



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월21일

(11) 등록번호 10-2785429

(24) 등록일자 2025년03월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/395* (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61K 47/60* (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01) *C07K 14/55* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*A61K 39/39541* (2013.01)  
*A61K 31/4745* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7035321
- (22) 출원일자(국제) 2018년05월02일  
 심사청구일자 2021년04월20일
- (85) 번역문제출일자 2019년11월28일
- (65) 공개번호 10-2019-0141760
- (43) 공개일자 2019년12월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/030714
- (87) 국제공개번호 WO 2018/204528  
 국제공개일자 2018년11월08일
- (30) 우선권주장  
 62/500,486 2017년05월02일 미국(US)  
 62/502,051 2017년05월05일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 KR1020160122748 A\*  
 WO2012109203 A1\*  
 KR1020190141760 A\*  
 US20080241139 A1\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
 넥타르 테라퓨틱스  
 미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미  
 션 베이 불러바드 455 스위트 100
- (72) 발명자  
 키비메 사울  
 미국 94122 캘리포니아주 샌프란시스코 46번 애비  
 뉴 1319  
 엔시 마를렌  
 미국 95110 캘리포니아주 샌호세 케온크레스트 애  
 비뉴 1379  
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 39 항

심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 면역 요법적 종양 치료 방법

(57) 요약

암을 갖는 환자에게 (a) 4-1BB 효현제; (b) IL-2R $\beta$ -활성화 양의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -선택적 효현제; 및/또는 (c) 톨-유사 수용체 효현제를 투여하는 방법뿐만 아니라, 관련 조성물, 키트 및 조성물이 제공된다.

(52) CPC특허분류

*A61K 45/06* (2013.01)  
*A61K 47/60* (2017.08)  
*A61K 9/0019* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 14/55* (2013.01)  
*C07K 16/2878* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*A61K 2300/00* (2023.05)  
*C07K 2317/75* (2013.01)

(72) 발명자

**아난드 닐 케이**

미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 반슨 애비뉴  
542

**카이 하이잉**

미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 반하트 플레이  
스 7450

**렝 보-량**

미국 94582 캘리포니아주 샌 라몬 펄 크레스트 코  
트 445

**렌 중쉬**

미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 리본 스트리  
트 1301

**조쉬 발찬드라 브이**

미국 35758 앨라배마주 매디슨 글렌 뷰 드라이브  
108

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

4-1BB 효현제,

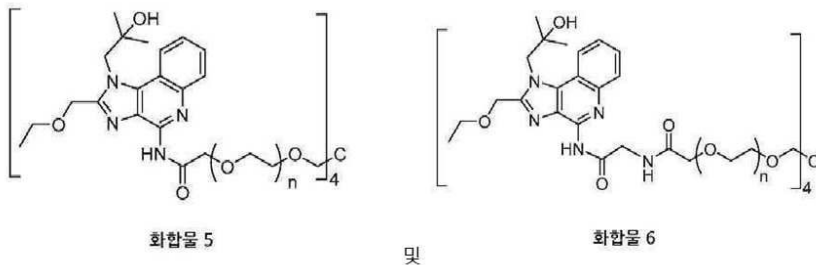
치료 유효량의 지속 작용성 인터루킨-2 수용체 베타(IL-2R $\beta$ )-우선적 효현제, 및

다중-아암, 수용성, 비펩티드성 중합체에 공유 부착된 톨-유사 수용체(TLR) 효현제를 포함하는, 암을 갖는 대상체를 치료하기 위한 병용물로서,

4-1BB 효현제는 항-CD137 항체이고,

지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제는 폴리에틸렌 글리콜에 방출가능하도록 공유 부착된 IL-2 를 포함하고,

TLR 효현제는



(식 중, 각 화합물 5 및 6 의 각 n 은 독립적으로 40 내지 350 의 정수임.)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택되는, 병용물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제, 톨-유사 수용체 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제 각각이 실질적으로 동시에 투여되는, 병용물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제가 톨-유사 수용체 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제 중 적어도 하나와 별도로 투여되는, 병용물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제 각각이 실질적으로 동시에 투여되는, 병용물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제 및 톨-유사 수용체 효현제 각각이 실질적으로 동시에 투여되는, 병용물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 톨-유사 수용체 효현제가 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제 중 적어도 하나와 별도로 투여되는, 병용물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제가 전신 투여용으로 제제화된, 병용물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제가 정맥내 투여용으로 제제화된, 병용물.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선허제가 동일한 제제로 투여되도록 제제화된, 병용물.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, 톨-유사 수용체 효현제가 대상체에서 암 조직에 직접 투여되도록 제제화된, 병용물.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, 톨-유사 수용체 효현제가 대상체의 고형암에 직접 투여되도록 제제화된, 병용물.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 톨-유사 수용체 효현제가 종양내 주사 및 종양 부근 주사로부터 선택된 방법에 의한 투여용으로 제제화된, 병용물.

#### 청구항 13

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선허제가 전신 투여용으로 제제화된, 병용물.

#### 청구항 14

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선허제 정맥내 투여용으로 제제화된, 병용물.

#### 청구항 15

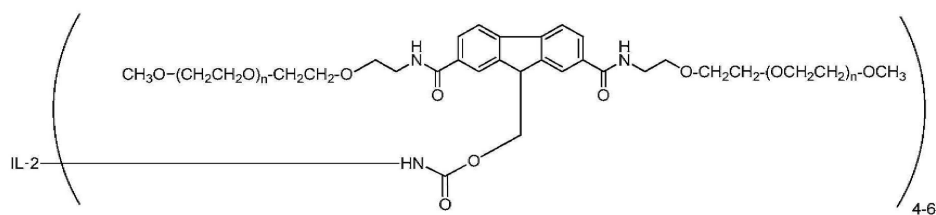
제1항에 있어서, 4-1BB 효현제가 우레루맙 및 유토밀루맙으로부터 선택된 것인, 병용물.

#### 청구항 16

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선허제 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kD</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2, 및 (2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>6 avg</sub>인터루킨-2로부터 선택된 것인, 병용물.

#### 청구항 17

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선허제 하기 식으로 나타내는 화합물



(식 중, IL-2 는 인터루킨-2 이고, 각 n 은 3 내지 4000의 범위임.)

또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물인, 병용물.

#### 청구항 18

제1항에 있어서, 암이 고형암인, 병용물.

#### 청구항 19

제1항에 있어서, 암이 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 골암, 결장직장암, 위암, 림프종, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 갑상샘암, 신장암, 담관의 암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광

암, 식도암, 호지킨병 및 부신피질암으로부터 선택된 것인, 병용물.

#### 청구항 20

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제, 및 톨-유사 수용체 효현제의 투여가 면역계의 활성화를 촉진시키는 데 효과적인, 병용물.

#### 청구항 21

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제, 및 톨-유사 수용체 효현제의 투여가 CD8 T 세포, CD11c+ 및 CD8+ 수지상 세포, 및 호중구 중 적어도 하나의 활성화를 촉진시키는 데 효과적인, 병용물.

#### 청구항 22

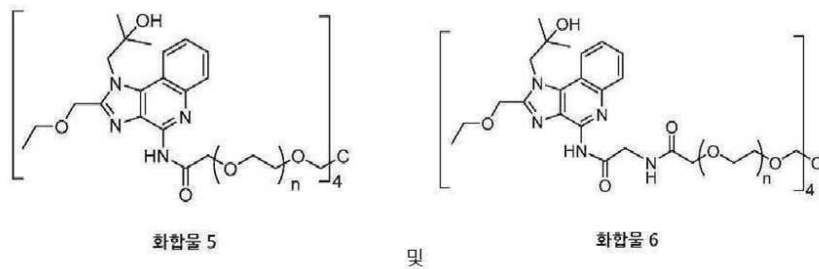
제1항에 있어서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제, 및 톨-유사 수용체 효현제의 투여가 T 조절 세포, 마크로파지 및 단핵구를 억제시키는 데 효과적인, 병용물.

#### 청구항 23

제1항에 있어서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제, 및 톨-유사 수용체 효현제의 투여가 암에 대한 압스코팔 효과를 생성하는 데 효과적인, 병용물.

#### 청구항 24

4-1BB 효현제;



(식 중, 각 화합물 5 및 6 의 각 n 은 독립적으로 40 내지 350 의 정수임.)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택되는 톨-유사 수용체 (TLR) 효현제 및

치료 유효량의 지속 작용성 인터루킨-2 수용체 베타(IL-2R $\beta$ )-우선적 효현제; 및

암을 갖는 대상체에게 이들을 투여하기 위한 지시사항

을 포함하는 키트로서,

4-1BB 효현제는 항-CD137 항체이고,

지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제는 폴리에틸렌 글리콜에 방출가능하도록 공유 부착된 IL-2 를 포함하는, 키트.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 4-1BB 효현제가 전신 투여용으로 제제화된, 키트.

#### 청구항 26

제24항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제가 전신 투여용으로 제제화된, 키트.

#### 청구항 27

제24항에 있어서, 4-1BB 효현제 또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선적 효현제 중 적어도 하나가 정맥내 투여용으로

제제화된, 키트.

#### 청구항 28

제24항에 있어서, 키트가 단일 제제로 제제화된 적어도 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제를 포함하는, 키트.

#### 청구항 29

제24항에 있어서, 키트가 (i) 단일 제제로 제제화된 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제, 및 (ii) 별도의 제제로 제제화된 톨-유사 수용체 효현제를 포함하는, 키트.

#### 청구항 30

제24항에 있어서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제, 및/또는 TLR 효현제 각각이 수성 희석제 중 재구성에 적합한 고체 형태인, 키트.

#### 청구항 31

제24항에 있어서, 톨-유사 수용체 효현제가 대상체에서 암 조직에 직접 투여용으로 제제화된, 키트.

#### 청구항 32

제24항에 있어서, 톨-유사 수용체 효현제가 종양내 주사용 또는 종양 부근 주사용으로 제제화된, 키트.

#### 청구항 33

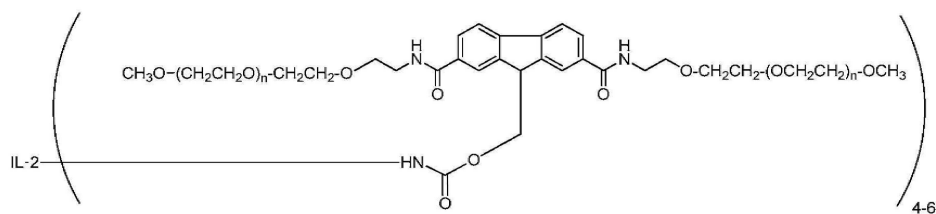
제24항에 있어서, 4-1BB 효현제가 우레루맵 및 유토밀루맵으로부터 선택된 것인, 키트.

#### 청구항 34

제24항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제가 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kd</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2, 및 (2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>6avg</sub>인터루킨-2로부터 선택된 것인, 키트.

#### 청구항 35

제24항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제가 하기 식으로 나타내는 화합물



(식 중, IL-2 는 인터루킨-2 이고, 각 n 은 3 내지 4000 의 범위임.)

또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물인, 키트.

#### 청구항 36

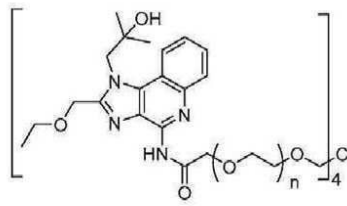
암 치료에 사용하기 위한 4-1BB 효현제를 포함하는 조성물로서,

상기 조성물은 (i) 지속 작용성 인터루킨-2 수용체 베타(IL-2R $\beta$ )-우선택 효현제 및 (ii) 톨-유사 수용체 (TLR) 효현제와 병용 투여되고,

4-1BB 효현제는 항-CD137 항체이고,

지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제는 폴리에틸렌 글리콜에 방출가능하도록 공유 부착된 IL-2 를 포함하고,

TLR 효현제는



화합물 5

및



화합물 6

(식 중, 각 화합물 5 및 6 의 각 n 은 독립적으로 40 내지 350 의 정수임.)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택되는, 조성물.

### 청구항 37

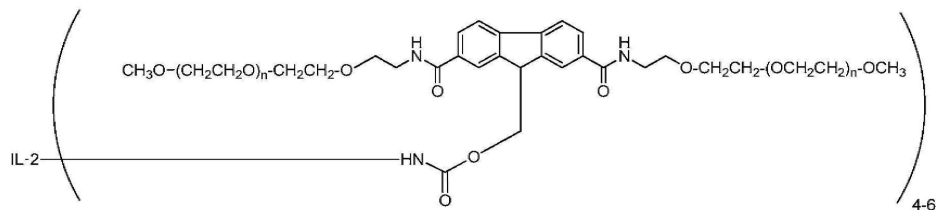
제36항에 있어서, 고형암의 치료에 사용하기 위한, 조성물.

### 청구항 38

제36항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제가 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kd</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub> 인터루킨-2, 및 (2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>6 avg</sub> 인터루킨-2로부터 선택된 것인, 조성물.

### 청구항 39

제36항에 있어서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -우선택 효현제가 하기 식으로 나타내는 화합물



(식 중, IL-2 는 인터루킨-2 이고, 각 n 은 3 내지 4000 의 범위임.)

또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물인, 조성물.

### 청구항 40

삭제

### 청구항 41

삭제

### 청구항 42

삭제

### 청구항 43

삭제

### 청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원들에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2017년 5월 5일에 출원된 미국 가출원 62/502,051 및 2017년 5월 2일에 출원된 미국 가출원 62/500,486에 대해 우선권의 이익을 주장하며, 이들의 개시내용은 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0003] 분야

[0004] 본원에는 (특히) 4-1BB 수용체 효현제를 IL-2R $\beta$ -선택적 효현제 및/또는 톨-유사(toll-like) 수용체(TLR) 효현제와 조합하여 포함하는 조성물, 관련 제제, 시스템 및 키트, 치료적 조합, 치료 방법, 및 상기 조성물의 제조 방법이 기재되어 있다. 또한, 본 출원은 암 면역 요법 분야에 관한 것으로, 예를 들어 암을 갖는 개인에게 4-1BB 수용체 효현제를 지속 작용성(long-acting) IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 톨-유사(TLR) 수용체 효현제와 병용하여 투여함에 의한 암을 갖는 개인의 치료를 포함한다.

**배경 기술**

[0005] 4-1BB 수용체는 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 군의 구성원이다. 이 수용체는 또한 림프구 활성화(ILA)에 의해 유도된 CD137, CDw137, 및 종양 괴사 인자 수용체 상과 구성원 9(TNFRSF9)로 식별된다. 4-1BB는 T 림프구, 자연 살해(NK) 세포, 수지상 세포, 과립백혈구, 및 비만 세포에 의해 발현되는 39 kDa 막관통 단백질이다. 4-1BB는 그의 리간드 4-1BBL에 결합시, NF- $\kappa$ B, c-Jun 및 p38 하류 경로의 활성화를 통해 CD4 및 CD8 T 세포 둘 다에 공동자극적 신호를 제공한다. 4-1BB 수용체는 면역 반응 조절에 중요한 것으로 생각된다. (문헌[Arch and Thompson, *Molecular and Cellular Biology*, 1998 Jan; 18(1): 558-565]. 또한, 문헌[Jang *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242, 613 - 620 (1998), article no. RC978016.]을 참조.) 일부 4-1BB 수용체 효현제가 그의 항종양 특성에 대해, 예를 들어 CD20에 결합하는 항체(Thall *et al.*, New Drugs in Hematology conference, Bologna, Italy, May 9-11, 2016, presented May 10, 2016), CCR4에 결합하는 항체(Pfizer press release, *Pfizer And Kyowa Hakko Kirin To Collaborate On Immuno-Oncology Combination Study*, September 29, 2014), PD-1에 결합하는 항체(Pfizer press release, *Pfizer Presents Data from Phase 1b Trial Investigating Utomilumab (a 4-1BB agonist) in Combination with a Checkpoint Inhibitor*, June 4, 2016), 및 OX40에 결합하는 항체(Pfizer press release, *Pfizer to Collaborate with National Cancer Institute to Study Three Immunotherapy Agents Targeting Multiple Cancers*, November 14, 2016)와 병용하여 연구되었다. 몇 가지 다른 4-1BB 병용 암 요법이 연구되었다(예를 들어, 문헌[Bartkowiak and Curran, *Frontiers in Oncology*, 2015, 5, 117, 08 June 2015.] 참조).

[0006] IL-2R $\beta$ -선택적 효현제의 투여는 적응성 면역계를 표적으로 함으로써 특정 암을 앓고 있는 환자에게 유리한 것으로 제안되었다. 이러한 투여는 CD8+ 기억 T-세포를 증가시키면서 조절 T-세포의 면역 억제 효과를 감소시켜 환자 자신의 면역계를 동원하여 암 세포를 제거할 것으로 예상된다. 예를 들어, 문헌[Charych *et al.*, AACR 2013, Abstract #482]을 참조한다.

[0007] IL-2R $\beta$ -선택적 효현제(직접적으로 면역활성시킬 수 있음)의 투여를 통한 암 치료에서 암 환자의 면역계의 동원은 일부 경우에 예를 들어 추가의 제제의 투여를 통해 추가로 강화될 수 있다. 그러나, 하나 초과 면역조절 물질을 투여함으로써 종양에 대한 세포독성 면역 반응을 활성화시키고자 할 경우 다수의 도전상황이 발생한다.



예를 들어, 일부 경우에, 제2 면역조절제의 투여는, 단일 제제로서 투여되는 경우(즉, 단일요법으로서) 강한 항종양 반응을 촉진하는 제1 면역조절제의 세포독성 효과를 증진시키기보다는 실제로는 약화 또는 억제할 수 있다. 암 면역 요법에서, 효과적인 항종양 반응을 제공하기 위한 면역 자극과 면역 억제간의 유리한 균형의 달성은, 특히 다수의 활성제가 투여되는 경우, 현저한 도전상황을 나타낸다.

[0008] 적응성 면역계를 표적으로 하는 것 이외에, 또한 선천성 면역계의 자극제를 투여하여 암을 치료할 수 있다. 예를 들어, 톨-유사 수용체(TLR)가 그의 강한 면역 자극 능력으로 인하여 연구되었다. TLR은 주로 선천성 면역계의 아암(arm)에 속하는 세포, 즉 수지상 세포(DC) 및 단핵구에 의해 발현된다. TLR은 몇 가지 유형의 종양에서 기능적으로 발현되지만, 발암에 긍정적 효과와 부정적 효과를 둘 다 미치는 작용을 할 수 있다. TLR은 다양한 감염성 유기체에 의해 발현되는 병원체-연관 분자 패턴(PAMP)을 검출하는 고도로 보존된 생식 세포 계열-인코딩 패턴 인식 수용체의 군을 포함한다. TLR은 선천성 면역계를 유발하고, 병원체 및 종양에 의해 발현된 항원에 대한 적응성 면역을 강화시킨다. 적어도 13개의 상이한 TLR이 포유동물에서 확인되었다(Zhao, G., et al., *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2014, 2:12). TLR1, -2, -4, -5, -6, 및 -10은 세포 표면 상에서 발현되는 한편, TLR-3, -7, -8, 및 -9는 세포 내 엔도솜 막 상에 위치된다(문헌 [Kaczanowska, S., et al., *J. Leukoc Biol.* 2013 Jun; 93(6): 847-863]). TLR은 병원체 및 병원체-연관 분자 패턴(PAMP)으로 명명되는 악성 세포-유래된 분자를 검출하는 센서로, 상기 분자는 TLR에 결합시, (NF)- $\kappa$ B 및 제I형 인터페론 경로를 촉발하여 수지상 세포(DC) 및 마크로파지와 같은 기타 다른 항원 제시 세포에서 전염증성 사이토카인의 생산을 초래한다. TLR은 DC 성숙의 자극, 항원 흡수 및 제시, 및 CD4<sup>+</sup> 세포의 분화 및 조절 T(Treg) 세포의 제어에 중요하다.

[0009] TLR-7, -8, 및 -9는 엔도솜 구획 내에서 핵산 모티프의 인식 및 발현에 있어서 유사하다(Zhao, G., 2014, 상동). 몇몇 리간드는 합성 및 천연 뉴클레오시드 모두, TLR7 및/또는 TLR8 리간드로서 특징지어졌다. TLR7 또는 TLR8 수용체에 의한 이들 뉴클레오시드 리간드의 인식은 결국은 전염증성 사이토카인, 케모카인 및 I형 인터페론(IFN)의 유도, 및 공동-자극 분자의 상향조절이 되는 세포내 경로를 활성화한다. TLR은 I형 막 단백질로, 병원체-연관 분자 패턴, 및 Toll/인터루킨-1 수용체(TIR) 도메인으로 명명되는 세포질 도메인의 인식을 담당하는, 류신-풍부 반복단위로 구성된 엑토도메인(ectodomain)에 의해 특징지어지며, 이는 하류 신호전달을 위해 요구된다. TLR7 및 TLR8은 밀접하게 관련되어서, 이들의 세포내 엔도솜성 위치뿐만 아니라 이들의 리간드를 공유한다. TLR7 또는 TLR8에 의한 리간드의 인식은 TLR 도메인-함유 어댑터 분자 골수 분화 1차 반응 유전자 88(MyD88)의 채용이 뒤따른다. TLR7/8 및 MyD88의 회합은 인터루킨-1 수용체-연관 키나아제 패밀리의 구성원의 채용을 자극하여, 미토겐-활성화 단백질 키나아제(MAPK) 및 I $\kappa$ B 키나아제(IKK) 복합체의 하류 활성화를 초래한다. TLR 7 및 TLR 8의 톨-유사 수용체 효현제는 마크로파지를 활성화하며, 일부 경우에서 종양 환경을 종양-촉진 환경에서 종양-억제(염증성) 환경으로 변화시킨다.

[0010] DC, 단핵구, 마크로파지, 섬유아세포, 및 인간 각질 세포와 같은 몇몇 세포 유형의 활성화, 세포자멸 유도, 증진된 면역원성 및 세포독성 T-세포 림프구 및 화학치료제에 의해 매개된 살생에 대한 감작을 생성할 수 있는 이들의 잠재적 능력 면에서, TLR 리간드는 효과적인 항종양 면역 반응을 생성하는 잠재력을 갖는 면역-반응 조절제의 부류로 간주된다. 나아가, TLR8 리간드는 CD8<sup>+</sup> Treg 세포의 억제 작용을 역전시키는 것으로 나타났다(문헌 [Kiniwa Y., et al., *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6947-58]). 나아가, TLR8 리간드의 적용은 종양 침윤 Foxp3<sup>+</sup> Treg 세포의 감소를 초래하여, 종양 환경을 종양 촉진에서 종양 억제로 변화시킨다(문헌 [Anz D. et al., *Cancer Res.* 2015; 75: 4483-93]). 한편, TLR 활성화는 특정 경우에서, 증식, 침입, 및/또는 종양 세포의 생존에 유리한 것으로 나타났다(예를 들어, 문헌 [Bohnhorst J., et al., *Leukemia* 2006; 20:1138-1144]; 및 [Jego G., et al., *Leukemia* 2006;20:1130-1137] 참조). 특정 TLR 7/8 효현제는 또한 면역억제 및 자가면역 질환을 유도하는 것으로 나타났다(문헌 [Chi H., et al. *Frontiers in Pharmacology.* 2017; 8: 304]).

[0011] TLR 효현제는 그의 항종양 특성에 대해 연구되어 왔으나, 일반적으로, 대부분의 TLR 효현제는 암 치료제로서의 성능은 저조하였다. 그러한 성능 저조는, 면역 억제 인자의 유도가 TLR 효현제-유도된 염증을 약화시키는 메커니즘에 의해 설명될 수 있는 것으로 가정되어 왔다(Lu, H. *Frontiers in Immunology*, March 2014, 5, 83). 예를 들어, TLR 효현제는 수지상 세포 상에서 CD80, CD86 및 CD40과 같은 공동-자극 분자 및 면역 반응을 분극화하는 TNF- $\alpha$  및 IL-12와 같은 염증성 사이토카인의 유도를 통해 면역 자극 효과를 갖는다. 그러나, TLR 효현제는 또한, 예를 들어 IL-10, 조절 T 세포(Treg), 및 PD-1(이들 모두는 항-종양 면역을 억제시킬 수 있음)을 포함하는 몇몇 면역 억제 인자를 유도함으로써 면역 억제 효과를 갖는다(Lu, H., 2014, 상동). 따라서, 두 성분들이 모두 유리하게 상호작용하여 증진된 치료 효과를 제공하는 면역 요법적 조합에 도달하기 위한 노력에 상당한 도전상황이 존재한다.

[0012] 상기 논의된 바와 같이, 지금까지 각종 플랫폼을 포괄하는 효과적인 암 면역 요법의 개발에 상당한 노력이 있어 왔지만, 예를 들어 암을 치료하기 위한 새롭고 더 효과적인 면역 요법적 치료 계획을 확인 및 제공할 필요가 남아있다. 본 개시내용은 이러한 요구 및 다른 요구를 다루고자 한다.

[0013] 다수의 양태 및 구현예가 본원에 기재되어 있다. 따라서, 본원에 기재된 각각의 특징 및 구현예는 명시적으로 언급되지 않더라도, 달리 언급되지 않는 한, 임의의 다른 양태, 구현예 또는 특징 또는 특징들의 조합에 적용가능하도록 의도된다(그러나 적용되도록 요구되는 것은 아님).

### 발명의 내용

[0014] 제1 양태에서, 암을 갖는 대상체에게 4-1BB 효현제를, 각각 본원에 더 상세하게 기재되는, IL-2R $\beta$ -활성화 양의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 TLR 효현제와 병용하여 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 조합은 또한 (예를 들어, T 조절 세포, 마크로파지 및 단핵구의 억제제를 통해) 면역 억제를 극복하면서, (예를 들어, CD8 T 세포, CD11c+ 및 CD8+ 수지상 세포 및 호중구의 축진을 통해) 면역계의 활성화를 촉진시킬 수 있다.

[0015] 또 다른 양태에서, 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제를 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다.

[0016] 또 다른 양태에서, 4-1BB 효현제 및 IL-2R $\beta$ -활성화 양의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제를 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다.

[0017] 또 다른 양태에서, 4-1BB 효현제, IL-2R $\beta$ -활성화 양의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및 TLR 효현제를 암을 갖는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에 제공된다.

[0018] 명확성을 위해, 투여 순서와 관련하여, 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제는, 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로, 동일 및/또는 상이한 투여 경로를 통해, 각각 면역조절 양으로 투여될 수 있다. 나아가, 치료는 요법의 단일 사이클을 포함할 수 있거나, 요법의 다중(즉, 2 이상) 사이클을 포함할 수 있다. 요법의 추가의 사이클은 4-1BB 효현제, TLR 효현제, 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 각각의 투여, 또는 이들의 서브세트의 투여를 포함할 수 있고, 이러한 개시내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다.

[0019] 상기 양태들 중 어느 하나와 관련된 하나 이상의 구현예에서, TLR 효현제는 국소적으로 투여된다. 추가로, 상기 양태들 중 임의의 하나 이상과 관련된 하나 이상의 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 비경구적으로 투여된다. 또한, 상기 양태들 중 임의의 하나 이상과 관련된 하나 이상의 추가의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 비경구적으로 투여된다. 하나 이상의 관련된 구현예에서, TLR 효현제는 중앙 위치에 직접 투여된다. 일부 적용가능한 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 동시에 또는 심지어 단일 제제의 성분으로서 투여된다.

[0020] 상기 양태들 중 임의의 하나 이상과 관련된 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제, TLR 효현제, 예를 들어 TLR 7/8 효현제의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 서로 별도로 투여된다. 또 다른 하나 이상의 추가의 구현예에서, TLR 효현제는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및 4-1BB 효현제를 투여하기 전에 대상체에게 투여된다. 하나 이상의 대안적인 구현예에서, TLR 효현제는 치료 1일차에 투여되고, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 4-1BB 효현제는 치료 1 내지 4일차 중 어느 한 날에 투여된다. 예를 들어, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및 4-1BB 효현제는 치료 1, 2, 3 또는 4일차 중 어느 한 날에 투여된다. 일부 구현예에서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 TLR 효현제는 함께 투여된다.

[0021] 상기 양태들 중 임의의 하나 이상과 관련된 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 서로 함께 투여된다. 예를 들어 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 치료 1일차에 투여된다. 일부 구현예에서, 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 동일한 제제로 투여된다.

[0022] 상기 양태들 중 임의의 하나 이상과 관련된 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제는 서로 함께 투여된다. 예를 들어, 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제는 치료 1일차에 투여된다. 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제는 동일한 제제로 투여된다.

[0023] 상기 양태들 중 임의의 하나 이상과 관련된 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 서로 함께 투여된다. 예를 들어, 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -

편향 효현제는 치료 1일차에 투여된다. 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 동일한 제제로 투여된다.

[0024]

바람직한 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0025]

하나 이상의 추가의 구현예에서, 암은 고형암이다. 예를 들어 암은 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 골암, 결장직장암, 위암, 림프종, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 갑상샘암, 신장암, 담관의 암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암, 호지킨병 및 부신피질암으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0026]

일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제는 폴리에틸렌 글리콜에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함한다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제는 4, 5 및 6개의 폴리에틸렌 글리콜 중합체에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함한다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제는 평균 약 6개의 폴리에틸렌 글리콜 중합체에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함한다. 하나 이상의 추가의 구현예에서, 알데스루킨에 방출가능하도록 공유 부착된 폴리에틸렌 글리콜 중합체는 분지형이다. 하나 이상의 또 다른 특정 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2, 예컨대 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kd</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2이다. 하나 이상의 또 다른 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 (2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>6 avg</sub>인터루킨-2이다.

[0027]

상기 양태 및 구현예 중 임의의 하나 이상 관련된 또 다른 일부 추가의 구현예에서, TLR 효현제는 TLR-7 또는 TLR-8 효현제이다. 하나 이상의 구현예에서, TLR 효현제는 TLR-7 효현제이다. 또 다른 하나 이상의 대안적인 구현예에서, TLR 효현제는 TLR-8 효현제이다. 일부 구현예에서, TLR 효현제는, 지속 작용성 TLR-7 또는 지속 작용성 TLR-8 효현제(예를 들어, 다중-아암을 갖는 중합체 개질된 TLR-7 또는 TLR-8 효현제)와 같은, 지속 작용성 TLR 효현제이다.

[0028]

또 다른 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 TLR 효현제는, TLR 7/8 효현제와 같은 TLR 효현제의 다중-아암을 갖는 수용성 중합체 컨쥬게이트이다. 또 다른 하나 이상의 추가의 구현예에서, 다중-아암을 갖는 수용성 중합체는 TLR 효현제, 예를 들어 TLR 7/8 효현제에 안정적으로 공유 연결된다.

[0029]

하나 이상의 대안적인 구현예에서, 다중-아암 수용성 중합체는 TLR 효현제에 방출가능하게 공유 연결된다. 하나 이상의 또 다른 특정 구현예에서, 지속 작용성 TLR 효현제는 선택적으로 개재 스페이서 또는 링커 모이어티를 통해 그의 4개의 중합체 아암 각각의 말단에서 안정적으로 또는 방출가능하게 공유 연결된 TLR 효현제 분자를 갖는 4-아암-펜타에리트리톨릴계 폴리에틸렌 글리콜 컨쥬게이트이다. TLR 효현제와 관련된 일부 구현예에서, TLR 효현제는 이미퀴모드 또는 레시퀴모드이다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, TLR 효현제는 레시퀴모드이다. 하나 이상의 특정 구현예에서, TLR 효현제는 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848이다.

[0030]

상기 양태 또는 구현예 중 임의의 하나 이상과 관련된 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 항체이다. 상기 양태 또는 구현예 중 임의의 하나 이상과 관련된 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 인간 단일클론 항체이다. 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 PRS-342(Pieris Pharmaceuticals), PRS-343(Pieris Pharmaceuticals), EU-101(Eutilex Co.), 우레루맵(urelumab)(BMS-663513, BMS), 또는 유토밀루맵(utomalumab)(PF-05082566, Pfizer)이다. 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 우레루맵(BMS-663513, BMS) 또는 유토밀루맵(PF-05082566, Pfizer)이다.

[0031]

일부 구현예에서, 병용 요법은 4-1BB 효현제 및 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848 또는 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kd</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2의 투여를 포함한다. 일부 추가의 구현예에서, 병용 요법은 4-1BB 효현제를 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848 및 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kd</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2와 병용하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 추가의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 우레루맵이다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 유토밀루맵이다.

[0032]

투여 방법의 임의의 하나 이상의 양태의 일부 구현예에서, 투여는 대상체에서 압스코팔 효과를 생성하기에 효과적이다.

- [0033] 또 다른 추가의 양태에서, T 세포 자극 양의 4-1BB 효현제 및 IL-2R $\beta$ -활성화 양의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 선천성 면역 활성화 양의 TLR 효현제를 포함하고, 암을 갖는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 지시사항이 동반된 키트가 제공된다.
- [0034] 또 다른 추가의 양태에서, IL-2R $\beta$ -활성화 양의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및 T 세포 자극 양의 4-1BB 효현제를 포함하고, 암을 갖는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 지시사항이 동반된 키트가 제공된다.
- [0035] 또 다른 추가의 양태에서, T 세포 자극 양의 4-1BB 효현제 및 선천성 면역 활성화 양의 TLR 효현제를 포함하고, 암을 갖는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 지시사항이 동반된 키트가 제공된다.
- [0036] 키트에 관한 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 본 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제 및/또는 TLR 효현제는 대상체의 투여를 위한 단일 조성물에 포함되는데, 이 단일 조성물은 선택적으로 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다. 키트의 하나 이상의 추가의 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 대상체에 투여하기 위한 단일 조성물에 포함되며, 여기서 키트는 선택적으로 즉 대상체에게 투여하기 위한 TLR 효현제를 포함하는 추가의 별도의 조성물을 더 포함하고, 각각의 별도의 조성물은 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함한다.
- [0037] 키트에 관한 일부 대안적인 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제 및/또는 TLR 효현제 각각은 별도의 용기에 제공되고, 이 키트는 TLR 효현제, 4-1BB 효현제, 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제의 각각을 대상체에 별도로 투여하는 것에 관한 지시사항을 포함한다.
- [0038] 키트의 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 4-1BB 효현제, 및/또는 TLR 효현제 각각은 고체 형태이다. 하나 이상의 관련된 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 TLR 효현제 각각은 수성 희석제 중 재구성에 적합한 고체 형태이다.
- [0039] 또 다른 하나 이상의 추가 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 TLR 효현제 각각은 별도의 조성물(이 조성물 각각은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함함) 중에 포함된다.
- [0040] 추가의 양태 및 구현예가 하기 설명 및 청구범위에 기재된다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 정의
- [0042] 본 개시내용의 특정 특성을 기술 및 청구하는 데 있어서, 달리 지시되지 않는 한 다음의 용어가 하기에 기재된 정의에 따라 사용될 것이다.
- [0043] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥이 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다.
- [0044] "수용성의 비펩티드성 중합체"는, 실온의 수중에서 적어도 35%(중량 기준) 가용성이고, 바람직하게는 70%(중량 기준) 초과, 더 바람직하게는 95%(중량 기준) 초과인 가용성인 중합체를 나타낸다. 통상적으로, "수용성" 중합체의 미여과된 수성 제제는 여과 후 동일한 용액에 의해 전달되는 광의 적어도 75%, 더 바람직하게는 적어도 95%를 전달한다. 그러나, 수용성 중합체는 수중에서 적어도 95%(중량 기준) 가용성이거나 수중에서 완전히 가용성인 것이 가장 바람직하다. "비펩티드성"과 관련하여, 중합체는 35%(중량 기준) 미만의 아미노산 잔기를 갖는 경우 비펩티드성이다.
- [0045] 용어 "단량체", "단량체 서브유닛" 및 "단량체 단위"는 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용되며, 중합체의 기본 구조 단위 중 하나를 지칭한다. 동중중합체의 경우에, 단일 반복 구조 단위는 중합체를 형성한다. 공중합체의 경우에, 2개 이상의 구조적 단위가 (패턴으로 또는 무작위로) 반복되어 중합체를 형성한다. 바람직한 중합체는 동중중합체이다. 수용성의 비펩타이드성 중합체는 연속으로 부착된 하나 이상의 단량체를 포함하여 단량체의 사슬을 형성한다. 중합체는 단일 단량체 유형으로부터(즉, 동중중합체성) 또는 2 또는 3개의 단량체 유형(즉, 공중합성)으로부터 형성될 수 있다.
- [0046] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "중합체"는 2 내지 약 4000개 이상, 예를 들어 약 2 내지 약 2000개의 단량체를 갖는 분자이다. 특정 중합체는 선형, 분지형, 갈라진 형태와 같은 다양한 기하 구조를 갖는 것들을 포함하며, 이는 하기에서 더 상세히 기재된다.
- [0047] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "PEG" 또는 "폴리에틸렌글리콜"은 임의의 수용성 폴리(에틸렌옥사이드)를 포함하



는 것으로 의미된다. 달리 나타내지 않는 한, "PEG 중합체" 또는 임의의 폴리에틸렌글리콜은, 중합체가, 예를 들어 컨쥬게이션을 위해 별개의 말단 캡핑 모이어티 또는 작용기를 함유할 수도 있지만, 실질적으로 모든(바람직하게는 모든) 단량체 서브유닛이 에틸렌옥사이드 서브유닛인 것이다. PEG 중합체는 2가지의 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 수 있다. 상기 진술한 바와 같이, PEG 중합체에 대해, 변수(n)(즉, 반복 단위의 수)는 약 2 내지 2000, 또는 약 2 내지 4000의 범위에 있고, 말단기 및 전반적인 PEG의 구조는 다를 수 있다. PEG는 예를 들어 소분자 또는 단백질에의 결합을 위한 작용기를 추가로 포함하며, 그 작용기는 PEG 중합체에 공유 부착되는 경우 산소-산소 결합(-O-O-, 퍼옥사이드 결합)의 형성을 초래하지 않는다.

[0048] 용어 "말단-캡핑된" 또는 "말단에서 캡핑된"은 말단-캡핑 모이어티를 갖는 중합체의 말단 또는 말단지점을 지칭하기 위해서 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 통상적으로, 필수적이지는 않지만, 말단-캡핑 모이어티는 히드록시 또는  $C_{1-20}$  알콕시 또는 알카릴옥시 기를 포함한다. 이에 따라, 말단-캡핑 모이어티의 예는 알콕시(예를 들어, 메톡시 및 에톡시), 벤질옥시뿐만 아니라, 아릴, 헤테로아릴, 시클로, 헤테로시클로 등을 포함한다. 추가적으로, 상기 각각의 포화, 불포화, 치환 및 비치환된 형태가 상정된다. 나아가, 말단-캡핑 기는 또한 실란일 수 있다. 말단-캡핑 기는 또한 검출가능한 표지를 유리하게 포함할 수 있다. 중합체가 검출가능한 표지를 포함하는 말단-캡핑 기를 갖는 경우, 중합체가 커플링되는 관심이 있는 중합체 및/또는 모이어티(예를 들어, 활성제)의 양 또는 위치는 적합한 검출기를 사용함으로써 결정될 수 있다. 그러한 표지는 제한 없이, 형광물질, 화학발광물질, 효소 표지화에 사용되는 모이어티, 비색성 모이어티(예를 들어, 염료), 금속 이온, 방사성 모이어티 등을 포함한다. 적합한 검출기는 광도계, 필름, 분광계 등을 포함한다. 추가적으로, 말단-캡핑 기는 표적화 모이어티를 포함할 수 있다.

[0049] 용어 "표적화 모이어티"는 컨쥬게이트가 표적화 영역에 국재화하는 것을 돕는, 예를 들어 세포에 도입되거나 수용체에 결합하는 것을 돕는 분자 구조물을 지칭한다. 바람직하게는, 표적화 모이어티는 비타민, 항체, 항원, 수용체, DNA, RNA, 시알릴 루이스 X(sialyl Lewis X) 항원, 히알루론산, 당, 세포-특이적 렉틴, 스테로이드 또는 스테로이드 유도체, RGD 펩티드, 세포 표면 수용체에 대한 리간드, 혈청 성분, 또는 각종 세포내 또는 세포의 수용체로 유도되는 조합성 분자를 포함한다. 표적화 모이어티는 또한 지질 또는 인지질을 포함할 수 있다. 예시적인 인지질은, 제한 없이, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딜글리세롤 및 포스파티딜에탄올아민을 포함한다. 이들 지질은 미셀 또는 리포솜 등의 형태일 수 있다. 표적화 모이어티는 검출가능한 표지를 추가로 포함할 수 있거나, 대안적으로는 검출가능한 표지는 표적화 모이어티로서 작용할 수 있다. 중합체 컨쥬게이트가 검출가능한 표지를 포함하는 표적화 군을 갖는 경우, 중합체가 그에 컨쥬게이트되는 중합체 및/또는 모이어티(예를 들어, 활성제)의 양 및/또는 분포/위치는 적합한 검출기를 사용하여 결정될 수 있다. 그러한 표지는, 제한 없이 형광물질, 화학발광물질, 효소 표지화에 사용되는 모이어티, 비색물질(예를 들어, 염료), 금속 이온, 방사성 모이어티, 금 입자, 양자점 등을 포함한다.

[0050] 수용성 중합체, 예컨대 PEG에 관한 내용 중 분자량은 수 평균 분자량 또는 중량 평균 분자량 중 어느 하나로 표현될 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서의 분자량에 대한 모든 언급은 중량 평균 분자량을 지칭한다. 두 분자량 결정치, 즉 수 평균 분자량과 중량 평균 분자량은, 겔 투과 크로마토그래피 또는 기타 다른 액체 크로마토그래피 기법(예를 들어, 겔 여과 크로마토그래피)을 사용하여 측정될 수 있다. 분자량 값을 측정하기 위한 기타 다른 방법, 예컨대 말단기 분석을 사용하는 방법, 또는 총괄성(예컨대, 동결점 강하, 비등점 상승 또는 삼투압)을 측정하여 수 평균 분자량을 결정하는 방법, 또는 광산란 기법을 사용하는 방법, 초원심분리, MALDI TOF, 또는 중량 평균 분자량 결정을 위한 점도측정법도 또한 사용될 수 있다. PEG 중합체는 통상적으로 다분산성이고(즉, 중합체의 수 평균 분자량과 중량 평균 분자량이 동일하지 않고), 다분산도 값이, 바람직하게 약 1.2 미만, 더 바람직하게 약 1.15 미만, 훨씬 더 바람직하게 약 1.10 미만, 훨씬 더 바람직하게 약 1.05 미만, 그리고 가장 바람직하게 약 1.03 미만으로 작다.

[0051] 중합체의 기하학적 구조 또는 전체 구조와 관련하여, "분지된"은 분지점으로부터 연장하는 둘 이상의 중합체 "아암" 또는 사슬을 갖는 중합체를 지칭한다.

[0052] 중합체의 기하학적 구조 또는 전체 구조와 관련하여, "갈라진"은 분지점으로부터 연장하는 둘 이상의 작용기(통상적으로는 하나 이상의 원자를 포함)를 갖는 중합체를 지칭한다.

[0053] "분지점"은, 중합체가 선형 구조로부터 하나 이상의 추가적인 아암으로 분지 또는 갈라지는 하나 이상의 원자를 포함하는 분기 지점을 지칭한다.

- [0054] "반응성" 또는 "활성화된"이라는 용어는 유기 합성의 통상적 조건 하에서 쉽게 또는 실질적인 속도로 반응하는 작용기를 지칭한다. 이는 반응하지 않거나 반응을 위해 강한 촉매 또는 비현실적 반응 조건을 요구하는 어느 하나의 기(즉, "비반응성" 또는 "불활성" 기)에 대조된다.
- [0055] 반응 혼합물에서 분자 상에 존재하는 작용기와 관련하여 "쉽게 반응성이 아닌"은, 그 기가 반응 혼합물에서 바람직한 반응을 생성하는 데 효과적인 조건 하에서 대부분 온전하게 유지됨을 나타낸다.
- [0056] "보호기"는 특정 반응 조건 하에서 분자 내에서 특정의 화학적으로 반응성인 작용기의 반응을 방지 또는 차단하는 모이어티이다. 보호기는 보호되는 화학적으로 반응성인 기의 유형뿐만 아니라 사용되는 반응 조건 및 분자 내 추가적인 반응성 기 또는 보호기의 존재에 따라 달라질 수 있다. 보호될 수 있는 작용기는, 예로서 카르복실산 기, 아미노기, 히드록실 기, 티올 기, 카르보닐 기 등을 포함한다. 카르복실 산에 대한 대표적인 보호 기는 에스테르(예컨대, *p*-메톡시벤질 에스테르), 아마이드 및 히드라지드; 아미노 기의 경우, 카바메이트(예컨대, *tert*-부톡시카르보닐) 및 아마이드; 히드록실 기의 경우, 에테르 및 에스테르; 티올기의 경우, 티오에테르 및 티오에스테르; 카르보닐 기의 경우, 아세탈 및 케탈; 등을 포함한다. 그러한 보호 기는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [T.W. Greene and G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999] 및 그 안에 인용된 참고문헌들에 기재되어 있다.
- [0057] "보호된 형태"의 작용기는 보호 기를 포함하는 작용기를 지칭한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "작용기" 또는 그의 임의의 동의어는 그의 보호된 형태를 포함한다.
- [0058] "방출가능한 연결기(linkage)"는 생리학적 조건 하에서 분열하는 상대적으로 불안정적인 결합으로, 여기서 분열은 다수의 상이한 메카니즘 중 임의의 것을 통해 일어날 수 있다. 예시적인 방출가능한 연결기 중 하나의 유형은 가수분해성 결합으로, 즉, 예를 들어 방향족 아마이드 결합과 같은 아마이드 결합의 가수분해와 같이, 예를 들어 생리학적 조건 하에서 물과의 반응 시에 분열되는(즉, 가수분해되는) 것이다. 수중에서 가수분해하는 결합의 경향은 2개의 원자를 연결하는 연결기의 일반 유형뿐만 아니라 이들 원자에 부착된 치환기에 따라 달라질 수 있다. 가수분해에 불안정적인 또는 약한 예시적인 연결기는 카르복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩티드, 올리고뉴클레오타이드, 티오에스테르, 및 카보네이트를 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 방출가능한 연결기는 또한 효소에 의해 방출가능한 연결기를 포함하며, 여기서 "효소에 의해 방출가능한 연결기"는 하나 이상의 효소에 의해 분열되는 연결기를 의미한다. 방출 메카니즘의 추가 유형은 1,6-벤질 제거,  $\beta$ -제거 등을 포함하지만 이로 제한되지는 않는다. 특정 결합은 안정적이거나 방출가능한 것으로 고려될 수 있지만, 그러한 특징화는 분자 또는 구조적 실체(entity)의 전체 구조 내에서 고려되어야 한다. 특정 경우들에서, 방출가능한 결합을 함유하는 중합체 컨쥬게이트는 전구약물로서 지칭될 수 있으며, 이 경우 생체 내에서(즉, 생리학적 조건 하에서) 방출가능한 결합의 분열시, 부모 약물이 방출된다(또는, 활성제에 방출가능하도록 부착된 중합체 모이어티의 수에 따라, 결과적으로 방출될 수 있다). 예를 들어 인터루킨-2, 또는 예를 들어 레시퀴모드(R848로도 알려짐)와 같은 TLR 효현제와 같은 활성 모이어티에 공유 부착된 폴리에틸렌 글리콜과 같은 수용성 중합체의 맥락에서, 공유적 "방출가능한" 연결기는 생리학적 조건 하에서 분열하여 이에 의해 활성 모이어티로부터 수용성 중합체를 방출하거나 수용성 중합체를 탈착시키거나, 수용성 중합체로부터 활성 모이어티를 탈착시키는 것이다.
- [0059] "안정적인" 연결기 또는 결합은 수중에서(예를 들어, 생리적 조건 하에서) 실질적으로 안정적이며, 즉 장기간의 시간에 걸쳐 임의의 주목할 만한 정도로 생리적 조건 하에서 가수분해를 겪지 않는 화학적 결합을 지칭한다. 가수분해에 안정적인 연결기의 예는 일반적으로 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 사슬에서), 에테르, 아마이드, 우레탄, 아민 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일반적으로, 안정적인 연결기는 생리적 조건 하에서 1 일당 약 1 내지 2% 미만의 가수분해율을 나타내는 것이다. 대표적인 화학적 결합의 가수분해율은 대부분의 표준 화학 교재에서 찾을 수 있다.
- [0060] "TLR 7/8 효현제"(또는 "TLR 효현제")는 톨-유사 수용체 7 및/또는 톨-유사 수용체 8에 대한 효현제인 임의의 화합물이다.
- [0061] "4-1BB 효현제"는 4-1BB 수용체의 효현제인 임의의 화합물(예컨대, 소분자, 리간드, 또는 항체)이다.
- [0062] "실질적으로" 또는 "본질적으로"는 거의 전부 또는 완전히, 예를 들어 95% 이상, 더 바람직하게는 97% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 98% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 99% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 99.9% 이상이며, 임의의 소정의 양 중 99.99% 이상이 가장 바람직하다.
- [0063] "알킬"은 길이가 약 1 내지 20개의 원자의 범위인 탄화수소 사슬을 지칭한다. 그러한 탄화수소 사슬은 바람직하

게는 포화되지만 필수적인 것은 아니며, 분지형 또는 직쇄일 수 있다. 예시적인 알킬 기는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 2-메틸부틸, 이소프로필, 3-메틸펜틸 등을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "알킬"은, 3 개 이상의 탄소 원자가 지칭되는 경우, 시클로알킬을 포함한다. "알케닐" 기는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 2 내지 20개의 탄소 원자의 알킬 기이다.

[0064] 용어 "치환된 알킬" 또는 "치환된  $C_{q-r}$  알킬"(식에서, q 및 r은 알킬 기 내에 함유된 탄소 원자의 범위를 확인하는 정수임)은, 1, 2 또는 3개의 할로 원자(예를 들어, F, Cl, Br, I)에 의해 치환된 상기 알킬 기, 트리플루오로메틸, 히드록시,  $C_{1-7}$  알킬(예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, 부틸, t-부틸 등),  $C_{1-7}$  알콕시,  $C_{1-7}$  아실옥시,  $C_{3-7}$  헤테로시클릴, 아미노, 페녹시, 니트로, 카르복시, 아실, 시아노 등을 나타낸다. 치환된 알킬 기는 동일하거나 상이한 치환기로 1회, 2회 또는 3회 치환될 수 있다.

[0065] "저급 알킬"은 1 내지 7개의 탄소 원자를 함유하는 알킬 기를 지칭하고, 메틸, 에틸, n-부틸, i-부틸, t-부틸에 의해 예시되는 바와 같이, 직쇄 또는 분지형일 수 있다.

[0066] "저급 알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 2 내지 6개의 탄소 원자의 저급 알킬 기를 지칭한다.

[0067] "비-간섭 치환기"는, 분자 내에 존재하는 경우, 그 분자 내에 함유된 기타 다른 작용기와 통상적으로 비반응성인 기를 지칭한다.

[0068] "알콕시"는 -O-R 기를 지칭하며, 식에서 R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는  $C_1$ - $C_{20}$  알킬(예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로필옥시 등), 바람직하게는  $C_1$ - $C_7$ 이다.

[0069] 용어 "아릴"은 14개 이하의 탄소 원자를 갖는 방향족 기를 의미한다. 아릴 기는 페닐, 나프틸, 비페닐, 페난트레닐, 나프탈레닐 등을 포함한다. "치환된 페닐" 및 "치환된 아릴"은, 할로(F, Cl, Br, I), 히드록시, 시아노, 니트로, 알킬(예를 들어,  $C_{1-6}$  알킬), 알콕시(예를 들어,  $C_{1-6}$  알콕시), 벤질옥시, 카르복시, 아릴 등으로부터 선택되는 1, 2, 3, 4 또는 5개(예를 들어, 1 내지 2개, 1 내지 3개 또는 1 내지 4개의 치환기)로 치환된 페닐 기 및 아릴 기를 각각 나타낸다.

[0070] 본원에 기재된 염기성 반응물 또는 산성 반응물은 그의 중성, 하전된 및 임의의 상응하는 염 형태를 포함한다.

[0071] 예시적인 컨쥬게이트, 활성 모이어티, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 다른 적합하게 적용가능한 화학 모이어티는, 적용가능한 경우, 그의 유사체, 이성질체, 다형체, 용매화물, 및 약학적으로 허용가능한 염 형태를 포함하는 것을 의미한다.

[0072] "약리학적 유효량", "생리학적 유효량" 및 "치료 유효량"은, 혈류에서 또는 표적 조직에서 활성제 및/또는 컨쥬게이트의 바람직한 수준을 제공하는 데 필요한 활성제, 예를 들어 중합체 컨쥬게이트의 양을 의미하기 위해 본 명세서에서 상호교환가능하게 사용된다. 정확한 양은 다양한 요소, 예를 들어 특정 활성제, 조성물의 성분 및 물리적 특성, 의도된 환자 개체군, 환자 고려사항에 따라 달라질 수 있으며, 본 명세서에 제공된 정보 및 관련 문헌에서 이용가능한 정보를 기준으로, 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 예를 들어, 화합물 또는 1종 이상의 화합물의 조합의 치료 유효량은, 투여될 경우 (순차적으로 또는 동시에), 원하는 생물학적 또는 의학적 반응을 유발하는 양, 예를 들어 암 세포를 파괴하거나, 대상체에서 암의 진행을 늦추거나 정지시키는 양이다. 또한, 이 용어는, 예를 들어 유리한 효과를 제공하기 위하여 병용하여 투여될 경우, 표적 세포에서 특정한 원하는 반응을 유도하는 화합물의 용량에 적용된다. 특정 구현예에서, 조합된 효과는 부가적이다. 특정 구현예에서, 조합된 효과는 상승작용적이다. 또한, 본 발명의 병용 요법의 경우, 4-1 BB 효연제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효연제, 예컨대 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2, 및/또는 TLR 효연제 각각의 양이 "치료량 이하(sub-therapeutic amount)"로, 즉 단독으로 투여될 경우 이러한 화합물의 치료 유효량보다 적은 양으로 사용될 수 있다는 것을 당업자는 인식할 것이다.

[0073] 병용 요법 또는 "~와 조합하여"는 특정 장애 또는 병태를 치료하기 위하여 1종 초과 치료제의 사용을 지칭한다. "~와 조합하여"는 치료제가 동시에 투여되고/투여되거나 함께 전달되도록 제제화되어야 함을 의미하고자 하는 것은 아니며, 이들 전달 방법은 본 개시내용의 범위내에 속한다. 치료제는 하나 이상의 다른 추가의 제제와 동시에, 그 이전에 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 또한, 병용 요법에서 치료제는 휴지기(예를 들어, 스케줄의 특정 일에 치료제가 투여되지 않음)가 있거나 없는 교대 투여 일정으로 투여될 수 있다. 치료제를 또 다른 치료제 "와 조합하여" 투여하는 것은 2종 이상의 제제의 순차적 투여 및 공동 투여를 포함하나, 이에 한정되는 것은

아니다. 일반적으로, 각각의 치료제는 특정 제제에 대해 결정된 용량 및/또는 시간 스케줄로 투여된다.

[0074] "약학적으로 허용가능한 부형제" 또는 "약학적으로 허용가능한 담체"는 환자에게 유의적으로 독성학적 부작용을 야기하지 않고 본원에 기재된 조성물에 포함될 수 있는 성분을 지칭한다.

[0075] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "환자" 또는 "대상체"는, 본 명세서에 제공된 바와 같은 화합물, 조성물 또는 이것들의 조합의 투여에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 병태, 예컨대 암을 앓고 있거나 그러한 병태에 걸리기 쉬운, 살아있는 유기체를 지칭하며, 인간과 동물을 둘 다 포함한다. 대상체로서는 포유동물(예컨대, 마우스, 원숭이, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 인간이다.

[0076] "선택적" 또는 "선택적으로"는, 설명은 상황이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함하도록, 후속적으로 기재된 상황이 일어날 수 있지만 반드시 일어날 필요는 없을 수 있음을 의미한다.

[0077] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "소분자"는 약 1000 달톤 미만의 분자량을 통상적으로 갖는 유기 화합물을 지칭한다.

## [0078] 개관

[0079] 본원에 기재된 조성물, 시스템, 키트, 조합 및 방법은 선천성 면역계 활성화가 가능한 신규의 잠재적으로 더 안전하고 매우 효과적인 항암 요법에 통합되는 약물 설계 및 치료 근거에서 다수의 혁신적인 진보를 포함한다.

[0080] 예를 들어, 높은 전신 노출 및 관련 독성 및/또는 하위-최적 종양세포봉괴성 효과와 같이, 단일 면역 요법제를 포함하는 현재의 항종양 전략과 연관된 결점들 중 적어도 일부를 다루기 위한 노력으로, 본 명세서는 암을 갖는 대상체에게 선천성 면역 활성화 양(예를 들어, T 세포 자극 양)의 4-1BB 효현제, 및 TLR 효현제와 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 적어도 하나를 투여하는 것을 포함하는 조성물, 시스템, 조합 및 방법을 제공한다. 본 개시내용은 적어도 부분적으로는 (i) 4-1BB 효현제 및 적어도 TLR 효현제 또는 지속 작용성 IL-2R 효현제, 및 보다 구체적으로는 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 또는 (ii) 4-1BB 효현제, TLR 효현제, 및 지속 작용성 IL-2R 효현제, 및 보다 구체적으로는 IL-2R $\beta$ -편향 효현제를 포함하는 놀라운 정도로 유리한 치료 조합의 발견에 기초한다.

[0081] IL-2는 알파(IL2R $\alpha$ , CD25), 베타(IL2R $\beta$ , CD122) 및 공통의 감마 사슬 수용체( $\gamma_c$ , CD132)를 함유하는 수용체-신호전달 복합체를 통해 면역 세포 증식 및 활성화를 자극시킨다. IL2는 고 용량에서 이형이량체 IL2R $\beta\gamma$  수용체와 결합하여 종양 사멸 CD8+ 기억 효과기 T(CD8 T) 세포의 원하는 팽창을 유도한다. 그러나, IL2는 또한 그의 이종삼량체 수용체 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 와 더 큰 친화성으로 결합하여, 면역억제성 CD4+, CD25+ 조절 T 세포(Treg)를 팽창시켜 암 면역 요법에 바람직하지 않은 효과를 초래할 수 있다. 따라서, 4-1BB 효현제와 (i) IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제, 구체적으로는, 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제, 또는 (ii) TLR 효현제, 예컨대 TLR 7/8 효현제, 또는 (i) 둘 다, 즉 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제, 구체적으로는, 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제와 TLR 효현제, 예컨대 TLR 7/8 효현제의 투여를 조합하는 치료 방식이 본원에 제공된다. 이론에 의해 구애되지는 않지만, 면역억제성 Treg를 활성화시키는 원인이 되는 IL2R $\alpha$  서브유닛과 상호작용하는 영역이 마스킹된(즉, 그의 활성이 억제 또는 약화된) 지속 작용성 IL-2 화합물, 즉 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제와 선택적으로 조합되고/조합되거나 항원제시 세포 성숙 및 T-세포 프라이밍의 작용 메커니즘을 갖는 TLR 효현제와 선택적으로 조합될 경우 T 세포의 활성을 자극시킬 수 있는 4-1BB 효현제를 이용함으로써, 뛰어난 치료 효능이 달성될 수 있는 것으로 생각되며, 이는 본 개시내용 및 지지 실시예로부터 명백해질 것이다. 실제로, 대표적인 예에서, 상기 조합은 효능이 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제 중 적어도 하나가 직접 투여된 종양(1차 종양) 및 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제 중 적어도 하나가 직접 투여되지 않은 종양(2차 종양) 둘 다의 모든 종양에서 관찰되도록 하는 뛰어난 압스코프 효과를 생성하였다.

[0082] 적어도 부분적으로는 마우스 종양 모델에서 본원에 기재된 바와 같은 TLR 7/8 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제, 예컨대 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2의 조합에 반응한 면역계의 초기 연구의 결과로서 발생한 조합 요법이 본원에 제공되며, 여기서 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2에 반응하여 체내에서 성장하는 T 세포의 큰 분획이 일반적으로 골수 세포, 예컨대 마크로파지 및 수지상 세포와 연관된 표면 단백질 CD11c 발현을 획득한 것으로 관찰되었다. 이러한 세포는 T 세포와 기능적으로 및 발달적으로 매우 상이하고, 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2의 직접적인 표적이 아니다. CD11c 표면 단백질 발현의 이러한 인식은 특정한 면역 세포 유형과 연관된 다양한 세포 유형-특이적 세포 표면 단백질의 풍부를 점수화하는 유세포 분석을 사용함으로써 추가로 지지되었다. 이러한 발견, 즉 표면 단백질 CD11c를 발현하는 T-세포는, CD11c 단백질이 이러한 세포



와 통상적으로 연관되지 않고, T 세포 분석에서, CD11c 단백질 검출이 거의 사용되지 않기 때문에, 뜻하지 않게 발견된 것이었다.

[0083] 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2와 달리, 본원에 기재된 것과 같은 TLR 효현제, 예를 들어 예시적인 TLR 7/8 효현제, 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848은 CD11c 단백질을 발현하는 세포 유형을 직접적으로 표적으로 하여, 조합 치료의 분석 및 평가는 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제 및 마크로파지 및 TLR 7/8 효현제에 의해 표적화된 수지상 세포로부터 생성된 두 T 세포에 대한 동일성 마커를 포함하였다. 이러한 조합된 분석은 동일한 설정에서 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제 및 TLR 7/8 효현제 표적 세포 집단 둘 다에 대한 세포 표면 단백질 마커의 가시화를 가능하게 하고, 뜻밖에 CD8 T 세포 상 CD11c 단백질 발현을 밝혔다.

[0084] 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제, 및 TLR 7/8 효현제와 조합된 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제 둘 다에 의한 CD8 T 세포 상 CD11c 단백질 발현의 유도에 대한 이러한 인식은 4-1BB를 통한 T-세포 자극을 위해 개발된 비-천연 효현제가 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제- 및/또는 TLR 효현제 유도 T 세포를 강화시켜 암 세포를 공격할지의 여부에 대한 조사로 이어졌다. 본원에 제공된 바와 같이, 4-1BB 효현제의 투여가 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제 및/또는 TLR 효현제와 조합될 경우, 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제 및 TLR 효현제 유도된 T 세포를 또한 강화시켜 암 세포를 공격함으로써 치료 효과를 증가시킨다는 것을 발견하였다.

#### [0085] 4-1BB 효현제

[0086] 4-1BB는 CD8 T 세포, 활성화 후, 활성화된 CD4 도움 T 세포, B 세포, 조절 T 세포, 자연 살해(NK) 세포 등을 포함하는 조혈 계통의 다수의 세포에서 발현된다(Bartkowiak et al., *Front. Oncol.* Vol. 5, article 117, 2015). 4-1BB 효현제 요법은 선천성 및 적응성 면역 아암 둘 다에서 다양한 면역 효과기 반응을 유발한다. 가장 강력한 반응은 CD8<sup>+</sup> 세포독성 T 세포를 자극하여 증가된 인터페론 감마 생성 및 다중 그랜자임의 발현을 통해 그의 효과기 잠재력을 확산 및 증가시킨다. 또한 CD4<sup>+</sup> 효과기 T 세포는 자극되어 전염증성 사이토카인을 확장 및 생성시킬 수 있다(Bartkowiak, 상동).

[0087] 본원에 제공된 조성물, 시스템 또는 조합은 적어도 하나의 4-1BB 효현제를 포함한다. 본원에 제공된 치료 방법은, 즉 선천성 면역 반응을 자극하기 위하여 4-1BB 효현제를 투여하는 것을 포함한다. 4-1BB 효현제의 투여는, 예를 들어 T 세포 증식, IL-2 분비, 생존, 및/또는 세포용해 활성을 향상시키는 데 효과적이다.

[0088] 다양한 4-1BB 효현제가 본원에 기재된 조성물, 시스템, 조합 및 방법에 따라 사용 및/또는 투여될 수 있고, 본원에서 조성물, 시스템, 조합 및 방법은 이와 관련하여 제한되지 않는다. 이론에 제한되는 것은 아니지만, IL-2 경로를 통해(즉, 4-1BB 효현제와 TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제의 공동 투여를 통해) 성공적인 결과가 달성되어, 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제의 상보적 성질 및 작용 메커니즘으로 인해 원하는 T-세포 반응을 자극할 수 있는 것으로 생각된다.

[0089] 예시적인 4-1BB 효현제는, 예를 들어 PRS-342(HER2-표적화 항체를 갖는 CD137-특이적 안티칼린, Pieris Pharmaceuticals), PRS-343(HER2-표적화 항체에 유전적으로 연결된 효현 CD137-표적화 안티칼린, Pieris Pharmaceuticals), EU-101(Eutilex Co.), 우레루맙(BMS-663513, BMS), 또는 유토밀루맙(PF-05082566, Pfizer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 하나 이상의 구현예에서, 4-1BB 효현제는 우레루맙(BMS-663513, BMS) 또는 유토밀루맙(PF-05082566, Pfizer)이고, 이 중 어느 하나 또는 둘 다는 본원에 제공된 삼중 및 이중 요법적 치료 방법에서 4-1BB 효현제와 병용하여 투여될 수 있다.

[0090] 일부 구현예에서, 약물학적으로 유효량은 약 0.5 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 1 내지 100 mg/kg, 3 내지 50 mg/kg, 3 내지 30 mg/kg 또는 3 내지 15 mg/kg일 수 있다. 일부 구현예에서, 0.5 mg/kg(체중) 미만의 용량이 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제, 지속 작용성 TLR 7/8 효현제 중 어느 하나와 병용하여 투여될 경우, 또는 상기 둘 다와 병용하여 투여될 경우 효과적일 수 있다.

[0091] 실시예 19에 나타난 바와 같이, 4-1BB 효현제, 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\alpha$   $\beta$ -편향 효현제, 즉 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2, 및 지속 작용성 TLR 7/8 효현제의 조합 투여는 단일 제제 4-1BB 효현제 및 예시적인 지속 작용성 TLR 7/8 효현제와 조합된 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2 둘 다를 사용한 면역 요법과 비교할 때, 쥐와 CT-26 결장 종양 모델에서 생존을 증가시키는 데 효과적이었다. 예시적인 동물 모델에서, 10  $\mu$ g 용량의 4-1BB 효현제를 포함하는 병용 요법은 100% 생존율을 초래하였다. 특히, 이 실시예에서, 더 높은 용량의

4-1BB 효현제(100  $\mu\text{g}$ )는 75% 생존율을 초래하였다. 따라서, 저 용량의 4-1BB 효현제를 포함하는 병용 요법은 고 용량의 4-1BB 효현제보다 우수한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는, 10  $\mu\text{g}$ 의 용량이 25% 생존율을 초래하였지만, 100  $\mu\text{g}$ 의 용량이 100% 생존율을 초래한 4-1BB 효현제를 사용하는 단일 제제 연구와 대조적인 것이다. 일부 구현예에서, 병용 요법은 저 용량의 4-1BB 효현제를 허용하는데, 이는 4-1BB 항체 효현제가 용량-제한 간 염증을 초래하는 것으로 밝혀졌기 때문에 중요하다(Bartkowiak, 상동).

[0092] 실시예 20에 나타난 바와 같이, 예시적인 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R  $\alpha\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2의 조합 투여는 유사한 결과를 제공하므로, 저 용량, 즉 10  $\mu\text{g}$ 의 용량의 4-1BB 효현제를 제공하는 치료는 100% 생존율을 초래하였다.

[0093] **톨-유사 수용체(TLR) 효현제**

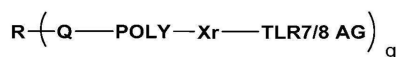
[0094] 본원에 제공된 조성물, 시스템, 조합 및 치료 방법은 하나 이상의 구현예에서, 즉 선천성 면역 반응을 자극하기 위한 TLR 효현제를 포함할 수 있다. TLR 효현제의 투여는 예를 들어 선천성 면역, 골수 세포 반응을 활성화시키고, 종양 항원 제시를 증가시키는 데 효과적이다. 일반적으로, TLR 효현제는 국소 감염을 모방함으로써 종양에 종양 억제 미세환경을 생성할 수 있다.

[0095] 다양한 TLR 효현제가 조성물, 시스템 또는 조합에 사용되거나; 본원에 기재된 방법에 따라 투여될 수 있고, 개시내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다. 이론에 제한되는 것은 아니지만, IL-2 경로를 통해(즉, 지속 작용성 IL-2R  $\alpha\beta$ -편향 효현제와 함께 또는 이것 없이 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제의 공동 투여를 통해) 성공적인 결과가 달성되어 4-1BB 효현제, TLR 효현제(및 지속 작용성 IL-2R  $\alpha\beta$ -편향 효현제)의 상보적 성질 및 작용 메커니즘으로 인하여 원하는 T-세포 반응을 자극할 수 있는 것으로 생각된다.

[0096] TLR 효현제는 일부 바람직한 구현예에서, 지속 작용성이고, 예를 들어 수용성 중합체 컨쥬게이트, 바람직하게는 다중-아암 수용성 중합체 컨쥬게이트 형태, 예컨대 TLR 7/8 효현제의 다중-아암 폴리에틸렌 글리콜 중합체(PEG) 컨쥬게이트 형태이다. TLR 효현제의 예시적인 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는 PCT 출원 번호 PCT/US2018/0131999에 기재되어 있으며, 그 내용은 명확하게 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0097] 일부 구현예에서, TLR 효현제는 톨-유사 수용체("TLR") 효현제 화합물, 즉 TLR 7/8 효현제(TLR 7, TLR 8 수용체 또는 둘 다의 효현제)의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트이다. 일부 특정 구현예에서, 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는 하기 화학식 I에 따른 구조를 가지며, 여기서 화학식 I은 또한 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다:

[0098] [화학식 I]



[0099]

[0100] (식에서, R은, 각각의 Q와 함께, 각각 3 내지 약 50개의 히드록실, 티올, 또는 아미노 기를 갖는 폴리올, 폴리티올, 또는 폴리아민의 잔기이고; 각각의 Q는 독립적으로 산소, 황 및 -NH(예를 들어, 각각 폴리올, 폴리티올, 또는 폴리아민으로부터의 산소, 황 또는 질소 원자에 상응함)로부터 선택된 링커이고; 각각의 POLY는 독립적으로 수용성 비-펩티드 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜이고; 각각의  $\text{X}_r$ 은 독립적으로 연결기-함유 스페이서로 이어티고; q는 3 내지 약 50의 양의 정수이고; 각각의 TLR 7/8 AG는 톨-유사 수용체 7/8 효현제임). 화학식 I의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트의 다양한 성분 각각이 하기에 논의된다.

[0101] 화학식 I을 고려하여, 하나 이상의 구현예에서, 다중-아암 중합체와 관련된, 폴리올, 폴리티올 또는 폴리아민의 잔기 "R"은 약 3 내지 약 150개의 탄소 원자(예를 들어, 약 3 내지 약 50개의 탄소 원자)를 갖는 유기 라디칼-함유 모이어티이다. 일부 바람직한 구현예에서, R이 Q와 함께 취해질 때, 즉 폴리올, 폴리아민 또는 폴리티올 코어 분자인  $(\text{R-Q})_q$ 는 3 내지 약 25개의 탄소 원자, 또는 약 3 내지 약 10개의 탄소 원자, 예를 들어 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 탄소 원자를 포함한다. 잔기는 Q에 의해 정의된 것과 같은 것에 추가적으로, 하나 초과와 헤테로원자(예를 들어, O, S, 또는 N)를 함유할 수 있다. 폴리올(또는 폴리아민 또는 폴리티올)와 관련하여, 잔기라 함은, 그의 말단 수소 원자 중 하나 이상을 제거 후 POLY에 대한 부착에 적합한 유기 라디칼을 제공하는 부모 분자를 의미한다.

[0102] 앞서 나타난 바와 같이, 폴리올, 폴리티올 또는 폴리아민의 잔기인, 본 명세서에 제공되는 다중-아암을 갖는 컨쥬게이트에 대한 분지에 대한 기초를 형성하는 "R-Q"<sub>q</sub>는 상응하는 폴리올, 폴리티올 또는 폴리아민으로부터 기원

한다. 하나 이상의 구현예에서, 상응하는 폴리올, 폴리티올, 또는 폴리아민은, 중합체 부착에 이용가능한 적어도 3개의 히드록실, 티올, 또는 아미노 기를 각각 포함한다. "폴리올"은 3개 이상의 히드록실 기를 포함하는 분자이다. "폴리티올"은 3개 이상의 티올 기를 포함하는 분자이다. "폴리아민"은 3개 이상의 아미노 기를 포함하는 분자이다.

[0103] 하나 이상의 구현예에서, 폴리올, 폴리아민 또는 폴리티올은 통상적으로 각각 3 내지 약 25개의 히드록실 기, 또는 아미노 기, 또는 티올 기, 예컨대 각각 3 내지 약 10(즉, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10)개의 히드록실, 아미노 기 또는 티올 기, 바람직하게는 각각 3 내지 약 8(즉, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8)개의 히드록실, 아미노 기 또는 티올 기를 각각 함유한다. 하나 이상의 구현예에서, 각각의 히드록실, 티올 또는 아미노 기 사이에 탄소 원자와 같은 개재 원자들의 약 1 내지 약 20개(예를 들어, 1 내지 약 5개)의 길이는 예시적이지만, 각각의 히드록실, 티올, 또는 아미노 기 사이의 원자들의 수는 다양할 수 있다. 개재(intervening) 코어 원자 및 길이와 관련하여,  $-CH_2-$ 는 하나의 개재 원자의 길이를 갖는 것으로서 간주되며,  $-CH_2CH_2-$ 는 2개의 원자의 길이를 갖는 것으로서 간주된다.

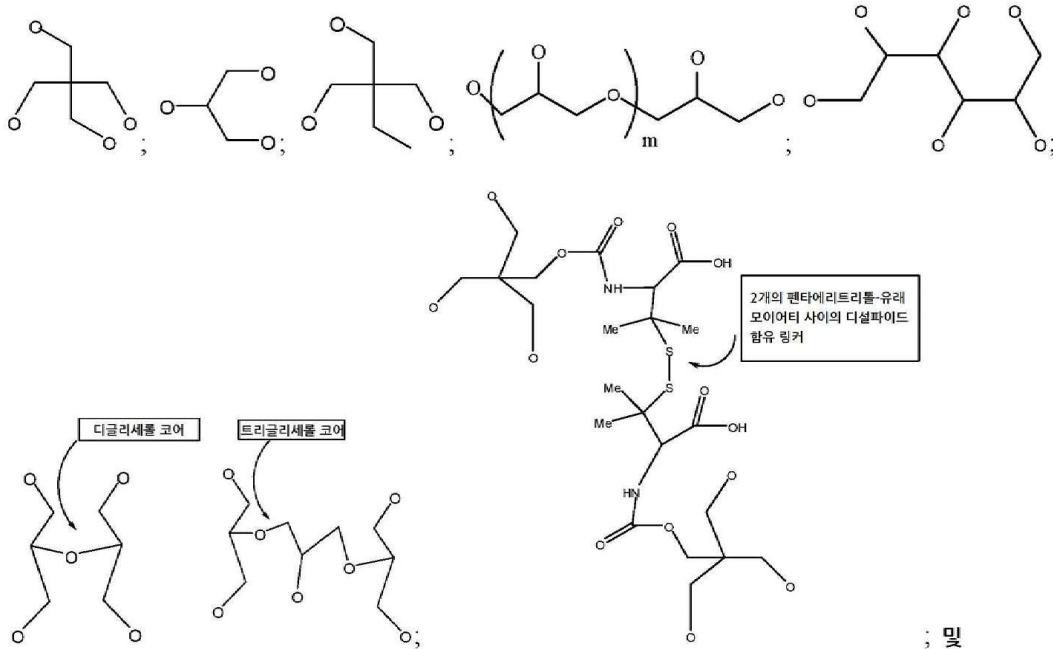
[0104] 예시적인 폴리올 및 폴리아민은 각각 (라디칼)-(OH)<sub>q</sub> 및 (라디칼)-(NH<sub>2</sub>)<sub>q</sub> 구조를 가지며, 식에서 (라디칼)은 유기-함유 라디칼에 상응하며, q는 3 내지 약 50의 양의 정수이다. 상기 기재된 바와 같이, 화학식 I에서, R과 함께 취해지는 경우, 변수 "Q"는 본 명세서에 기재된 바와 같은 코어 유기 라디칼의 잔기를 통상적으로 나타낼 것을 주목한다. 즉, 명칭으로 폴리올, 폴리티올 및 중합체 아민을 기재하는 경우, 이들 분자는 다중-아민을 갖는 중합체-함유 구조 내로의 포함 전의 그의 형태로 지칭된다(즉, 이들의 부모 분자로서 지칭됨). 즉, 바람직한 유기 코어 분자를 특히 명칭으로 기재하는 경우, 코어 분자는 예를 들어 하나 이상의 양성자의 제거 후 그의 라디칼 형태보다는, 그의 전구체 형태로 기재된다. 따라서, 예를 들어 유기 코어 라디칼이 펜타에리트리톨로부터 유래된다면, 전구체 폴리올은 구조식  $C(CH_2OH)_4$ 를 갖고, 유기 코어 라디칼은 Q와 함께  $C(CH_2O-)_4$ 에 상응하며, 식에서 Q는 0이다. 따라서, 예를 들어 화학식 I의 컨쥬게이트의 경우, 식에서 Q와 함께 취해진 R은 폴리올인 펜타에리트리톨  $C(CH_2OH)_4$ 의 잔기이며, Q와 함께 잔기 R은 " $C(CH_2O-)_4$ "에 상응하여, 다중-아민을 갖는 중합체 컨쥬게이트 내 각각의 "q" 중합체 아민이 펜타에리트리톨 코어 또는 잔기 중 산소 원자 각각으로부터 유래하도록 할 것이다.

[0105] 예시적인 폴리올은 1 내지 10개의 탄소 원자 및 3 내지 10개의 히드록실 기를 갖는 지방족 폴리올을 포함하며, 예를 들어 트리히드록시알칸, 테트라히드록시알칸, 폴리히드록시 알킬 에테르, 폴리히드록시알킬 폴리에테르 등을 포함한다. 지환족 폴리올은 직쇄 또는 닫힌 고리의 당류 및 당 알코올, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 자일리톨, 케브라치톨(quebrachitol), 트레이톨, 아라비톨, 에리트리톨, 아도니톨, 돌시톨, 파코스, 리보스, 아라비노스, 자일로스, 락소스, 람노스, 갈락토스, 글루코스, 프룩토스, 소르보스, 만노스, 피라노스, 알트로스, 탈로스, 타기토스, 피라노시드, 수크로스, 락토스, 말토스 등을 포함한다. 지방족 폴리올의 추가적인 예는 글루코스, 리보스, 만노스, 갈락토스, 및 관련 입체이성질체의 유도체를 포함한다. 1,1,1-트리스(4'-히드록시페닐)알칸, 예컨대 1,1,1-트리스(4-히드록시페닐)에탄, 2,6-비스(히드록시알킬)크레졸 등과 같은 방향족 폴리올이 또한 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 기타 다른 코어 폴리올은 폴리히드록시크라운 에테르, 시클로덱스트린, 텍스트린 및 기타 다른 탄수화물(예를 들어, 단당류, 올리고당류, 및 다당류, 전분 및 아밀라제)을 포함한다.

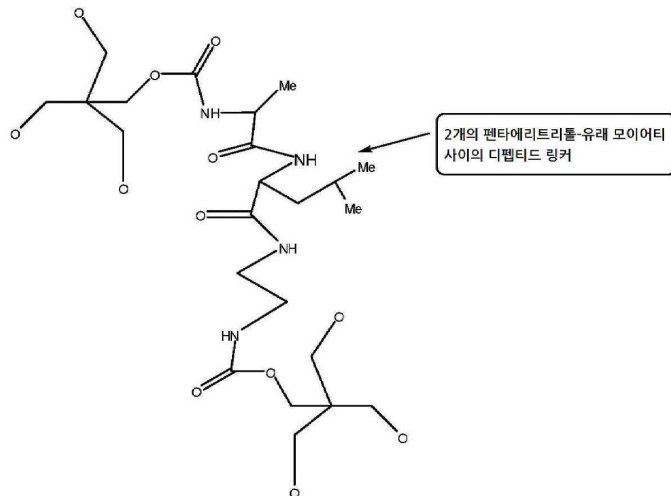
[0106] 예시적인 폴리올은 글리세롤, 트리메틸올프로판, 펜타에리트리톨, 디펜타에리트리톨, 트리펜타에리트리톨, 글리세롤의 에톡실화 형태, 트리메틸올프로판, 펜타에리트리톨, 디펜타에리트리톨, 트리펜타에리트리톨을 포함한다. 또한, 소르비톨 및 글리세롤 올리고머와 같은 환원당, 예컨대 디글리세롤, 트리글리세롤, 헥사글리세롤 등이 바람직하다. 21개의 이용가능한 히드록실 기를 갖는 히드록시프로필-β-시클로덱스트린을 사용하여 21-아민 중합체가 합성될 수 있다. 추가적으로, 평균 24개의 히드록실기를 갖는 폴리글리세롤 또한 예시적인 폴리올로서 포함된다.

[0107] 예시적인 폴리아민은 디에틸렌 트리아민, N,N',N"-트리메틸디에틸렌 트리아민, 펜타메틸 디에틸렌 트리아민, 트리에틸렌 테트라민, 테트라에틸렌 펜타민, 펜타에틸렌 헥사민, 디프로필렌 트리아민, 트리프로필렌 테트라민, 비스-(3-아미노프로필)-아민, 비스-(3-아미노프로필)-메틸아민, 및 N,N-디메틸-디프로필렌-트리아민과 같은 지방족 폴리아민을 포함한다. 사용될 수 있는 천연 발생 폴리아민은 푸트레신, 스페르미딘, 및 스페르민을 포함한다. 사용에 적합한 다수의 적합한 펜타민, 테트라민, 올리고아민, 및 펜타미딘 유사체는 문헌 [Bacchi et al. (2002) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1):55-61]에 기재되어 있으며, 이는 참고문헌으로 본 명세서에 포함된다.

[0108] 아래에, 폴리올의 잔기에 상응하는 예시적인 구조가 제공된다(각각의 구조는 상응하는 히드록실 기로부터 유래된 산소 원자("O")로 서술되어 있지만, 각각의 "O"는 각각 폴리티올 또는 폴리아민의 상응 잔기를 서술하기 위하여 황("S") 또는 NH로 치환될 수 있음). Q와 함께 취해진 R에 상응하여, 아래 나타낸 산소(또는 기타 다른 적합한 헤테로원자) 원자에 상응하는 다수의 아암을 갖는 다중-아암을 갖는 중합체 컨쥬게이트를 제공하므로, 아래 나타낸 잔기는 화학식 I의 컨쥬게이트 면에서 이해될 수 있음을 주목한다.



[0109]



[0110]

[0111] (식에서, m은 0 내지 40[예를 들어, 0 내지 10, 예를 들어, 0 내지 5(즉, 0, 1, 2, 3, 4, 5) 등]의 양의 정수임).

[0112] 다중-아암 중합체 TLR 7/8 효현제 컨쥬게이트는 수용성의 비펩티드성 중합체를 포함한다. 다양한 중합체가 사용될 수 있으며, 본 명세서에 제공된 구조는, 수용성 중합체의 유형(예를 들어, 폴리에틸렌 옥사이드 또는 폴리옥사졸린), 또는 크기(예를 들어, 2 내지 4,000개의 단량체 크기)와 관련하여 제한되지 않는다.

[0113] 유형과 관련하여, 수용성의 비펩티드성 중합체는 일련의 반복 단량체로서 이해되며, 여기서 단량체(들)의 유형은 수용성의 비펩티드성 중합체의 유형을 따른다. 예시적인 단량체는 알킬렌 옥사이드, 예컨대 에틸렌 옥사이드 또는 프로필렌 옥사이드; 올레핀성 알코올, 예컨대 비닐 알코올, 1-프로펜올 또는 2-프로펜올; 비닐 피롤리돈; 히드록시알킬 메타크릴아미드 및 히드록시알킬 메타크릴레이트(여기서 각각의 경우에, 알킬은 바람직하게는 메틸임); α-히드록시 산, 예컨대 락트산 또는 글리콜산; 포스포젠, 옥사졸린, 당당류와 같은 탄수화물, 만니톨과 같은 알디톨; 및 N-아크릴로일모르폴린을 포함하지만, 이로 한정되지는 않는다. 하나 이상의 구현예에서, 수용성의 비펩티드성 중합체는 이러한 군으로부터 선택되는 2개의 단량체 유형의 공중합체, 또는 더 바람직하게는



이러한 군으로부터 선택되는 1개의 단량체 유형의 동중중합체이다. 블록 공중합체를 포함하는 공중합체와 관련하여, 공중합체에서 2개의 단량체 유형은 동일한 단량체 유형, 예를 들어 에틸렌 옥사이드 및 프로필렌 옥사이드와 같은 2개의 알킬렌 옥사이드일 수 있다.

[0114] 크기와 관련하여, 수용성의 비펩티드성 중합체는 상대적으로 작을 수 있거나, 수용성의 비펩티드성 중합체는 상대적으로 클 수 있다.

[0115] 화학식 I에서 POLY, 즉 각각의 중합체 아암과 관련하여, 상대적으로 작은 수용성의 비펩티드성 중합체가 존재하는 구현예에서, 분자량의 예시적인 값은 약 2000 달톤 미만; 약 1500 달톤 미만; 약 1450 달톤 미만; 약 1400 달톤 미만; 약 1350 달톤 미만; 약 1300 달톤 미만; 약 1250 달톤 미만; 약 1200 달톤 미만; 약 1150 달톤 미만; 약 1100 달톤 미만; 약 1050 달톤 미만; 약 1000 달톤 미만; 약 950 달톤 미만; 약 900 달톤 미만; 약 850 달톤 미만; 약 800 달톤 미만; 약 750 달톤 미만; 약 700 달톤 미만; 약 650 달톤 미만; 약 600 달톤 미만; 약 550 달톤 미만; 약 500 달톤 미만; 약 450 달톤 미만; 약 400 달톤 미만; 약 350 달톤 미만; 약 300 달톤 미만; 약 250 달톤 미만; 약 200 달톤 미만; 및 약 100 달톤 미만을 포함한다. 상대적으로 작은 수용성의 비펩티드성 중합체의 예시적인 범위는 약 100 내지 약 1400 달톤; 약 100 내지 약 1200 달톤; 약 100 내지 약 800 달톤; 약 100 내지 약 500 달톤; 약 100 내지 약 400 달톤; 약 200 내지 약 500 달톤; 약 200 내지 약 400 달톤; 약 75 내지 1000 달톤; 및 약 75 내지 약 750 달톤을 포함한다.

[0116] 상대적으로 작은 수용성의 비펩티드성 중합체("POLY")에 대해, 그 안의 단량체의 수는 하기 범위들 중 하나 이상 내에 통상적으로 포함될 것이다: 1 내지 약 30(양 말단 값 포함); 약 2 내지 약 25; 약 2 내지 약 20; 약 2 내지 약 15; 약 2 내지 약 12; 약 2 내지 약 10. 특정 경우들에서, 중합체 내에서 일련의 단량체의 수(및 상응하는 컨주게이트)는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 중 하나이다. 추가의 구현예에서, 중합체(및 상응하는 컨주게이트)는 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 단량체를 함유한다. 또 다른 추가의 구현예에서, 각각의 중합체 "아암"에서 중합체 부분(및 상응하는 컨주게이트)은 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개의 일련의 단량체를 갖는다. 따라서, 예를 들어, 수용성의 비펩티드성 중합체 아암이  $-(OCH_2CH_2)_n-$ 을 포함하는 경우, "n"은, 일부 구현예에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 및 30으로부터 선택되고, 약 1 내지 약 25; 약 1 내지 약 20; 약 1 내지 약 15; 약 1 내지 약 12; 약 1 내지 약 10 중 하나 이상의 범위에 속할 수 있는 정수이다.

[0117] 컨주게이트 내 전체 수용성의 비펩티드성 중합체의 분자량이 상대적으로 큰 경우(예를 들어, 2,000 달톤 초과), 전체 분자량은 2,000 달톤 내지 약 150,000 달톤의 범위 내에 속할 수 있다. 그러나, 예시적인 범위는 약 3,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위 내; 약 5,000 달톤 내지 약 110,000 달톤의 범위 내; 5,000 달톤 초과 내지 약 100,000 달톤의 범위 내, 약 6,000 달톤 내지 약 90,000 달톤의 범위 내, 약 10,000 달톤 내지 약 85,000 달톤의 범위 내, 10,000 달톤 초과 내지 약 85,000 달톤의 범위 내, 약 20,000 달톤 내지 약 85,000 달톤의 범위 내, 약 53,000 달톤 내지 약 85,000 달톤의 범위 내, 약 25,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위 내, 약 29,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위 내, 약 35,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위 내, 및 약 40,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위 내의 분자량을 포함한다.

[0118] 화학식 I에서 각각의 중합체 아암 "POLY"과 관련하여 상대적으로 큰 수용성의 비펩티드성 중합체에 대한 예시적인 분자량은 약 500 달톤, 약 750 달톤, 약 1,000 달톤, 약 1500 달톤, 약 2,000 달톤, 약 2,200 달톤, 약 2,500 달톤, 약 3,000 달톤, 약 4,000 달톤, 약 4,400 달톤, 약 4,500 달톤, 약 5,000 달톤, 약 5,500 달톤, 약 6,000 달톤, 약 7,000 달톤, 약 7,500 달톤, 약 8,000 달톤, 약 9,000 달톤, 약 10,000 달톤, 약 11,000 달톤, 약 12,000 달톤, 약 13,000 달톤, 약 14,000 달톤, 약 15,000 달톤, 및 약 20,000 달톤을 포함한다.

[0119] 다중-아암 컨주게이트의 전체 중합체 부분과 관련하여, 상대적으로 큰 수용성의 비펩티드성 중합체에 대한 예시적인 분자량은, 예를 들어 약 20,000 달톤 22,500 달톤, 약 25,000 달톤, 약 30,000 달톤, 약 35,000 달톤, 약 40,000 달톤, 약 45,000 달톤, 약 50,000 달톤, 약 55,000 달톤, 약 60,000 달톤, 약 65,000 달톤, 약 70,000 달톤, 및 약 75,000 달톤을 포함한다. 상기 중 임의의 총 분자량을 갖는 수용성의 비펩티드성 중합체의 분지형 형태는 또한 중합체 아암 각각에서 다수의-분지형 컨주게이트를 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0120] 따라서, 상대적으로 작은 또는 큰 수용성의 비펩티드성 중합체가 사용되는지의 여부에 관계없이, 수용성의 비펩티드성 중합체가 폴리(에틸렌 옥사이드)인 경우, 중합체는 다수의  $(OCH_2CH_2)$  단량체[또는 PEG가 어떻게 정의되는지에 따라 달라지는,  $(CH_2CH_2O)$  단량체]를 포함할 것이다. 상세한 설명에 걸쳐 사용되는 바와 같이, 반복 단위의 수는  $-(OCH_2CH_2)_n-$ 에서 아래첨자 "n"으로 표시된다. 따라서, (n)의 값은 통상적으로 2 내지 약 3400, 약 100 내

지 약 2300, 약 100 내지 약 2270, 약 136 내지 약 2050, 약 225 내지 약 1930, 약 450 내지 약 1930, 약 1200 내지 약 1930, 약 568 내지 약 2727, 약 660 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 909 내지 약 2730, 및 약 1,200 내지 약 1,900 중 하나 이상의 범위에 속한다. 분자량이 알려진 임의의 소정의 중합체의 경우, 반복 단위의 수(즉, "n")는 중합체의 총 중량-평균 분자량을 반복 단량체의 분자량으로 나눔으로써 결정하는 것이 가능하다.

[0121] 다중-아암인 수용성의 비펩티드성 중합체와 관련하여, 이들 중합체는 통상적으로 3개 이상의 식별가능한 수용성의 비펩티드성 중합체 아암 또는 세그먼트를 함유한다. 다른 이익들 중, 다중-아암인 수용성의 비펩티드성 중합체는(각각의 아암이 TLR 7/8 효현제에 공유 부착하는 능력을 고려) 예를 들어 그에 부착되는 단일의 TLR 7/8 효현제를 갖는 선형 중합체에 비하여, 더 큰 약물 특징을 제공하는 잠재력을 갖는다. 하나 이상의 바람직한 구현예에서, 다중-아암 수용성 중합체는 각각 Xr을 통해 TLR 7/8 효현제에 부착된 4개의 중합체 아암, 예를 들어 PEG 아암을 갖는다.

[0122] 화학식 I과 관련하여, POLY를 TLR 7/8 효현제에 일반적으로 공유 부착시키는 연결기-함유 스페이서 모이어티는 생물학적으로 관련된 pH에서 가수분해에 및/또는 효소에 안정적이거나 방출가능할 수 있다. 즉, 일부 구현예에서, Xr은 가수분해에 안정적인 연결기이다. 또 다른 일부 다른 구현예에서, Xr은 방출가능한 연결기를 포함한다.

[0123] 앞서 기재된 바와 같이, 안정적인 연결기는 환자에게 투여 후 생체 내에서 눈에 띄게 분열되지(cleave) 않는 것이다. 이와 관련하여, 안정적인 연결기는 당업자에게 알려져 있다. 추가적으로, 소정의 연결기가 본 명세서에 제공된 컨쥬게이트와 관련하여 안정적인 연결기로서 작용하는지 여부는 실험(예를 들어, 제안된 안정적인 연결기를 갖는 컨쥬게이트를 환자에게 투여하고, 분열의 표시를 위해 주기적으로 수득된 혈액 샘플을, 예를 들어 크로마토그래피 또는 기타 다른 적합한 기법을 통해 시험하는 것에 의한 실험)을 통하여 시험될 수 있다.

[0124] 다중-아암 컨쥬게이트의 일부 구현예에서, 스페이서 모이어티를 함유하는 연결기는 TLR 7/8 효현제와 수용성의 비펩티드성 중합체 사이에 삽입된 방출가능한 연결기를 포함한다. 따라서, 방출가능한 연결기는 생체 내에서 환자에게 투여 후 분열되어, 그에 의해, 그의 중합체 아암으로부터 TLR 7/8 효현제 화합물(또는, 예를 들어 소분자량 태그를 이용하여, 그의 약간 변형된 형태)을 방출시키는 것이다. 이와 관련하여, 방출가능한 연결기는 당업자에게 알려져 있다. 추가적으로, 소정의 연결기가 본 명세서에서 제공된 다중-아암을 갖는 컨쥬게이트와 관련하여 천연으로 방출가능한지의 여부는 실험(예를 들어, 제안된 방출가능한 연결기를 갖는 컨쥬게이트를 환자에게 투여하고, 분열의 표시를 위해 주기적으로 수득된 혈액 샘플을, 예를 들어 크로마토그래피 또는 기타 다른 적합한 기법을 통해 시험하는 것에 의한 실험)을 통하여 시험될 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, TLR 7/8 효현제의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는 방출가능한 연결기를 포함하며, 즉 Xr은 방출가능한 연결기를 포함한다.

[0125] 예를 들어, TLR 7/8 효현제의 다중-아암을 갖는 중합체 컨쥬게이트에 포함된 연결기의 방출가능한 특성의 평가는 컨쥬게이트 샘플과 인간으로부터의 hepatocellular carcinoma (HCC) 풀링된(pooled) 혈장(pH 7.2 내지 7.4)과의 37°C에서의 인큐베이션 후에 다양한 시점에서 샘플을 꺼내어 시험관 내에서 결정될 수 있으며, 여기서 샘플은 예를 들어 LC-MS와 같이 검출 및 정량화에 적합한 임의의 기법을 사용하는 샘플 분석 및 정량화까지 즉시 동결된다. 명백한 전환 반감기( $t_{1/2,app}$ )는, 이후 그의 초기 공칭 인큐베이션 농도로부터의 컨쥬게이트 전환이 TLR 7/8 효현제 방출에만 기인한다는 가정을 기준으로 계산되며, 여기서 약 300시간 이하의  $t_{1/2}$ 은 방출가능한 연결기 또는 방출가능한 컨쥬게이트를 나타내는 것으로 고려될 수 있다.

[0126] 본 명세서에서 제공된 컨쥬게이트와 관련하여 사용하기 위한 예시적인 방출가능한 연결기는 제한 없이, 아마이드, 티오에테르, 카바메이트, 에스테르, 카보네이트, 우레아 및 효소-분열가능한 펩티드 연결기를 포함할 수 있으며, TLR 7/8 효현제 화합물의 구조 및 전체 링커 구조에 따라 달라진다. 일부 경우에, 결합 또는 연결기는, 단독으로 고려되는 경우, 대체로 "방출가능한" 또는 분열가능한 성질인 것으로 고려되지 않을 수 있지만, 결합 또는 연결기가 공유 부착되는 분자 실체의 구조와 함께 취해지는, 예를 들어 이미다조퀴놀린 구조를 갖는 TLR 7/8 효현제 화합물의 경우, 그러한 연결기는 베타-제거, 아마이드 가수분해 등과 같은 특정 방출 메커니즘으로 인해, 방출가능할 수 있다. 예를 들어, 티오에테르, 아마이드, 카바메이트, 에스테르, 카보네이트, 우레아 등은  $\beta$ -제거 반응을 통해 또는 가수분해를 통해 분열될 수 있다(효소적 조직화와 함께 또는 없이, 예를 들어 에스테르가 에스테라제를 통해 분열되는지의 여부에 관계없이 에스테르는 방출가능한 연결기로서 작용할 수 있다).

[0127] 방출가능한 연결기를 포함하는 TLR 7/8 효현제의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는, 방출이 비변형된 부모 분자의

방출을 초래하는 경우, 종종 전구약물로서 범주화되는데, 이는 이들이 투여 후 공유 부착된 TLR 7/8 효현재 화합물을 방출시키기 때문이다(즉, 생리학적 조건 하). 대체로, 본 명세서에 기재된 다중-아암 중합체 레시퀴모드(R-848) 컨쥬게이트는 레시퀴모드에 방출가능한 연결기를 포함한다.

[0128] 효소-분열가능한 펩티드 연결기와 관련하여, 스페이서 모이어티는 의도된 환자 개체군에 존재하는 효소에 대한 기재로 알려져 있는 하나 이상의 일련의 아미노산을 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 환자에 투여시, 컨쥬게이트 내에 포함된 효소-분열가능한 펩티드 연결기의 효소-유도된 분열은 TLR 7/8 효현재(또는 분열로 생성된 상대적으로 소분자 단편 또는 "태그"를 갖는 TLR 7/8 효현재)를 방출할 것이다. 소정의 환자 개체군에서 효소 분열된 펩티드 연결기의 예는, 예를 들어 미국 특허출원 공보 US 2005/0079155에 기재되어 있으며, 이는 또한 실험적으로 결정될 수 있다.

[0129] Xr에 관하여, 연결기-함유 스페이서 모이어티는 임의의 다수의 예시적인 아미노산, 예컨대 베타-알라닌, 글리신, L-알라닌, L-발린, 류신, 디메틸글리신 등을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Xr은, 그의 아미노기를 통해 상기 임의의 하나 이상의 아미노산들에 공유 부착된 카르복시메틸("CM")기,  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ 를 포함하며, 여기서 그의 말단 카르복시기는, TLR 7/8 효현재의 아미노기에 공유 부착되어 일부 구현예에서 방출가능한, 아미드 연결기를 제공한다.

[0130] 일부 구현예에서, 연결기-함유 스페이서 모이어티, "Xr"은 화학식 II에 따르며:

[0131] [화학식 II]

[0132]  $\sim[\text{X}^1]_a-[\text{Lr}]_b-\text{X}^2\sim$

[0133] (식에서, "a"는 0 또는 1(0은 " $\text{X}^1$ "의 부재를 나타내고, 1은 그의 존재를 나타냄)이고; "b"는 0 또는 1(0은 "Lr"의 부재를 나타내고, 1은 그의 존재를 나타냄)이고;  $\text{X}^1$ 은, 존재하는 경우, 스페이서이고; Lr은, 존재하는 경우, 연결기이고; 및  $\text{X}^2$ 는 TLR 7/8 효현재에 직접 공유 부착된 작용기임).

[0134] a 및 b가 모두 0인 화학식 II의 경우, 연결기-함유 스페이서는 TLR 7/8 효현재를 다중-아암 중합체의 잔여부(예를 들어, 중합체 아암, POLY에)에 공유 부착시키는 작용기인,  $\text{X}^2$ 로 구성됨이 이해될 것이다. 그러한 경우에, 연결기-함유 스페이서는 단지 작용기  $\text{X}^2$ 만을 함유하고, 기타 다른 원자는 TLR 7/8 효현재와 수용성의 비펩티드성 중합체 사이에 존재하지 않는다. 통상적으로,  $\text{X}^2$ 는 다중-아암 중합체의 잔여부가 공유 부착되는 비변형된 TLR 7/8 효현재의 원자 또는 원자들을 포함한다. 예를 들어, 부착이 TLR 7/8 효현재의 아미노기에서 일어나는 경우, 통상적으로는 아미노기는  $\text{X}^2$ 의 일부를 형성한다.

[0135] a 및 b 중 어느 하나 또는 이들 모두가 1인 화학식 II의 경우에서, 연결기-함유 스페이서가  $\text{X}^2$ 를 구성하는 것들 외에 하나 이상의 추가적인 원자를 함유함이 이해될 것이다. 비제한적인 예시적인  $\text{X}^1$  및 Lr은, 왼쪽에서 오른쪽으로 또는 오른쪽에서 왼쪽 중 어느 하나를 고려할 때,  $-\text{O}-$ ,  $-\text{NH}-$ ,  $-\text{S}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{OC}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ ,  $\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ ,  $\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ ,  $-\text{C}(\text{S})-$ ,  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ ,

2가 시클로알킬 기,  $-N(R^6)-$ (식에서,  $R^6$ 은 H 또는 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴 및 치환된 아릴, 및 상기 하나 이상의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기 라디칼임)을 포함한다. 추가의 스페이서 및 연결기는 아실아미노, 아실, 아릴옥시, 1 내지 5개의 탄소 원자를 함유하는 알킬렌 브릿지, 알킬아미노, 약 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 디알킬아미노, 피페리디노, 피롤리디노, N-(저급 알킬)-2-피페리딜, 모르폴리노, 1-피페리지닐, 4-(저급 알킬)-1-피페리지닐, 4-(히드록실-저급 알킬)-1-피페리지닐, 4-(메톡시-저급 알킬)-1-피페리지닐, 플루오레닐, 및 구아니딘을 포함한다. 그러나, 본 설명의 목적을 위해서는, 일군의 원자들은 중합체 세그먼트에 바로 인접한 경우 스페이서로 간주되지 않고, 일군의 원자들은 그 그룹이 중합체 사슬의 단지 연장을 나타낼 수 있도록 중합체의 단량체와 동일하다.

[0136] 존재하는 경우, 스페이서 및 또는 연결기는 통상적으로 그 성질상 선형이지만 필수적이지는 않다. 추가적으로, 스페이서 및/또는 연결기는 통상적으로 가수분해에 안정적 및/또는 효소에 안정적이지만, 필수적이지는 않다. 하나 이상의 구현예에서, 스페이서 또는 연결기는, 존재하는 경우, 약 12개 미만의 원자(예를 들어, 약 10개 미만의 원자, 약 8개 미만의 원자 및 약 5개 미만의 원자)의 사슬 길이를 갖는다. 특정 스페이서 또는 연결기의 길이의 결정과 관련하여, 본 명세서에서 길이는 치환기는 세지 않고, 단일 사슬 내 원자의 수로서 정의된다. 예를 들어, R-POLY-NH-(C=O)-NH-TLR 7/8 효현제와 같은 우레아 연결기는, 3개의 원자의 사슬 길이( $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ )를 갖는 것으로 여겨진다.

[0137] 화학식 II와 관련하여, 존재하는 경우,  $X^1$ 의 특정 예는  $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ (본 명세서에서 카르복시메틸로서 지칭됨)를 포함한다.

[0138]  $X^2$ 의 예는  $-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ (식에서, NH는 TLR 7/8 효현제에 대한 부착 지점이고, 공유 부착 전에 개질되지 않은 TLR 효현제의 일부를 형성함);  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-$ (식에서, NH는 TLR 7/8 효현제의 부착 지점을 나타내고, 공유 부착 전에 개질되지 않은 TLR 효현제의 일부를 형성함);  $-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-$ (식에서, 카르보닐 탄소는 TLR 7/8 효현제에 대한 부착 지점을 나타내고, 공유 부착 전에 개질되지 않은 TLR 효현제의 일부를 형성함), 및  $-\text{NH}-$ (식에서, 질소 원자는 TLR 7/8 효현제에 대한 부착 지점을 나타내고, 공유 부착 전에 개질되지 않은 TLR 효현제의 일부를 형성함)를 포함한다.

[0139] Lr의 예는  $-(\text{CR}_x\text{R}_y)_z-$  및  $-\text{NH}(\text{CR}_x\text{R}_y)_z-$ 을 포함하고, 식에서 각각의  $R_x$  및  $R_y$ 는 수소, 저급 알킬, 할로(X), 및 할로-치환된 저급 알킬로부터 독립적으로 선택되고,  $z$ 는 1 내지 6의 정수, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5 및 6으로부터 선택된다. 저급 알킬의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, 펜틸, 및 헥실을 포함하고; 예시적인 할로 기는 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도이다. 예시적인 Lr 기는, 예를 들어  $-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CHF}-$ ,  $-\text{CHCH}_3-$ ,  $-\text{CHCH}(\text{CH}_3)_2-$ ,  $-\text{CHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ ,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{NHCH}_2\text{CHF}-$ ,  $-\text{NHCHCH}_3-$ ,  $-\text{NHCHCH}(\text{CH}_3)_2-$ ,  $-\text{NHCHCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2-$ , 및  $-\text{NHC}(\text{CH}_3)_2-$ 를 포함한다. 추가의 구조가 본 명세서에서 제공된다.

[0140] 하나 이상의 구현예에서, TLR 7/8 효현제, 예를 들어 다중-아암 수용성 중합체-TLR 효현제 컨쥬게이트인 지속 작용성 TLR 7/8 효현제는 약 3 내지 약 50개의 중합체 아암을 가질 수 있고, 보다 통상적으로는 중심 코어 분자(예를 들어, 통상적으로 폴리에틸렌, 폴리테트라플루오렌 또는 폴리아민)로부터 연장되는 약 3 내지 약 10개의 중합체 아암을 가질 것이며(예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 수용성 중합체 아암을 가질 것이며), 여기에 수용성 중합체 부분이 안정하게 또는 방출가능하게 공유 부착된다. 통상적으로, 중심 코어로부터 연장되는 수용성 중합체 아암이 그에 안정하게 공유 부착된다. 예시적인 폴리에틸렌 코어 분자는, 예를 들어 글리세롤, 트리메틸올프로판, 환원당, 예컨대 소르비톨 또는 펜타에리트리톨, 및 글리세롤 올리고머, 예컨대 헥사글리세롤을 포함한다. 통상적으로, 그러나 반드시 꼭 그런 것은 아니지만, 다중-아암 수용성 중합체 컨쥬게이트는 각각의 중합체 아암의 말단에 공유 부착된 TLR 효현제를 가질 것이다.

[0141] 이제 화학식 I의 TLR 7/8 효현제와 관련하여, TLR 7/8 효현제는 톨-유사 수용체 7 및/또는 톨-유사 수용체 8에 대한 효현제인 임의의 화합물이다. 바람직하게는, TLR 7/8 효현제는 소분자 효현제이다. 예시적인 구조 부류는 구아노신-함유 화합물 및 이미다조퀴놀린을 포함한다. 예시적인 TLR-효현제는 예를 들어 TLR-7 또는 TLR-8 효현제를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0142] 대표적인 TLR 효현제는, 예를 들어 텔라톨리모드(3M-052, 3M; MEDI-9797, MedImmune), 레시퀴모드(R848; S-



28463, 3M에서 입수할 수 있음), 이미퀴모드(R837; S-26308), S-28690(이미다조퀴놀린, 3M), N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸-]메탄설폰아미드(3M-001, 3M), (852A, 3M; PF-4878691, Pfizer) 베시무네(TMX-101, Telormedix SA), 에사톨리모드(GS-9620, Gilead Sciences), ANA-773(Anadys), 메틸 2-(3-(((3-(6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7,8-디히드로-9H-푸린-9-일)프로필)(3-모르폴리노프로필)아미노)메틸)페닐)아세테이트(AZD8848, Astra Zeneca), CL097, R848의 수용성 유도체(InvivoGen), 티아졸로퀴놀론 유도체(CL057; 3M-002, 3M), 3M-003(이미다조퀴놀린, 3M), TMX-202(Telormedix SA), TMX-302(Telormedix SA), TMX-306(Telormedix SA), 9-벤질-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시) 아데닌(IV136, Pfizer), IV209, 3M-011(3M), 2-부틸아미노-8-히드록시-9-(6-메틸피리딘-3-일메틸)아데닌(SM-276001), 메틸 3-[(6-아미노-2-부톡시-7,8-디히드로-8-옥소-9H-푸린-9-일)메틸]벤젠아세테이트(SM-324405), (SM-360320), 4-아미노-1-벤질-6-트리플루오로메틸-1,3-디히드로이미다조 [4,5-c] 피리딘-2-온(PF-4171455, Pfizer), CpG, CpR, ssRNA, BHMA, 메틸 2-(3-(((3-(6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7,8-디히드로-9H-푸린-9-일)프로필)(3-(디메틸아미노)프로필)아미노)메틸)페닐)아세테이트(AZ12441970, AstraZeneca), 및 2-(3-(((3-(6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)프로필)(3-(디메틸아미노)프로필)아미노)페닐)아세트산(AZ12443988, AstraZeneca)을 포함한다.

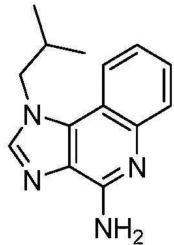
[0143] 예를 들어, 하나 이상의 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 다음으로부터 선택된다: 4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)-메틸)-N-(20-아지도-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코실)벤즈아미드; 3-(1-(1-(4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸)페닐)-1-옥소-5,8,11,14,17,20-헥사옥사-2-아자도코산-22-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)프로피온산; 4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)-메틸)-N-(20-아미노-3,6,9,12,15,18-헥사옥사이코실)벤즈아미드; 4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸)-N-(32-아지도-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사-일)메틸)-N-(32-아지도-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)벤즈아미드; 3-(1-(1-(4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-3-(1-(1-(4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸)페닐)-1-옥소-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-데카옥사-2-아자테트라트리아콘탄-34-일)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)-프로피온산; 4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸)-N-(32-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-데카옥사도트리아콘틸)-벤즈아미드; 4-(((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸)-N-(59-아미노-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-노나데카옥사노나펜타콘틸)벤즈아미드; N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸] 메탄설폰아미드; [8-(3-(피롤리딘-1-일메틸)벤질)-4-아미노-2-부톡시-7,8-디하이드로프테리딘-6(5H)-온]; [2-(4-(((6-아미노-2-(2-메톡시에톡시)-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일) 메틸) 벤즈아미도) 에틸 2,3-비스 (도데카노일옥시) 프로필 포스페이트]; [1-(4-(((6-아미노-2-(2-메톡시에톡시)-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일) 메틸) 페닐)-1-옥소-5,8,11,14,17,20-헥사옥사-2-아자트리코산-23-오익산]; [9-벤질-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시) 아데닌; 메틸 2-(3-[[6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일]메틸]페닐)아세테이트, SM-324406: 2-(3-[[6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일]메틸]페닐)아세트산; 메틸 2-(3-(((3 - (6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)프로필)(3-(디메틸아미노)프로필)아미노)페닐) 아세테이트; 2-(3-(((3-(6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7H-푸린-9(8H)-일)프로필)(3-(디메틸아미노)프로필)아미노)페닐).

[0144] 화학식 I의 일부 특정 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 텔라톨리모드(3M-052, 3M; MEDI-9197, MedImmune), 레시퀴모드(R848; S-28463, 3M에서 입수할 수 있음), 이미퀴모드(R837; S-26308), S-28690(이미다조퀴놀린, 3M), N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)부틸-]메탄설폰아미드(3M-001, 852A, 3M; PF-4878691, Pfizer), 베시무네(TMX-101, Telormedix SA), 베사톨리모드(GS-9620, Gilead Sciences), ANA-773(Anadys), 메틸 2-(3-(((3-(6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7,8-디히드로-9H-푸린-9-일)프로필)(3-모르폴리노프로필)아미노)메틸)페닐)아세테이트(AZD8848, AstraZeneca), CL097, R848의 수용성 유도체(InvivoGen), 메틸 3-[(6-아미노-2-부톡시-7,8-디히드로-8-옥소-9H-푸린-9-일)메틸]벤젠아세테이트(SM-324405), 메틸 2-(3-(((3-(6-아미노-2-부톡시-8-옥소-7,8-디히드로-9H-푸린-9-일)프로필)(3-(디메틸아미노)프로필)아미노)메틸)페닐)아세테이트(AZ12441970, AstraZeneca), GSK2245053(GlaxoSmithKline), SZ-101, 4-[6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)푸린-9-일메틸]벤즈알데히드(UC-1V150, U.C. San Diego), 9-벤질-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시) 아데닌(SM360320, IV136, Pfizer), VTX-1463 및 VTX-2337(VentiRx)이다. 일부 다른 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 (N-[4-(4-아미노-2-에틸-1H-이미다조[4,5c]퀴놀린-1-일)부틸] 메탄설폰아미드 또는 [8-(3-(피롤리딘-1-일메틸)벤질)-4-아미노-2-부톡시-7,8-디하이드로프테리딘-6(5H)-온]이다.

[0145] 특정의 바람직한 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 이미다조퀴놀린 화합물이다. 예시적인 이미다조퀴놀린은, 미국 특허 5,389,640에 기재된 바와 같은, 예를 들어 1-치환된, 2-치환된 1H-이미다조[4,5-c]-퀴놀린-4-아민 화합물을 포함한다. 그러한 화합물은 4-아미노-7-클로로-알파, 알파-디메틸-2-에톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-

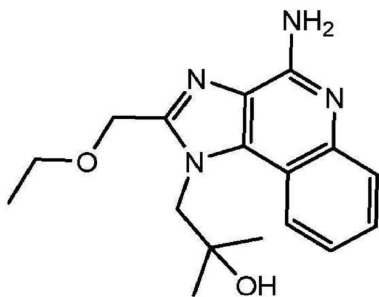
1-에탄올; 4-아미노-알파,알파-디메틸-2-히드록시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올; 4-아미노-알파,알파-디메틸-2-메톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-에탄올; 2-에톡시메틸-1-(3-메톡시프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민; 및 1-(2-메톡시에틸)-2-메톡시메틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민을 포함한다.

[0146] 하나 이상의 바람직한 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 레시퀴모드(R-848) 또는 이미퀴모드(1-이소부틸-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-아민), 또는 이들의 유도체이다. 하나 이상의 특정 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 이미퀴모드이다.



[0147]

[0148] 또 다른 특성의 다른 구체적인 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 레시퀴모드이다.



**R-848**

[0149]

[0150] TLR 7/8 효현제의 다중-아암을 갖는 중합체로의 공유 부착은 TLR 7/8 효현제 화합물 상에서 임의의 적합한 기능기 또는 원자로의 부착을 통해 일어날 수 있다. 다중-아암을 갖는 중합체로의 부착에 적합한 예시적인 작용기는 아미노, 히드록실, 카르복시, 및 티올 등을 포함한다. 특성의 바람직한 구현예에서, 이미퀴모드에 대한 공유 부착은 방향족 -NH<sub>2</sub> 기에서 일어난다. 다른 바람직한 구현예에서, 레시퀴모드로의 공유 부착은 방향족 -NH<sub>2</sub> 기에서 일어난다. 예시적인 구조가 아래에 제공된다.

[0151] 본 명세서에 기재된 컨쥬게이트는 다양한 방법으로 제조될 수 있으며, 예시적인 합성이 아래 실시예에서 제공된다.

[0152] 한 실시예에서, 다중-아암 중합체 TLR7/8 효현제 컨쥬게이트는 다중-아암 수용성 비-펩티드 반응성 중합체를 TLR 7/8 효현제에 공유 부착시키는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된다. 다수의 TLR 7/8 효현제가 상업적으로 수득되거나, 당업자에게 알려진 방법에 의해 합성될 수 있다.

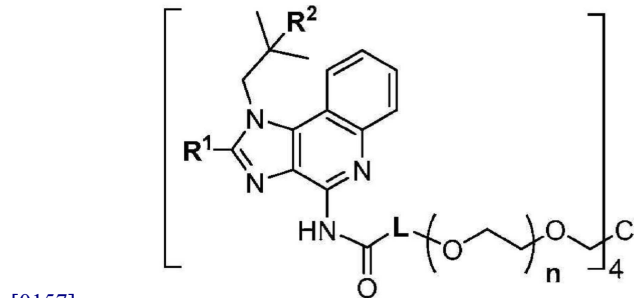
[0153] TLR 7/8 효현제의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트의 특정 특징이 바람직하며, 하기 기재된 바와 같은 이들 특징들 각각은 개별적으로 및 명시적으로 조합된 것으로 간주되어야 한다. 일부 바람직한 구현예에서, 중심 코어로부터 방사되는 각각의 중합체 아암은 동일하다. 즉, 예를 들어 화학식 I과 관련하여, R로부터 방사되어 나오는 각각의 Q, POLY, Xr 및 TLR 7/8 효현제는 동일하다. 특성의 바람직한 구현예에서, q는 4이다. 다른 바람직한 구현예에서, 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는 펜타에리트리톨 코어를 포함한다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 레시퀴모드이다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, POLY는 폴리에틸렌 글리콜이고, POLY-Xr은 -CH<sub>2</sub>-C(O)-아미노산-을 포함하고, 여기서 아미노산은 베타-알라닌, 글리신, L-알라닌, L-발린, 류신, H<sub>2</sub>NCH<sub>2</sub>CHFCOOH, 및 디메틸글리신으로부터 선택되고, 아미노산의 아미노 기는 카르보닐 기에 직접 부착된다. 상기 내용 중 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 아미노산은 글리신이다. 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는 화합물 6이다.

[0154] 다른 이점들 중에서, 본원에 제공된 다중-아암 중합체 TLR 7/8 컨쥬게이트는 컨쥬게이트를 예를 들어 종양 부위에 국소 투여할 수 있게 하며, 여기서 컨쥬게이트는 종양 부위에서 체류하는 동안 우선적으로 항-종양 면역을

국소적으로 개시하는 데 효과적이다. 특정 TLR 7/8 효현제와 함께 다중-아암 컨쥬게이트의 구조, 부착 화학, 및 투여 방식은 종양내에서 연장된 기간 동안 유지되는 컨쥬게이트를 생성하는 데 효과적이고, 종양 항원 제시 및 T-세포 자극을 증가시키는 데(즉, 강화된 CD8 T 세포 프라이밍을 초래함), 즉 국소화된 활성으로 인한 최소의 독성 부작용을 수반하면서 선천성 면역 반응을 유발하는 데 효과적이다.

[0155] 상기 기재된 바와 같은 특징을 갖는 대표적인 컨쥬게이트가 하기에 제공된다. 예를 들어, 컨쥬게이트는 화학식 III에 의해 정의된 바와 같은 구조:

[0156] [화학식 III]



[0158] 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 또는 입체이성질체를 가질 수 있으며, 식에서 **L**은  $-(CH_2)_m-$ ,  $-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_m-$ ,  $-CHF-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_m-$ ,  $-CH(CH_3)-NH-C(O)-(CH_2)_m-$ ,  $-(CH_2)_m-CH(CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-(CH_2)_m-$ ,  $-(CH_2)_m-CH(CH_2CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-(CH_2)_m-$ ,  $-C(CH_3)_2-NH-C(O)-(CH_2)_m-$ , 단일 결합, 또는  $-NH-(CH_2)_m-$ 이고; 각각의 **m**은 독립적으로 1 내지 5의 정수(양 말단 값 포함)이고; 각각의 **n**은 독립적으로 40 내지 350의 정수(양 말단 값 포함)이고; **R<sup>1</sup>**은 수소 또는  $-CH_2-O-CH_2-CH_3$ 이고; 및 **R<sup>2</sup>**는 수소 또는 히드록실이다.

[0159] 화학식 III의 특정 컨쥬게이트에서, **L**은 예를 들어,  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CHF-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH(CH_3)-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH(CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH(CH_2CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-CH_2-$ ,  $-C(CH_3)_2-NH-C(O)-CH_2-$ , 단일 결합, 및  $-NH-CH_2-CH_2-$ 로부터 선택된다.

[0160] 화학식 III의 일부 특정 구현에는 다음과 같다.

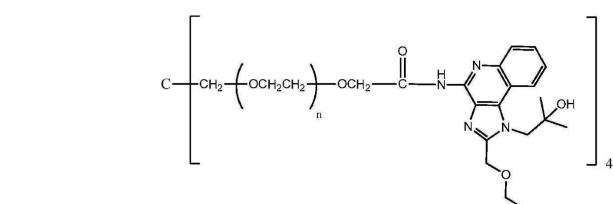
[0161] 예를 들어 일부 구현예에서, 각각의 **n**은 독립적으로 100 내지 250의 정수(양 말단 값 포함)이다.

[0162] 화학식 III의 일부 컨쥬게이트에서, **R<sup>1</sup>**은 수소이고, **R<sup>2</sup>**는 수소이다.

[0163] 화학식 III의 또 다른 추가의 컨쥬게이트에서, **R<sup>1</sup>**은  $-CH_2-O-CH_2-CH_3$ 이고, **R<sup>2</sup>**는 히드록실이다.

[0164] 하나 이상의 구현예에서, TLR 7/8 효현제는 그의 4개의 중합체 아암 각각의 말단에 안정하게 또는 방출가능하게 공유 연결된 TLR 효현제 분자, 예컨대 레시퀴모드 또는 이미퀴모드를 갖는 20,000 달톤의 4-아암-펜타에리트리톨릴계 폴리에틸렌 글리콜 컨쥬게이트이다. 또 다른 하나 이상의 구현예에서, TLR 7/8 효현제 분자는 레시퀴모드이다.

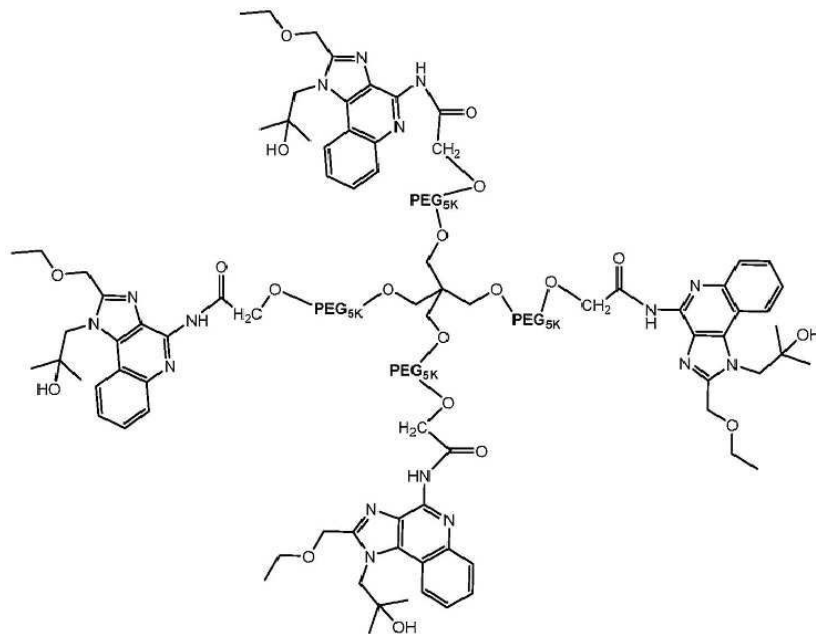
[0165] 특정 구현예에서, 지속 작용성 TLR 효현제는 그의 4개의 중합체 아암 각각의 말단에 방출가능하게 공유 연결된 레시퀴모드(R848)를 갖는, 하기 구조를 갖는 4-아암-펜타에리트리톨릴계 폴리에틸렌 글리콜 컨쥬게이트이다.



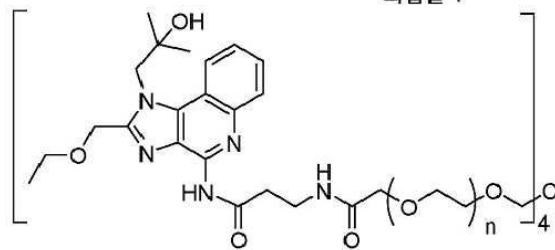
[0167] 상기 TLR 효현제 다중-아암 중합체 컨쥬게이트는 본원에서 "4-아암-PEG-CM-N-R848"로서 칭해지며, 여기서 N-은 TLR 효현제 분자, R848의 아미노 기에 대한 연결기를 나타내고; 그의 제조는 실시예 3에 기재되어 있다.

[0168]

특정의 다중-아암을 갖는 컨쥬게이트는 하기 구조를 갖는다. 즉, 일부 구현예에서, 다중-아암을 갖는 중합체 컨쥬게이트(예를 들어 지속 작용성 TLR 효현제)는 화합물 1 내지 10 또는 화합물 12 내지 16 구조 중 임의의 구조, 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염 또는 입체이성질체를 갖는다:



화합물 1

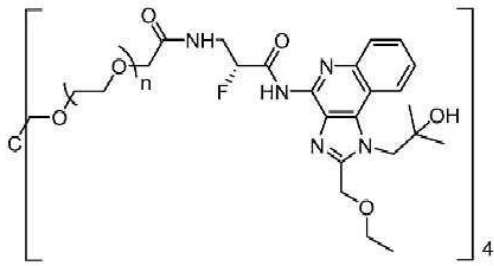


화합물 2

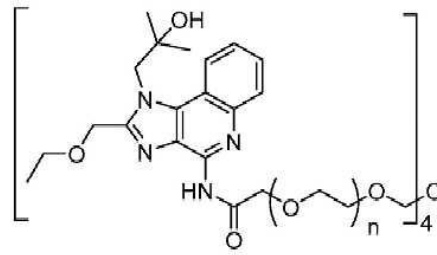


화합물 3

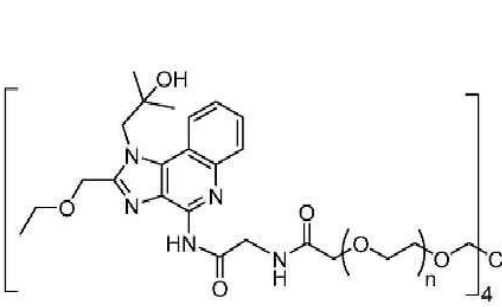
[0169]



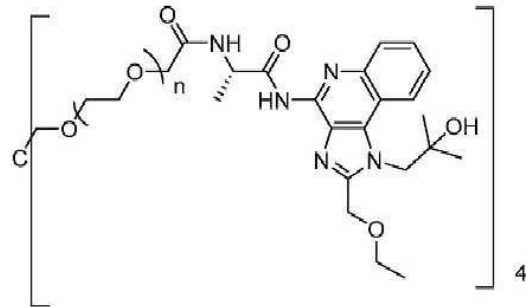
화합물 4



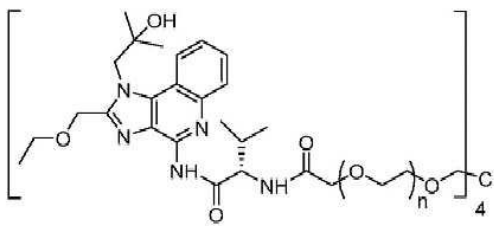
화합물 5



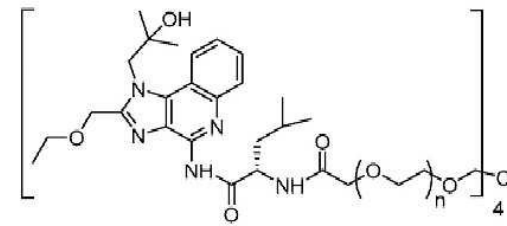
화합물 6



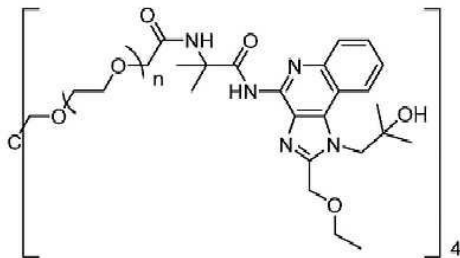
화합물 7



화합물 8



화합물 9

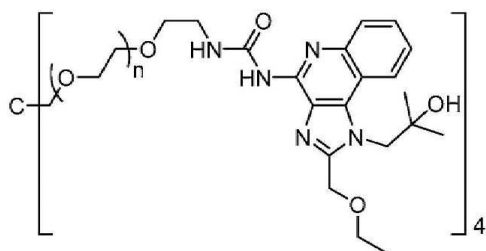


화합물 10

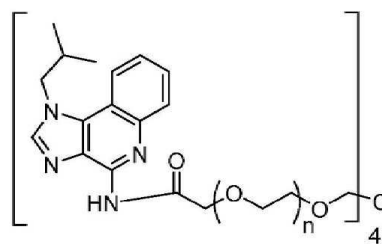


화합물 12

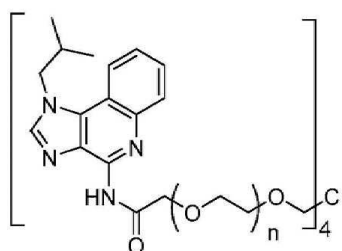
[0170]



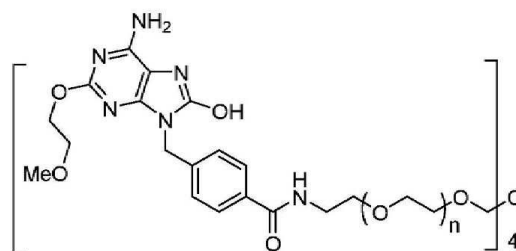
화합물 13



화합물 14



화합물 15



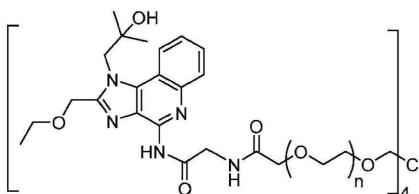
화합물 16

[0171]

[0172] 특정 구현예에서, TLR 효현제는 하기 나타낸 구조를 갖는 화합물 11이고, 여기서 n은 본원에 기재된 바와 같은 반복 단위의 임의의 적합한 수이다.

[0173]

[0174] 또 다른 일부 다른 바람직한 구현예에서, TLR 효현제 화합물은 하기 나타낸 구조를 갖는 화합물 6이고, 여기서 n은 본원에 기재된 바와 같은 반복 단위의 임의의 적합한 수이다:



[0175]

[0176] 화합물 1 내지 10 또는 화합물 12 내지 16의 일부 구현예에서, 화합물의 전체 다중-아암 PEG 부분은 약 10,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는다. 화합물 1 내지 10 또는 화합물 12 내지 16의 또 다른 일부 다른 구현예에서, 화합물의 전체 다중-아암 PEG 부분은 약 20,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는다. 화합물 1 내지 10 또는 화합물 12 내지 16의 또 다른 일부 다른 구현예에서, 화합물의 전체 다중-아암 PEG 부분은 약 30,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는다. 화합물 1 내지 10 또는 화합물 12 내지 16의 또 다른 일부 추가의 구현예에서, 화합물의 전체 다중-아암 PEG 부분은 약 40,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는다. 화합물 1 내지 10 또는 화합물 12 내지 16의 일부 바람직한 구현예에서, 화합물의 전체 다중-아암 PEG 부분은 약 20,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는다.

[0177]

일부 구현예에서, 불완전한 화학 전환(즉, TLR 7/8 효현제에 공유 커플링), 100% 미만의 수율, 및/또는 화학적 합성 동안 일상적으로 마주치게 되는 피할 수 없는 기타 다른 문제로 인해, 다중-아암 중합체 컨주게이트를 포함하는 예시적인 조성물은 각각의 "q" 중합체 아암의 수에 부착된 TLR 7/8 효현제 화합물의 이상적인 수보다 적은 수를 포함할 것이다. 그러한 수는 통상적으로는 중합체 부하도로서 지칭되며, 여기서 100% 부하는 TLR 7/8 효현제 화합물이 "q" 중합체 아암 각각의 말단에 공유 부착되도록 하는 완전한 부하를 나타낸다. 예를 들어, 예시적인 "4-아암-PEG" 컨주게이트는 4-아암 컨주게이트를 포함하는 혼합물로서 특징지어질 수 있으며, 여기서 조



성물 내 4-아암 컨쥬게이트의 적어도 50 면적%(a/a, HPLC에 의해 측정됨)는 TLR 7/8 효현제에 컨쥬게이트된 각각 4개의 아암을 갖는다. 예시적인 "4-아암-PEG" 컨쥬게이트를 포함하는 추가의 예시적인 조성물은 4-아암 컨쥬게이트를 포함하는 조성물로서 특징지어질 수 있으며, 여기서 조성물 내 4-아암 컨쥬게이트의 적어도 65 내지 90, 70 내지 85, 또는 70 내지 75 면적%(a/a, HPLC에 의해 측정됨)는 TLR 7/8 효현제에 컨쥬게이트된 각각 4개의 아암을 갖는다.

[0178] 컨쥬게이트는 그 자체로 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 투여될 수 있으며, 본 명세서에서 임의의 하나 이상의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트에 대한 임의의 지칭은 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 것으로 의도된다. 사용되는 경우, 본 명세서에 기재된 바와 같은 컨쥬게이트의 염은 약리학적 및 약학적으로 모두 허용가능하여야 한다. 그러한 약리학적 및 약학적으로 모두 허용가능한 염은, 문헌에 상술된 표준 방법을 사용하여, 컨쥬게이트와 유기산 또는 무기산과의 반응에 의해 제조될 수 있다. 유용한 염의 예는, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산, 말레산, 아세트산, 살리실산, p-톨루엔설폰산, 타르타르산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 말론산, 숙신산, 나프탈렌-2-설폰산 및 벤젠설폰산, 트리플루오로아세트산 등의 산으로부터 제조될 수 있는 것들을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 또한, 약학적으로 허용가능한 염은, 카르복실산 기의 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘 염과 같은, 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염으로서 제조될 수 있다.

[0179] 컨쥬게이트, 및 구체적으로 컨쥬게이트의 TLR 7/8 효현제 부분은 하나 이상의 키랄 중심을 함유할 수 있다. 그 안에 포함된 각각의 키랄 중심에 있어서, 본 화합물 및 구조물은 각각의 광학 이성질체 뿐만 아니라 광학 활성 형태, 예를 들어 단일의 광학 활성 거울상 이성질체의 조합 또는 비율, 또는 거울상 이성질체의 임의의 조합 또는 비율(예를 들어, 비라세미성(scalemic) 및 라세미성 혼합물)을 포함하는 것으로 의도된다.

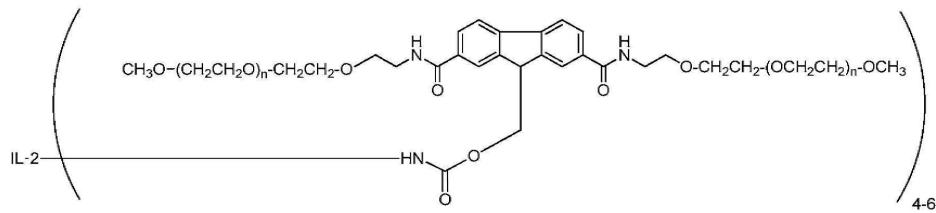
[0180] 또한, 본원에 기재된 바와 같은 TLR 7/8 효현제의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트를 포함하는 조성물 및 약학 제제가 본원에 제공된다. 하나 이상의 구현예에서, 다중-아암 TLR 7/8 효현제 컨쥬게이트 그 자체는 고체 형태(예를 들어, 침전물)일 것이다.

[0181] TLR 효현제는 임의의 적합한 투여 경로, 예를 들어 피내, 정맥내, 피하, 절내(intranodal), 림프내, 종양내 등에 의해 투여될 수 있다. 방법의 하나 이상의 특정 구현예에서, TLR 효현제는 예를 들어 주사에 의해 대상체에서 선천성 면역을 활성화시키기 위해 효과적인 양으로 종양에 직접 투여된다.

#### [0182] 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제

[0183] 본원에 기재된 방법, 제제, 시스템, 키트, 조성물, 조합 등은 추가로 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 투여를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시내용은 효현제가 동일한 시험관내 모델에서 IL-2R $\alpha$   $\beta$ 에 대한 결합 친화성보다 적어도 5배 더 큰(보다 바람직하게는 적어도 10배 더 큰) IL-2R $\beta$ 에 대한 시험관내 결합 친화성을 나타내고, IL-2보다 적어도 사실상 10배 더 큰 생체내 반감기(IL-2의 생체내 소실에 기초한 반감기)를 갖는 한 임의의 특정한 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제에 제한되지 않는다. 예로서, 표준물로서 IL-2에 대한 결합 친화성을 측정할 수 있다. 이와 관련하여, 실시예 1에서 언급된 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드))(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2(또한, 본원에서 "RSLAIL-2"로서 칭해짐)는 IL-2에 관해서는 IL-2R $\alpha$   $\beta$ 에 대해 친화성의 약 60배 감소를 나타내지만, IL-2에 관해서는 IL-2R $\beta$ 에 대해 친화성의 단지 약 5배 감소만을 나타낸다.

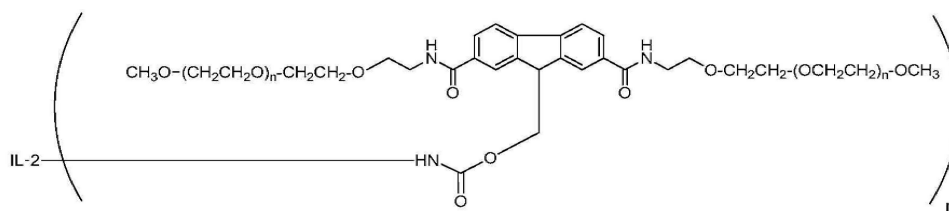
[0184] 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 비제한적인 예는 국제 특허 공보 번호 WO 2012/065086 및 WO 2015/125159에 기재되어 있다. 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 본 출원에서 실시예 1에서 언급된 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드))(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2("RSLAIL-2")이며, 여기서 방출가능한 PEG는 아마이드 연결기(플루오렌-C(O)-NH-)를 통해 플루오렌 고리 상 2- 및 7-위치로부터 연장된 폴리(에틸렌 글리콜) 사슬, 및 메틸렌 기(-CH<sub>2</sub>-)를 통해 플루오렌 고리의 9-위치에 부착된 카르바메이트 질소 원자에 대한 부착을 통해 IL-2(인터루킨-2)에 방출가능한 공유 부착을 갖는 하기 나타낸 바와 같은 2,7,9-치환된 플루오렌을 바탕으로 한다. 이와 관련하여, RSLAIL-2는, 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 하기 화학식에 의해 포함된 화합물을 포함하는 조성물이다:



[0185]

[0186] (식에서, IL-2는 인터루킨-2(예를 들어, 알데스루킨)이고, 여기서 "n"은 독립적으로 약 3 내지 약 4000의 정수임). RSLAIL-2는 또한 2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2로서 칭해진다.

[0187] 하나 이상의 구현예에서, 상기 기재된 2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2 조성물은 10% 이하(몰량 기준으로), 바람직하게는 5% 이하(몰량 기준으로)의 하기 화학식에 의해 포함되는 화합물 및 그의 약학적으로 허용가능한 염을 함유한다:



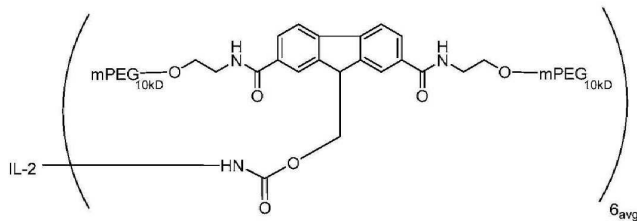
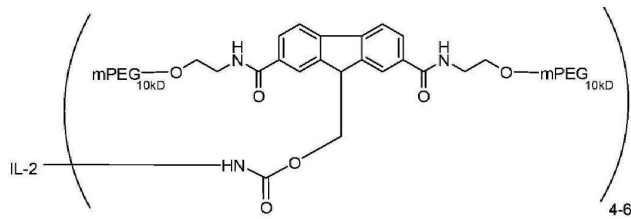
[0188]

[0189] (식에서, IL-2는 인터루킨-2이고, (n)(IL-2에 부착된 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 수를 나타냄)은 1, 2, 3, 7 및 >7로 구성된 군으로부터 선택된 정수임).

[0190] 또 다른 일부 추가의 구현예에서, RSLAIL-2는 IL-2(또한 (2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>6avg</sub>인터루킨-2로 칭해짐)에 부착된 평균 약 6개의 폴리에틸렌 글리콜 모이어티를 갖는다. 일부 추가의 구현예에서, RSLAIL-2는 일반적으로 비활성 프로드러그, 즉 투여시 비활성이고, 생체내 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 느린 방출에 의해 중앙 부위에서 지속되는 농도를 달성하기에 효과적인 인터루킨-2의 활성 컨쥬게이트된 형태를 제공하는 것으로 생각된다.

[0191] 이 섹션에서 구조를 참조하면, 각각의 "n"에 대한 대표적인 범위는, 예를 들어 약 40 내지 약 550의 정수, 또는 약 60 내지 약 500의 정수, 또는 약 113 내지 약 400 또는 200 내지 300의 정수를 포함한다. 특정 구현예에서, 각각의 폴리에틸렌 글리콜 사슬에서 "n"은 약 227이고(즉, 중심 플루오레닐 코어로부터 연장되는 각각의 폴리에틸렌 글리콜 사슬이 약 10,000 달톤의 중량 평균 분자량을 가져서, 전체 분지된 PEG 모이어티의 중량 평균 분자량은 약 20,000 달톤임), 즉 본원에서 하기에 나타낸 바와 같은 구조를 갖는 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kD</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2 또는 (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kD</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub>인터루킨-2로 칭해진다:





[0192]

[0193]

RSLAIL-2의 추가의 예시적인 조성물은 상기 화학식에 따른 화합물을 포함하며, 여기서 분자의 전체 중합체 부분은 약 250 달톤 내지 약 90,000 달톤 범위의 중량 평균 분자량을 갖는다. 추가의 적합한 범위는 약 1,000 달톤 내지 약 60,000 달톤으로부터 선택된 범위, 약 5,000 달톤 내지 약 60,000 달톤 범위, 약 10,000 달톤 내지 약 55,000 달톤 범위, 약 15,000 달톤 내지 약 50,000 달톤 범위 및 약 20,000 달톤 내지 약 50,000 달톤 범위의 중량 평균 분자량을 포함한다.

[0194]

폴리에틸렌 글리콜 중합체 부분에 대한 추가의 예시적인 중량-평균 분자량은 약 200 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤, 약 600 달톤, 약 700 달톤, 약 750 달톤, 약 800 달톤, 약 900 달톤, 약 1,000 달톤, 약 1,500 달톤, 약 2,000 달톤, 약 2,200 달톤, 약 2,500 달톤, 약 3,000 달톤, 약 4,000 달톤, 약 4,400 달톤, 약 4,500 달톤, 약 5,000 달톤, 약 5,500 달톤, 약 6,000 달톤, 약 7,000 달톤, 약 7,500 달톤, 약 8,000 달톤, 약 9,000 달톤, 약 10,000 달톤, 약 11,000 달톤, 약 12,000 달톤, 약 13,000 달톤, 약 14,000 달톤, 약 15,000 달톤, 약 20,000 달톤, 약 22,500 달톤, 약 25,000 달톤, 약 30,000 달톤, 약 35,000 달톤, 약 40,000 달톤, 약 45,000 달톤, 약 50,000 달톤, 약 55,000 달톤, 약 60,000 달톤, 약 65,000 달톤, 약 70,000 달톤, 및 약 75,000 달톤을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌 글리콜 중합체의 중량-평균 분자량은 약 20,000 달톤이다.

[0195]

상기 기재된 바와 같이, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 약학적으로 허용가능한 염 형태일 수 있다(TLR 효현제의 경우와 같음). 통상적으로, 이러한 염은 약학적으로 허용가능한 산 또는 산 등가물과의 반응에 의해 형성된다. 이 점에 있어서, 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은 일반적으로 비교적 비독성인 무기 및 유기 산 부가 염을 지칭할 것이다. 이러한 염은 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 공정에서 동일계에서, 또는 본원에 기재된 바와 같은 지속 작용성 인터루킨-2를 적합한 유기 또는 무기 산과 별도로 반응시키고, 이렇게 형성된 염을 단리시킴으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염은 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 설페이트, 비설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올레이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말레이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 옥실레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트, 및 라우릴설포네이트 염 등을 포함한다(예를 들어, 문헌[Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 따라서, 기재된 바와 같은 염은 무기산, 예컨대 하이드로클로라이드, 브롬화수소산, 황산, 설��팜산, 인산, 질산 등으로부터 유도되거나; 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 히드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실릭산, 설펜산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설포산, 메탄설포산, 에탄 디설포산, 옥살산, 이소티온산 등으로부터 제조될 수 있다.

[0196]

상기 IL-2R $\beta$ -편향 효현제와 관련하여, 본원에서 사용된 용어 "IL-2"는 인간 IL-2 활성을 갖는 모이어티를 지칭한다. IL-2의 잔기의 맥락에서 용어 "잔기"는 상기 화학식에 나타난 바와 같이, 하나 이상의 공유 부착 부위에서 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜에 공유 부착 후 남아있는 IL-2 분자의 부분을 의미한다. 비개질된 IL-2가 중합체, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜에 부착될 경우, IL-2는 중합체(들)에 대한 연결기와 연관된 하나 이상의 공유 결합의 존재로 인하여 약간 변경되는 것을 이해될 것이다. 또 다른 분자에 부착된 IL-2의 약간 변경된 형태

는 일부 경우에 IL-2의 "잔기"로 칭해질 수 있다.

[0197] 예를 들어, 국제 특허 공보 번호 WO 2012/065086에 기재된 서열번호 1 내지 4 중 어느 하나에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 단백질이 예시적인 IL-2 단백질이며, 그와 실질적으로 상동성인 임의의 단백질 또는 폴리펩티드도 마찬가지이다. 용어 실질적으로 상동성은 특정 대상체 서열, 예를 들어 돌연변이 서열이, 순수 효과가 기준 서열과 대상체 서열 사이에 불리한 기능적 부동성을 초래하지 않는 하나 이상의 치환, 삭제 또는 부가에 의해 기준 서열로부터 변할 수 있다는 것을 의미한다. 본원의 목적 상, 95% 초과와 상동성, 등가의 생물학적 활성(반드시 동등한 강도의 생물학적 활성일 필요는 없지만) 및 등가의 발현 특징을 갖는 서열이 실질적으로 상동성인 것으로 생각된다. 상동성 측정의 목적을 위하여, 성숙 서열의 절단은 무시되어야 한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL-2"는 예를 들어 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 또는 우연히 돌연변이를 통해 의도적으로 개질된 단백질을 포함한다. 또한, 이러한 용어는 1 내지 6개의 추가의 글리코실화 부위를 갖는 유사체, 단백질의 카르복시 말단에 적어도 하나의 추가의 아미노산을 갖는 유사체(여기서, 추가의 아미노산(들)은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함함), 및 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 갖는 유사체를 포함한다. 이 용어는 천연 및 재조합적으로 생성된 모이어티를 둘 다 포함한다. 또한, IL-2는 인간 공급원, 동물 공급원, 및 식물 공급원으로부터 유래될 수 있다. 한 예시적인 IL-2는 알데스루킨으로 칭해지는 재조합 IL-2이다.

[0198] 화합물을 방사성 표지하고, 그것을 생체내에 투여하고, 그의 클리어언스를 측정하는 것을 포함하는 것과 같은 종래의 접근법은, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제인 것으로 제안된 화합물이 "지속 작용성"인지를 결정하는데 사용될 수 있다. 본원의 목적 상, IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 지속 작용성 성질은 통상적으로 마우스에서 평가될 효현제의 투여 후 다양한 시점에 림프구에서 STAT5 인산화를 측정하기 위하여 유세포 분석을 사용하여 측정된다. 참고로, IL-2에 대한 신호는 약 24시간 경과할 때까지 소멸되지만, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제에 대한 신호는 그보다 더 긴 기간 동안 지속된다. 예시로서, RSLAIL-2 조성물에 대한 신호는 수 일에 걸쳐 지속된다.

[0199] 지금부터 본원에 기재된 바와 같은 지속 작용성 효현제의 IL-2R $\beta$  편향성을 고려하여, 실시예 2는 RSLAIL-2의 예시적인 조성물에 대한 수용체 편향과 관련된 시험관내 및 생체내 데이터 둘 다를 제공한다. 실시예 2에 기재된 바와 같이, 쥐와 흑색종 종양 모델에서, RSLAIL-2에 대한 CD8/조절 T 세포의 비는 IL-2에 대한 경우와 비교되었을 때 IL2 수용체 알파보다 IL-2 수용체 베타가 우선적으로 활성화됨을 뒷받침한다. 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 예컨대 RSLAIL-2는, 예를 들어 Treg보다 효과기 CD8+ T- 및 NK-세포를 우선적으로 활성화하여 증식시키는 데 효과적이다.

[0200] 게다가, 대표적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 예컨대 RSLAIL-2는 IL-2에 비하여 증가한 종양 노출, 바람직하게는 상당히 증진된 종양 노출, 예를 들어 IL-2의 당량에 대해 정규화되었을 때 적어도 50배 증가한 노출, 또는 적어도 100배 증가한 노출, 또는 적어도 200배 증가한 노출, 또는 적어도 300배 증가한 노출, 또는 적어도 400배 증가한 노출, 또는 적어도 500배 증가한 노출을 제공한다.

# [0201] 방법, 조성물 및 키트

[0202] 본원에 기재된 방법, 조합, 조성물, 제제, 시스템 및 키트에 따라, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 IL-2R $\beta$ -활성화 양으로 제공된다. 당업자는 얼마나 많은 양의 소정의 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제가 IL-2R $\beta$ 에서 임상학적으로 적절한 효현 활성을 제공하기에 충분한지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 당업자는 문헌을 참조하고/참조하거나, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제를 점차적으로 증량하여 투여하여, IL-2R $\beta$ 의 임상학적으로 효과적인 효현 활성을 제공하는 양 또는 양들을 결정할 수 있다. 대안적으로, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 활성화 양은 상기 기재되고 당업계에 알려진 생체내 STAT5 인산화 분석을 사용하여 결정될 수 있고(생체내 투여 후 결정됨), 여기서 STAT5 인산화를 10% 초과와 NK 세포에서 최고로 유도하기에 충분한 양이 활성화 양인 것으로 간주된다.

[0203] 그러나, 하나 이상의 경우에서, IL-2R $\beta$ -활성화 양은 단백질 양으로 표시되는 다음의 범위들: 약 0.01 내지 100 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 75 mg/kg; 약 0.02 mg/kg 내지 약 60 mg/kg; 약 0.03 mg/kg 내지 약 50 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 40 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 30 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 25 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 15 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 5 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 1 mg/kg 중 하나 이상에 의해 포함되는 양이다. 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 0.7 mg/kg 이하의 용량으로 투여된다. 특정한 예시적 투여량 범위는, 예를 들어 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.2 mg/kg 내지 약 7 mg/kg 또는 약 0.2 mg/kg 내지 약 0.7 mg/kg 미만을 포함한다.

- [0204] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용되는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2의 용량은 3주에 한 번 투여된다.
- [0205] 특정한 추가의 구현예에서, 본원에 제공된 조성물, 조합 및 방법에 사용되는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2의 양은 약 0.0005 내지 0.3 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.3 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.25 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.15 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.05 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.008 mg/kg; 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.005 mg/kg; 약 0.002 mg/kg 내지 약 0.005 mg/kg; 약 0.002 mg/kg 내지 약 0.004 mg/kg이다.
- [0206] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2는 0.003 mg/kg 이하의 용량으로 투여된다. 특정 구현예에서, 용량 범위는, 예를 들어 약 0.001 mg/kg 내지 약 0.01 mg/kg, 또는 약 0.002 mg/kg 내지 약 0.008 mg/kg 또는 약 0.002 mg/kg 내지 약 0.006 mg/kg 미만을 포함한다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물 및 방법에 사용되는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 멀티(2,7-(비스-메톡시PEG-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)인터루킨-2의 용량은 3주에 한 번 투여된다.
- [0207] 확인을 위하여, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제와 관련하여, 활성화 정도 및 그 양은 광범위하게 변할 수 있으며, 4-1BB 효현제를 단독으로 또는 TLR 효현제와 병용하여 투여하는 것과 결합될 경우 여전히 효과적인 수 있다. 즉, 충분히 연장된 시간 동안 IL-2R $\beta$ 에서 단지 최소의 효현제 활성을 나타내는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 양은, 4-1BB 효현제 및 선택적으로 TLR 효현제와 함께 투여될 경우 본원에 기재된 방법, 조성물 및 키트가 임상학적으로 유의미한 반응을 보일 수 있는 한, 여전히 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제일 수 있다. 일부 경우에, (예를 들어) 상승작용적 상호 작용 및 반응으로 인하여, 4-1BB 효현제 및 선택적으로 TLR 효현제(예를 들어, 지속 작용성 TLR 효현제)의 투여가 수반될 경우, IL-2R $\beta$ 의 단지 최소한의 효현제 활성만이 요구될 수 있다. 유사하게, 4-1BB 효현제 및/또는 TLR 효현제의 투여량은 본원에 기재된 조합으로 사용될 경우, 제제가 단독으로 투여될 때, "치료량 이하" 용량으로 간주될 수 있지만, 본원에 제공된 바와 같은 이중 모드 또는 삼중 모드 치료 전략의 일부분으로서 사용될 때, 이러한 용량은 임상적으로 유의미한 반응을 초래할 수 있다.
- [0208] 본원에 기재된 치료 방법은 환자 케어를 관리하는 임상가가 치료 방법이 효과적이라고 여기는 동안 지속될 수 있다. 치료 방법이 효과적인지를 나타내는 비제한적 매개변수는 다음: 종양 수축(종양 및/또는 부피의 관점에서); 개인 종양 결장의 수의 감소; 종양 제거; 및 비진행 생존 중 임의의 한 가지 이상을 포함한다. 종양 크기 변화는 임의의 적합한 방법, 예컨대 영상화에 의해 측정될 수 있다. 다양한 진단 영상화 방식, 예컨대 컴퓨터 단층촬영(CT 스캔), 이중 에너지 CDT, 양전자 방출 단층촬영 및 MRI가 사용될 수 있다.
- [0209] 투여되는 TLR 효현제, 4-1BB 효현제, 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 실제 용량 뿐만 아니라, 본원에 기재된 방법, 조성물, 제제, 시스템 및 키트와 연관된 투여 계획은 대상체의 나이, 체중 및 전반적인 상태뿐만 아니라, 치료중인 상태의 유형 및 중증도(예를 들어, 치료중인 암의 진행상태), 건강 케어 전문가의 판단, 및 투여될 특정 TLR 효현제, 4-1BB 효현제, 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제에 따라 달라질 것이다. 치료적 유효량은 당업자에게 알려져 있고/있거나 관련된 참고 문서 및 문헌에 기재되어 있거나, 결정될 수 있다. 일반적으로, 4-1BB 효현제 또는 TLR 7/8 효현제(활성 분자를 기준으로 함)의 치료 유효량은 약 0.001 mg 내지 1000 mg, 바람직하게는 0.01 mg/일 내지 750 mg/일의 용량, 보다 바람직하게는 0.10 mg/일 내지 500 mg/일의 용량 범위일 것이다.
- [0210] 임의의 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제(다시, 바람직하게는 약학 제제의 일부로서 제공됨)의 단위 투여량은 임상가의 판단, 환자의 필요 등에 따라 다양한 투여 일정으로 투여될 수 있다. 특정 투여 일정은 당업자에게 알려져 있을 것이거나, 일상적인 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 예시적인 투여 일정은, 제한 없이, 1일 5회, 1일 4회, 1일 3회, 1일 2회, 1일 1회, 주당 3회, 주당 2회, 주당 1회, 월당 2회, 월당 1회 및 이들의 임의의 조합을 포함한다. 임상 종료시점에 도달하면, 조성물의 투여는 정지된다.
- [0211] TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 투여의 빈도 및 일정과 관련하여, 당업자는 적절한 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 치료 사이클에서, 임상가는 TLR 효현제를 단일 용량 또는 일련의 용량으로, 예를 들어 며칠 또는 몇 주에 걸쳐 투여하도록 결정할 수 있다. 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제에 대해서도 그러하다. TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현

제 각각은 다른 TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 투여 전, 그와 함께 또는 그 후에 투여될 수 있다.

[0212] 4-1BB 효현제가 TLR 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 어느 하나 또는 둘 다와 함께 또는 별도로 투여될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 구현예에서, 4-1BB 효현제는 TLR 효현제 또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 어느 하나와 함께 투여될 수 있지만, TLR 효현제 또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 다른 것과 별도로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 4-1BB 효현제는 TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제(투여되는 것 또는 둘 다에 따라) 각각과 별도로 투여된다. TLR 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제가 둘 다 포함될 경우, 함께 투여될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 한 특정 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 동시에 또는 함께(동일한 제제 또는 별개의 제제로) 투여된다. 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제가 임의의 순서로 투여될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 또한, 4-1BB 효현제, TLR 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 어느 것 또는 이들 모두의 투여는 필요에 따라 분, 시간 또는 일만큼 분리될 수 있다.

[0213] 일부 치료 계획에서, TLR 효현제는 치료 개시시 단일 용량으로 투여된다. 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 4-1BB 효현제는 TLR 효현제와 동시에, TLR 효현제의 투여 전에, 또는 TLR 효현제의 투여 후에 투여된다. 예를 들어, 일부 치료 방식에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 4-1BB 효현제는 TLR 효현제 투여(전 또는 후) 7일 내에(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7일차 중 어느 한 날에) 투여되며, 여기서 1일은 치료의 개시를 나타낸다. 일부 치료 계획에서, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 4-1BB 효현제는 TLR 효현제의 투여 4일 내에, 예를 들어 1, 2, 3 또는 4일차 중 어느 한 날에 투여된다. IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 지속 작용성 성질을 바탕으로, 이러한 화합물은 통상적으로 비교적 빈번하지 않게(예를 들어, 3주에 한 번, 2주에 한 번, 8 내지 10일에 한 번, 매주에 한 번 등) 투여된다.

[0214] 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.

[0215] 본원에 기재된 치료 방법은 통상적으로 환자의 케어를 관리하는 임상의가 치료 방법이 효과적이라고 여기는 한, 즉 환자가 해당 치료에 반응하는 한 지속된다. 치료 방법이 효과적임을 나타내는 비제한적인 매개변수는 다음: 종양 수축(종양 및/또는 부피 및/또는 시각적 외관의 관점에서); 개인 종양 결장의 수의 감소; 종양 제거; 비진행 생존; (적용가능할 경우) 적합한 종양 마커에 의한 적절한 반응, 증가한 NK(자연 살해) 세포 수, 증가한 T 세포 수, 증가한 기억 T 세포 수, 증가한 중앙 기억 T 세포 수, 조절 T 세포, 예컨대 CD4+ Treg, CD25+ Treg, 및 FoxP3+ Treg의 감소된 수 중 한 가지 이상을 포함할 수 있다.

[0216] 본원에 제공된 방법은 (특히) 암을 갖는 환자의 치료에 유용하다. 예를 들어, 환자는 TLR 효현제를 단독으로 이용한 치료에 대해, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제를 단독으로 이용한 치료에 대해, 4-1BB 효현제를 단독으로 이용한 치료에 대해, 뿐만 아니라 TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 조합에 대해 반응성일 수 있지만, 조합에 대해 더 반응성이다. 추가의 예로서, 환자는 4-1BB 효현제, 또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제/TLR 효현제에 대해 비반응성일 수 있지만, 조합에 대해서는 반응성이다. 또 다른 추가의 예로서, 환자는, 단독으로 투여될 경우 TLR 효현제, 4-1BB 효현제, 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 임의의 것에 대해 비반응성일 수 있지만, 조합에 대해서는 반응성이다. 구현예에서, 암의 치료 방법은 4-1BB 효현제, 및 TLR 효현제와 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 적어도 하나를 포함하는 1종 이상의 제약 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일 구현예에서, 암, 예컨대 고형암의 치료에 유용한 약제의 제조에서 본원에 기재된 바와 같은 1종 이상의 제약 조성물의 용도가 본원에 제공된다.

[0217] 예를 들어, TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 투여는 통상적으로 주사에 의한다. 또한, 다른 투여 방식, 예컨대 경구, 폐, 비강, 협측, 직장, 설하, 경피, 종양내, 및 비경구가 고려된다. 본원에서 사용된 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 동맥내, 종양내, 림프내, 복강내, 심장내, 척추강내, 및 근육내 주사, 뿐만 아니라 인퓨전 주사를 포함한다. 앞서 기재된 바와 같이, TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제는 별도로 투여될 수 있다. 대안적으로, TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제의 투여가 초기 용량으로서 또는 치료 과정 전체에 걸쳐거나 또는 투여 계획의 다양한 단계에서 동시에 이루어지는 것이 바람직하고, TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -



편향 효현제가 주어진 제제에서 함께 양립가능할 경우, 동시 투여는 단일 투여 형태/제제의 투여(예를 들어, 면역학적 성분 모두를 함유하는 정맥내 제제의 정맥내 투여)를 통해 달성될 수 있다. 당업자는 경로결정 시험(routine testing)을 통해 이러한 성분들이 주어진 제제에서 함께 양립가능함을 결정할 수 있다.

- [0218] 본원에 기재된 치료적 조합, 즉 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 1종 이상의 조성물 또는 제제 형태로 제공될 수 있다. 4-1BB 효현제, 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 및/또는 TLR 효현제 중 적어도 하나가 동일한 조성물로 제공될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 다른 구현예에서, 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 각각 별도의 조성물로 제공될 수 있다. 일반적으로, 조성물은 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제 중 하나 이상을 제약 부형제와 조합하여 포함한다. 본원에 기재된 조성물은 고체 또는 액체 형태일 수 있다.
- [0219] 예시적인 부형제는 탄수화물, 무기염, 향미생물제, 산화방지제, 계면활성제, 완충제, 산, 염기, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들을 포함하며, 이로 제한되지 않는다.
- [0220] 당, 알디톨과 같은 유도체화된 당, 알돈산, 에스테르화 당, 및/또는 당 중합체와 같은 탄수화물이 부형제로서 존재할 수 있다. 특정 탄수화물 부형제는 예를 들어 단당류, 예컨대 프룩토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등; 이당류, 예컨대 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등; 다당류, 예컨대 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 텍스트란, 전분 등; 및 알디톨, 예컨대 만니톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨, 소르비톨, 미오이노시톨 등을 포함한다.
- [0221] 부형제는 또한 시트르산, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 질산칼륨, 제1 인산나트륨, 제2 인산나트륨, 및 이들의 조합과 같은 무기염 또는 완충제를 포함할 수 있다.
- [0222] 제제는 또한 미생물 성장을 방지 또는 억제하기 위한 향미생물제를 포함할 수 있다. 적합한 향미생물제의 비제한적인 예는 염화 벤즈알코늄, 염화 벤제토늄, 벤질 알코올, 염화 세틸피리디늄, 클로로부탄올, 페놀, 페닐에틸 알코올, 페닐수은 질산, 티머솔, 및 이들의 조합을 포함한다.
- [0223] 항산화제 또한 제제에 존재할 수 있다. 항산화제는 산화를 방지하는 데 사용되어 이에 의해 컨주게이트 또는 제제의 기타 다른 성분의 열화를 방지한다. 적합한 항산화제는, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시안isol, 부틸화 히드록시톨루엔, 차아인산, 모노티오글리세롤, 프로필 갈레이트, 중아황산나트륨, 나트륨 포름알데히드 설폭실레이트, 메타중아황산나트륨, 및 이의 조합을 포함한다.
- [0224] 계면활성제는 부형제로서 존재할 수 있다. 예시적인 계면활성제는, 폴리소르베이트, 예컨대 "트윈(Tween) 20" 및 "트윈 80," 및 F68 및 F88(이들 둘 다 미국 뉴저지주 마운트올리브 소재의 BASF로부터 입수가 가능)과 같은 플루로닉스; 소르비탄 에스테르; 레시틴과 같은 인지질 및 기타 다른 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 지방산 및 지방산 에스테르와 같은, 지질; 콜레스테롤과 같은 스테로이드; 및 킬레이트화제, 예컨대 EDTA, 아연, 및 기타 다른 그러한 적합한 양이온을 포함한다.
- [0225] 약학적으로 허용가능한 산 또는 염기는 제제에서 부형제로서 존재할 수 있다. 사용될 수 있는 산들의 비제한적인 예는 염산, 아세트산, 인산, 시트르산, 말산, 락트산, 포름산, 트리클로로아세트산, 질산, 과염소산, 인산, 황산, 푸마르산 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 산을 포함한다. 적합한 염기의 예는, 제한없이 수산화나트륨, 아세트산나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 아세트산암모늄, 아세트산칼륨, 인산나트륨, 인산칼륨, 시트르산나트륨, 포름산나트륨, 황산나트륨, 황산칼륨, 푸마르산칼륨 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기를 포함한다.
- [0226] 본 개시 내용에 따른 조성물 및 제형을 위한 관련 방법에서 사용하기에 적합한 기타 다른 약학적 부형제 및/또는 첨가제는 예를 들어, 문헌 ["Remington: The Science & Practice of Pharmacy" 22nd Ed., Remington: The Essentials of Pharmaceutics (2009)]; ["Physician's Desk Reference", 2017], 및 ["Handbook of Pharmaceutical Excipients" 7<sup>th</sup> edition"]에서 찾을 수 있다.
- [0227] 조성물 중 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제의 양은 다수의 인자에 따라 달라질 것이지만, 조성물이 단위 용량 용기에 저장된 경우 최적의 치료 유효 용량일 것이다. 치료 유효 용량은 어떤 양이 임상적으로 원하는 종료점을 생성하는지를 결정하기 위하여, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제의 증가량의 반복 투여에 의해 실험적으로 결정될 수 있다.
- [0228] 조성물 중 임의의 개별적인 부형제의 양은 부형제의 활성 및 조성물의 특정 필요에 따라 변화될 것이다. 임의의 개별적인 부형제의 최적 양은 일상의 실험, 즉 부형제의 다양한 양(적은 양에서 많은 양의 범위)을 함유하는 조

성물을 제조하는 단계, 안정성 및 기타 다른 파라미터를 시험하는 단계, 및 그 후 현저한 부작용 없이 최적의 성능이 획득되는 범위를 결정하는 단계를 통해 결정된다.

- [0229] 그러나, 일반적으로 부형제는 조성물 내에 약 1 중량% 내지 약 99 중량%, 바람직하게는 약 5 중량% 내지 98 중량%, 더 바람직하게는 약 15 내지 95 중량%의 양의 부형제로 존재할 것이며, 30 중량% 미만의 농도가 가장 바람직하다.
- [0230] 약학 조성물은 임의의 수의 형태를 취할 수 있으며, 조성물은 이와 관련하여 제한되지 않는다. 예시적인 제제는 정제, 당의정, 캡슐, 젤 캡, 트로기제, 분산액, 현탁액, 용액, 엘릭시르(elixir), 시럽, 로젠지(lozenge), 경피 패치, 스프레이, 좌약 및 분말과 같은 경구 투여에 적합한 형태일 수 있다. 바람직한 구현예에서, 조성물은 중양내 투여에 적합한 형태이다.
- [0231] 경구 투여형은 정제, 당의정, 캡슐, 젤 캡, 현탁액, 용액, 엘릭시르, 및 시럽을 포함하고, 또한 선택적으로 캡슐화되는 복수의 과립, 비즈, 분말 또는 펠렛을 포함할 수 있다. 그러한 투여형은 약학 제형 분야의 당업자에게 알려지고, 관련 교과서에서 기재된 통상의 방법을 사용하여 제조된다.
- [0232] 정제 및 당의정은, 예를 들어 표준 정제 가공 절차 및 설비를 사용하여 제조될 수 있다. 본 명세서에서 기재된 건유게이트를 함유하는 정제 또는 당의정의 제조시, 직접 압착 및 과립화 기법이 일반적으로 바람직하다. 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제 이외에, 정제 및 당의정은 일반적으로 비활성, 약학적으로 허용가능한 담체 물질, 예컨대 결합제, 윤활제, 붕해제, 충전제, 안정화제, 계면활성제, 착색제, 유동제 등을 함유할 것이다. 결합제는 정제에 응집성을 부여하는 데 사용되어, 이에 따라 정제가 온전하게 유지되는 것을 보장한다. 적합한 결합제 재료는, 전분(옥수수 전분 및 예비젤라틴화 전분 포함), 젤라틴, 당류(수크로스, 글루코스, 텍스트로스 및 락토스 포함), 폴리에틸렌 글리콜, 왁스, 및 천연 및 합성 검류, 예를 들어 아카시아 나트륨 알지네이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스성 중합체(히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스 등 포함), 및 비검(Veegum)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 윤활제는 정제 제조, 분말 유동 촉진 및 압력이 완화된 때 입자 캡핑(즉, 입자 파괴) 방지를 촉진하는 데 사용된다. 유용한 윤활제는 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트 및 스테아르산이다. 붕해제는 정제의 붕해를 촉진하는 데 사용되고, 대체로 전분, 클레이, 셀룰로스, 알긴, 검 또는 가교결합 중합체이다. 충전제는 예를 들어, 이산화규소, 이산화티타늄, 알루미늄, 탈크, 카올린, 분말화 셀룰로스, 및 미정질 셀룰로스와 같은 재료뿐만 아니라, 만니톨, 우레아, 수크로스, 락토스, 텍스트로스, 염화나트륨 및 소르비톨과 같은 가용성 재료를 포함한다. 당 분야에 잘 알려진 바와 같은, 안정화제는 예로서, 산화 반응을 포함하는 약물 분해 반응을 저해 또는 지연시키는 데 사용된다.
- [0233] 캡슐은 또한 바람직한 경구 투여형으로, 이 경우 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제를 함유하는 조성물은 액체 또는 젤(예를 들어, 젤 캡의 경우) 또는 고체(과립, 비즈, 분말 또는 펠렛과 같은 미립자 포함)의 형태로 캡슐화될 수 있다. 적합한 캡슐은 경질 및 연질 캡슐을 포함하고, 대체로 젤라틴, 전분 또는 셀룰로스성 재료로 만들어진 것이다. 2개 조각의 경질 젤라틴 캡슐은 젤라틴 밴드 등과 같은 것으로 바람직하게 밀봉된다.
- [0234] 실질적으로 (분말 또는 케이크 형태일 수 있는, 동결건조물 또는 침전물과 같은) 건조 형태의 비경구 제형뿐만 아니라, 액체이고 비경구 제형의 건조 형태를 재구성하기 위한 단계를 필요로 하는, 주사용으로 제조된 제형이 포함된다. 주사 전에 고체 조성물을 재구성하는 데 적합한 희석제의 예는 물, 포스페이트-완충된 식염수, 링거액, 식염수, 멸균수, 탈이온수, 및 이들의 조합 중에 주사용 정균수, 텍스트로스 5%를 포함한다.
- [0235] 일부 경우들에서, 비경구 투여용으로 의도된 조성물은, 정상적으로는 멸균인, 비수성 용액, 현탁액, 또는 에멀션의 형태를 취할 수 있다. 비수성 용매 또는 비히클의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대 올리브유 및 옥수수유, 젤라틴 및 에틸 올레이트와 같은 주사가가능한 유기 에스테르이다.
- [0236] 본 명세서에 기재된 비경구 제형은 또한 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 함유할 수 있다. 제형은 멸균제, 세균-보유 필터를 통한 여과, 방사선 조사 또는 가열의 포함에 의해 멸균화된다.
- [0237] 조성물 또는 제제는 또한 통상의 경피 패치 또는 기타 다른 경피 전달계를 사용하여 피부를 통해 투여될 수 있으며, 여기서 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 피부에 부착되는 약물 전달 장치로서 작용하는 적층 구조 내에 함유된다. 그러한 구조 내에서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 층 또는 상부 배킹 층의 아래에 놓이는 "저장소" 내에 함유된다. 적층된 구조는 단일 저장소를 함유할 수 있거나, 다수의 저장소를 함유할 수 있다.

- [0238] 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 또한 직장 투여용 좌약으로 제제화될 수 있다. 좌약과 관련하여, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 코코아 버터(테오브로마(theobroma)유), 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린화 젤라틴, 지방산, 및 이들의 조합과 같은 좌약 기재 물질(예를 들어, 실온에서는 고체로 남아있지만, 체온에서는 연화, 용융 및 용해되는 부형제)와 혼합된다. 좌약은, 예를 들어 하기 단계들을 수행하여 제조될 수 있다(반드시 제시된 순서일 필요는 없음): 좌약 기재 물질을 용융시켜 용융물을 형성하는 단계; 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제를 혼입시키는 단계(좌약 기재 물질의 용융 전 또는 후 중 어느 하나); 용융물을 몰드 내로 붓는 단계; 용융물을 냉각시켜서(예를 들어, 용융물 함유 몰드를 실온 환경에 두어서) 좌약을 형성하는 단계; 및 몰드로부터 좌약을 제거하는 단계.
- [0239] 일부 바람직한 구현예에서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제 중 적어도 하나를 포함하는 적어도 하나의 조합 및/또는 조성물을 종양내로 투여하고, 예를 들어 종양에, 예를 들어 주사에 의해 직접 투여한다. 그러한 투여는, TLR 7/8 효현제를 체순환 내로, 그리고 방출가능한 연결기를 포함하는 컨쥬게이트의 경우에는 종양 자체 내로 지연 방출시켜서, 고농도의, 예를 들어 TLR 7/8 효현제가 종양에서 달성되도록 제공한다. TLR 7/8 효현제의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트의 종양내 투여를 위한 예시적인 제형은 pH 7.4의 Na/K 포스페이트 완충제를 포함한다.
- [0240] 일부 구현예에서, 4-1BB 효현제, 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제를 포함하는 조성물은 적합한 전달 비히클내로 추가로 포함될 수 있다. 그러한 전달 비히클은 컨쥬게이트의 제어된 및/또는 연속 방출을 제공할 수 있으며, 또한 표적화 모이어티로서 작용할 수 있다. 전달 비히클의 비제한적 예는 보조제, 합성 보조제, 미세캡슐, 미세입자, 리포솜, 및 효모 세포벽 입자를 포함한다. 효모 세포 벽은 다양하게 처리되어 단백질 성분, 글루칸, 또는 만난 층을 선택적으로 제거할 수 있으며, 전체 글루칸 입자(WGP), 효모 베타-글루칸 만난 입자(YGMP), 효모 글루칸 입자(YGP), 로도토룰라(*Rhodotorula*) 효모 세포 입자(YCP)로서 지칭된다. *S. cerevisiae*(*S. cerevisiae*) 및 로도토룰라 종과 같은 효모 세포가 바람직하지만; 임의의 효모 세포가 사용될 수 있다. 이들 효모 세포는, 수력학적 부피 면에서 상이한 특성을 나타내며, 또한 이들 효모 세포가 그 내용물을 방출할 수 있는 표적 기관에 있어서 상이하다. 이들 입자의 제조 및 특징화 방법은 미국 특허 5,741,495, 4,810,646, 4,992,540, 5,028,703, 5,607,677 및 미국 특허 출원 공개 2005/0281781 및 2008/0044438에 기재되어 있다.
- [0241] 본원에 기재된 치료적 조합, 즉 4-1BB 효현제 및 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, 및/또는 TLR 효현제는 키트 형태로 제공될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 성분은 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제에 의해 수반되는 단일 조성물에 포함되거나, 별도의 용기에 제공될 수 있으며, 여기서 키트는 통상적으로 사용 지시사항을 포함한다. 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제는, 예를 들어 문헌[Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7<sup>th</sup> ed., Rowe, R.C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012]에 기재된 것을 포함한다. 키트내 성분, 예를 들어 TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제를 포함하는 조성물은 액체 형태 또는 고체 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다. 특정 구현예에서, TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제는 고체 형태로 존재한다. 대표적인 고체 형태는, 예를 들어 물 약 5 중량% 미만, 또는 바람직하게는 물 2 중량% 미만을 함유하는 건조 고체 형태이다. 고체 형태는, 일반적으로 수성 희석제 중에서의 재구성에 적합하다.
- [0242] 또한, 본원에 제공된 바와 같은 4-1BB 효현제, 및 TLR 효현제(예를 들어, TLR 7/8 효현제)의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트와 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 적어도 하나를 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제(예를 들어, TLR 7/8 효현제)의 다중-아암 중합체 컨쥬게이트 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제 중 적어도 하나에 반응하는 병태를 앓고 있는 환자, 예를 들어 암을 갖고 있는 환자에게 투여하는 방법이 제공된다. 본 방법은 치료 유효량의 조성물 또는 조성물들(바람직하게는 약학 제제의 일부로서 제공됨)을 투여하는 것을 포함한다.
- [0243] 본 명세서에 기재된 방법, 키트 및 관련 조성물은 본 명세서에 제공된 방법에 의해 치유 또는 예방될 수 있는 임의의 병태, 예컨대 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 구현예에서, 암은 고형암이다. 예시적 병태는 암, 예컨대 육종, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성 육종, 척삭종, 혈관육종, 내피육종(endotheliosarcoma), 림프관육종, 림프관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 활막종, 증피종, 유잉(Ewing) 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 뇌암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암, 기저세포암, 선암종, 한선암, 피지선암, 유두모양암, 유두모양 선암종, 낭샘암종, 수질암, 기관지원성암, 신세포암, 간세포암, 담관의 암, 융모막암종, 정상피종, 배암(embryonal cancer), 빌름(Wilms) 종양, 자궁경부암, 호

지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 고환암, 폐암, 소세포 폐암, 뇌암, 방광암, 상피암, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청각 신경종, 췌장교종, 뇌수막종, 흑색종(진행성 및 전이성 포함), 다발성 골수종, 신경모세포종, 망막모세포종 및 백혈병이다. 일부 특정 구현예에서, 치료될 암은 고형암, 예컨대 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 췌장암, 결장직장암, 요로상피세포암, 위암, 림프종, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 갑상샘암, 신장암, 담관의 암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암, 메르켈 세포암, 호지킨 질환 및 부신피질암이다. 일부 구현예에서, 암은 국소 진행성 또는 전이성 고형 종양 암이다.

[0244] 본 발명의 방법, 키트 및 조성물은 단일 약제로서 TLR 효현제, 4-1BB 효현제 및/또는 지속 작용성 IL-2R $\beta$  편향 효현제의 투여의 치료 유효성을 증진시키는 데 유용하다. 증진된 반응은 치료 중 임의의 적합한 시점, 즉 치료 1회차 후, 치료 2 내지 3회차 후 등에 임의의 수의 적합한 방법에 의해 평가될 수 있으며, 상기 방법은 종양 수축(부분 반응)(즉, 종양 크기 또는 부피의 평가), 종양 소멸, 질환 진행 감소(암이 진행되지 않는 것), 그리고 적절하다면 하나 이상의 종양 시험 마커 분석을 포함한다. 특히 효과적인 치료는 50% 최대 종양 성장에서 평가되었을 때 생존을 적어도 5일 또는 적어도 10일 또는 적어도 12일 또는 적어도 15일 또는 적어도 20일 또는 적어도 30일 또는 이 이상까지 연장시킬 것이다.

[0245] 본 명세서에 제공된 방법, 키트, 조성물 등은 또한 치료가 진행되고 있는 대상체에서 종양 성장 또는 크기(또는 부피)를 감소시키는 데 유용하다. 예를 들어 일부 구현예에서, 종양 크기를 치료전 종양 크기와 비교하였을 때 약 25% 또는 약 30% 또는 약 40% 또는 약 50% 또는 심지어 약 60% 또는 약 70% 또는 이 이상, 예를 들어 약 90% 또는 이 이상까지 줄이는 데에는 1차 이상의 치료 회차가 효과적이다.

#### [0246] 실시예

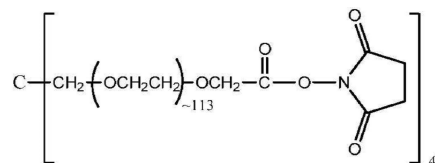
[0247] 상기 기재뿐만 아니라 하기 실시예는 본원에 제공된 발명(들)의 범위를 예시하려는 것이며, 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다. 본 발명의 범위내에서 다른 양태, 장점 및 변형은 본 발명이 관련된 기술분야의 당업자에게 명백할 것이다.

#### [0248] 재료 및 방법

[0249] 알테스루킨의 것과 동일한 아미노산 서열을 갖는 재조합 인간 IL-2를 클로닝하고 발현시켜 본원에서 RSLAIL-2로 칭해지는 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\alpha\beta$ -편향 효현제를 제조하는 데 사용하였다.

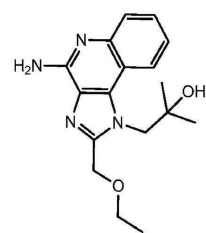
[0250] RSLAIL-2는 PCT 국제 특허 출원 공보 번호 WO 2015/125159의 실시예 1의 절차에 따라 수득가능한 조성물을 지칭하고, 일반적으로 IL-2의 멀티페길화된 형태를 포함하는 조성물을 지칭하며, 여기서 컨쥬게이트를 형성하기 위하여 사용된 PEG 시약의 부착은 대상체에 투여 후 방출가능하다.

[0251] 4-아암-20kD-PEG-SCM은 하기 구조에 상응한다:



[0252]

[0253] R848(레시퀴모드)는 하기 구조를 갖는다(유리 염기로서 나타냄):



[0254]

[0255] 4-아암-PEG20kD-SCM 및 4-아암-PEG40kD-SCM은 PCT 국제 특허 출원 공보 번호 WO 2010/019233 A1의 실시예 3에 따라 합성될 수 있다.

[0256] 4-아암-PEG20kD-BA는 PCT 국제 특허 출원 공보 번호 WO 2010/019233 A1의 실시예 1에 따라 합성될 수 있다.



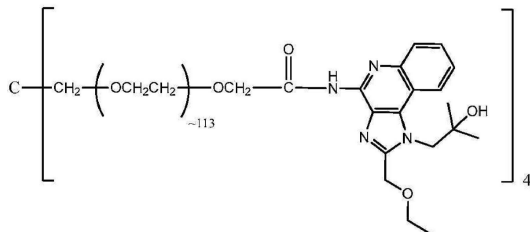
- [0257] mPEG5kD-SC는 미국 캘리포니아주 어바인 소재 NOF America Corporation에서 입수할 수 있다.
- [0258] 4-아암-PEG20kD-SC는 미국 매사추세츠주 워터타운 소재 Biochempeg Scientific Inc.에서 입수할 수 있다.
- [0259] 4-아암-PEG20kD-NC0는 미국 텍사스주 플라노 소재 JenKem Technology에서 입수할 수 있다.
- [0260] 4-아암-PEG20k-아민은 미국 앨라배마주 아랍 소재 Laysan Bio에서 입수할 수 있다.
- [0261] LOB12.3은 마우스 4-1BB와 반응하는 항-CD137 항체이다. LOB12.3 항체는 면역 관문 억제제와 병용하여 투여될 경우 생체내에서 4-1BB 신호 전달을 자극하고, 종양 성장을 지연시키는 것으로 나타난 효능 항체이다. LOB12.3은 미국 뉴햄프셔주 웨스트 레바논 소재 Bio X Cell에서 입수할 수 있다.
- [0262] 실시예에서 언급된 모든 비-PEG 화학 시약은, 달리 나타내지 않는 한 상업적으로 구매가능하다. 수용성 중합체 시약의 제제는 달리 나타내지 않는 한, 문헌에 기재된 당 기술 분야에 알려진 기술을 사용하여 제조될 수 있거나, 상업적으로 구매가능한 공급원으로부터 취득될 수 있다.
- [0263] **실시예 1**
- [0264] **rIL-2와 mPEG2-C2-Fmoc-20kD-NHS의 반응**
- [0265] 1.44mg/ml의 정제된 rIL-2(106.4 mL)를 제1 용기에 충전시킨 다음, 53.6 mL의 제제 완충제(10 mM 나트륨 아세트레이트, pH 4.5, 5% 트레할로스)를 첨가하였다. pH를 4.62에서 측정하고, 온도를 21.2℃에서 측정하였다. PEG 시약, C2-PEG2-FMOC-NHS-20K(WO 2006/138572에 기재된 바와 같이 이용가능함)(13.1 g)를 제2 용기에 충전시킨 다음, 73.3 mL의 2 mM HCl을 첨가하였다. 생성된 용액을 25분 동안 손으로 소용돌이치게 하였다. 나트륨 보레이트(0.5 M, pH 9.8)를 제1 용기에 첨가하여 pH를 약 9.1까지 상승시킨 후, PEG 시약을 함유하는 제2 용기의 내용물을 1 내지 2분에 걸쳐 제1 용기에 첨가하였다. 이어서, 8.1 mL의 2 mM HCl을 제2 용기에 충전시키고, 내용물을 제1 용기에 첨가함으로써 세정 단계를 수행하였다. 컨쥬게이션 반응을 위하여, 최종 rIL-2 농도는 0.6 mg/mL이고, 나트륨 보레이트 농도는 120 mM이고, pH는 9.1 +/-0.2이고, 온도는 20 내지 22℃이고, 시약의 활성(치환 수준)에 대한 조정 후 PEG 시약 대 rIL-2의 물비는 35:1이었다. 컨쥬게이션 반응을 30분 동안 진행시키고, 75 mL의 2N 아세트산을 첨가하여(pH를 약 4까지 저하시켜) 산성화에 의해 켄칭시켰다. 생성물을 앞서 기재된 바와 같은 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제시켜 주로 4-mers, 5-mers 및 6-mers(r-IL-2에 방출가능하게 공유 부착된 PEG 시약의 수를 지칭함)(여기서, 8-mers 및 그보다 높은 정도의 폐길화는 크로마토그래피와 연관된 세척 단계 동안 제거됨)의 조성물을 제공하였다. 이 조성물은 본원에서 "RSLAIL-2"로 칭해지며, 보다 구체적으로는, (2,7-(비스-메톡시PEG<sub>10kD</sub>-카르복시아미드)(9H-플루오렌-9-일)메틸 N-카르바메이트)<sub>4-6</sub> 인터루킨-2로서 칭해진다.
- [0266] **실시예 2**
- [0267] **RSLAIL-2의 수용체-편향성 및 면역 요법상의 관련 특성**
- [0268] IL-2 수용체에 대한 결합 친화성 및 면역자극 프로파일과 관련된 수용체 편향성: IL-2R $\alpha$  및 IL-2R $\beta$ 에 대한 RSLAIL-2의 친화성을 표면 플라즈몬 공명(Biacore T-100)에 의해 직접 측정하고, 이를 임상적으로 이용가능한 IL-2(알데스루킨)의 IL-2R $\alpha$  및 IL-2R $\beta$ 에 대한 친화성과 비교하였다. 항인간 항체(인비트로젠(Invitrogen))를 EDC/NHS 화학을 이용하여 CM-5 센서 칩 표면에 커플링하였다. 이어서, 인간 IL-2R $\alpha$ -Fc 또는 IL-2R $\beta$ -Fc 융합 단백질 중 어느 하나를 이 표면에 대하여 포착된 리간드로서 사용하였다. RSLAIL-2 및 이의 활성 IL-2 컨쥬게이트 대사체(1-PEG- 및 2-PEG-IL-2)의 일련의 희석액을 아세트이트 완충제(pH 4.5) 중에 제조하였다(5 mM에서 출발). 이 희석액들을 5분 동안 리간드와 결합하도록 하고, 결합된 반응 단위(RU)를, 농도에 대해 플롯화하여 EC50 값을 결정하였다. 각각의 이소폼의, 각각의 IL-2 수용체 서브타입에 대한 친화성을 IL-2의 것을 기준으로 하는 배수 변화로서 산정하였다.
- [0269] RSLAIL-2의 시험관내 결합 및 활성화 프로파일은, 폐길화가, 알데스루킨에 비해 IL2와 IL2R $\alpha$  사이의 상호 작용을 방해함을 시사하였으며; 이러한 효과가 생체 내 면역 세포 서브타입의 프로파일을 편향시키는지 확인하기 위한 연구를 수행하였다. RSLAIL-2 또는 IL2 중 어느 하나를 투여한 후 종양 내 CD8 T 및 Treg 세포의 수는, (RSLAIL-2에서처럼) IL2/IL2R $\alpha$  계면에서의 IL2와 폴리(에틸렌 글리콜)의 컨쥬게이션으로 인하여 IL2의 다면 발현효과가 변동되었는지에 관한 중요한 척도이다. 의문을 해결하기 위해, 피하 B16F10 마우스 흑색종 종양을 보유하는 마우스를 RSLAIL-2 단일 용량 또는 알데스루킨 5회분 용량으로 처리하고, 종양 미세환경 내 면역 세포를 유세포 분석으로 정량화하였다.

[0270] 알테스루킨-처리된 마우스의 종양에서, 총 CD8 세포 및 기억 CD8 세포는 증가하였지만(종양 침습 림프구의 백분율로 파악); 이러한 효과는 일시적이었으며, 5일차에는 비히클에 관하여 유의미한 정도에 이르게 되었다. 반면, 단일 RSLAIL-2 투여 후에는 유의미하고( $P < 0.05$ ) 지속적인 총 CD8 T-세포 자극 및 기억 CD8 T-세포 자극이 달성되었는데, 이 경우 알테스루킨에 비하여 (7일차에서의) 기억 CD8의 백분율 및 (7일차 및 10일차에서의) 총 CD8의 백분율은 월등히 컸다. RSLAIL-2 및 알테스루킨 처리는 둘 다 처리 개시후 5일 및 7일 경과시에 활성화된 자연 살해(NK) 세포의 증가를 초래하였지만, 이 효과는 10일차에 이르기까지 사라졌다. 5일차에, 종양 침윤 림프구 중 CD4 세포 백분율은 비히클에 비해 RSLAIL-2 처리 후 감소하였다. 10일차에, RSLAIL-2는 비히클 및 알테스루킨에 비하여 더 낮은 CD4 세포 백분율을 초래하였다. CD4 세포 집단을, Treg 집단을 정의하는 FoxP3<sup>+</sup> 서브 세트에 대해 더 분석하였다. RSLAIL-2 투여는 매 시점마다 Treg의 백분율을 감소시켰는데, 이는 PEG 사슬로부터 유래하는 IL2R  $\alpha$  서브유닛에 대한 접근경로가 감소한 것과 일치하였다. 반면, 알테스루킨에 의한 Treg 감소는 5일차에 유의성을 달성하면서도 보통의 수준이었다. CD8 T 세포의 증가와 Treg의 감소는, 7일차가 될 때까지 종양 내 CD8/Treg 비의 상당한 증가를 유도하였다. RSLAIL-2, 알테스루킨, 및 비히클에 대한 CD8/Treg 비는 각각 449, 18 및 4였는데, 이 점은 RSLAIL-2에 대해서 IL2 수용체 알파보다는 IL2 수용체 베타가 우선적으로 활성화됨을 뒷받침한다.

[0271] 면역조직화학적 염색을 수행한 결과, CD8 T 세포는 그 수가 증가하였을 뿐만 아니라, 종양 세포 속에 존재하였음을 확인하였다. 이러한 결과는, RSLAIL-2가, 종양 내 Treg의 상응하는 자극을 일으키지 않고도 시험관 내 IL2R  $\beta$ -편향 결합 프로파일과 일관되게, 비변형 IL-2(알테스루킨)에 의해 보이는 것보다 더 강력한 생체 내 기억 효과기 CD8 T-세포 반응을 유도하는 데 유효함을 나타낸다. 즉, RSLAIL-2는 Treg보다 효과기 CD8<sup>+</sup> T- 및 NK-세포를 우선적으로 활성화하고 증식시키는 데 유효하다.

[0272] 실시예 3

[0273] 예시적인 지속 작용성 TLR 효현제, 4-아암-PEG20k-CM-N-R848(레시퀴모드)의 합성



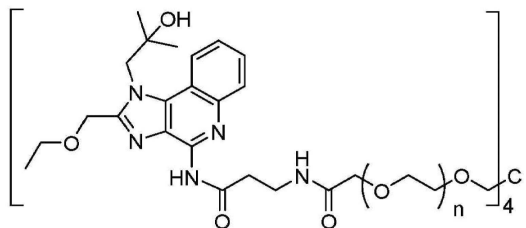
[0274]

[0275] "4-아암-PEG20k-CM-N-R848"

[0276] 20℃에서, 4-아암-20k-PEG-SCM(5.0 g, 1.0 밀리몰의 SCM) 및 R-848(377 mg, 1.2 밀리몰)을 무수 DMF(25 ml) 중 에 용해시켰다. 반응 용액을 50℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터 에틸 에테르 내로 부었다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(IPA)(300 ml) 내에 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 용액을 교반하는 동안 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. IPA 중 침전에 의한 정제를 한번 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트를 제공하였다(5.1 중량% R848 부하로 4.24 g). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, 클로로포름-*d*) δ 9.4 (광역, 0.9H), 8.22 - 8.14 (t, 1.8 H), 7.61 (ddd, *J* = 8.3, 7.0, 1.3 Hz, 0.9H), 7.49 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 1.4 Hz, 0.9H), 4.94 (s, 1.8H), 4.80 (s, 1.8H), 3.7-3.9(m, 460H), 1.32 (s, 5.1H), 1.25 (t, *J* = 7.0 Hz, 2.7H).

[0277] 실시예 4

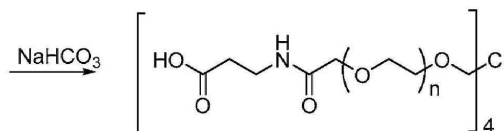
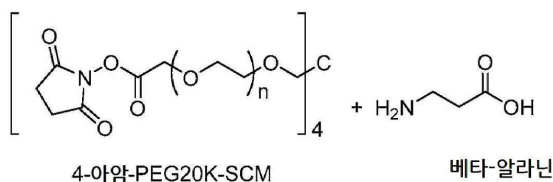
[0278] 4-아암-PEG20k-CM-β-알라닌-N-R848(화합물 2)의 합성



화합물 2

[0279]

[0280] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



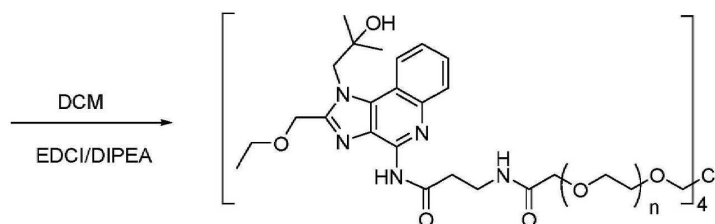
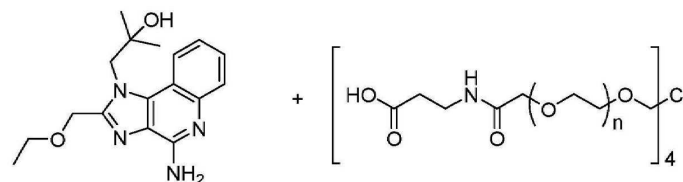
4-아암-PEG20k-CM-베타-알라닌

[0281]

[0282] 4-아암-PEG20k-CM-β-알라닌:

[0283] 베타-알라닌(7.100 g, 10 당량) 및 중탄산나트륨(6.720 g, 10 당량)을 탈이온수(800 ml) 내로 첨가하고, 혼합물을 교반하여 투명한 용액을 형성하였다. 4-아암-PEG20k-SCM(40.020 g, 1 당량)을 용액 내로 첨가하였다. 반응용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 5 N HCl을 용액 내로 첨가하여 pH를 4.0으로 조정하였다. 용액을 디클로로메탄(150 ml)으로 2회 추출하고 유기상을 합하고, 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 필터를 통과시켜 고체를 제거하였다. 여과액을 50 ml로 농축시키고, 그 후 500 ml 에틸 에테르에 첨가하여 침전시켰다. 고진공 하에서 밤새 여과 및 건조에 의해 백색 분말로서 생성물(35.050 g, 수율 87%)을 수득하였다.

[0284]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.98 (s, 7.11H), 3.64 (t, 7.11H), 3.58- 3.33 (m, 1818H), 3.27 (s, 7.90H), 2.40 (t, 7.11H).



[0285]

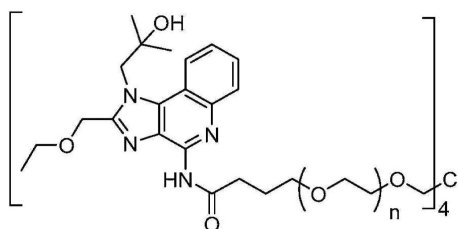
[0286] 4-아암-PEG20k-CM-β-알라닌-N-R848:

[0287] 20℃에서, 4-아암-PEG20k-CM-β-알라닌(4.012 g, 0.8 밀리몰의 -COOH), 히드록시벤조트리아졸(216 mg, 1.6 밀리몰), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(307 mg, 1.6 밀리몰), 및 N,N-디이소프로필에틸아민(207 mg, 1.6 밀리몰)을 디클로로메탄(25 ml) 중에 용해시켰다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. R848(302 mg, 0.96 밀리몰)을 첨가하고, 반응 용액을 20℃에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜 백색 고체로서 순수한 컨주게이트를 제공하였다(5.6% w/w R848 부하로 3.860 g).

[0288] <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.82 (s, 3.56H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 4.49H), 8.07 (d, J = 8.0 Hz, 4.02H), 7.49 (t, J = 7.8 Hz, 4.17H), 7.49 (t, J = 7.8 Hz, 7.55H), 4.93 (s, 8.39H), 4.79 (s, 9.0H), 3.99 (s, 7.60H), 3.80-3.44 (m, 1818H), 1.33 (s) 및 1.26 (t, J = 7.1 Hz) (전체 34.18H).

[0289] 실시예 5

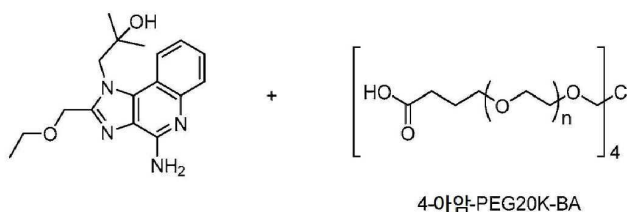
[0290] 4-아암-PEG20k-BA-N-R848(화합물 3)의 합성



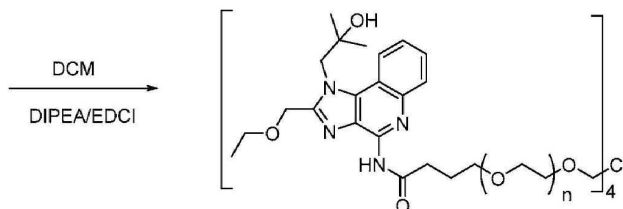
화합물 3

[0291]

[0292] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



4-아암-PEG20K-BA



[0293]

[0294] 4-아암-PEG20k-BA-N-R848:

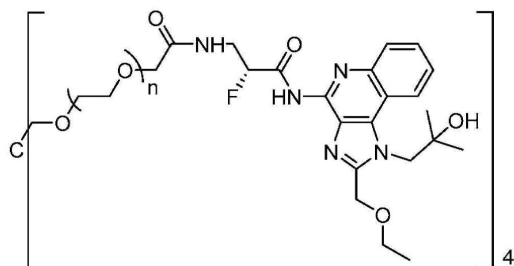
[0295] 20℃에서, 4-아암-PEG20k-BA(4.020 g, 0.8 밀리몰의 -COOH), 히드록시벤조트리아졸(216 mg, 1.6 밀리몰), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(307 mg, 1.6 밀리몰), 및 N,N-디이소프로필에틸아민(207 mg, 1.6 밀리몰)을 디클로로메탄(15 ml) 중에 용해시켰다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. R848(302 mg, 0.96 밀리몰)을 첨가하고, 반응 용액을 20℃에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한

용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트를 제공하였다(5.2% w/w R848 부하로 3.805 g).

[0296]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 3.45H), 8.07 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 3.43H), 7.59 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 3.63H), 7.47 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 3.71H), 4.91 and 4.78 (s, 15.86H), 3.77-3.40 (m, 18.18H), 2.10 (t, 7.30H), 1.33 (s) 및 1.26 (t,  $J$  = 7.1 Hz) (전체 31.34H).

[0297] 실시예 6

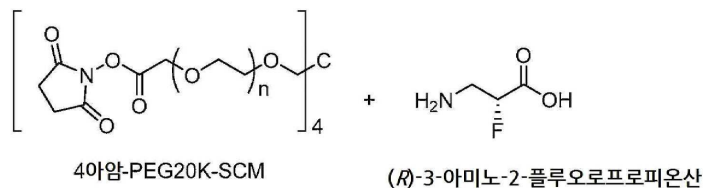
[0298] 4-아암-PEG20k-CM- $\alpha$ -(R)-플루오로-프로판아미드-N-R848(화합물 4)의 합성



화합물 4

[0299]

[0300] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



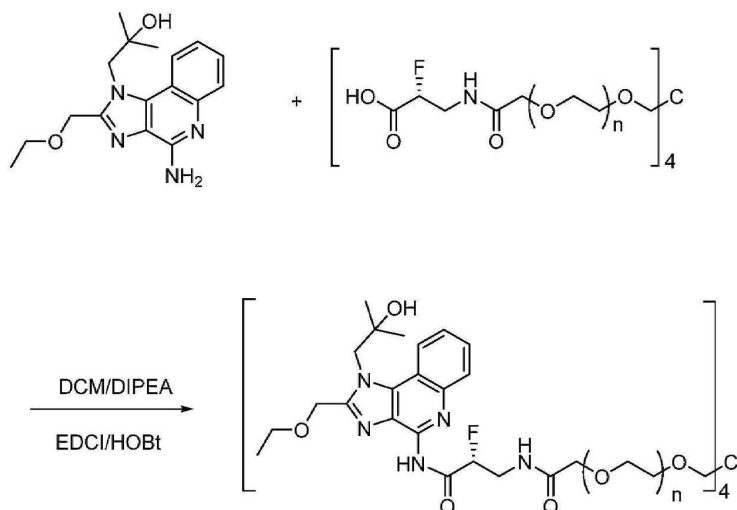
[0301]

[0302] 4-아암-PEG20k-CM- $\alpha$ -(R)-플루오로-프로피온산:

[0303] 4-아암-PEG20k-SCM(5.140 g, 1.03 밀리몰)을 디클로로메탄(50 ml) 중에 용해시켰다. (R)-3-아미노-2-플루오로-프로피온산(440 mg, 4.11 밀리몰), 및 트리에틸아민(416 mg, 4.11 밀리몰)을 N,N-디메틸포름아미드(5 ml) 내로 첨가하여 현탁액을 형성하였다. 현탁액을 DCM 용액 내 4-아암-PEG20k-SCM에 첨가하였다. 반응을 10일 동안 20℃에서 교반한 후 물(200 ml)로 희석하였다. 수용액을 디클로로메탄(3×100 ml)으로 추출하였다. 유기상을 합하고, 무수 황산 마그네슘으로 건조시키고 여과하였다. 여과물을 50 ml로 농축시키고, 이를 에틸 에테르(1 리터) 내로 첨가하여 침전물을 형성하였다. 침전물을 여과에 의해 수집하고, 고진공 하에서 건조시켜, 70% 치환으로 4.638 g의 백색 고체 4-아암-PEG20k-CM- $\alpha$ -(R)-플루오로-프로피온산을 제공하였다.

[0304]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.49 (s, 2.77H), 5.02 (d,  $J$  = 48.5 Hz, 2.77H), 4.15 (s, 3.95H), 3.65 (br, 18.18H), 3.11 (q,  $J$  = 7.3 Hz, 2.92H), 1.35 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3.95H).





[0305]

[0306]

[0307]

#### 4-아암-PEG20k-CM- $\alpha$ -(R)-플루오로-프로판아미드-N-R848:

4-아암-PEG20k-CM- $\alpha$ -(R)-F-프로피온산(2.004 g, 0.4 밀리몰의 COOH), N,N-디이소프로필에틸아민(207 mg, 1.6 밀리몰), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(153 mg, 0.8 밀리몰), 및 히드록시벤조트리아졸(108 mg, 0.9 밀리몰)을 무수 디클로로메탄(15 ml) 중에 용해시켰다. R848(113 mg, 0.36 밀리몰)을 30분 후 첨가하였다. 반응 용액을 20℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜, 4.1(w/w)% R848 부하로, 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트 1.602 g을 제공하였다.

[0308]

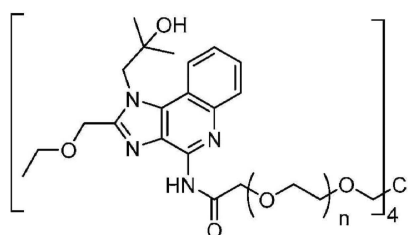
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.17 (s, 5.53H), 7.54 (d, J = 57.7 Hz, 6.72H), 4.92 (s, 4.74H), 4.79 (s, 4.74H), 3.62 (br, 1818H), 1.5-1.0 (br., 30.0H).

[0309]

#### 실시예 7

[0310]

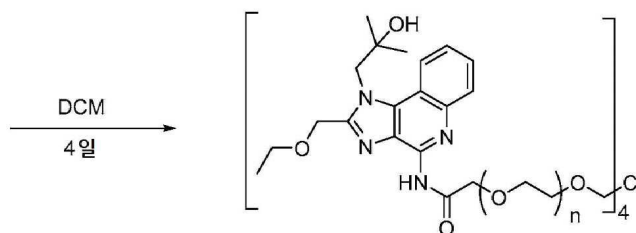
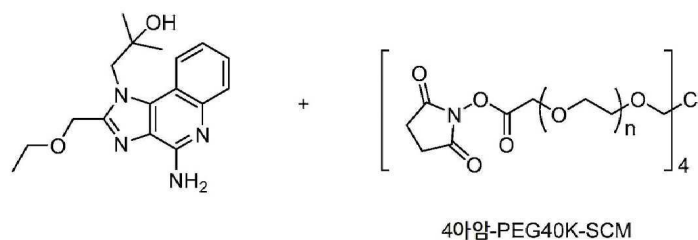
#### 4-아암-PEG40k-CM-N-R848(화합물 5)의 합성



화합물 5

[0311]

[0312] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



[0313]

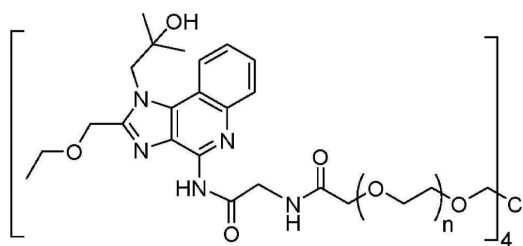
[0314] 4-아암-PEG40k-CM-N-R848:

[0315] 4-아암-PEG40k-SCM(4.410 g, 0.44 밀리몰의 SCM)을 무수 디클로로메탄(33 ml) 중에 용해시켰다. R848(116 mg, 0.53 밀리몰)을 실온에서 첨가하였다. 생성된 혼합물 용액을 실온에서 4일 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하여 용매를 제거하였다. 잔류물을 상기 언급된 바와 같이 이소프로필 알코올(300 ml)을 이용하여 2회 재결정화하여 4.262 g의 생성물을 백색 고체로서 제공하였다. 생성물은 NMR 분석을 기준으로 2.0%(w/w) R848을 함유하였다.

[0316]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (m, 5.4H), 7.58 (t, 2.8H), 7.47 (t, 2.8H), 4.92-4.70 (m, 10.6 H), 4.07 (s, 1.5H), 3.88-3.45 (m, 3636 H), 1.23 (s) 및 1.21 (t) (전체 23.6H).

[0317] 실시예 8

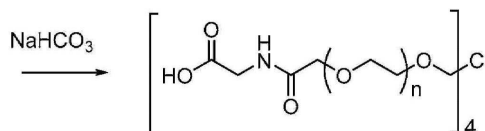
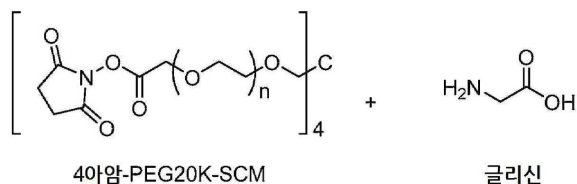
[0318] 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848(화합물 6)의 합성



화합물 6

[0319]

[0320] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.

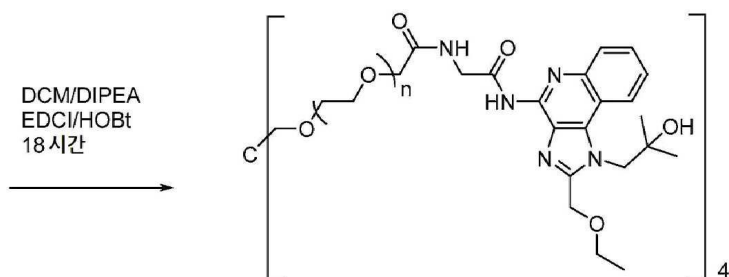
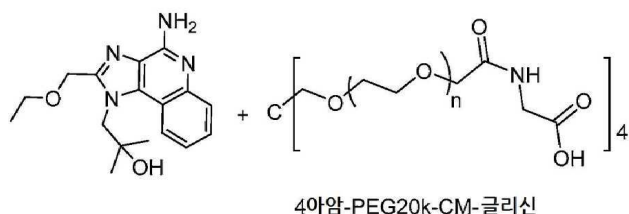


[0321]

[0322] 4-아암-PEG20k-CM-글리신:

[0323] 글리신(6.003 g, 10 당량) 및 중탄산나트륨(6.720 g, 10 당량)을 탈이온수(800 ml) 내로 첨가하고, 투명해질 때까지 용액을 교반하였다. 4-아암-PEG20k-SCM(40.020 g, 1 당량)을 용액 내로 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 5 N HCl 용액을 용액 내로 첨가하여 pH를 4.0으로 조정하였다. 용액을 디클로로메탄( $2 \times 150$  ml)으로 추출하였다. 유기상을 합하고, 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 프리트를 통과시켜 고체를 제거하였다. 여과액을 50 ml로 농축하고, 그 후 500 ml 에틸 에테르에 첨가하여 침전물을 수득하였다. 여과 및 고진공 하에서 밤새 건조시킴으로써 생성물을 백색 고체 분말(35.050 g)로서 수득하였다.

[0324]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.01 (d, 7.1H), 3.99 (s, 7.1H), 3.74-3.48 (m, 1818H), 3.35 (s, 7.1H).



[0325]

[0326] 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848:

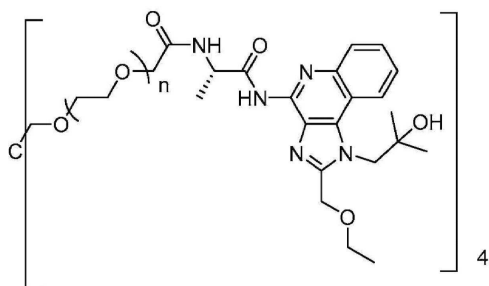
[0327] 20℃에서, 4-아암-PEG20k-CM-글리신(2.520 g, 0.5 밀리몰 COOH), 히드록시벤조트리아졸(135 mg, 1 밀리몰), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(192 mg, 1 밀리몰), 및 N,N-디이소프로필에틸아민(258 mg, 2 밀리몰)을 디클로로메탄(15 ml) 중에 용해시켰다. 혼합물을 20℃에서 30분 동안 교반하였다. R848(189 mg, 0.6 밀리몰)을 첨가하였다. 반응 용액을 20℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에

밤새 건조시켜 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트를 제공하였다(5.1% w/w R848 부하로 1.823 g).

[0328]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.97 (s, 3.56H), 8.18 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 3.52H), 8.16 - 8.11 (m, 2.77H), 7.81 (s, 2.92H), 7.63 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 3.06H), 7.51 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 3.48H), 4.98 (d,  $J$  = 39.6 Hz, 13.32H), 4.81 (s, 6.64H), 4.13 (s, 6.20H), 3.65 (s, 1818H), 1.34 (s, 23.63H), 1.27 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 10.59H).

[0329] 실시예 9

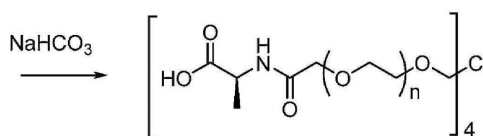
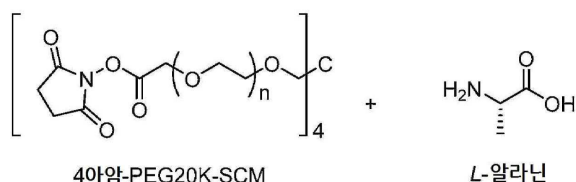
[0330] 4-아암-PEG20k-CM-(L)-알라닌-N-R848(화합물 7)의 합성



화합물 7

[0331]

[0332] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.

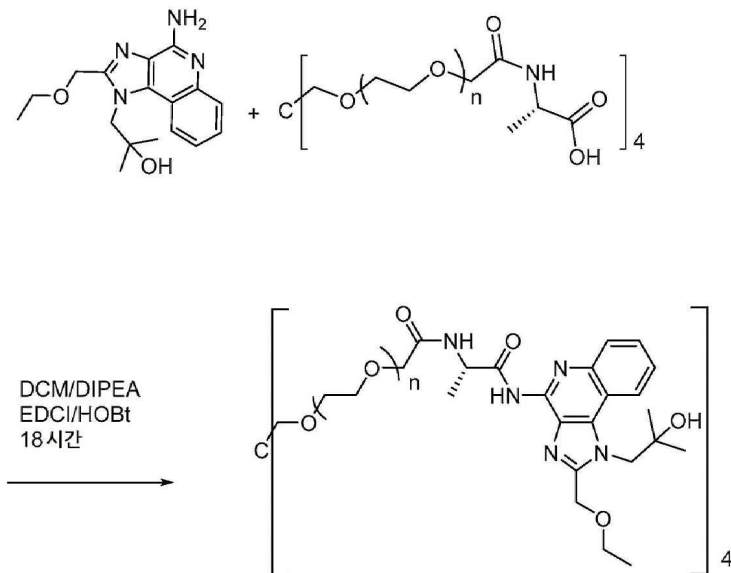


[0333]

[0334] 4-아암-PEG20k-CM-L-알라닌:

[0335] L-알라닌(7.100 g, 10 당량) 및 중탄산나트륨(6.720 g, 10 당량)을 탈이온수(800 ml) 내로 첨가하고, 투명해질 때까지 용액을 교반하였다. 그 후 4-아암-PEG20k-SCM(40.030 g, 1 당량)을 용액 내로 첨가하였다. 반응 용액을 20℃에서 3시간 동안 교반하였다. 5 N HCl 용액을 용액 내로 첨가하여 pH를 4.0으로 조정하였다. 용액을 디클로로메탄( $2 \times 150$  ml)으로 추출하였다. 유기상을 합하고, 무수 황산나트륨으로 건조시켰다. 프릿을 통과시켜 고체를 제거하였다. 여과액을 50 ml로 농축시키고, 그 후 500 mL 에틸 에테르에 첨가하여 침전물을 수득하였다. 여과 및 진공 내 밤새 건조에 의해 생성물(35.012 g, 수율 87%)을 백색 고체 분말로서 수득하였다.

[0336]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.42 (m, 3.56H), 3.85 (s, 7.11H), 3.58- 3.33 (m, 1818H), 3.27 (s, 7.90H), 1.30 (d, 10.28H).



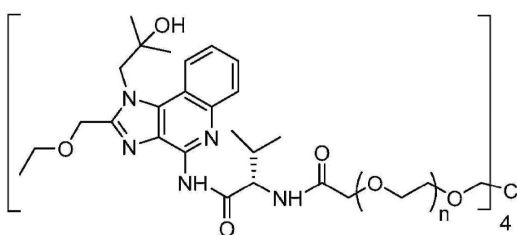
**4-아암-PEG20k-CM-L-알라닌-N-R848:**

20℃에서, 4-아암-PEG20k-CM-L-알라닌(2.500 g, 0.5 밀리몰의 COOH), N,N-디이소프로필에틸아민(258 mg, 2.0 밀리몰), N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(192 mg, 1.0 밀리몰), 및 히드록시벤조트리아졸(135 mg, 1 밀리몰)을 무수 디클로로메탄(15 ml) 중에 용해시켰다. R848(189 mg, 0.6 밀리몰)을 30분 후에 첨가하였다. 반응 용액을 20℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 부었다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜, 4.2%(w/w) R848 부하로 백색 고체로서 순수한 컨주게이트 1.702g을 제공하였다.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 5.14H), 7.69 - 7.54 (m, 3.95H), 7.48 (d, *J* = 8.0 Hz, 2.37H), 4.90 (s, 4.74H), 4.78 (s, 4.74H), 3.62 (br, 18.18H), 1.60 (d, *J* = 6.9 Hz, 5.93H), 1.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 5.93H), 1.36 - 1.27 (m, 21.73H), 1.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 15.80H).

**실시예 10**

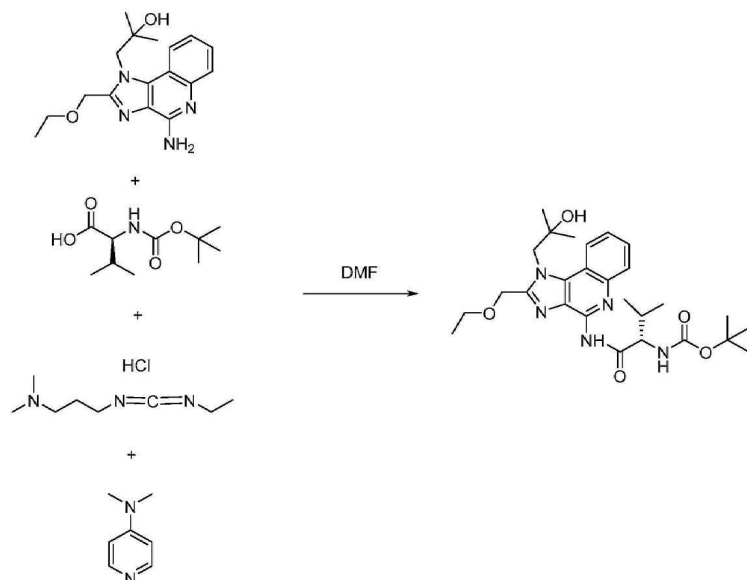
**4-아암-PEG20k-CM-(L)-발린-N-R848 (화합물 8)의 합성**



화합물 8



[0344] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



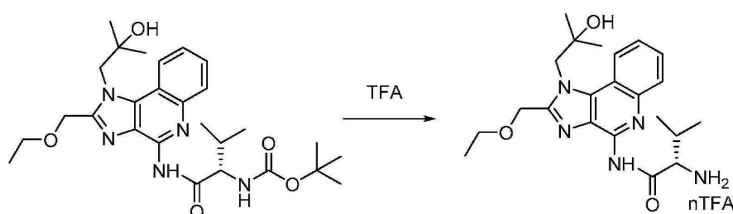
[0345]

[0346] **Boc-발린-R848:**

[0347] 1-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올(R848)(237.5 mg, 0.755 밀리몰)을 무수 N,N-디메틸포름아미드(5 ml) 내로 용해시켰다. Boc-L-발린(263.4 mg, 1.2 밀리몰) 및 4-(디메틸아미노)피리딘(187.4 mg, 1.534 밀리몰)을 첨가하였다. N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보다이미드 하이드로클로라이드(236.1 mg, 1.232 밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응을 퀀칭시켰다. 식염수를 첨가하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(2×50 ml)로 추출하였다. 합한 유기 용액을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 건조 농축시켰다. 잔류물을 1 내지 10% 메탄올/디클로로메탄을 사용하여 실리카 겔 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 생성물(394.7 mg)을 백색 고체로서 제공하였다.

[0348]  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.99 (br., 1 H), 8.15-8.11 (m, 2H), 7.58 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 7.47 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 5.42 (m, 1H), 4.89 (br, 2 H), 4.77 (s, 2H), 3.63 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.27 (m, 1H), 2.45 (br, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.31 (br, 6H), 1.22 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.14 (br, 3H), 0.93 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H). LC-MS: 514 ( $\text{MH}^+/\text{z}$ ).

[0349] **발린-R848.nTFA 염:**

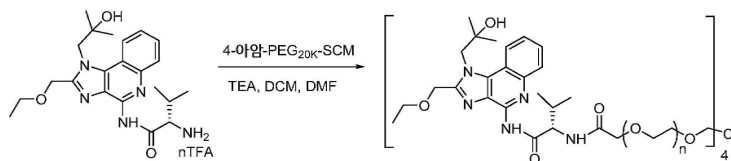


[0350]

[0351] (S)-tert-부틸(1-((2-(에톡시메틸)-1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일)아미노)-3-메틸-1-옥소부탄-2-일)카바메이트(Boc-발린-R848)(377.0 mg, 0.73 밀리몰)를 디클로로메탄(30 ml) 중에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(3 ml, 38.8 밀리몰)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 3.5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔류물을 고진공 하에서 건조시켜 TFA 염으로서 생성물(678.5 mg)을 제공하였다.

[0352] LC-MS: 414 ( $\text{MH}^+/\text{z}$ ).

[0353] 4-아암-PEG<sub>20k</sub>-발린-N-R848



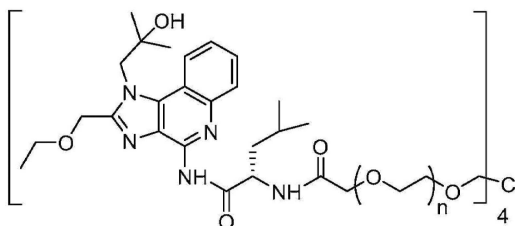
[0354]

[0355] 무수 디클로로메탄(20 ml) 중 4-아암-PEG20k-SCM(4.170 g, 0.74 밀리몰의 SCM)의 용액을 실온에서 N,N-디메틸포름아미드(1.0 ml) 중 발린-R848.nTFA(약 0.734 밀리몰) 및 트리에틸아민(0.3 mL, 2.15 밀리몰)의 혼합물에 첨가하였다. 디클로로메탄(약 10 mL)을 사용하여 바이알 내 4-아암-PEG20k-SCM 잔류물을 용해시키고 반응 혼합물에 첨가하였다. 트리에틸아민(0.15 mL, 1.076 밀리몰)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 23시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔류물을 이소프로필 알코올(275 ml)을 이용하여 재결정화하였다. 고형분을 에틸 에테르로 세척하고 고진공 하에서 밤새 건조시켜 백색 고체로서 4.053 g의 생성물을 제공하였다. 약물 부하는 4.3%(w/w)이었다.

[0356] <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.99 (br), 8.10-8.09 (m, 6H), 7.54 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 7.47 (d, 3 H). 7.42 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 4.840 (br, 6H), 4.712 (s, 6H), 4.07-3.95 (m, 6H), 3.72-3.42 (m, 1818H), 3.39 (m, 3H), 2.41 (br, 6H), 1.36 (br, 18H), 1.16 (t, J = 6.5 Hz, 9H), 1.12 (m, 9H), 0.92 (d, J = 6.0 Hz, 9H).

[0357] 실시예 11

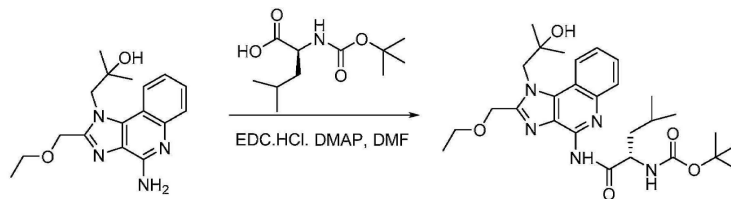
[0358] 4-아암-PEG20k-CM-(L)-류신-N-R848(화합물 9)의 합성



화합물 9

[0359]

[0360] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



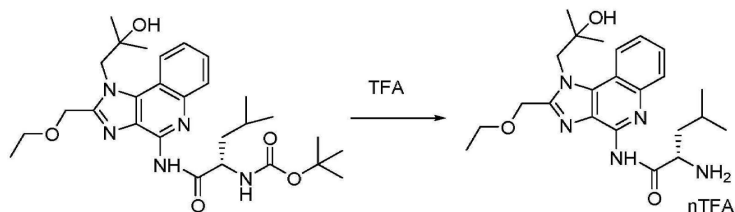
[0361]

[0362] Boc-Leu-R848:

[0363] 1-(4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올(R848)(421.8 mg, 1.34 밀리몰)을 N,N-디메틸포름아미드(10 ml) 내로 용해시켰다. Boc-Leu-OH(501.4 mg, 2.207 밀리몰) 및 4-(디메틸아미노)피리딘(344.6 mg, 2.82 밀리몰)을 첨가하였다. N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카르보디이미드 하이드로클로라이드(438.2 mg, 2.286 밀리몰)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응을 퀀칭시켰다. 식염수를 첨가하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(2×50 ml)로 추출하였다. 합한 유기 용액을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 건조 농축시켰다. 잔류물을 1 내지 10% 메탄올/디클로로메탄을 사용하여 실리카 겔 상에서 플래시 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 70% 수율로 494 mg의 생성물을 백색 고체로서 제공하였다.

[0364] <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.03 (br, 1H), 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.57 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.46 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 5.26 (m, 1H), 4.85 (br, 2H), 4.77 (s, 2H), 3.63 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 3.26 (m, 1H), 1.89 (m, 2H), 1.69 (s, 3H), 1.56 (m, 1H), 1.43 (s, 9H), 1.31 (br, 3H), 1.22 (t,

$J = 7.0$  Hz, 3H), 1.08 (br, 3H), 0.94 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H). LC-MS: 528 ( $MH^+$ /z).



**Leu-R848. nTFA 염:**

(S)-tert-부틸 (1-((2-(에톡시메틸)-1-(2-히드록시-2-메틸프로필)-1H-이미다조[4,5-c]퀴놀린-4-일)아미노)-4-메틸-1-옥소펜탄-2-일)카바메이트(Boc-Leu-R848)(494 mg, 0.936 밀리몰)를 디클로로메탄(20 ml) 중에 용해시키고, 트리플루오로아세트산(3 ml, 38.8 밀리몰)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔류물을 고진공 하에서 건조시켜 생성물(895.7 mg)을 TFA 염으로서 제공하였다.

LC-MS: 428 ( $MH^+$ /z).



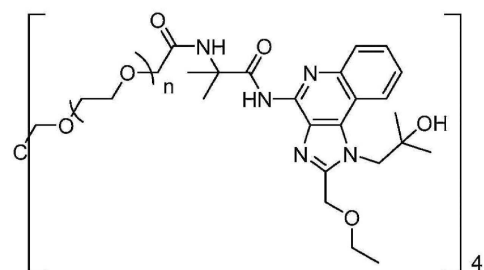
**4-아암-PEG20k-CM-L-류신-R848:**

무수 디클로로메탄(30 ml) 내 4-아암-PEG20k-SCM(5.200 g, 0.96 밀리몰의 SCM)의 용액을 실온에서 N,N-디메틸포름아미드(1.0 ml) 내 R848-Leu-NH<sub>2</sub>.nTFA(약 0.936 밀리몰)의 용액에 첨가하였다. 디클로로메탄(약 10 mL)을 사용하여 바이알 내 4-아암-PEG20k-SCM의 잔류물을 용해시키고, 이를 반응 혼합물에 첨가하였다. 트리에틸아민(0.35 ml, 2.51 밀리몰)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 35분 동안 교반하였다. 트리에틸아민(0.25 ml, 1.79 밀리몰)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 19시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔류물을 이소프로필 알코올(275 ml)로 재결정화시켰다. 고형분을 에틸 에테르로 세척하고, 밤새 고진공 하에서 건조시켜 생성물로서 5.12 g의 백색 고체를 제공하였다. 약물 부하는 4%(w/w)였다.

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.09-8.08 (m, 5.5H), 7.51 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2.75H), 7.40 (m, 5.5H). 4.85 (br, 5.5H), 4.70 (s, 5.5H), 4.02-3.91 (m, 5.5H), 3.70-3.32 (m, 1818H), 1.81 (m, 2.75H), 1.72 (br, 2.75H), 1.63 (m, 2.75H), 1.22 (m, 16.5H), 1.12 (t,  $J = 6.0$  Hz, 8.25H), 0.95 (br, 8.25H), 0.86 (d,  $J = 6.0$  Hz, 8.25H).

**실시예 12**

**4-아암-PEG20k-CM-α, α-디메틸-글리신-N-R848(화합물 10)의 합성**



**화합물 10**

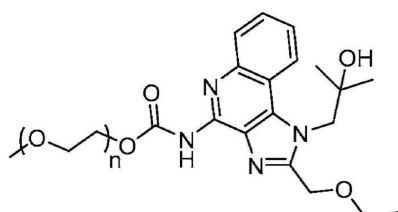


(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜, 4.7%(w/w) R848 부하로 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트 1.819 g을 제공하였다.

[0384]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.71 (s, 3.95H), 8.29 – 8.03 (m, 3.95H), 7.57 (s, 3.95H), 7.45 (s, 3.95H), 4.83 (d,  $J$  = 66.8 Hz, 11.85H), 3.61 (br, 1818H), 2.50 (s, 7.90H), 1.76 (s, 11.85H), 1.42 (s, 3.95H), 1.26 (d,  $J$  = 34.3 Hz, 27.65H).

[0385] 실시예 13

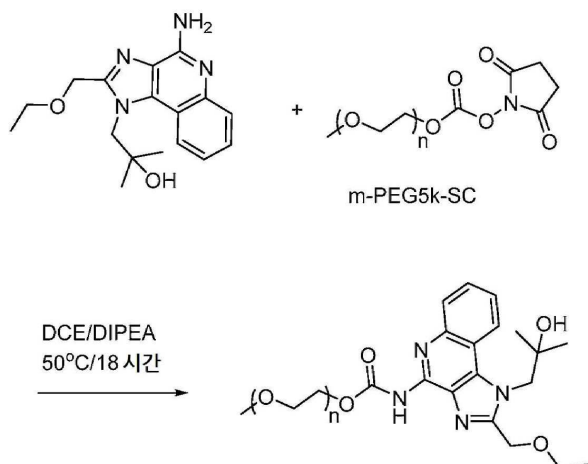
[0386] mPEG5k-카바메이트-N-R848(화합물 11)의 합성



화합물 11

[0387]

[0388] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다:



[0389]

[0390] mPEG5k-카바메이트-N-R848:

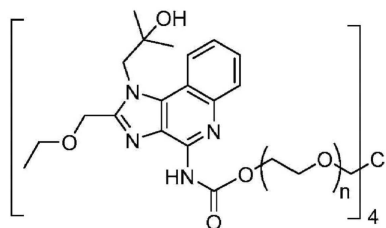
[0391] 50°C에서, mPEG5k-SC(2.500 g, 0.5 밀리몰), R848(236 mg, 0.75 밀리몰), 및 N,N-디이소프로필에틸아민(129 mg, 1.0 밀리몰)을 무수 N,N-디메틸포름아미드(20 ml) 중에 용해시켰다. 반응 용액을 50°C에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60°C까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜, 4.5%(w/w) R848 부하로 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트 2.338 g을 제공하였다.

[0392]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.18 (s, 0.77H), 8.13 (dd,  $J$  = 8.4, 1.3 Hz, 0.78H), 7.59 (ddd,  $J$  = 8.4, 7.0, 1.3 Hz, 0.82H), 7.49 – 7.44 (m, 0.82H), 4.91 (s, 1.7H), 4.78 (s, 1.7H), 4.43 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 3.63 (br, 574H), 3.37 (s, 3H), 1.32 (s, 5H), 1.25 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H).

[0393] 실시예 14



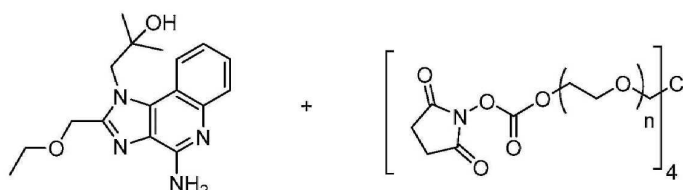
[0394] 4-아암-PEG20k-카바메이트-N-R848(화합물 12)의 합성



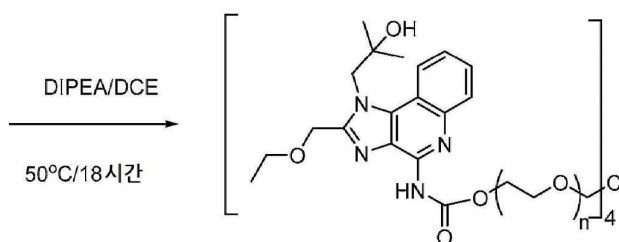
화합물 12

[0395]

[0396] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



4아암-PEG20K-SC



[0397]

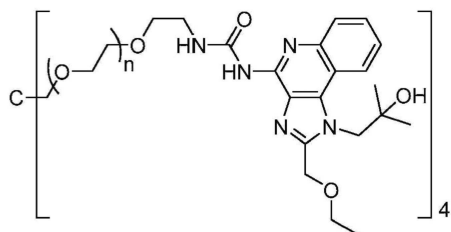
[0398] 4-아암-PEG20k-카바메이트-N-R848:

[0399] 50℃에서, 4-아암-PEG20k-SC(5.0 g, 1.0 밀리몰의 SCM) 및 R848(377 mg, 1.2 밀리몰)을 무수 1,2-디클로로에탄 (25 ml)중에 용해시켰다. N,N-디이소프로필에틸아민(129 mg, 2 밀리몰)을 용액 내로 첨가하였다. 반응 용액을 50℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 1 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(300 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 침전물이 형성되었고, 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜, 4.5%(w/w) R848 부하로 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트 4.240 g을 제공하였다.

[0400]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.16 (t,  $J$  = 8.7 Hz, 5.93H), 7.61 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 3.16H), 7.48 (t,  $J$  = 7.7 Hz, 3.16H), 4.93 (s, 2.96H), 4.80 (s, 5.93H), 4.45 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2.96H), 3.82 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2.96H), 3.79 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 5.93H), 3.65 (br, 1818H), 3.42 (s, 3.16H), 1.33 (s, 19.75H), 1.26 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 7.90H).

[0401] 실시예 15

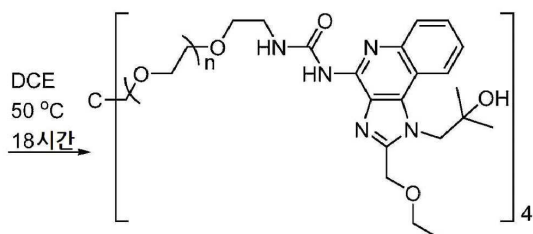
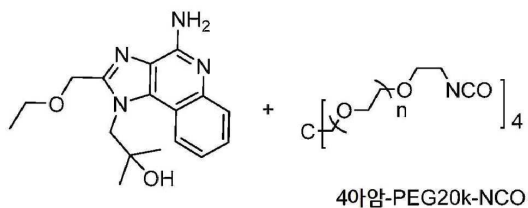
[0402] 4-아암-PEG20k-우레아-N-R848(화합물 13)의 합성



화합물 13

[0403]

[0404] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



[0405]

[0406] 4-아암-PEG20k-우레아-N-R848:

[0407]

50℃에서, 4-아암-PEG20k-이소시아네이트(1.0 g, 0.2 밀리몰 NCO) 및 R848(69.2 mg, 0.22 밀리몰)을 무수 1,2-디클로로에탄(10 ml) 중에 용해시켰다. 반응 용액을 50℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 0.5 리터의 에틸 에테르 내로 부었다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 이소프로필 알코올(250 ml) 내로 첨가하였고, 현탁액을 60℃까지 가열하여 투명한 용액을 형성하였다. 교반하는 동안 용액을 실온까지 냉각시켰다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 이소프로필 알코올 중 침전에 의한 정제를 한번 더 반복하고, 이어서 고진공 하에 밤새 건조시켜, 4.7%(w/w) R848 부하로 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트 938 mg을 제공하였다.

[0408]

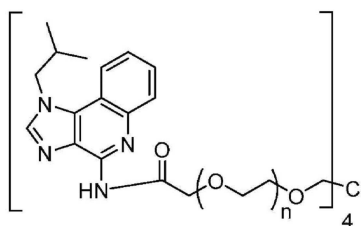
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.30 (d,  $J$  = 5.5 Hz, 3.56H), 8.17 - 8.09 (m, 7.11H), 7.94 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 3.56H), 7.57 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 3.56H), 7.43 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 3.56H), 4.92 (s, 7.51H), 4.77 (s, 7.51H), 3.63 (br, 1818H), 1.32 (s, 23.70H), 1.24 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 10.67H).

[0409]

실시예 16

[0410]

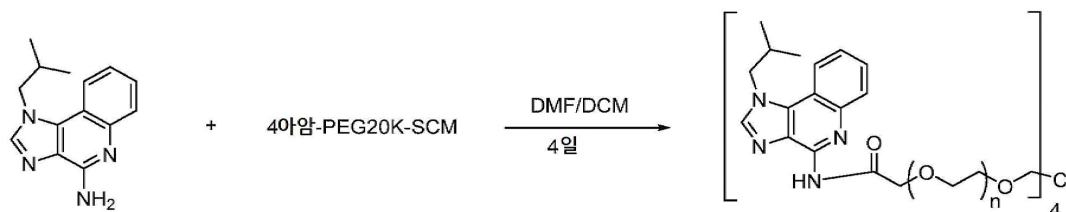
4-아암-PEG20k-CM-이미퀴모드(화합물 14)의 합성



화합물 14

[0411]

[0412] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



[0413]

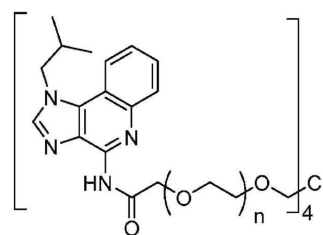
[0414] 4-아암-PEG20k-CM-이미퀴모드:

[0415] 4-아암-PEG20k-SCM(6.789 g, 1.2 밀리몰의 SCM)을 무수 디클로로메탄(33 ml) 중에 용해시키고, 그 후 실온에서 N,N-디메틸포름아미드(5.0 ml) 내 이미퀴모드(359.7 mg, 1.452 밀리몰)의 현탁액에 첨가하였다. 디클로로메탄 (약 10 mL)을 사용하여 4-아암-PEG20k-SCM 잔류물을 용해시키고, 반응 혼합물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 3일 동안 교반하였다. 디클로로메탄(10 ml)을 첨가하였다. 혼합물을 하루 더 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔류물을 이소프로필 알코올로 2회 재결정화하여 백색 고체로서 생성물 4.8612 g을 제공하였다. 약물 부하는 3.9%(w/w)였다.

[0416]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.55 (br, 2.5H), 8.026 (m, 3.2H), 7.853 (d,  $J = 8.0$  Hz, 3.3H), 7.720 (s, 3.3H), 7.450 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3.3H), 7.371 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3.3H), 4.30-4.18 (m, 13.26H), 3.471 (m, 1818H), 2.190 (m, 3.1H), 0.877 및 0.986 (2s, 20.4H).

[0417] 실시예 17

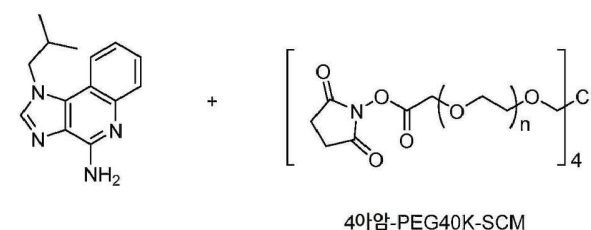
[0418] 4-아암-PEG40k-CM-N-이미퀴모드(화합물 15)의 합성



화합물 15

[0419]

[0420] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



[0421]

[0422] 4-아암-PEG40k-CM-N-이미퀴모드:

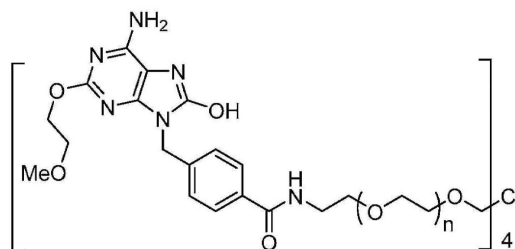
[0423] 4-아암-PEG40k-SCM(5.110 g, 0.51 밀리몰의 SCM)을 무수 디클로로메탄(33 ml) 중에 용해시키고, 이미퀴모드

(148 mg, 0.61 밀리몰)를 실온에서 첨가하였다. 생성된 현탁액을 4일 동안 실온에서 교반하여 투명한 용액을 형성하였다. 반응 혼합물을 농축시켜 용매를 제거하였다. 잔류물을 상기 언급된 바와 같이 이소프로필 알코올(250 ml)로 2회 재결정화하여 백색 고체로서 생성물 4.609 g을 제공하였다. 생성물은 NMR 분석을 기준으로 1.8%(w/w) 이미퀴모드를 함유하였다.

[0424]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.21 (d, 3.06H), 8.02 (d, 3.06H), 7.85 (s, 3.15H), 7.63 (t, 3.34H), 7.53 (t, 3.17H), 4.34 (d, 6.21H), 3.89-3.43 (m, 3636H), 1.03 (s, 18.09H).

[0425] 실시예 18

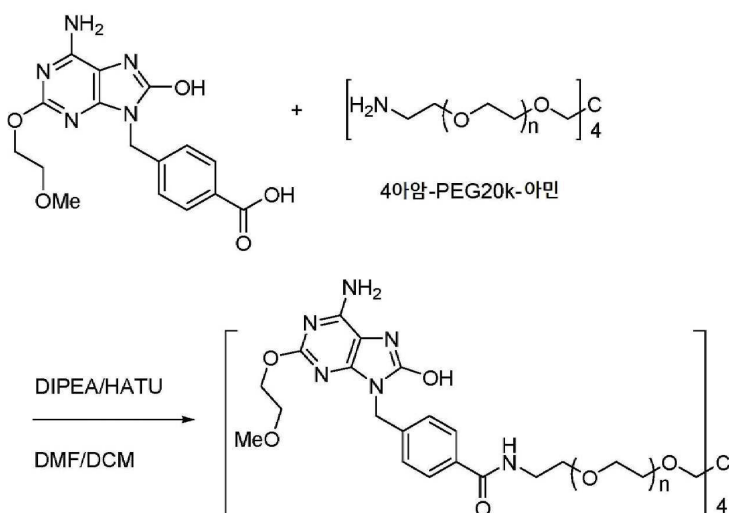
[0426] 4-아암-PEG20k 4-((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸)-벤즈아미드(화합물 16)의 합성



화합물 16

[0427]

[0428] 표제의 화합물을 하기 반응식에 따라 합성하였다.



[0429]

[0430] 20℃에서, 4-아암-PEG20k-아민(1.500 g, 0.3 밀리몰의 아민)을 디클로로메탄(3 ml) 중에 용해시켰다. 용액을 N,N-디이소프로필에틸아민(116 mg, 0.9 밀리몰), 1-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-1H-1,2,3-트리아졸로[4,5-b]피리디늄-3-옥시드헥사플루오로포스페이트(137 mg, 0.36 밀리몰), 및 4-((6-아미노-8-히드록시-2-(2-메톡시에톡시)-9H-푸린-9-일)메틸) 벤조산(108 mg, 0.3 밀리몰)을 함유하는 N,N-디메틸포름아미드(10 ml) 용액 내로 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 교반하면서, 0.3 리터의 에틸 에테르 내로 첨가하였다. 형성된 침전물을 여과에 의해 수집하고, 에틸 에테르(50 ml)로 세척하였다. 수득된 고체를 10 내지 30%의 디클로로메탄 중 메탄올을 이용하여 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 생성물을 20 ml 디클로로메탄 중에 용해시키고, 여과하였다. 여과물을 농축시키고, 다시 에틸 에테르 중에 침전시켜서 6.0%(w/w) 약물 부하를 이용하여, 백색 고체로서 순수한 컨쥬게이트 300 mg을 제공하였다.

[0431]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.26 (s, 3.95H), 7.78 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 7.90H), 7.52 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 7.90H), 5.67 (s, 7.90H), 5.04 (s, 7.90H), 4.42 (t,  $J$  = 5.0 Hz, 7.90H), 3.66 (br, 1818H).

[0432] 실시예 19

- [0433] **생체내 연구: 쥐과 CT-26 결장 종양 모델에서 RSLAIL-2 및 TLR 효현제 및 4-1BB 효현제의 투여**
- [0434] 본 연구는 쥐과 CT-26 결장 종양 모델에서, 단일 제제 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제와 RSLAIL-2 조합을 이용한 면역 요법과 비교시, 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, RSLAIL-2, 및 예시적인 지속 작용성 TLR 효현제(4-아암-PEG20k-CM-N-R848) 및 예시적인 4-1BB 효현제(항-CD137 항체 LOB12.3)의 조합의 항종양 반응을 평가 및 비교하기 위하여 수행되었다.
- [0435] 생체 내 모델: 사용된 마우스들은 각각의 옆구리에 이식된 2백만 CT26 종양 세포를 갖는 약 10주령 암컷 Balb/c 계통이었다. 세포들이 10일 동안 종양으로 성숙되도록 두어 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 부피에 도달되었다.
- [0436] 투여: 4-아암-PEG20k-CM-N-R848을, 2개의 종양들 중 하나(1차 종양)의 종양 내 또는 종양 주변(즉, 직접)에 40  $\mu$ l 부피로 투여하였다. 두번째로, 반대측 종양은 TLR 효현제(4-아암-PEG20k-CM-N-R848)로 직접 처리되지 않았다. RSLAIL-2는 0.8 mg/kg로 정맥 주사에 의해 전신 투여되었다. CD137 효현제는 복강내 주사에 의해 전신적으로 투여되었다.
- [0437] "RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848"로 표지화된 군: 마우스들은 100 내지 150 mm<sup>3</sup>의 종양 크기에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 종양 내/종양 주변에 20  $\mu$ g의 4-아암-20kPEG-CM-N-R848을 종양 내/종양 주변 투여되었다. 동일한 마우스들은 또한 4일차 및 13일차(즉, 투여일 0 후 4일차에 시작하여, 9일 간격으로 총 2회 투여됨)에 0.8 mg/kg의 RSLAIL-2를 정맥주사로 투여되었다.
- [0438] "100  $\mu$ g CD137 효현제"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 100  $\mu$ g의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다.
- [0439] "10  $\mu$ g CD137 효현제"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 10  $\mu$ g의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다.
- [0440] "100  $\mu$ g CD137 효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 100  $\mu$ g의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다. 동일한 마우스는 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에 첫번째 투여일(투여일 0)에 20  $\mu$ g의 4-아암-20kPEG-CM-N-R848로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 4일차 및 13일차에 0.8 mg/kg의 용량의 RSLAIL-2로 정맥내 투여되었다(즉, 마우스는 투여일 0 후 4일차에 시작하여 9일 간격으로 총 2회 용량으로 투여됨).
- [0441] "10  $\mu$ g CD137 효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 10  $\mu$ g의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다. 동일한 마우스는 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에 첫번째 투여일(투여일 0)에 20  $\mu$ g의 4-아암-20kPEG-CM-N-R848로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 4일차 및 13일차에 0.8 mg/kg의 용량의 RSLAIL-2로 정맥내 투여되었다(즉, 마우스는 투여일 0 후 4일차에 시작하여 9일 간격으로 총 2회 용량으로 투여됨).
- [0442] "비히클"로 표지화된 군: 마우스들은 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 범위의 종양 크기에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 40  $\mu$ l의 헵크 완충 식염수(4아암-PEG20k-CM-N-R848의 비히클)으로 종양 내/종양 주변에 투여되었다. 동일한 마우스들은 또한 4일차 및 13일차(즉, 4일차에 시작하여, 이들은 9일 간격으로 총 2회 투여됨)에 RSLAIL-2 비히클을 정맥주사로 투여되었다.
- [0443] 측정: 종양 부피는 주 당 3회의 캘리퍼 측정으로 수집하고, 식  $L \times W^2/2$ 를 이용하여 계산하였으며, 식에서 L은 종양 길이, W는 종양 너비이다.
- [0444] 결과: 데이터는 표 1에 제공되었다. 결과는 동일한 용량 수준에서 CD137 효현제 단일요법 및 효능이 불량한 RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848 이중 조합과 비교할 때 낮은 10  $\mu$ g의 CD137 효현제 용량 수준에서 삼중 조합에 대해 현저하였으며, 즉, RSLAIL-2 및 4-아암-PEG20k-CM-N-R848 및 CD137-효현제의 삼중 조합 투여는 4-아암-PEG20k-CM-N-R848이 주사에 의해 직접 투여된 1차 종양을 퇴치하는 데 효과적인일 뿐만 아니라, 2차 종양을 퇴치하는 데에도 효과적이었다. 완전한 종양 퇴행 후 21일 동안 종양 재생이 관찰되지 않았다. 또한, 더 낮은



10  $\mu\text{g}$ 의 CD137-효현제 용량 수준을 갖는 삼중 병용 요법 군에 대해 생존율이 100%로 유지된 반면, "10  $\mu\text{g}$  CD137-효현제" 단일요법 군 및 "RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848" 군에서 42일차까지의 생존율은 25%까지 감소되었다. "100  $\mu\text{g}$  CD137 효현제" 군은 단일요법으로서 89%의 생존율을 나타내었지만, 100  $\mu\text{g}$ 의 CD137-효현제 용량 수준과 RSLAIL-2 및 4-아암-PEG20k-CM-N-R848의 삼중 조합은 "100  $\mu\text{g}$  CD137 효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848" 군에서 15일차까지 독성 관련 생존율을 75%까지 감소시켰다.

표 1

마우스 생존 비율

처리 시작 후 일자	비허를 i.t.	4-아암-PEG20k-CM-N-R848 i.p. + RSLAIL-2 i.v.	단일 제제 10 $\mu\text{g}$ CD137-효현제 i.p.	단일 제제 100 $\mu\text{g}$ CD137-효현제 i.p.	10 $\mu\text{g}$ CD137-효현제 + 4-아암- PEG20k-CM-N-R848 i.p. + RSLAIL-2 i.v.	100 $\mu\text{g}$ CD137-효현제 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848 i.p. + RSLAIL-2 i.v.
0	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++
11	++++	++++	++++	++++	++++	++++
15	++	++++	++++	++++	++++	+++
19	+	++++	++++	++++	++++	+++
22	+	++++	++++	++++	++++	+++
26	+	++++	++	++++	++++	+++
33	+	++	+	++++	++++	+++
38	+	++	+	++++	++++	+++
42	+	+	+	++++	++++	+++

[0445]

[0446]

생존율은 다음과 같이 제공되었다:

[0447]

0%  $\leq$  + < 25%

[0448]

25%  $\leq$  ++ < 50%

[0449]

50%  $\leq$  +++ < 75%

[0450]

75%  $\leq$  ++++ < 100%

[0451]

10  $\mu\text{g}$  CD137-효현제를 이용한 단일 제제 처리는 투여 시작 후 42일차에 실험이 끝날 때까지 동물의 단지 25%만의 생존을 초래하였다. 생존한 25%의 동물 모두 완전한 반응을 보였으며, 처리측 종양 및 비처리측 종양 둘 다 제거되었다.

[0452]

100  $\mu\text{g}$  CD137-효현제를 이용한 단일 제제 처리는 투여 개시 후 42일차에 연구가 끝날 때까지 동물의 87.5%의 생존을 초래하였다. 생존한 군의 모든 동물은 완전한 반응을 보였으며, 두 종양 모두 제거되었다.

[0453]

RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848을 이용한 이중 제제 처리는 투여 개시 후 42일차에 연구가 끝날 때까지 동물의 12.5%의 생존을 초래하였다. 생존한 군의 모든 동물은 완전한 반응을 보였으며, 두 종양 모두 제거되었다.

[0454]

100  $\mu\text{g}$  CD137-효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848을 이용한 삼중 제제 처리는 투여 개시 후 42일차에 연구가 끝날 때까지 동물의 87.5%의 생존을 초래하였다. 생존한 군의 모든 동물은 완전한 반응을 보였으며, 두 종양 모두 제거되었다.

[0455]

가장 주목할 만하게, 10  $\mu\text{g}$  CD137-효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848을 이용한 삼중 조합 처리는

투여 개시 후 42일차에 연구가 끝날 때까지 동물의 100%의 생존을 초래하였다. 생존한 군의 모든 동물은 완전한 반응을 보였으며, 두 종양 모두 제거되었다. 놀랍게도, 1차 및 2차 종양 둘 다 치료 과정에서 제거되었다. 즉, 뜻밖에도, 저 용량 10  $\mu\text{g}$ 의 CD137-효현제 및 RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848을 이용한 조합 치료가 적어도 42일차까지 100% 생존의 삼중 조합 면역 요법과 대조적인 등가 용량 CD137-효현제 단일 제제 및 비효율적인 (sub-efficacious) RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-N-R848 이중 조합 면역 요법적 치료 방식(각각 42일차에 10% 및 20% 생존)에 비해 상당히 개선되었을 뿐만 아니라, 1차 종양(TLR 효현제로 주사됨) 및 2차 종양(1차 종양의 부위로부터 제거된, TLR 효현제를 직접 주사하지 않은 것) 둘 다의 완전한 박멸을 초래하였다.

[0456] 비히클 군은 생존한 동물이 없었다. 모든 동물이 치료 시작 후 11일차 내지 22일차 사이에 한계 종양 부피에 도달하였으므로 연구에서 제거되었다.

[0457] 실시예 20

[0458] 생체내 연구: 쥐과 CT-26 결장 종양 모델에서 RSLAIL-2 및 4-1BB 효현제의 투여

[0459] 본 연구는 쥐과 CT-26 결장 종양 모델에서, 단일 제제 4-1BB 효현제를 이용한 면역 요법과 비교시, 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, RSLAIL-2 및 예시적인 4-1BB 효현제(항-CD137 항체 LOB12.3)의 조합의 항종양 반응을 평가 및 비교하기 위하여 수행되었다.

[0460] 생체내 모델: 사용된 마우스는 각각의 옆구리에 이식된 2백만 CT26 종양 세포를 갖는 약 10주령 암컷 Balb/c 계통이었다. 세포가 10일 동안 종양으로 성숙되도록 두어 100 내지 150  $\text{mm}^3$  부피에 도달되었다.

[0461] RSLAIL-2를 0.8 mg/kg으로 정맥내 주사에 의해 전신적으로 투여하였다. CD137 효현제를 복강내 주사에 의해 전신적으로 투여하였다.

[0462] "100  $\mu\text{g}$  CD137 효현제"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150  $\text{mm}^3$  범위의 종양 크기에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 100  $\mu\text{g}$ 의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다.

[0463] "10  $\mu\text{g}$  CD137 효현제"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150  $\text{mm}^3$  범위의 종양 크기에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 10  $\mu\text{g}$ 의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다.

[0464] "100  $\mu\text{g}$  CD137 효현제 + RSLAIL-2"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150  $\text{mm}^3$  범위의 종양 크기에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 추가로 5일차 및 10일차에 총 3회 100  $\mu\text{g}$ 의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 4일차 및 13일차에 0.8 mg/kg의 용량의 RSLAIL-2로 정맥내 투여되었다(즉, 투여일 0 후 4일차에 시작하여 9일 간격으로 총 2회 용량으로 투여되었다).

[0465] "비히클"로 표지화된 군: 마우스는 100 내지 150  $\text{mm}^3$  범위의 종양 크기에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 40  $\mu\text{l}$ 의 Hank(Hank) 완충 식염수(4-아암-PEG20k-CM-N-R848의 비히클)로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 투여 4일차에 시작하여 9일 간격으로 총 2회 용량으로 4일차 및 13일차에 RSLAIL-2 비히클로 정맥내 투여되었다.

[0466] 측정: 종양 부피는 주 당 2 내지 3회의 캘리퍼 측정으로 수집하고, 식  $L \times W^2/2$ 를 이용하여 계산하였으며, 식에서 L은 종양 길이이고, W는 종양 너비이다.

[0467] 결과: 데이터는 표 2에 제공되었다.

표 2

마우스 생존 비율

처리 시작 후 일자	비허를 it.	단일 제제 10 $\mu$ g CD137- 효현제 i.p.	단일 제제 100 $\mu$ g CD137- 효현제 i.p.	10 $\mu$ g CD137-효현제 + + RSLAIL-2 i.v.
0	++++	++++	++++	++++
1	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++
6	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++
11	++++	++++	++++	++++
15	++	++++	++++	++++
19	+	++++	++++	++++
22	+	++++	++++	++++
26	+	++	++++	++++
33	+	+	++++	++++
38	+	+	++++	++++
42	+	+	++++	++++

[0468]

[0469]

생존율은 다음과 같이 제공되었다:

[0470]

0%  $\leq$  + < 25%

[0471]

25%  $\leq$  ++ < 50%

[0472]

50%  $\leq$  +++ < 75%

[0473]

75%  $\leq$  ++++ < 100%

[0474]

10  $\mu$ g CD137-효현제를 이용한 단일 제제 처리는 투여 시작 후 42일차에 실험이 끝날 때까지 동물의 단지 25%만의 생존을 초래하였다. 생존한 25%의 동물 모두 완전한 반응을 보였으며, 처리측 종양 및 비처리측 종양 둘 다 제거되었다.

[0475]

100  $\mu$ g CD137-효현제를 이용한 단일 제제 처리는 투여 개시 후 42일차에 연구가 끝날 때까지 동물의 87.5%의 생존을 초래하였다. 생존한 군의 모든 동물은 완전한 반응을 보였으며, 두 종양 모두 제거되었다.

[0476]

가장 주목할 만하게, 10  $\mu$ g의 CD137-효현제 + RSLAIL-2를 이용한 이중 조합 처리는 투여 개시 후 42일차에 연구가 끝날 때까지 동물의 100%의 생존을 초래하였다. 생존한 군의 모든 동물은 완전한 반응을 보였으며, 두 종양 모두 제거되었다. 놀랍게도, 1차 및 2차 종양 둘 다 치료 과정에서 제거되었다. 즉, 뜻밖에, 저 용량 10  $\mu$ g의 CD137-효현제 및 RSLAIL-2를 이용한 조합 치료가 42일차에 25% 생존율의 등가 용량의 CD137-효현제 단일 제제에 비해 상당히 개선되었다.

[0477]

실시예 21

[0478]

쥐과 CT-26 결장 종양 모델에서 RSLAIL-2 및 TLR 효현제 및 4-1BB 효현제의 투여

[0479]

본 연구는 쥐과 CT-26 결장 종양 모델에서, 단일 제제 4-1BB 효현제 및 TLR 효현제와 RSLAIL-2 조합을 이용한 면역 요법과 비교시, 예시적인 지속 작용성 IL-2R $\beta$ -편향 효현제, RSLAIL-2, 및 예시적인 지속 작용성 TLR 효현제(4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848) 및 예시적인 4-1BB 효현제(항-CD137 항체 LOB12.3)의 조합의 항종양 반응을 평가 및 비교하기 위하여 수행되었다.

- [0480] 생체내 모델: CT-26 종양 세포가 각각의 옆구리에 이식된 약 10주령 암컷 Balb/c 계통의 마우스가 사용되었다. 세포가 종양으로 성숙되도록 하여(예를 들어, 10일 동안) 적합한 부피(예를 들어, 100 내지 150 mm<sup>3</sup> 부피)에 도달하였다.
- [0481] 투여: 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848을 적절한 용량으로(예를 들어, 40 µl의 부피로) 2개의 종양 중 하나(1차 종양)에 종양 내 또는 종양 부근에(즉, 직접) 투여하였다. 부차적으로, 반대측 종양은 TLR 효현제(4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848)로 처리될 수 없었다. RSLAIL-2를 정맥내 주사로 (예를 들어, 0.8 mg/kg으로) 전신적으로 투여하였다. CD137 효현제를 복강내 주사로 전신적으로 투여하였다.
- [0482] "RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848"로 표지화된 군: 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup>)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 4-아암-20kPEG-CM-글리신-N-R848(예를 들어, 20 µg)로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 적절한 용량(예를 들어, 4일차 및 13일차에 0.8 mg/kg으로 총 2회 용량)으로 RSLAIL-2로 정맥내 투여되었다.
- [0483] "100 µg CD137 효현제"로 표지화된 군: 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup> 범위)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 선택적으로 추가 일차에(예를 들어, 5일차 및 10일차에) 적절한 총 횟수로(예를 들어, 3회) 100 µg의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다.
- [0484] "10 µg CD137 효현제"로 표지화된 군: 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup> 범위)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 선택적으로 추가 일차에(예를 들어, 5일차 및 10일차에) 적절한 총 횟수로(예를 들어, 3회) 10 µg의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다.
- [0485] "100 µg CD137 효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848"로 표지화된 군: 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup> 범위)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 선택적으로 추가 일차에(예를 들어, 5일차 및 10일차에) 투여되어 적절한 총 횟수로(예를 들어, 총 3회) 100 µg의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다. 동일한 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup>)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 적절한 용량의 4-아암-20kPEG-CM-글리신-N-R848(예를 들어, 20 µg)로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 적절한 용량(예를 들어, 별도의 날에 0.8 mg/kg)의 RSLAIL-2로 정맥내 투여되었다.
- [0486] "10 µg CD137 효현제 + RSLAIL-2 + 4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848"로 표지화된 군: 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup> 범위)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 시작하여 선택적으로 추가 일차에(예를 들어, 5일차 및 10일차에) 투여되어 적절한 횟수로(예를 들어, 총 3회) 10 µg의 CD137 효현제로 복강내 투여되었다. 동일한 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup>)에 첫번째 투여일(투여일 0)에 적절한 용량의 4-아암-20kPEG-CM-글리신-N-R848(예를 들어, 20 µg)로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 적절한 용량(예를 들어, 0.8 mg/kg)의 RSLAIL-2로 적절한 투여 횟수(예를 들어, 4일 및 9일 간격으로) 정맥내 투여되었다.
- [0487] "비히클"로 표지화된 군: 마우스는 적절한 종양 크기(예를 들어, 100 내지 150mm<sup>3</sup> 범위)에, 첫번째 투여일(투여일 0)에 40 µl의 행크 완충 식염수(4-아암-PEG20k-CM-글리신-N-R848의 비히클)로 종양 내/종양 부근에 투여되었다. 동일한 마우스는 또한 적절한 일차에(예를 들어, 투여 4일차에 시작하여 9일 간격으로 총 2회 용량으로 4일차 및 13일차에) RSLAIL-2 비히클로 정맥내 투여되었다.
- [0488] 측정: 종양 부피는 주 당 2 내지 3회의 캘리퍼 측정으로 수집하고, 식  $L \times W^2/2$ 를 이용하여 계산하였으며, 식에서 L은 종양 길이이고, W는 종양 너비이다.
- [0489] **참고문헌의 포함**
- [0490] 본 명세서에서 언급된 모든 논문, 책, 특허, 특허 공보 및 기타 다른 간행물은 그 전체로서 참고문헌으로 포함된다. 이러한 명세서의 교시와 참고로 포함된 기술이 일치되지 않는 경우, 본 명세서에서의 교시 및 정의에서의 의미가 우선할 것이다(특히, 본원에 첨부된 청구범위에 사용된 용어와 관련하여). 예를 들어, 본 출원 및 참고로 포함된 공보가 동일한 용어를 다르게 정의하는 경우, 용어의 정의는 정의가 위치한 문헌의 교시 내에서 유지되어야 한다.