sushi+(S40C)는 Fc에 융합된다.

[0101] 여기서, IL-15(L52C)(서열번호 1):

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLLELQVISC
ESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHVIVQ
MFINTS

[0103] IL-15R α-Sushi+(S40C)-Fc(서열번호 2):

ITCPPMMSVEHADIWVKSYSLSRERYICNSGFKRKAGTCSLTECVLNKATN
VAHWTTPSLKICRDPALVHQRRGGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0105] 단백질을 생산하고 정제하는 방법은 Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapters 5-8 and 15와 같이 당업계에 잘 알려져 있다. 개시의 단백질 복합체는 종래의 유전자 조작 방법에 의해 생성된다.

[0106] 본 개시의 조작된 단백질 복합체는 종래 방법에 의해 제조 및 정제될 수 있다. 예를 들어, IL-15 및 IL-15 수용체를 암호화하는 cDNA 서열은 클로닝되어 GS 발현 벡터 내로 재조합될 수 있다. 재조합 단백질 발현 벡터는 CHO 세포로 안정하게 형질감염될 수 있다. 권장되는 선행 기술로서, 포유류 발현 시스템은 특히 Fc 영역의 고도로 보존된 N-말단 부위에서 단백질의 글리코실화를 초래할 수 있다. 안정한 클론은 인간 IL-15에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현시킴으로써 얻어질 수 있다. 양성 클론은 단백질 복합체를 제조하기 위해 생물반응기의 혈청을 포함하지 않은 배지에서 증폭된다. 단백질이 분비된 배양 배지는 종래 기법에 의해 정제될 수 있다. 예를 들어, 정제는 조정된 완충액을 함유하는 A 또는 G 세파로오스 FF 컬럼을 사용함으로써 수행된다. 비특이적으로 결합된 성분은 세척된다. 결합된 단백질 복합체는 pH 구배에 의해 용출되고, 단백질 분획은 SDS-PAGE에 의해 검출되고 수집된다. 단백질 복합체는 종래 방법을 사용한 여과에 의해 농축될 수 있다. 가용성 혼합물 및 다량체는 또한 분자체(molecular sieve), 이온 교환과 같은 종래 방법에 의해 제거될 수 있다. 그 결과 얻어진 생성물은 즉시, 예컨대 -70℃에서 동결되거나, 동결건조될 필요가 있다.

[0107] 아미노산 서열 "동일성(identity)"은 2개의 단백질 또는 폴리펩타이드 사이의 서열 유사성을 나타낸다. 비교될 두 서열에서의 위치가 동일한 아미노산 잔기에 의해 점유될 때, 예를 들어 두 폴리펩타이드에서의 위치가 동일한 아미노산 잔기에 의해 점유되는 경우, 분자는 그 위치에서 동일한 것으로 간주된다. 퍼센트 서열 동일성 및 퍼센트 서열 유사성을 결정하기에 적합한 알고리즘의 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이며, 이것은 각각 Altschul et al.(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 및 Altschul et al.(1977) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402에 기술되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 공개적으로 이용할 수 있다.

[0108] "투여(administration)" 및 "치료(treatment)"는 동물, 인간, 실험 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체에 적용될 때, 외인성 약물, 치료제, 진단제 또는 조성물을 동물, 인간, 대상체, 세포, 조직, 기관 또는 생물학적 유체와 접촉시키는 것을 나타낸다. "투여" 및 "치료"는, 예를 들어 치료적, 약동학적, 진단적, 연구 및 실험 방법을 나타낼 수 있다. 세포의 치료는 시약을 세포와 접촉시키는 것 및 시약을 유체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 유체는 세포와 접촉한다. "투여" 및 "치료"는 또한 예를 들어, 시험관 내(in vitro)에서 및 생체 외(ex vivo)에서 세포를 시약, 진단제, 결합 조성물(binding composition)을 이용하여, 또는 또 다른 세포를 이용하여 치료하는 것을 의미한다. "치료"는 인간, 수의학적 또는 연구 대상체에게 적용될 때, 치료적 치료, 예방 또는 예방 조치, 연구 및 진단적 적용을 나타낸다.

[0109] "치료"는 내부 또는 외부 사용을 위해 치료제, 예를 들어 본 개시의 임의의 결합 화합물(binding compound)을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 것을 의미하며, 환자는 질환의 하나 이상의 증상을 나타내며, 치료제는 이들 증상에 대해 치료 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 치료제는 임의의 임상적으로 측정 가능한 정도로 증상의 퇴행(degeneration) 또는 이러한 증상의 진행의 억제를 유도하기 위하여, 치료될 대상체 또는 집단에 질환의 하나 이상의 증상을 효과적으로 완화시키는 양으로 투여된다. 임의의 특정 질환의 증상을 효과적으로 완화시키는 치료제의 양("치료적 유효량(therapeutically effective amount)")으로도 언급됨)은 다양한

인자, 예컨대 환자의 질환 상태, 연령 및 체중, 및 환자에게서 원하는 효과를 생성하는 약물의 능력에 따라 달라질 수 있다. 상태의 중증도 또는 진행을 평가하기 위하여 의사 또는 기타 전문 의료 서비스에 제공자에 의해 통상적으로 사용되는 임의의 임상적인 테스트 방법은 질환의 증상이 완화되었는지의 여부를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 개시의 구현예(예컨대, 치료 방법 또는 생성물)가 단일 표적 질환의 증상을 개선하는 데 비효과적일 수 있는 한편, 그것들은 당업계에 알려져 있는 임의의 통계학적 검정, 예컨대 학생 t-검정, 카이-제곱 검정, Mann 및 Whitney U-검정, Kruskal-Wallis 검정(H 검정), Jonckheere-Terpstra 검정 및 Wilcoxon 검정에 따라 통계학적으로 유의한 수의 환자에서 표적 질환의 증상을 완화시켜야 한다.

[0110] "유효량(effective amount)"은 의학적 질환의 증상 또는 상태를 개선 또는 예방하기에 충분한 양을 포함한다. 유효량은 또한 진단을 가능하게 하거나 용이하게 하기에 충분한 양을 의미한다. 특정 환자 또는 수의학적 대상체에 대한 유효량은 치료될 상태, 환자의 전체적인 건강, 투여의 방법, 경로 및 투여량, 및 부작용의 중증도와 같은 인자들에 따라 달라질 수 있다. 유효량은 심각한 부작용 또는 독성 효과를 피하는 최대 투여량 또는 투여요법일 수 있다.

[0111] II. 실시예 및 시험예

[0112] 개시는 다음의 실시예에서 추가로 설명된다. 그러나 이들 실시예는 본 개시의 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

[0113] 본 개시의 실시예 또는 시험예에서 그에 대한 특정 조건이 구체적으로 표시되지 않은 실험 방법은 일반적으로 통상적인 조건을 따라 또는 제조사에 의해 권장되는 조건에 따라 수행하였다. J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Frederick M. Ausubel, The Modern Molecular Biology Method, Greene Press Association을 참조한다. 출처가 구체적으로 표시되지 않은 시약은 통상적으로 시장에서 구입하였다.

[0114] IL-15 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물(제형)의 제조 방법

[0115] 실시예

[0116] IL-15 단백질 복합체를 포함하는 약학 조성물(제형)의 제조 방법은 다음과 같다(각 제형의 성분 및 조성은 단백질 복합체의 안정성을 기준으로 선택 및 조절될 수 있음):

[0117] 제1 단계: IL-15 단백질 복합체 3(IL-15 단백질 복합체 3의 제조, 발현 및 정제에 대해, 2015년 11월 17일에 출원된 PCT/CN2015/094780의 출원 번호를 갖는 특허 출원 W02016/095642(전체적으로 본원에 참조로 포함됨)을 참조함) 및 안정화 성분을 포함하는 스톱 용액을 제조하고, 여과한 후 무균 테스트를 위해 용액을 샘플링하는 단계. 스톱 용액을 0.22 μ m PVDF 필터를 통해 통과시키고 여액을 수집하였다.

[0118] IL-15 단백질 복합체 3은 다음의 폴리펩타이드로 구성된다:

[0119] IL-15(L52C)(서열번호 1):

NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMKCFLLQLQVISC
ESGDASIHDVTENLIILANNSLSSNGNVTESGCKECEEELEKNIKEFLQSFVHVIVQ
MFINTS

[0121] IL-15R α -Sushi+(S40C)-Fc(서열번호 2):

ITCPPPMSVEHADIWVKSYSLYSRERYICNSGFKRKAGTCSLTECVLNKATN
VAHWTTPSLKCIRDPALVHQRGGGSGGGGSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
EPQVYITLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0123] 제2 단계: 로딩 부피를 1.1 ml로 조정하고, 여액을 2 ml 바이알에 채우고, 마개를 불완전하게 막았다. 충전의 시작, 중간 및 끝에서 각각 로딩 차이를 모니터링하기 위하여 샘플링을 수행하였다.

[0124] 제3 단계: 마개가 있는 액체 용액을 동결건조 챔버에 채우고 동결건조시켰다. 동결건조는 사전 동결, 1차 건조 및 2차 건조 단계를 연속적으로 포함한다. 동결건조 과정이 완료되면, 마개를 진공 상태에서 완전하게 막았다.

[0125] 제4 단계: 캡핑기를 사용하여 알루미늄 캡으로 캡핑하는 단계.

[0126] 제5 단계: 제품 붕괴의 부재, 정확한 로딩 부피 및 기타 결함을 확인하기 위하여 육안 검사를 수행하였다. 바이알의 표지를 인쇄하여 바이알에 붙였다. 바이알을 종이 쟁반에 넣고, 인쇄하고 표지를 종이 쟁반 위에 붙였다.

[0127] 실시예 1

[0128] 1 mg/mL 농도의 IL-15 단백질 복합체 3의 제형을 pH 5.0 내지 8.5의 일련의 완충액 중에 제조하였다. 각각의 제형을 여과하고, 2 mL 바이알에 1 mL/바이알로 채우고, 마개로 막고, 캡핑하여 밀봉하였다. 샘플을, 예컨대 40℃ 고온에 두고, 동결-해동 및 진탕을 반복하는 것에 의해 강제 분해(forced degradation) 시험을 수행하였다. 외관 및 SEC를 평가 지수로서 사용하였다. 그 결과는 40℃에서의 강제 분해 시험 후각 완충액 시스템에서 SEC 단량체의 순도가 유의하게 감소되었음을 보여주었다. 그러나 시트레이트 시스템의 감소가 가장 적었다. 진탕, 동결-해동 후, 각 완충액 시스템(포스페이트 시스템 제외)의 SEC는 D0와 비교했을 때 유의한 변화를 나타내지 않았다. 따라서 시트레이트를 완충액 시스템으로 선택하였다. 시트레이트 시스템의 경우, pH 6.0에서, 동결-해동 후 외관 및 40℃에서의 SEC는 약간 더 나빴다. 따라서, pH 5.0 내지 5.5의 조건이 더 양호하였다.

[0129] [표 1]

[0130] IL-15 단백질 복합체 3에 대한 완충액 시스템-pH의 스크리닝 결과

[0131]

배치 번호, 완충액의 유형 및 pH	조건	시간	외관	SEC(%)		
				중합체	단량체	단편
1 10 mM 완충액 pH 5.0	N/A	0	투명함	0.3	96.7	3.0
	40℃	17 일	투명함	0.2	90.1	9.7
	동결-해동	5 회	투명함	0.4	96.7	2.9
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.2	96.7	3.1
2 10 mM 석시네이트	N/A	0	투명함	0.5	96.7	2.8
	40℃	17 일	투명함	0.4	88.0	11.6

완충액 pH 5.5	동결-해동	5 회	작고 현탁된 입자	0.5	96.6	2.9
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.3	96.6	3.1
3 10 mM 석시네이트 완충액 pH 6.0	N/A	0	투명함	0.6	96.4	3.1
	40℃	17 일	투명함	0.4	90.1	9.5
	동결-해동	5 회	투명함	0.6	96.4	3.0
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.3	96.8	2.9
4 10 mM 시트레이트 완충액 pH 5.0	N/A	0	투명함	0.5	96.9	2.6
	40℃	17 일	투명함	0.4	93.3	6.3
	동결-해동	5 회	투명함	0.6	96.4	3.1
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.3	96.7	3.0
5 10 mM 시트레이트 완충액 pH 5.5	N/A	0	투명함	0.6	96.4	3.0
	40℃	17 일	투명함	0.3	93.9	5.8
	동결-해동	5 회	투명함	0.6	96.5	2.9
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.4	96.6	3.1
6 10 mM 시트레이트 완충액 pH 6.0	N/A	0	투명함	0.6	96.3	3.2
	40℃	17 일	투명함	0.3	92.5	7.1
	동결-해동	5 회	작고 현탁된 입자	0.6	96.7	2.7
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.4	96.6	3.0
7 10 mM 포스페이트 완충액 pH 6.0	N/A	0	투명함	0.5	96.9	2.6
	40℃	17 일	투명함	0.3	89.4	10.3
	동결-해동	5 회	투명함	0.6	96.4	2.9
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	작은 입자	0.3	97.0	2.7
8 10 mM 포스페이트 완충액 pH 7.0	N/A	0	투명함	0.6	95.9	3.5
	40℃	17 일	투명함	N/A	N/A	N/A
	동결-해동	5 회	투명함	0.7	96.1	3.2
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.6	95.2	4.2
9 10 mM 포스페이트 완충액 pH 7.5	N/A	0	투명함	0.6	96.0	3.5
	40℃	17 일	투명함	N/A	N/A	N/A
	동결-해동	5 회	투명함	1.5	94.5	3.9
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.5	92.8	6.6
10 10 mM 포스페이트 완충액 pH 8.0	N/A	0	투명함	0.6	95.2	4.2
	40℃	17 일	투명함	N/A	N/A	N/A
	동결-해동	5 회	투명함	1.4	94.6	4.0
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.5	90.1	9.4
11 10 mM 포스페이트 완충액 pH 8.5	N/A	0	투명함	0.6	95.0	4.4
	40℃	17 일	투명함	N/A	N/A	N/A
	동결-해동	5 회	투명함	1.1	94.8	4.1
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.5	90.5	9.0
12 10 mM 히스티딘 완충액	N/A	0	투명함	0.3	96.8	2.9
	40℃	17 일	투명함	0.2	90.8	9.0
	동결-해동	5 회	투명함	0.4	96.2	3.4

pH 5.5	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.2	97.0	2.8
13 10 mM 히스티딘 완충액 pH 6.0	N/A	0	투명함	0.4	97.0	2.6
	40℃	17 일	투명함	0.4	92.1	7.5
	동결-해동	5 회	투명함	0.4	97.1	2.5
	진탕(25℃ 250 rpm)	2 일	투명함	0.3	97.0	2.7

주: N/A는 특별한 조작이 없음을 의미한다.

실시예 2

1 mg/mL 농도의 IL-15 단백질 복합체 3, 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨, 60 mg/mL 수크로오스, pH 5.5를 포함하는 제형을 다음과 같이 다양한 농도의 계면활성제를 함유하는 완충액 중에 제조하였다:

1) 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 20

2) 0.4 mg/mL 폴리소르베이트 20

3) 0.2 mg/mL 폴리소르베이트 80

4) 0.4 mg/mL 폴리소르베이트 80

[0141] 각각의 제형을 여과하고, 2 mL 바이알에 1 mL/바이알로 채우고, 마개로 막고, 캡핑하여 밀봉하였다. 샘플을, 예컨대 40℃ 고온에 두고, 동결-해동을 반복하는 것에 의해 강제 분해 시험을 수행하였다. 안정성 결과는 상이한 제형 사이에서 외관 및 SEC에 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 40℃ 고온 및 동결-해동 비환원된 CE-SDS 조건하에서 얻어진 결과는 0.4 mg/mL 폴리소르베이트 20 그룹에서의 안정성이 더 우수함을 보여주었다.

[0142] [표 2]

[0143] IL-15 단백질 복합체 3의 안정성에 대한 Tween의 스크리닝 결과

Tween의 유형 및 농도	실험 조건	SEC (%)			비환원 CE-SDS (%)	외관
		중합체	단량체	단편		
0.2 mg/ml 폴리소르베이트 20	0	0.1	97.8	2.0	87.3	투명함
	동결- 해동 5 회	0.1	96.8	3.1	87.8	매우 작은 입자
	14 일 동안 40℃	0.1	95.5	4.3	81.1	투명함
0.4 mg/ml 폴리소르베이트 20	0	0.2	97.4	2.5	86.4	투명함
	동결-해동 5 회	0.1	97.0	2.9	89.5	매우 작은 입자
	14 일 동안 40℃	0.1	95.6	4.3	82.8	투명함
0.2 mg/ml 폴리소르베이트 80	0	0.2	97.4	2.4	85.3	투명함
	동결-해동 5 회	0.1	97.1	2.8	87.5	매우 작은 입자
	14 일 동안 40℃	0.2	95.3	4.5	80.9	투명함
0.4 mg/ml 폴리소르베이트 80	0	0.2	97.4	2.4	86.0	투명함
	동결-해동 5 회	0.2	96.9	3.0	88.1	매우 작은 입자
	14 일 동안 40℃	0.1	95.4	4.4	82.0	투명함

[0144]

[0145] 실시예 3

[0146] 1 mg/mL 농도의 IL-15 단백질 복합체 3, 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨을 포함하는 약학 조성물을 각각 α , α -트레할로오스 2수화물 및 수크로오스를 함유하는 완충액(pH 5.5) 중에 제조하였다. 각각의 제형을 여과하고, 2 mL 바이알에 1 mL/바이알로 채우고, 마개로 막고, 캡핑하여 밀봉하였다. 샘플을, 예컨대 40℃ 고온에 두고, 동결-해동을 반복하는 것에 의해 강제 분해 시험을 수행하였다. 결과는 트레할로오스 시스템에서 IL-15 단백질 복합체 3의 안정성이 수크로오스 시스템에서의 안정성보다 우수함을 보여주었다.

[0147] [표 3]

[0148] IL-15 단백질 복합체 3의 안정성에 대한 당의 스크리닝 결과

당류의 유형 및 농도	실험 조건	SEC(%)			비환원 CE-SDS(%)	외관
		중합체	단량체	단편		
6% 트레할로오스	0	0.2	97.5	2.3	87.2	투명함
	동결-해동 5 회	0.2	97.0	2.8	88.9	매우 미세한 입자
	14 일 동안 40℃	0.3	95.0	4.7	82.5	필라멘트성 입자
9% 트레할로오스	0	0.1	97.6	2.3	85.3	투명함
	동결-해동 5 회	0.2	96.8	3.0	88.7	매우 미세한 입자
	14 일 동안 40℃	0.1	95.3	4.6	85.6	필라멘트성 입자
6% 수크로오스	0	0.1	97.4	2.4	84.9	투명함
	동결-해동 5 회	0.2	96.9	2.9	87.8	매우 미세한 입자
	14 일 동안 40℃	0.2	95.4	4.4	81.7	필라멘트성 입자
9% 수크로오스	0	0.2	97.3	2.5	86.7	투명함
	동결-해동 5 회	0.2	96.8	3.0	87.5	매우 미세한 입자
	14 일 동안 40℃	0.2	94.8	5.0	79.9	필라멘트성 입자

[0149]

[0150] 주: 본 개시에서, 트레할로오스의 6%는 60 mg/ml이고; 9%는 90 mg/ml이다.

[0151] 실시예 4: 제형의 최적화

[0152] 트레할로오스 및 폴리소르베이트 20의 농도, 이온 강도 및 pH를 추가로 최적화하기 위하여, DOE 실험을 JMP 소프트웨어를 사용하여 설계하였고, RSM 모델을 사용하여 함으로써 일련의 제형을 얻었고, 이때 단백질 농도는 1 mg/mL이었다. 용액에 SEC 및 비환원 CE-SDS를 평가 지수로서 사용하는 강제 분해 방법을 수행하였고, 결과를 최소 제곱 테스트에 의해 통계학적으로 분석하였다. DOE 매개변수를 표 4에 나타내었다. 테스트 제형 및 결과를 표 5 및 6에 나타내었다. 통계학적 분석 결과를 도 1 내지 3에 나타내었다.

[0153] [표 4]

[0154] DOE에서 설계한 인자 및 수준

인자	수준	반응
pH	5.0-6.0	20 일 동안 40℃, 동결-해동 5 회 진탕 (300 rpm, 4℃) SEC, CE-SDS (비환원)
이온 강도	10 - 30 mM	
트레할로오스	6-9%	
폴리소르베이트 20	0.1 -0.6 mg/ml	

[0155]

[0156] [표 5]

[0157] DOE에 의해 설계된 IL-15 단백질 복합체 3의 제형

번호	완충액	pH	이온 강도 (mM)	당의 농도 (%)	폴리소르베이트 20 의 농도 mg/ml
01	시트르산-시트르산 나트륨	5	10	9	0.6
02		5	30	9	0.6
03		6	20	6	0.1
04		5.5	30	7.5	0.35
05		6	10	6	0.6
06		5.5	20	7.5	0.35
07		5.5	20	9	0.6
08		6	30	9	0.1
09		5	20	7.5	0.6
10		5	10	6	0.35
11		5.5	30	6	0.6
12		6	30	7.5	0.6
13		5	20	9	0.1
14		5	30	6	0.1
15		5.5	10	7.5	0.1
16		6	10	9	0.35

[0158]

[0159] 주: 본 개시에서, 트레할로오스의 6%는 60 mg/ml이고; 9%는 90 mg/ml이다. 다른 단위는 유사한 방식으로 전환된다.

[0160] [표 6]

[0161] DOE에 의해 스크리닝된 제형의 결과

번호	SEC 단량체의 순도(%)				비환원 CE-SDS(%)			
	0	동결-해동 5 회	20 일 동안 40℃	15 일 동안 진탕	0	동결-해동 5 회	20 일 동안 40℃	15 일 동안 진탕
01	96.0	97.0	92.1	95.8	94.1	94.9	90.3	92.1
02	95.9	96.9	92.5	96.3	94.7	95.6	90.8	93.4
03	96.1	96.6	91.3	93.6	92.0	92.9	88.4	89.8
04	96.1	96.9	91.9	96.2	93.6	94.2	90.5	92.3
05	96.0	96.8	92.0	95.9	92.8	93.9	89.4	90.1
06	96.4	97.0	93.8	96.3	93.3	94.5	90.3	91.6
07	96.1	97.2	92.1	96.0	93.6	94.7	91.0	92.0
08	95.8	96.5	92.7	95.9	91.8	93.2	89.0	90.6
09	96.3	96.6	93.0	96.7	94.7	94.9	90.9	93.8
10	96.4	96.9	91.6	95.9	94.1	94.5	90.6	91.8
11	96.0	96.7	93.6	96.2	93.9	94.8	91.3	93.1
12	96.4	96.6	92.9	95.6	93.0	93.9	90.0	91.4
13	96.1	96.5	92.9	94.4	94.2	94.1	89.9	92.4
14	96.0	96.7	92.7	93.4	94.5	94.8	90.7	93.2
15	95.6	96.5	94.1	94.0	93.3	93.7	90.8	90.7
16	95.9	96.8	91.0	95.4	92.4	93.3	89.2	89.6

[0162]

[0163] 강제 분해로부터 얻어진 데이터를 피팅하였고, 그 결과는 다음과 같았다:

[0164] D0와 D15(진탕 후) 사이의 SEC 단량체 순도의 값의 차이를 피팅하였고(차이 값은 음(negative)인 경우, 0으로 간주함), $R^2 > 0.99$, $P < 0.05$, 모델은 유효하였다. 결과를 도 1에 나타내었다.

[0165] 비환원 CE-SDS를 사용하여, D0와 D15(진탕 후) 사이의 SEC 단량체 순도의 값의 차이를 피팅하였고, $R^2 > 0.98$, $P < 0.05$, 모델은 유효하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

[0166] 다른 데이터의 경우, 피팅은 유효하지 않았다.

[0167] 동결건조된 제형의 양호한 압축성 및 적합한 오스몰 농도를 확보하기 위하여, 트레할로오스의 농도를 $7.5 \pm 0.5\%$ (75 ± 5 mg/ml)로 설정하였다. 10 ± 2 mM 이온 강도는 충분한 완충 용량을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0168] 트레할로오스의 농도를 7.5% (75 mg/ml)로 설정하고, 이온 강도를 10 mL로 설정하였으며, 가로 좌표에 pH를 플로

팅하고, 세로 좌표에 폴리소르베이트의 농도를 플로팅하고, 진탕 후 SEC와 비환원 CE-SDS에 대한 값의 차이를 나타내기 위해 등고선 맵을 플로팅하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 단백질 복합체의 등전점과 조합하여 도면에 도시된 결과에 기초하여, 제형에 대한 바람직한 pH 범위는 pH 5.15 내지 pH 5.25이고, 폴리소르베이트의 농도는 0.4 내지 0.6 mg/ml인 것을 알 수 있다.

[0169] 실시예 5

IL-15 단백질 복합체 3을 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨(pH 5.2), 75 mg/mL α , α -트레할로오스 2수화물, 0.5 mg/mL 폴리소르베이트 20, pH 5.2에서 1.0 mg/mL로 제형화하였다. 단백질을 2 mL 바이알에 1.1 mL/바이알로 채우고, 각각 -25℃, -20℃ 및 -15℃의 1차 건조 온도에서 동결건조하고, 테스트를 위해 동결건조된 고무 마개로 밀봉하였다. 결과는 다양한 온도에서 모든 재구성된 용액의 외관이 요구조건을 충족하였고, -25℃에서 동결건조된 제형의 외관이 더 우수하였으며, 분말 케이크는 붕괴되지 않고 가득 찬 것으로 나타났다.

[0171] [표 7]

제형의 동결건조를 위한 단계

동결건조 과정에 대한 매개변수	온도 (℃)	진공 정도 (mBar)
사전 동결	5	N/A
	-45	N/A
1 차 건조	-25	0.08
2 차 건조	25	0.01

[0174] 실시예 6

IL-15 단백질 복합체 3을 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨(pH 5.2), 75 mg/mL α , α -트레할로오스 2수화물, 0.5 mg/mL 폴리소르베이트 20, pH 5.2에서 1.0 mg/mL로 제형화하였다. 제형을 각각 유리 바이알, 액체 저장 백 및 316 L의 스테인레스 강 탱크에 충전하고, 각각 2 내지 8℃ 및 25℃에 24시간 동안 놓아두었다. 외관, pH, 단백질 함량 및 순도의 분석은 IL-15 단백질 복합체 3이 24시간 내에는 안정적이었음을 나타냈다. 제형은 유리 바이알, 스테인레스 강 탱크 및 액체 저장 백과 상용성이었다.

[0176] [표 8]

다양한 접촉 물질에서 IL-15 단백질 복합체 3의 안정성

온도	그룹 분류	시간 (시간)	외관	pH	함량 (mg/ml)	SEC 단량체의 순도(%)	비환원 CE-SDS (%)
2 - 8℃	유리	0	투명함	5.28	1.043	99.83	96.4
		8	투명함	5.27	1.031	99.84	96.2
		24	투명함	5.28	1.030	99.82	96.0
	액체 저장 백	8	투명함	5.27	1.049	99.80	96.6
		24	투명함	5.27	1.027	99.82	96.1
	스테인레스 강	8	투명함	5.27	1.046	99.82	96.6
		24	투명함	5.27	1.056	99.90	95.3
25℃	유리	8	투명함	5.28	1.032	99.83	96.9
		24	투명함	5.28	1.026	99.79	95.3
	액체 저장 백	8	투명함	5.28	1.029	99.84	97.0
		24	투명함	5.25	1.034	99.78	96.6
	스테인레스 강	8	투명함	5.29	1.032	99.76	96.0
		24	투명함	5.27	1.057	99.88	95.0

[0179] 실시예 7

기타 대안적인 약학 조성물(또는 제형) 또는 재구성된 용액

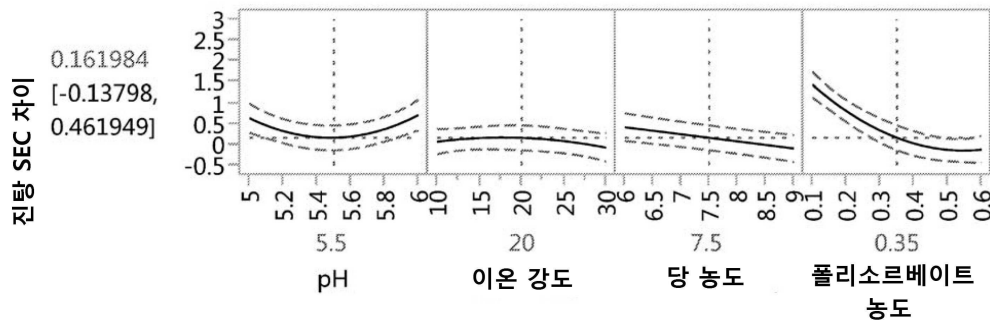
추가로 제공되는 안정한 약학 제형은 다음을 포함한다:

(1) 5 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 75 mg/ml 트레할로오스, 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 최종 pH는 5.2임;

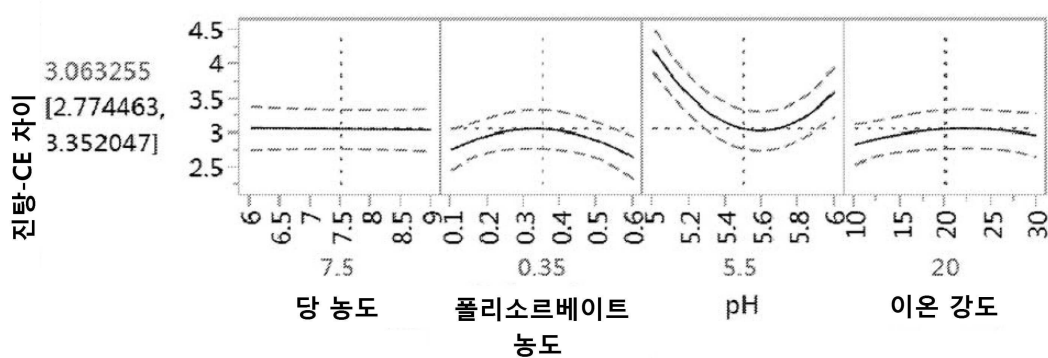
- [0183] (2) 10 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 75 mg/ml 트레할로오스, 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 최종 pH는 5.2임;
- [0184] (3) 10 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 75 mg/ml 수크로오스, 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 최종 pH는 5.25임;
- [0185] (4) 0.9 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 60 mg/ml 트레할로오스, 0.1 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 20 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액(pH 5.0);
- [0186] (5) 1 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 75 mg/ml 트레할로오스, 0.5 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 10 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액(pH 5.2);
- [0187] (6) 1.1 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 90 mg/ml 트레할로오스, 0.6 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 30 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액(pH 5.5);
- [0188] (7) 0.9 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 60 mg/ml 트레할로오스, 0.1 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 20 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 최종 pH는 5.0임;
- [0189] (8) 1.1 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 90 mg/ml 트레할로오스, 0.6 mg/ml 폴리소르베이트 20, 및 30 mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액, 최종 pH는 5.5임;
- [0190] (9) 0.5 mg/ml IL-15 단백질 복합체 3, 65 mg/ml 트레할로오스, 0.3 mg/ml 폴리소르베이트 20(pH 5.3), 및 15mM 시트르산-시트르산 나트륨 완충액.

도면

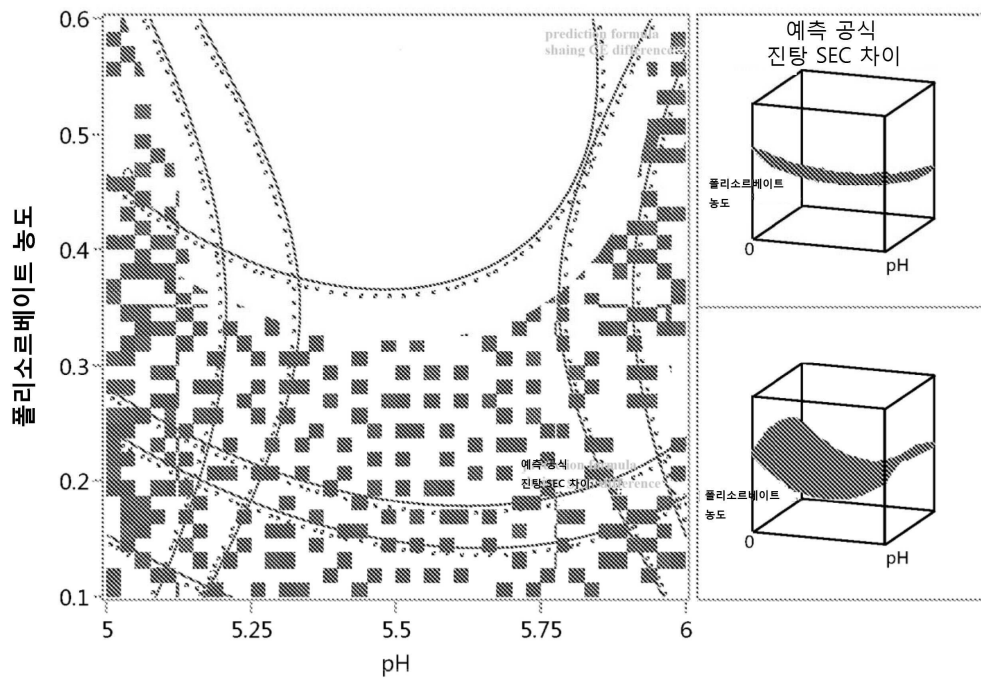
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.,LTD
SHANGHAI HENGRUI PHARMACEUTICAL CO.,LTD
- <120> IL-15 PROTEIN COMPLEX PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USES THEREOF
- <130> P19-119-INP-GC
- <150> CN 201710611317.2
- <151> 2017-07-25
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> IL-15 (L52C)
- <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 Cys 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> 315
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IL-15R alpha-Sushi+(S40C)-Fc
 <400> 2

Ile Thr Cys Pro Pro Pro Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val
 1 5 10 15
 Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly

20 25 30
 Phe Lys Arg Lys Ala Gly Thr Cys Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn
 35 40 45
 Lys Ala Thr Asn Val Ala His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile
 50 55 60
 Arg Asp Pro Ala Leu Val His Gln Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 85 90 95

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 100 105 110

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
115 120 125

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
130 135 140

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
145 150 155 160

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
165 170 175

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
180 185 190

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
195 200 205

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
210 215 220

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
225 230 235 240

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
245 250 255

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
260 265 270

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
275 280 285

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
290 295 300

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315