



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0122748
(43) 공개일자 2016년10월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 - A61K 38/20 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
 - A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
 - A61K 47/48 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
 - C07K 16/30 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 - A61K 38/2013 (2013.01)
 - A61K 39/39541 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7023162
- (22) 출원일자(국제) 2015년02월20일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년08월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/IN2015/000099
- (87) 국제공개번호 WO 2015/125159
 국제공개일자 2015년08월27일
- (30) 우선권주장
 - 499/DEL/2014 2014년02월21일 인도(IN)
 - 3087/DEL/2014 2014년10월29일 인도(IN)

- (71) 출원인
 넥타르 테라퓨틱스 (인디아) 프라이빗 리미티드
 인도 500 078 안드라 프라데쉬 하이데라바드 랑가
 레디 디스트릭트 샤메르페트 만달 말라크렛 탈가디
 에스와이 넘버 101/102
 넥타르 테라퓨틱스
 미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미
 션 베이 블러바드 455 스위트 100
- (72) 발명자
 아데팔리 무랄리 크리쉬나
 인도 500 015 안드라 프라데쉬 세쿰데라바드 티처
 스 콜로니 주피터 콜로니 플롯 넘버4
 차리치 데보라 에이치
 미국 94706 캘리포니아주 올버니 테일러 스트리트
 909
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체와 조합한 IL-2 R 베타-선택적 효현제**

(57) 요약

본 발명은 (특히) 암으로 고통받고 있는 환자에게, (a) IL-2R β -활성화량의 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제; 및 (b) CTLA-4 경로-저해량의 항-CTLA-4 항체 또는 PD-1 경로-저해량의 항-PD-1 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/48215 (2013.01)
C07K 16/2815 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/3084 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

칸탁 세마

미국 94044 캘리포니아주 퍼시픽카 웨일라 레인
1230

리 스티븐 로버트

미국 94578 캘리포니아주 샌 레안드로 이스트 14번
스트리트 15956 넘버209

명세서

청구범위

청구항 1

암으로 고통받고 있는 환자에게 (a) IL-2R β -활성화량의 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제; 및 (b) CTLA-4 경로-저해량의 항-CTLA-4 항체 또는 PD-1 경로-저해량의 항-PD-1 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 환자는 인간인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 암은 고형암인, 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 고형암은 유방암, 난소암, 결장암, 결장직장암, 위암, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 갑상선암, 신장암, 담관암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암, 호지킨병 및 부신피질암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 암은 결장암인, 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 암은 유방암인, 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)는 단계 (b)가 수행되기 전에 수행되는 것인, 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)는 단계 (b)가 수행된 후에 수행되는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (a)와 (b)는 동시에 수행되는 것인, 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] **관련출원에 대한 상호참조**

[0002] 본 출원은 2014년 10월 29 일 출원된 인도 특허 출원 번호 3087/DEL/2014, 및 2014년 2월 21 일 출원된 인도 특허 출원 번호 499/DEL/2014에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이들의 개시내용은 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] **본 발명의 기술분야**

[0004] 본 발명은 (특히) 암 화학요법 분야에 관한 것이며, 환자에게 다른 약리학적 활성제와 조합하여 지속 작용성 IL-2R α β -선택적 효현제를 투여하는 것에 의한 암으로 고통받는 개체의 치료와 관련된다.

배경기술

[0005] 인터류킨-2 수용체(IL-2R)는 IL-2 사이토카인에 결합하고 반응하는 림프구와 같은 특정 면역 세포의 표면 상에 서 발현된 이형삼량체 단백질이다. IL-2 수용체는 3 개의 서브유닛(IL-2R α , IL-2R β 및 IL-2R γ)으로

구성되며, 각각의 IL-2R α 및 IL-2R β 는 IL-2에 대해 결합 친화도를 갖는 반면, IL-2R γ 단독은 눈에 띄는 친화도를 갖지 않는다. 문헌[Theze et al. (1994) *Immunol. Today* 17(10):481-486]. 추가로, IL-2R $\alpha\beta$ 이형이량체는 사슬 단독 중 하나에 대해 IL-2를 결합할 때보다 더 빠른 결합 속도 및 더 느린 해리 속도를 가진다. 문헌[Liparoto et al. *J. Mol. Recognit.*12(5):316-321].

- [0006] 면역 반응을 억제하는 것을 초래하는 CD4+ 조절 T-세포는 IL-2R의 IL-2R $\alpha\beta$ 형태를 우선적으로 발현시킨다. 따라서, IL-2R $\alpha\beta$ 의 효현제인 화합물의 투여는 면역 반응을 억제하는 것으로 예상될 수 있다.
- [0007] 면역 반응을 향상시키는 것을 초래하는 CD8+ 기억 T-세포는 IL-2R의 IL-2R β 형태를 우선적으로 발현시킨다. IL-2R β 에 대한 효현제인 화합물의 투여는 (예를 들어, CD8+ 기억 T-세포의 증식을 증가시킴으로써) 면역 반응을 향상시키는 것으로 예상될 수 있다.
- [0008] 따라서, IL-2R β -선택적 효현제의 투여는 조절 T-세포의 면역-억제 효과를 감소시키는 반면 CD8+ 기억 T-세포를 증가시킴으로써, 암 세포를 제거하는 환자 자신의 면역계를 동원하는 것으로 예상되기 때문에 특정 암으로 고통받는 환자에게 유리할 것이다. 최적으로는, 이러한 IL-2R β -선택적 효현제는 또한 투여 후 상대적으로 긴 노출을 나타냄으로써 치료에 대한 환자의 반응을 추가로 개선시킬 것이다.
- [0009] IL-2R β -선택적 효현제(이는 직접적으로 면역활성화함)의 투여를 통한 암 치료에서 암 환자의 면역계를 동원하는 것은 면역억제 경로의 길항제(예를 들어, CTLA-4 및 PD-1의 길항제)의 투여를 통해 추가로 향상될 수 있다.
- [0010] 따라서, 본 발명은 (특히), 예를 들어 암으로 고통받고 있는 환자에게 면역억제 경로의 악리기반 길항제와 조합하여 IL-2R β -선택적 효현제를 투여함으로써 암의 더 효과적인 치료를 제공할 지속적인 필요를 해결하는 것을 추구한다.
- [0011] 당업계의 이러한 필요와 기타 다른 필요는 본 발명에 의해 해결된다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 암 환자에게: (a) IL-2R β -활성화량의 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제; 및 (b) CTLA-4 경로-저해량의 항-CTLA-4 항체 또는 PD-1 경로-저해량의 항-PD-1 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 명확하게, 본 방법에 따른 단계들의 순서에 관해, 달리 표시되지 않는 한, 상기 방법은 단계들의 순서로 제한되지 않으며, 단계 (a)는 단계 (b)를 수행하기 전에, 후에 또는 동시에 수행될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 추가 구현예는 다음의 설명 및 청구범위에서 제시된다.

도면의 간단한 설명

- [0014] **도 1, 도 2 및 도 3**은 CT26 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 수용체-선택적, 지속 작용성 IL-2 효현제의 효능 연구와 연관된 평균 종양 용적, 상대적 종양 용적 및 체중 각각의 플롯이며, 이 연구는 실시예 2에서 추가로 기재한다.
- 도 4, 도 5 및 도 6**은 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 수용체-선택적, 지속 작용성 IL-2 효현제의 효능 연구와 연관된 30 일 동안의 평균 종양 용적, 106 일 동안의 평균 종양 용적, 및 체중의 플롯이며, 이 연구는 실시예 3에서 추가로 기재한다.
- 도 7 및 도 8**은 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 함께 프로류킨의 효능 연구에 비교한 항-CTLA-4 항체와 조합한 수용체-선택적, 지속 작용성 IL-2 효현제의 효능 연구와 연관된 종양 용적 및 체중 각각의 플롯이며, 이 연구는 실시예 4에서 추가로 기재한다.
- 도 9 및 도 10**은 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 수용체-선택적, 지속 작용성 IL-2 효현제의 유세포 분석을 수반하는 효능 연구와 연관된 11 일 동안의 종양 용적 및 체중 각각의 플롯이며, 이 연구는 실시예 5에서 추가로 기재한다.
- 도 11 및 도 12**는 각각 실시예 5에서 추가로 기재한 유세포 분석에 대응하는 면역 세포 집단의 종양 및 비장 각각의 그래프를 포함한다.
- 도 13 및 도 14**는 CT26 종양 모델에 대한 항-PD-1 항체와 조합한 수용체-선택적, 지속 작용성 IL-2 효현제의 효

능 연구와 연관된 평균 종양 용적 및 체중 각각의 플롯이며, 이 연구는 실시예 6에서 추가로 기재한다.

도 15는 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구의 I상 후 평균 종양 용적 및 체중의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 16은 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구의 I상 후에 상대적 평균 종양 용적 및 체중 변화의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 17은 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구의 II상 후 상대적 체중 변화의 플롯을 나타낸다.

도 18은 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구의 II상 후 평균 종양 용적 및 체중 변화의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 19는 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구의 III상 후 평균 종양 용적의 플롯을 나타낸다.

도 20은 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구의 III상 후 체중 변화 및 상대적 체중 변화의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 21은 실시예 7에 추가로 기재한 3상 재시험감염 연구 동안 평균 종양 용적 및 개개 종양 용적의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 22는 실시예 8에 추가로 기재한 RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 조합 연구와 관련하여 제0 일 내지 제11 일의 평균 종양 용적 및 체중의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 23은 실시예 8에 추가로 기재한 RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 조합 연구와 관련하여 제0 일 내지 제11 일의 상대적 평균 종양 용적 및 체중의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 24는 실시예 8에 추가로 기재한 RSLAIL-2 및 항-PD-1 조합 연구와 관련하여 제0 일 내지 제11 일의 평균 종양 용적 및 체중의 2 개 플롯을 나타낸다.

도 25는 실시예 8에 추가로 기재한 RSLAIL-2 및 항-PD-1 조합 연구와 관련하여 제0 일 내지 제11 일의 상대적 평균 종양 용적 및 체중의 2 개 플롯을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥에서 달리 명확하게 지시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0016] 본 발명을 기재하고 청구함에 있어서, 다음의 용어는 이하에 기재된 정의에 따라 사용될 것이다.

[0017] "수용성, 비-펩타이드 중합체"는 실온에서 수 중에서 적어도 35%(중량 기준) 가용성, 바람직하게는 70%(중량 기준) 초과, 더 바람직하게는 95%(중량 기준) 초과인 가용성인 중합체를 지칭한다. 통상적으로, "수용성" 중합체의 여과되지 않은 수성 제조물은 여과 후 동일한 용액에 의해 전달된 빛의 양의 적어도 75%, 더 바람직하게는 적어도 95%를 전달한다. 그러나 수용성 중합체는 수중에서 적어도 95%(중량 기준) 가용성이거나 또는 수중에서 완전히 가용성인 것이 가장 바람직하다. "비펩타이드성"인 것에 대하여, 중합체는 그것이 아미노산 잔기의 35%(중량 기준) 미만일 때 비펩타이드성이다.

[0018] 용어 "단량체", "단량체 서브유닛" 및 "단량체 단위"는 본 명세서에서 상호호환적으로 사용되며, 중합체의 기본 구조 단위 중 하나를 지칭한다. 동중중합체의 경우에, 단일 반복 구조 단위는 중합체를 형성한다. 공중합체의 경우에, 2 개 이상의 구조적 단위가 (패턴으로 또는 무작위로) 반복되어 중합체를 형성한다. 본 발명과 관련하여 사용된 바람직한 중합체는 동중중합체이다. 수용성, 비펩타이드성 중합체는 연속으로 부착된 하나 이상의 단량체를 포함하여 단량체의 사슬을 형성한다.

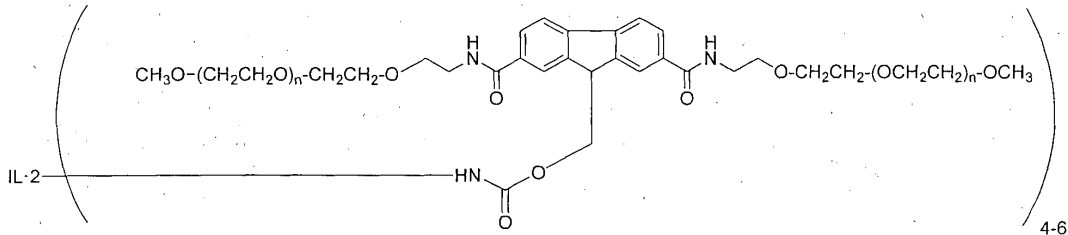
[0019] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "PEG" 또는 "폴리에틸렌글리콜"은 임의의 수용성 폴리(에틸렌옥사이드)를 포함하는 것으로 의미된다. 달리 나타내지 않는 한, "PEG 중합체" 또는 폴리에틸렌글리콜은, 중합체가, 예를 들어 컨쥬게이션을 위해 별개의 말단 캡핑 모이어티 또는 작용기를 함유할 수도 있지만, 실질적으로 모든(바람직하게는 모든) 단량체 서브유닛이 에틸렌옥사이드 서브유닛인 것이다. 본 발명에서 사용을 위한 PEG 중합체는 2 가지의 구조, 즉 말단의 산소(들)가, 예를 들어 합성 전환 동안 대체되었는지 여부에 따라서 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 또는 $-(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2-$ 중 하나를 포함할 것이다. 상기 진술한 바와 같이, PEG 중합체에 대해, 변수(n)는 약 3 내

지 4000의 범위에 있고, 말단기 및 전반적인 PEG의 구조는 다를 수 있다.

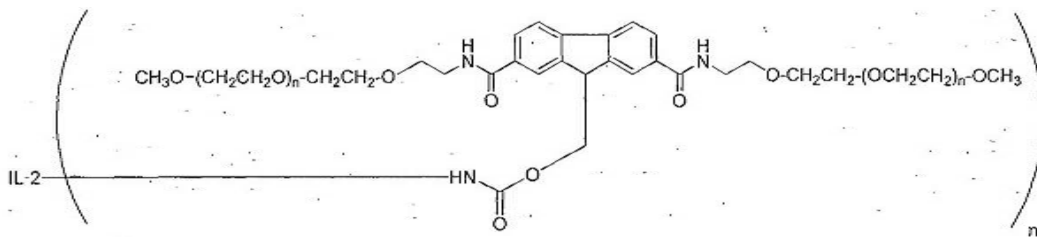
- [0020] 중합체의 기하학적 구조 또는 전반적인 구조와 관련하여 "분지된"은 분지점으로부터 연장되는 2 개 이상의 중합체 "암"을 갖는 중합체를 지칭한다.
- [0021] "생리적으로 절단가능한" 또는 "가수분해가능한" 또는 "분해가능한" 결합은 생리학적 조건 하에서 물과 반응하는(즉, 가수분해되는) 상대적으로 불안정적인 결합이다. 수 중에서 가수분해하는 결합의 경향은 주어진 분자 내에서 2 개의 원자를 연결하는 일반적 유형의 결합뿐만 아니라 이들 원자에 부착된 치환에 좌우될 수 있다. 적절한, 가수분해에 불안정적인 또는 약한 결합은 카복실산에스테르, 인산에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 티오에스테르 및 탄산염을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0022] "효소로 분해가능한 결합"은 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 결합을 의미한다.
- [0023] "안정적인" 연결 또는 결합은 수 중에서 실질적으로 안정적이며, 즉 장기간의 시간에 걸쳐 임의의 주목할 만한 정도로 생리적 조건 하에서 가수분해를 겪지 않는 화학적 결합을 지칭한다. 가수분해에 안정적인 연결의 예는 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 사슬에서), 에테르, 아마이드, 우레탄, 아민 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일반적으로, 안정적인 연결은 생리적 조건 하에서 1 일당 약 1% 내지 2% 미만의 가수분해율을 나타내는 것이다. 대표적인 화학적 결합의 가수분해율은 대부분의 표준 화학 교재에서 찾을 수 있다.
- [0024] "실질적으로" 또는 "본질적으로"는 거의 전체적으로 또는 완전하게, 예를 들어, 95% 이상, 더 바람직하게는 97% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 98% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 99% 이상, 또한 훨씬 더 바람직하게는 99.9% 이상을 의미하며, 99.99% 이상은 일부 주어진 양의 가장 바람직한 것이다.
- [0025] "약제학적으로 허용가능한 부형제" 또는 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 환자에게 상당한 유해한 독성학적 효과를 전혀 야기하지 않고 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 성분을 지칭한다.
- [0026] 용어 "환자"는 본 명세서에 기재된 바와 같은 본 발명의 화합물의 투여에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 병태를 앓고 있거나 그러한 병태에 걸리기 쉬운 살아있는 유기체를 지칭하며, 인간과 동물을 둘 다 포함한다.
- [0027] 상기 나타낸 바와 같이, 본 발명은 (특히) 암으로 고통받고 있는 환자에게 (a) IL-2R β -활성화량의 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제; 및 (b) CTLA-4 경로-저해량의 항-CTLA-4 항체 또는 PD-1 경로-저해량의 항-PD-1 항체를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 투여하는 단계 (a) 및 (b)에 관해, 이들 투여하는 단계는 어느 순서로도(뿐만 아니라 동시에) 수행될 수 있고, 본 발명은 이에 관해 제한되지 않는다. 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 투여하는 단계 (a)는 투여하는 단계 (b) 전에 수행될 것이다. 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 투여하는 단계 (b)는 투여하는 단계 (a) 전에 수행될 것이다. 하나 이상의 구현예에서, 투여하는 단계 (a)와 (b)는 둘 다 동시에 수행될 것이다. 추가로, 하나 이상의 구현예에서, 단계 (a) 및/또는 (b)는 반복적으로 투여될 것이다. 추가로, 하나 이상의 구현예에서, 단계 (a) 및 (b)는 단지 1 회로 수행될 것이다.
- [0028] 본 명세서에 기재된 치료 방법은 환자의 치료를 감독하는 임상가가 상기 치료 방법이 효과적인 것으로 여긴다면, 지속될 수 있다. 치료 방법이 효과적이라는 것을 나타내는 비제한적 매개변수는, 종양 수축(종양 및/또는 용적에 대해); 개개 종양 콜로니 수의 감소; 종양 제거; 및 무 진행 생존을 포함한다.
- [0029] 청구된 방법에 따른 요법의 과정과 연관된 시간의 예시적 길이는 약 1 주; 2 주; 약 3 주; 약 4 주; 약 5 주; 약 6 주; 약 7 주; 약 8 주; 약 9 주; 약 10 주; 약 11 주; 약 12 주; 약 13 주; 약 14 주; 약 15 주; 약 16 주; 약 17 주; 약 18 주; 약 19 주; 약 20 주; 약 21 주; 약 22 주; 약 23 주; 약 24 주; 약 7 개월; 약 8 개월; 약 9 개월; 약 10 개월; 약 11 개월; 약 12 개월; 약 13 개월; 약 14 개월; 약 15 개월; 약 16 개월; 약 17 개월; 약 18 개월; 약 19 개월; 약 20 개월; 약 21 개월; 약 22 개월; 약 23 개월; 약 24 개월; 약 30 개월; 약 3 년; 약 4 년 및 약 5 년을 포함한다.
- [0030] 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제를 투여하는 빈도에 관해, 당업자는 적절한 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 임상가는 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제를 상대적으로 덜 빈번하게(예를 들어, 2 주마다 1 회) 투여하도록 결정하고 환자에 의해 용인되는 투약 사이의 기간을 점진적으로 단축시킬 수 있다. 항-CTLA-4 항체 및 항-PD-1 항체를 투여하는 빈도에 관해, 이들 제제에 대한 빈도는 유사한 방식으로 결정될 수 있다. 추가로, 일부 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제, 항-CTLA-4 항체, 항-PD-1 항체는 앞서 임상 시험되었거나 또는 상업적으로 입수가능하기 때문에, 적절한 투여 빈도를 얻기 위해 또한 문헌을 참고할 수 있다(일부 조절은 치료 요법의 조합 효과를 고려하여 필수적일 수 있다는 것을 유념한다).

[0031] 본 명세서에 기재된 방법은 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제의 투여를 수반한다. 이와 관련하여, 효현제가 동일한 시험관내 모델에서의 IL-2Rα β에 대한 결합 친화도 보다 적어도 5 배 더 큰(더 바람직하게는 적어도 10 배 더 큰) IL-2Rβ에 대한 시험관내 결합 친화도를 나타내고, IL-2보다 생체내 반감기가 적어도 10배 더 크게 효과적이라면(생체내 소멸 IL-2에 기반한 반감기) 본 발명은 임의의 특이적 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제로 제한되지 않는다. 예로서, 표준으로서 IL-2에 대한 결합 친화도를 측정할 수 있다. 이와 관련하여, 본 개시 내용의 실시예 1에서 언급한 RSLAIL-2는 IL-2에 비해 IL-2Rα β에 대해 친화도의 약 60배 감소를 나타낼 뿐만 아니라, IL-2에 비해 IL-2Rβ에 대해 친화도의 약 5 배 감소를 나타낸다.

[0032] 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제의 비제한적 예는 WO 2012/065086에 기재되어 있다. 예시적인 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제는 본 출원에서 실시예 1에 언급한 RSLAIL-2이다. 이와 관련하여, RSLAIL-2는 다음의 식에 의해 포함되는 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물이며,



[0033] 식 중, IL-2는 IL-2의 잔기이다. 하나 이상의 구현예에서, 상기 조성물은 다음의 화학식에 의해 포함되는 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 10% 이하(몰량 기준), 바람직하게는 5% 이하(몰량 기준)를 함유하며,



[0034] 식 중 IL-2는 IL-2의 잔기이며, (n)은 1, 2, 3, 7 및 7 초과로 이루어진 군으로부터 선택되는 정수이다.

[0035] 본 명세서에 기재된 방법은 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체의 투여를 수반한다. 항-CTLA-4 항체에 관해, 이들은 공지되어 있고 트레멜리무맙 및 이필리무맙을 포함한다. 항-PD-1 항체에 관해, 이들은 공지되어 있고, 니볼루맙 및 램브롤리주맙, AMP-224, MDPL3280A, MEDI4736 및 MSB0010718C를 포함한다.

[0036] 주어진 혼합물이 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체로서 작용할 수 있는지 여부를 결정하기 위한 분석은 당업자에 의해 일상적인 실험을 통해 결정될 수 있다.

[0037] 본 명세서에 기재된 방법에 따르면, 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제는 환자에게 IL-2Rβ-활성화량으로 투여된다. 당업자는 얼마만큼의 주어진 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제가 IL-2Rβ에서 임상적으로 적절한 효현제 활성을 제공하기에 충분한지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 당업자는 문헌을 참고할 수 있고/있거나 일련의 증가하는 양의 지속 작용성 IL-2Rβ-선택적 효현제를 투여하고, IL-2Rβ의 임상적 효현제 활성을 제공하는 양 또는 양들을 결정할 수 있다.

[0038] 그러나 하나 이상의 예에서, IL-2Rβ-활성화량은, 약 0.01 mg/kg 내지 1 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg; 약 1 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg; 약 2 mg/kg 내지 약 900 mg/kg; 약 3 mg/kg 내지 약 800 mg/kg; 약 4 mg/kg 내지 약 700 mg/kg; 약 5 mg/kg 내지 약 600 mg/kg; 약 6 mg/kg 내지 약 550 mg/kg; 약 7 mg/kg 내지 약 500 mg/kg; 약 8 mg/kg 내지 약 450 mg/kg; 약 9 mg/kg 내지 약 400 mg/kg; 약 5 mg/kg 내지 약 200 mg/kg; 약 2 mg/kg 내지 약 150 mg/kg; 약 5 mg/kg 내지 약 100 mg/kg; 약 10 mg/kg 내지 약 100 mg/kg; 및 약 10 mg/kg 내지 약 60 mg/kg의 범위 중 하나 이상에 의해 포함되는 양이다.

[0039] 본 명세서에 기재된 방법에 따르면, CTLA-4 경로-저해량의 항-CTLA-4 항체가 투여되거나 또는 PD-1 경로-저해량의 항-PD-1 항체가 투여된다. 당업자는 얼마만큼의 주어진 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체가 CTLA-4 경로 또는 PD-1 경로 각각의 임상적으로 적절한 저해를 제공하기에 충분한지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 당업자는 문헌을 참고할 수 있고/있거나 일련의 증가하는 양의 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체를 투여하고, CTLA-4 경

로 또는 PD-1 경로의 임상적으로 적절한 저해를 제공하는 양 또는 양들을 결정할 수 있다.

[0042] 그러나 하나 이상의 예에서, CTLA-4 및 PD-1 경로-저해량은, 약 1 mg/kg 내지 약 1000 mg/kg; 약 2 mg/kg 내지 약 900 mg/kg; 약 3 mg/kg 내지 약 800 mg/kg; 약 4 mg/kg 내지 약 700 mg/kg; 약 5 mg/kg 내지 약 600 mg/kg; 약 6 mg/kg 내지 약 550 mg/kg; 약 7 mg/kg 내지 약 500 mg/kg; 약 8 mg/kg 내지 약 450 mg/kg; 약 9 mg/kg 내지 약 400 mg/kg; 약 5 mg/kg 내지 약 200 mg/kg; 약 2 mg/kg 내지 약 150 mg/kg; 약 5 mg/kg 내지 약 100 mg/kg; 약 10 mg/kg 내지 약 100 mg/kg; 및 약 10 mg/kg 내지 약 60 mg/kg의 범위 중 하나 이상에 의해 포함된다.

[0043] 확인을 위해, CTLA-4 및 PD-1 경로-저해량의 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체 각각에 대해 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 저해량 및 저해 정도는 크게 다를 수 있고, 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제를 이용하는 이들 중 하나의 조합은 여전히 효과적일 수 있다. 예를 들어, CTLA-4 또는 PD-1 경로 각각을 단지 최소로 저해하는 항-CTLA-4 항체 또는 항-PD-1 항체의 양은 청구된 발명의 방법이 임상적으로 의미있는 반응을 야기한다면 여전히 본 명세서에서 사용되는 저해량일 수 있다. 따라서 또한, 청구된 발명의 방법이 임상적으로 의미있는 반응을 야기한다면, 충분히 장시간의 기간 동안 IL-2R β 에서 최소 효현제 활성화만을 나타내는 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제의 양은 여전히 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제일 수 있다. 일부 예에서, (예를 들어) 상승적 반응에 기인하여, CTLA-4 또는 PD-1 경로의 최소 저해는 지속 작용성 IL-2R β -선택적 효현제의 존재 하에서만 필요할 수 있다. 또 다른 예에서, (예를 들어) 상승적 반응에 기인하여, IL-2R β 의 최소 효현제 활성화는 CTLA-4 및 PD-1 경로 저해의 존재 하에서 필요할 수 있다.

[0044] 투여될 실제 용량은 대상체의 연령, 체중 및 일반적 상태뿐만 아니라 치료 중인 병태의 중증도, 의료인의 판단 및 투여 중인 컨쥬게이트에 따라 다를 것이다.

[0045] 본 발명은 (특히) 화합물을 이용하는 치료에 반응하는 병태로 고통받고 있는 환자를 치료하는데 유용한 방법을 제공한다. 예를 들어, 환자는 개개 제제 단독뿐만 아니라 조합물에 대해 반응성일 수 있지만, 조합물에 대해 더 반응성이다. 추가 예로서, 환자는 개개 제제 중 하나에 대해 비반응성일 수 있지만, 조합물에 대해 반응성일 수 있다. 또한 추가 예로서, 환자는 개개 제제 단독 중 하나에 대해 비반응성일 수 있지만, 조합물에 대해 반응성이다.

[0046] 상기 방법은 주사를 통해 치료적 유효량의 활성제를 투여하는 단계를 포함한다. 기타 다른 투여 방식, 예컨대 폐, 비강, 협측, 직장, 설하 및 경피가 또한 상정된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 동맥내, 복강내, 심장내, 척추강내 및 근육내 주사뿐만 아니라 인퓨전 주사를 포함한다. 상기 방법의 각각의 약학적 성분은 별도로 투여될 수 있다. 대안적으로, 2 가지 약학적 성분의 투여는 동시일 것이 요망되면(그리고 2 가지 약학적 성분이 함께 그리고 주어진 제형에서 양립가능하면), 동시 투여는 단일 투약 형태/제형의 투여(예를 들어, 약리학적 활성제를 둘 다 함유하는 정맥내 제형의 정맥내 투여)를 통해 달성될 수 있다. 당업자는 2 가지 주어진 약학적 성분이 함께 그리고 주어진 제형에서 양립가능한지의 여부를 일상적인 시험을 통해 결정할 수 있다.

[0047] 현재 기재된 방법은 본 방법에 의해 치료되거나 또는 예방될 수 있는 임의의 병태로 고통받고 있는 환자를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 병태는 암, 예컨대 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프혈관육종, 림프 내피 육종, 활막종, 증피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 전립선암종, 편평세포암종, 기저세포암, 선암종, 땀샘암, 피지선 암, 유두암, 유두 선암종, 낭선종, 수질암, 기관지원성암, 신세포암, 간세포암, 담도암, 융모암, 정상피종, 배아암, 윌름 종양, 자궁경부암, 고환암, 폐암, 소세포 폐암, 방광암, 상피암, 신경교종, 성상세포종, 속질모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 술방울샘종, 혈관아세포종, 청신경초종, 희돌기세포신경교종, 뇌수막종, 흑색종, 신경아세포종, 망막아세포종 및 백혈병이 있다.

[0048] 본 명세서에 언급된 모든 논문, 서적, 특허, 특허 공개 및 기타 다른 간행물은 전체가 참고로 포함된다. 본 명세서의 교시와 참고로 포함된 기술 사이에 불일치가 있는 경우에는, (특히 본 명세서에 첨부된 청구범위에서 사용된 용어에 대해) 본 명세서의 교시 및 정의의 의미가 우선할 것이다. 예를 들어, 참고로 포함된 출원 및 공개가 동일한 용어를 상이하게 정의하는 경우, 해당 용어의 정의는 정의가 있는 문헌의 교시 내에서 보존될 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] 본 발명은 특정의 바람직하고 구체적인 구현예와 함께 기재되었지만, 앞의 기재뿐만 아니라 다음의 실시예는 본

발명의 범주를 설명하는 것으로 의도되며 제한하지 않는 것으로 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 본 발명의 범주 내의 다른 양태, 이점 및 변형은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 명확할 것이다.

[0051] 실시예 2 내지 7에서 언급한 항-CTLA-4 항체는 UC10-4F10-11 혼성세포주(ATCC)로부터 정제된 항-마우스 CLTA-4 항체에 대응한다. 세포를 1×10^5 개 내지 1×10^6 개 세포/mL의 밀도로 PFHM-II 배지(Invitrogen)에서 유지시켰다. 정제 전에, 배지를 원심분리시켜, 세포를 제거하였다. 배지의 pH를 NaOH를 이용하여 8로 조절하고 나서, 그것의 전도도를 물을 이용하여 희석시킴으로써 7 mS/cm로 낮추었다. pH/전도도 조절 배지를 Q-FF 칼럼 상에 장입하고 나서, 항-마우스 CLTA-4 항체를 NaCl 구배를 사용하여 용리시켰다.

[0052] 항-CTLA-4의 그의 항원에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 결정하고 나서, 20 pM인 것으로 결정하였다.

[0053] 항-PD-1을 BioXcell로부터 구입하였다. 이를 다음의 특징을 지니는 용액으로서 얻었다: 농도: 4.76 mg/mL; 내독소: <0.63 EU/mg; 제형: PBS pH 7; 순도: >95%; 아이소타입: 래트 IgG2a; 및 흡광계수: 1.33. 항-PD-1의 그의 항원에 대한 친화도를 표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 측정하고 나서, 1 nM인 것으로 확인하였다. 구입한 항체를 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC에 의해 순도를 확인하고 나서, 추가 검사 없이 효능 연구에 대해 충분히 순수한 것으로 결정하였다.

[0054] **실시예 1**

[0055] **mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS를 이용하는 rIL-2의 폐길화**

[0056] mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS를 이용하는 rIL-2의 폐길화(PEGylation)를 WO 2012/065085의 실시예 2에서 이미 보고하였다. 거기서, 합성을 4량체, 3량체, 2량체 및 1량체의 혼합물에서의 결과에 대해 보고하였다. 그러나, 반응의 추가 분석은 더 높은 부착 정도(예를 들어, 5량체, 6량체 및 7량체)가 또한 생성되었다는 것을 나타내었다. 본 합성은 mPEG2-C2-fmoc-20K-NHS를 이용하는 IL-2의 폐길화를 위한 규모가 확대된 접근법을 나타낸다.

[0057] 1.44 mg/ml로 정제된 rIL-2(106.4 mL)를 첫 번째 용기에 채우고 나서, 53.6 mL의 제형 완충제(10 mM 아세트산 나트륨, pH 4.5, 5% 트레할로스)를 첨가하였다. pH가 4.62로 측정되고, 온도가 21.2°C로 측정되었다. PEG 시약인 C2-PEG2-FMOC-NHS-20K(WO 2006/138572에서 기재한 바와 같이 이용가능)(13.1 g)를 제2 용기 내에 채우고 나서, 73.3 mL의 2 mM HCl을 첨가하였다. 생성된 용액을 손으로 25 분 동안 교반시켰다. 붕산나트륨(0.5 M, pH 9.8)을 제1 용기에 첨가하여 pH를 약 9.1로 상승시키고, 이어서 PEG 시약을 함유하는 제2 용기를 1 분 내지 2 분에 걸쳐 제1 용기에 첨가하였다. 이어서 8.1 mL의 2 mM HCl을 제2 용기에 채움으로써 행급 단계를 수행하고, 제1 용기에 첨가하였다. 컨주게이션 반응에서, 최종 rIL-2 농도는 0.6 mg/mL이고, 붕산나트륨 농도는 120 mM이며, pH는 9.1 +/-0.2이고, 온도는 20°C 내지 22°C이며, 시약의 활성에 대한 조절 후 PEG 시약 대 rIL-2의 몰 비(치환 수준)는 35:1이다. 컨주게이션 반응을 30 분 동안 진행시키고, 이어서 75 mL의 2 N 아세트산을 사용하는 산성화 반응으로 중단시켰다(pH는 4.01로 하락). 반응 생성물을 물로 희석시키고 나서, 희석된 폐길화된 rIL-2 용액을 0.2 마이크론 필터를 사용하여 여과시키고, 여과된 생성물을 멸균 용기에 넣는다.

[0058] 그 후에, SP 세파로스 FF 수지(GE Healthcare)로 채운 크로마토그래피 칼럼 상에 용액을 장입함으로써 희석된 폐길화된 rIL-2 용액을 정제하였다. 세척 단계 후에, 폐길화된 rIL-2를 염화나트륨 구배를 사용하여 용리시킨다. 1량체, 2량체 또는 3량체를 함유하는 분획을 제거하는 한편, 4량체, 5량체, 6량체, 7량체 및 임의의 더 큰 정도의 폐길화를 함유하는 분획을 폴딩함으로써, 주로 4량체, 5량체 및 6량체를 갖는 조성물을 생성한다(8량체 및 더 높은 정도의 폐길화는 크로마토그래피와 연관된 세척 단계 동안 제거되는 것으로 확인하였다). 이 조성물은 실시예 2 내지 6과 관련하여 사용되고 거기서 "RSLAIL-2"로서 언급되는 것이다.

[0059] 본 실시예에 기재한 접근법을 사용하여 4량체, 5량체 및 6량체의 수율이 증가되는 것을 확인하였다(동시에 1량체, 2량체 및 3량체는 감소됨).

[0060] **실시예 2**

[0061] **암컷 BALB/c 마우스에서 CT26 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가**

[0062] 본 연구의 목적은 암컷 BALB/c 마우스에서 CT26 무린 결장암종 종양 모델 중의 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 항종양 활성을 평가하는 것이었다.

[0063] 각각의 그룹에 12 마리의 동물이 있는 5 개의 그룹이 있었다. 제0 일, 제4 일, 제9 일 및 제14 일에 처리한 비히클 대조군, 2 개의 단일 제제 그룹(제0 일, 제4 일, 제9 일, 제14 일 및 제18 일에 처리한 항-CTLA-4 항체 또

는 제0 일 및 제9 일에 RSLAIL-2) 및 2 개의 조합 면역 요법 그룹(항-CTLA-4 항체 + RSLAIL-2)(하나의 그룹에 대한 항-CTLA-4 항체(제0 일, 제4 일, 제9 일, 제14 일 및 제18 일에 제공) 처리를 RSLAIL-2(제0 일, 제4 일 및 제9 일)와 동시에 개시하고, 나머지에 대해 RSLAIL-2 처리 개시(제4 일, 제13 일 및 제22 일에 제공) 전 4 일에 개시함)을 포함시켰다. 연구를 위한 처리 개시를 0.1 mL 주사 용적으로 2×10^6 개 세포/부위에서 CT26 세포의 접종 후 7 일에 수행하였다. 종양 세포를 복부 영역에 피하 주사하였다. 동물을 StudyLog[®] 소프트웨어에 의해 생성된 무작위화에 기반하여 그에 맞춰 분포시켰다. 처리일(제0 일)의 평균 종양 용적은 $111 \pm 9 \text{ mm}^3$ 내지 $115 \pm 10 \text{ mm}^3$ (평균 \pm SEM)의 범위에 있었다.

[0064] 종양 용적(mm^3) 및 체중(그램)을 주 당 2 회 내지 3 회 모니터링하고 처리 스케줄을 상세하게 설명하여 각각 도 1 및 도 2에 제시한다. 대응하는 상대적 종양 값, 연구의 시작 시 개개 종양 용적에 대해 계산하고 성장 백분율로서 제시한 표준값을 도 1에서 요약한다(제0 일 내지 제30 일). 무 종양 동물을 106 일 동안 종양 재성장에 대해 모니터링하고 나서, 체중을 처리의 개시로부터 기록하였다.

[0065] 터키 사후 검정(Tukey's post-test)(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software)의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 이용하는 일원 ANOVA에 의한 제11 일의 비히클 대조군 동물과 처리한 동물 사이의 종양 용적 비교는 모든 처리군이 비히클 대조군과 유의하게 다르다는 것을 나타내었다.

[0066] 다음의 식을 사용함으로써 평균 종양 성장 저해(TGI%)를 제11 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)에 평가하였다:

[0067]
$$\text{TGI}\% = (1 - (\text{상대적 종양 용적}^{\text{처리군}}) \div \text{상대적 종양 용적}^{\text{대조군}}) \times 100$$

[0068] 항-CTLA-4 항체(그룹 2) 처리 종양에 대해 53% 평균 저해 및 RSLAIL-2 그룹(그룹 3)에 대해 58% 평균 저해가 있었다. 조합 면역 요법 공동 투여(RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 항체는 제0 일에 동시에 개시함)로 74% 저해를 수득하였다. 제0 일에 개시한 항-CTLA-4 항체와 제4 일에 개시한 RSLAIL-2 처리를 이용한 조합 면역 요법(그룹 5)은 88%로 처리 중에서 가장 큰 저해를 수득하였다.

[0069] 그룹 4에서 12 마리 중 한 마리(1/12) 동물은 제14 일까지 종양이 없었다. 총 4 마리의 동물은 제28 일까지 종양이 없었다. 그룹 5에서, 두 마리(2/12) 동물은 제14 일까지 종양이 없었고, 총 8 마리 동물은 제25일까지 종양이 없었다. 표 1을 참조한다. 그룹 4 및 그룹 5로부터의 모든 이들 동물은 연구 종료까지 무 종양으로 남아있었다(처리 개시로부터 106 일).

표 1

종양 용적(평균 \pm SEM(mm^3))

[0070]

처리	용량	N	처리 개시 시 종양 용적 (제0 일) (평균 \pm SEM)	제11 일의 종양 용적 (평균 \pm SEM)	평균 종양 성장 저해(%) (종말점: 제18 일)	평균 종양 지연 (일수)	종료 시 종양이 없는 동물
1. 비히클 대조군	NA	12	111 ± 9	1499 ± 196	NA		12 마리 중 1 ¹ 마리 (제18 일)
2. 항 CTLA-4 항체	100 ug	12	115 ± 10	732 ± 165	53.3		12 마리 중 1 ¹ 마리 (제18 일)
3. RSLAIL-2	0.8 mg/kg	12	111 ± 11	600 ± 143	58.4		12 마리 중 1 ¹ 마리 (제18 일)

4. RSLAIL-2 (제0 일) + 항-CTLA-4 항체 (제0 일)	100 ug 0.8 mg/kg	12	113 ± 12	414 ± 115	74.2	12 마리 중 4 마리 (제106 일)
5. RSLAIL-2 (제4 일) + 항-CTLA-4 항체 (제0 일)	0.8 mg/kg 100 ug	12	111 ± 9	170 ± 27	88.1	12 마리 중 8 마리 (제106 일)

[0071] ¹ (이 동물을 포함하는) 그룹을 제18 일에 연구로부터 총괄적으로 제외함

[0072] 처리일에 평균 체중은 17.4 ± 0.3 g 내지 18.2 ± 0.3 g(평균 ± SEM)의 범위에 있었다. 처리 단계 동안 기준 미만의 유의한 평균 체중 상실은 어떤 처리군에서도 관찰되지 않았다(도 3).

[0073] **실시예 3**

[0074] **암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가**

[0075] 본 연구의 목적은 암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 무린 유방 암종 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 항종양 활성을 평가하는 것이었다.

[0076] 각각의 그룹에 각각 12 마리의 동물이 있는 5 개 그룹이 있었다. 제0 일, 제4 일, 제9 일 및 제14 일에 처리한 비히클 대조군, 2 개의 단일 제제 그룹(제0 일, 제4 일, 제9 일, 제14 일 및 제18 일에 처리한 항-CTLA-4 항체 또는 제0 일 및 제9 일의 RSLAIL-2) 및 2 개의 조합 면역 요법 그룹(항-CTLA-4 항체 + RSLAIL-2)(여기서 하나의 그룹에 대한 항-CTLA-4 항체(제0 일, 제4 일, 제9 일, 제14 일 및 제18 일에 제공) 처리를 RSLAIL-2(제0 일, 제4 일 및 제9 일)와 동시에 개시하고, 나머지에 대해 RSLAIL-2 처리 개시(제4 일, 제13 일 및 제22 일에 제공) 전 4 일에 개시함)을 포함시켰다. 연구를 위한 처리 개시를 0.1 mL 주사 용적으로 2 x 10⁶ 개 세포/부위에서 EMT6 세포의 접종 후 7 일에 수행하였다. 종양 세포를 복부 영역에 피하 주사하였다. 동물을 StudyLog[®] 소프트웨어에 의해 생성된 무작위화에 기반하여 그에 맞춰 분포시켰다. 처리일(제0 일)의 평균 종양 용적은 144 ± 8 mm³ 내지 147 ± 10 mm³(평균 ± SEM)의 범위에 있었다.

[0077] 종양 용적(mm³) 및 체중(그램)을 주 당 2 회 내지 3 회 모니터링하고 처리 스케줄을 상세하게 설명하여 종양 용적 데이터를 도 4(제0 일 내지 제30 일)에 제시한다. 무 종양 동물을 처리 개시로부터 106 일 동안 종양 재성장 에 대해 모니터링하고 이를 도 5에 제시한다.

[0078] 터키 사후 검정(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 이용하는 일원 ANOVA에 의한 제18 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)의 비히클 대조군 동물과 처리한 동물 사이의 종양 용적 비교는 비히클 대조군(그룹 1) 대 그룹 2(항-CTLA-4 항체 처리) 및 그룹 5(제0 일에 시작한 항-CTLA-4 항체 + 제4 일에 시작한 RSLAIL-2) 사이의 유의한 차이를 나타내었다. 그룹 1(비히클 대조군) 대 그룹 3(RSLAIL-2 단독)과 그룹 4(RSLAIL-2 + 항-CTLA-4 항체 둘 다 처리를 제0 일에 시작함) 사이의 통계적 인 차이는 발견되지 않았다.

[0079] 평균 종양 성장 저해(TGI%)를 다음의 식을 사용함으로써 제18 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)에 평가하였다:

[0080]
$$TGI\% = (1 - \frac{\text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{처리군}}}{\text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{대조군}}}) \times 100$$

[0081] 항-CTLA-4 항체(그룹 2) 처리 종양에 대해 55% 평균 저해 및 RSLAIL-2 그룹(그룹 3)에 대해 22% 평균 저해가 있었다. 조합 면역 요법 공동 투여(RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 항체를 제0 일에 동시에 개시함)는 27% 저해를 수득하였다. 제0 일에 개시한 항-CTLA-4 항체와 제4 일에 개시한 RSLAIL-2 처리를 이용한 조합 면역 요법(그룹 5)은 92%로 처리 중에서 가장 큰 저해를 수득하였다. 비히클 대조군에서 하나의 동물에 대한 종양이 제11 일까지 완전히 자가퇴화한 것을 관찰하였다. 이것에도 불구하고, 평균 종양 용적은 그룹을 연구로부터 총괄적으로 제외한 제18 일까지 1789 mm³ ± 196(평균 ± SE, N=12)이었다. 그룹 4에서 12 마리 동물 중 하나는 또한 제18 일까지 종양이 없었다. 나머지 그룹에 대한 평균 종양 용적은 전체 그룹을 연구로부터 제거하였을 때(제18 일에) 1361

± 214 mm³이었다.

[0082] 그룹 5에서 12 마리 중 5 마리(5/12) 동물은 제14 일까지 종양이 없었다. 총 10 마리의 동물은 제18 일까지 종양이 없었다. 10 마리의 동물 모두 연구 종료까지 무 종양으로 남아있었다(처리 개시로부터 106 일). 표 2를 참조한다.

표 2

[0083] 종양 용적 (평균 ± SE(mm³))

처리	용량	N	처리 개시 시 종양 용적 (제0 일) (평균 ± SEM)	제18 일에 종양 용적 (평균 ± SEM)	평균 종양 성장 저해(%) (종말점: 18 Days)	종료 시 종양이 없는 동물
6. 비히클 대조군	NA	12	147 ± 10	1789 ± 196	NA	12 마리 중 1 ¹ 마리 (제18 일)
7. 항 CTLA-4	100 ug	12	145 ± 9	824 ± 185	55	없음
8. RSLAIL-2	0.8 mg/kg	12	144 ± 11	1405 ± 13	22	없음
9. RSLAIL-2 (제0 일) + 항-CTLA-4 항체 (제0 일)	100 ug / 0.8 mg/kg	12	145 ± 10	1361 ± 214	27	12 마리 중 1 ¹ 마리 (제18 일)
10. RSLAIL-2 (제4 일) + 항-CTLA-4 항체 (제0 일)	0.8 mg/kg / 100 ug	12	144 ± 8	155 ± 83	92	12 마리 중 10 마리 (제107 일)

[0084] ¹(이 동물을 포함하는) 그룹을 제18 일에 연구로부터 총괄적으로 제외함

[0085] 처리일에 평균 체중은 17.8 ± 0.3 g 내지 18.4 ± 0.4 g(평균 ± SEM)의 범위에 있었다(도 6). 유의한 체중 상실이 어떤 처리군에서도 관찰되지 않았다.

[0086] 실시예 4

[0087] **암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한, 항-CTLA-4 항체와 조합한 프로류킨의 효능에 비교한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가**

[0088] 본 연구의 목적은 암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 무린 유방 암종 종양 모델에 대한, 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 항종양 활성을 평가하고 그것을 프로류킨의 효능과 비교하는 것이다.

[0089] 각각 10 마리 동물이 있는 7 개의 그룹이 있었다. 제0 일, 제4 일, 제8 일 및 제13 일에 제공한 항체 대조군(그룹 1) 및 3 개의 단일 제제 그룹을 포함하였다. 이들은 제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일 및 제18 일에 제공한 항-CTLA-4 항체(그룹 2)였다. 프로류킨(그룹 3)을 제0 일 내지 제4 일, 이어서 제7 일 내지 제11 일에 제공하고, RSLAIL-2(그룹 4)를 제0 일 및 제9 일에 제공하였다. 또한 3 개의 조합 면역 요법 그룹이 있었다. 상이한 치료 스케줄로 항-CTLA-4 항체를 프로류킨과 함께 사용하는 조합 면역 요법 그룹(그룹 5) 및 항-CTLA-4 항체를 RSLAIL-2와 함께 사용하는 2 개의 조합 치료 그룹(그룹 6 및 7). 항-CTLA-4 항체 요법을 제4 일에 개시하고, 제9 일 및 제13 일에 다시 제공한 반면, RSLAIL-2는 제0 일에 개시하고, 그룹 6에 대해 제9 일에 다시 제공하였다. 그룹 7에 대한 항-CTLA-4 항체 요법을 제0 일에 개시하였고, 제4 일, 제8 일 및 제13 일에 다시 제공한 한편, RSLAIL-2를 제4 일에 개시하였고, 제13 일 및 제22 일에 다시 제공하였다. 치료 개시(제0 일)를 마우스에 대한 0.1 mL 주사 용적으로 2 x 10⁶ 개 세포/부위로 EMT6 세포의 접종 후 7 일로서 지정하였다. 종양 세포를 복부 영역에서 피하로 주사하였다. 동물을 StudyLog[®] 소프트웨어에 의해 생성한 무작위화에 기반하여 제0 일에 그에 맞춰 분포시켰다. 치료일에 평균 종양 용적은 159 ± 7 mm³ 내지 170 ± 8 mm³(평균 ± SE)의 범위에 있었다.

[0090] 종양 용적(mm³) 및 체중(그램)을 1 주에 2 회 내지 3 회 모니터링하였고, 도 7 및 도 8에서 각각 제시한다(제0

일 내지 제28 일). 종양이 없는 동물을 (처리 개시로부터) 99 일 동안 재성장 및 건강 상태에 대해 모니터링하였다.

[0091] 터키 사후 검정(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 이용하는 일원 ANOVA에 의한 제18 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)의 대조군 동물과 처리한 동물 사이의 종양 용적 비교는 그룹 5(항-CTLA-4 항체 + 프로류킨)와 그룹 7(항-CTLA-4 항체 + RSLAIL-2)만이 대조군의 종양 용적과 유의하게 다르다는 것을 나타내었다. 그러나 대조군과 유의하게 다름에도 불구하고, 두 처리군의 평균 종양 용적은 서로 유의하게 다르지 않았다.

[0092] 다음의 식을 사용함으로써 평균 종양 성장 저해(TGI%)를 제18 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)에 평가하였다:

$$TGI\% = (1 - (\text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{처리군}} \div \text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{대조군}})) \times 100$$

[0094] 항-CTLA-4 항체 처리 단독(그룹 2)에 대해 27% 평균 저해가 있었다. 종양 성장의 저해는 프로류킨에 의해 24%였고(그룹 3) RSLAIL-2에 의해 5%였으며(그룹 4), 항-CTLA-4 항체 및 프로류킨에 의한 조합 면역 요법(그룹 5)은 26% 저해를 획득하였고, 항-CTLA-4 항체와 함께 RSLAIL-2 처리(그룹 6)는 2% 저해를 제공한 반면, 그룹 7(RSLAIL-2와 함께 항-CTLA-4 항체)는 94% 저해를 획득하였다.

[0095] 몇몇 동물은 제18 일까지 종양이 없는 것을 관찰하였다. 그룹 5로부터 3 마리(3/10), 그룹 6으로부터 1 마리(1/10) 및 그룹 7에서 5 마리(5/10)가 있었다. 연구 종결까지(제99 일), 그룹 5, 6 및 7로부터 종양이 없는 동물의 총 수는 각각 4/10, 1/10 및 7/10이었다. 표 3을 참조한다.

표 3

[0096] 종양 용적(평균 ± SE(mm³))

처리군	용량	N	처리 개시 시 종양 용적 (제0 일) (평균 ± SEM)	제18 일에 종양 용적 (평균 ± SEM)	평균 종양 성장 저해(%) (종말점: 제18 일)	종료 시 종양이 없는 동물
1. 항체 대조군 (제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일)	100 ug	10	166 ± 6	1803 ± 174	NA	NA
2. 항 CTLA-4 항체 (제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일)	100 ug	10	166 ± 7	1294 ± 122	27	없음
3. 프로류킨 (제0 일 내지 제4 일, 제7 일 내지 제11 일)	0.5 mg/kg	10	165 ± 7	1335 ± 236	24	없음
4. RSLAIL-2	0.8 mg/kg	10	167 ± 8	1040 ± 78	5	없음
5. 항-CTLA-4 항체 (제0 일) + 프로류킨(제4 일)	0.8 mg/kg 0.5 mg/kg	10	159 ± 7	155 ± 83	76	10 마리 중 4 마리 (제99 일)
6. RSLAIL-2(제0 일) + 항-CTLA-4 항체(제4 일)	0.8 mg/kg 100 ug	10	165 ± 7	1701 ± 229	2	10 마리 중 1 마리 (제99 일)
7. 항-CTLA-4 항체 (제0 일) + RSLAIL-2 (제4 일)	100 ug 0.8 mg/kg	10	170 ± 8	108 ± 56	94	10 마리 중 7 마리 (제99 일)

[0097] 실시예 5

- [0098] **암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2를 시험하는 효능 연구(유세포 분석에 대한 제0 일, 제3 일 및 제11 일 샘플 수집)**
- [0099] RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 항체 효능 연구의 앞선 조합은 EMT6 마우스 유방 모델에서의 상승효과를 시사한다. 본 연구의 목적은 암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 무린 유방 암종 종양 모델에서 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 항종양 활성을 평가/사정하는 것이었다. 추가로, 조합 효능을 초래하는 면역 집단을 동정하기 위해, 조직(종양 및 비장)을 수집하고 나서, 처리 개시 후 제0 일, 제3 일 및 제11 일에 처리하였다. 조직을 침윤한 면역 세포의 동정 및 정량화를 유세포 분석에 의해 평가하였다. 결과를 처리군 간에 비교하였다.
- [0100] 생체내 단계
- [0101] 이 연구에서 각각의 그룹에서 3 내지 10 마리의 동물이 있는 6 개 처리군이 있었다. 제0 일, 제4 일 및 제8 일에 100 ug/마우스로 제공한 항체 대조군, IgG2a(그룹 1); 제4 일 및 제8 일에 100 ug/마우스로 제공한 항-CTLA-4 항체 처리(그룹 2); 제4 일 내지 제8 일에 0.5 mg/kg으로 제공한 프로류킨 처리(그룹 3); 및 제4 일에 0.8 mg/kg의 단일 투여로 제공한 RSLAIL-2 처리(그룹 5)를 포함시켰다. 또한 항-CTLA-4 항체(제0 일, 제4 일 및 제8 일에 100 ug/마우스로 제공) 및 프로류킨(제4 일 내지 제8 일에 0.5 mg/kg으로 제공)의 조합(그룹 4) 또는 RSLAIL-2(제4 일에 0.8 mg/kg으로 제공)(그룹 6)로 처리한 3 개의 그룹을 포함시켰다.
- [0102] 동물을 복부 영역에서 피하로 EMT6 무린 유방 암종 세포(0.1 mL)의 2×10^6 개 세포/부위로 접종시킨 후 7 일에 처리를 개시하였다. 마우스를 종양 용적에 따라 처리군으로 분포시켰다.
- [0103] 동물을 희생시키고 나서, 조직(종양 및 비장)을 제0 일(나이프 대조군), 제3 일(그룹 1 및 6)에 수집하고, 그룹 6에서 제3 일에 항-CTLA-4 항체만을 동물에 투약하고, 제4 일에 RSLAIL-2의 첨가를 시작하였으며, 처리 개시 후에 제11 일(모든 그룹)에 샘플을 또한 취하였다. 각각의 수집일에 대해 3 마리 동물을 선택하였다. 선택한 동물은 해당 일에 그룹 평균 종양 용적에 가장 가까운 무결함 종양(비피사) 및 용적을 가졌다.
- [0104] 평균 종양 용적은 제0 일에 처리 시 나이브 그룹에 대해 $164 \pm 10 \text{ mm}^3$ 였다. 제3 일에, 평균 종양 용적은 그룹 1 및 그룹 6에 대해 각각 $282 \pm 7 \text{ mm}^3$ 및 $333 \pm 26 \text{ mm}^3$ (평균 \pm SEM)였다. 제11 일에, 평균 종양 용적은 그룹 1에 대해 $843 \pm 138 \text{ mm}^3$, 그룹 2에 대해 $1059 \pm 135 \text{ mm}^3$, 그룹 3에 대해 $814 \pm 70 \text{ mm}^3$, 그룹 4에 대해 $832 \pm 262 \text{ mm}^3$, 그룹 5에 대해 $620 \pm 103 \text{ mm}^3$ 및 그룹 6에 대해 $255 \pm 11 \text{ mm}^3$ (평균 \pm SEM)였다. 도 9를 참조한다.
- [0105] 동물을 1 주에 적어도 1 회 체중을 잰다. 평균 체중은 처리일(제0 일)에 그룹 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 대해 각각 18.9 ± 0.3 그램, 18.6 ± 0.3 그램, 19.2 ± 0.2 그램, 18.7 ± 0.2 그램, 17.8 ± 0.3 그램, 18.9 ± 0.3 그램이었다. 제3 일에, 그룹 1 및 6에 대한 평균 체중은 각각 19.1 ± 0.7 그램 및 19 ± 0.3 그램이었다. 제11 일에 평균 체중은 그룹 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 대해 각각 19.8 ± 0.2 그램, 19.4 ± 0.2 그램, 19.9 ± 0.2 그램, 20 ± 0.5 그램, 19.6 ± 0.4 그램 및 19.5 ± 0.4 그램(평균 \pm SEM)이었다. 도 10을 참조한다.
- [0106] 생체밖 단계
- [0107] 수집한 조직 샘플을 해부용 칼을 사용하여 손으로 민싱하고 나서, 13 분 효소 분해물을 37°C에서 인큐베이션시켰다. 분해 완충제의 성분은 PBS/BSA 중 2.5 mg/ml 콜로게나제 II형(GIBCO BRL), 2.5 mg/ml 콜로게나제 IV형(GIBCO BRL) 및 0.5 mg/ml DNase(Sigma-Aldrich)이었다. 인큐베이션 후에, 10% FBS(열 불활성화; GIBCO BRL)를 함유하는 웨이머스 MB(Waymouth's MB)(GIBCO BRL)를 첨가함으로써 분해물을 쿼칭시키고, 70 uM 나일론 필터(Falcon)를 통해 여과시켜 단일 세포 현탁액을 수득하였다. 세포를 HBSS에서 세척하고, 원심분리하고 나서, 새로운 HBSS에서 재현탁시켰다. 계수화를 위해 각각의 샘플로부터 엘리퀼트를 취하고, 이어서 eFlour-450 생존도 염료를 이용하여 염색하였다. 이어서, 샘플을 96-딥 웰 플레이트에 플레이팅하고, 염색하고 나서, 유세포 분석을 위해 수집하였다.
- [0108] 종양 및 비장 세포 샘플을 우선 고정성 생존도 지표로 처리하고, 이어서 생존 면역 세포, CD3, CD4, CD8, CD25, CD44, CD122, Foxp3(내부 군주), DX5 및 Nkp46 표면 항원에 대해 염색하였다.
- [0109] 살아있는 면역 세포의 총량을 각각의 샘플(처리군 당 3 개)에 대해 계수화하고 나서, CD4+, TREG+ 세포, CD8+, 기억 효과기 CD8+ 세포, 총 NK 세포, 성숙 NK 세포에 대한 총 사건(종양 조직의 1 평방 밀리미터에 대해 정규화)뿐만 아니라 각각의 처리군에 대해 비장에 대한 총 세포수를 게이팅/수집하기 위해 사용하였다. 유세포 분석기 판독의 요약한 원 데이터로부터 주요 계수를 도출하고, FlowJo를 사용하여 분석하였다.

- [0110] 유세포 분석
- [0111] 3 마리의 나이브 동물을 제0 일에 희생시켰다. 3 마리 동물을 그룹 1(아이소타입 대조군을 받음)로부터 그리고 제3 일에 그룹 6(항-CTLA-4 항체 처리만을 받음)으로부터 희생시키고, 모든 그룹 1 내지 6으로부터의 3 마리 동물을 처리 개시 후 제11 일에 희생시켰다.
- [0112] 데이터의 그래프 표현을 종양 및 비장에서 11 일 동안에 대해 도 11 및 도 12에서 각각 확인할 수 있다.
- [0113] 항-CTLA-4 항체 단독으로 처리하였을 때 CD4+ 또는 조절 T 세포 집단(제3 일 내지 제11 일)에서 차이가 없다. 항-CTLA-4 항체에 의한 전처리 다음에 프로류킨 또는 RSLAIL-2 처리는 CD4+ 집단을 증가시키지만; 조절 T 세포 집단(항-CTLA-4 항체 대 항-CTLA-4 항체 + RSLAIL-2 또는 프로류킨)에서 차이가 없다. RSLAIL-2 + 항-CTLA-4 항체 대 RSLAIL-2 단독에서 CD4+ 세포에서의 차이는 없지만; RSLAIL-2 + 항-CTLA-4 항체는 RSLAIL-2와 비교할 때 조절 T 세포 집단을 감소시킨다. 고려하지 않은 RSLAIL-2 + 항-CTLA-4 항체 그룹에서 CD4+ 세포의 큰 집단이 있으며; 이들 결과는 이들 세포의 대다수가 Treg가 아니라는 것을 시사한다.
- [0114] 항-CTLA-4 항체에 의한 전처리 다음에 RSLAIL-2 처리는 CD8+ 집단(P = 0.0078), 및 기억 효과기 CD8 세포(P = 0.0058)를 유의하게 증가시킨다. (양측 t 검정 항-CTLA-4 항체 + RSLAIL-2 대 항-CTLA-4). 추가로, RSLAIL-2 + 항-CTLA-4 항체는 RSLAIL-2 단독에 비해 CD8+ 및 기억 효과기 CD8 세포를 유의하게 증가시킨다.
- [0115] 항-CTLA-4 항체 단독은 총 NK 세포 집단에 대해 대세적인 효과가 없었지만; 성숙 NK 세포는 유의하게 감소되었다(제3 일 내지 제11 일에 P = 0.0278). 항-CTLA-4 항체에 의한 전처리 다음에 RSLAIL-2 처리는 총 NK 집단 및 성숙 NK 세포 집단을 증가시킨다. RSLAIL-2 그룹과 비교할 때 RSLAIL-2 + 항-CTLA-4 항체 그룹에서의 성숙 NK 세포에서 차이가 없다.
- [0116] 실시예 6
- [0117] **암컷 BALB/c 마우스에서 CT26 무린 결장암종 종양 성장에 대한 RSLAIL-2 와 항-PD-1 항체를 이용하는 조합 면역 요법의 효능**
- [0118] 본 연구의 목적은 암컷 BALB/c 마우스에서 CT26 무린 결장암종 종양 모델에 대한 RSLAIL-2와 항-PD-1 항체를 이용하는 조합 면역 요법의 항종양 활성을 평가하는 것이었다.
- [0119] 각각 10 마리의 동물이 있는 4 개의 그룹이 있었다. 비히클 대조군(그룹 1), 항-PD-1 항체 처리군, RSLAIL-2 처리군(그룹 3) 및 해당일에 항-PD-1 항체(200 ug)로 처음 처리하고 4 일 후에 RSLAIL-2(0.8 mg/kg)로 처리한 조합 처리군을 포함하였다. 0.1 mL 주사 용적으로 2×10^6 개 세포/부위로 CT26 세포를 마우스에서 복부 영역에 피하로 주입하였다. 종양 세포 접종(제0 일) 후 제7 일에 처리를 시작하였다. StudyLog[®] 소프트웨어에 의해 생성된 무작위화에 기반하여 제0 일에 그에 따라 동물을 분포시켰다. 처리일(제0 일)에 평균 종양 용적은 $123 \pm 5 \text{ mm}^3$ 내지 $127 \pm 6 \text{ mm}^3$ (평균 \pm SE)의 범위에 있었다.
- [0120] 종양 용적(mm^3) 및 체중(그램)을 1 주 2 회 내지 3 회 모니터링하고 나서, 도 13 및 도 14에서 각각 제시한다. 연구를 16 일 동안 모니터링하였다.
- [0121] 터키 사후 검정(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 이용하는 일원 ANOVA에 의한 제12 일의 대조군 동물과 처리군 동물 사이의 종양 용적의 비교는 모든 처리군에 대한 종양 용적이 비처리 대조군의 종양 용적과 유의하게 다르다는 것을 나타내었다.
- [0122] 종양 성장 저해 백분율(TGI%)을 다음의 식을 사용하여 계산하였다:
- [0123]
$$\text{TGI}\% = (1 - (\text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{처리군}} \div \text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{대조군}})) \times 100$$
- [0124] 항-PD-1 항체(그룹 2) 및 RSLAIL-2(그룹 3) 각각에 의해 55% 및 58% 평균 종양 성장 저해를 관찰하였다. 조합으로 처리를 둘 다 제공한 그룹(그룹 4)에 대한 종양 성장 저해가 83%로 관찰되었다. 연구 종결 시 그룹 4에서 5 마리(5/10) 동물은 제0 일에 그들의 초기 용적 미만의 용적을 지니는 종양을 가졌다.
- [0125] 평균 종양 용적 4 배 시간(TVQT)(종양이 초기 용적의 4 배로 성장하는데 걸리는 시간(일수))을 비선형 2차 다항 분석(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 사용하여 보간하여 종양 성장 지연(Tumor Growth Delay: TGD)을 평가하였다. 대조군 종양에 대한 평균 종양 용적 4 배 시간은 5.2 일이었고, 그룹 3(항-PD-1 항체)에 대해 7.6 일, 그룹 3(RSLAIL-2)에 대해 8.2 일 및 조합 면

역 요법 그룹(그룹 4)에 대해 15.6 일이었다. 그룹 2, 그룹 3 및 그룹 4에 대한 평균 종양 성장 지연은 각각 2.4 일, 3.0 일 및 10.4 일이다. 표 4를 참조한다.

표 4

종양 용적(평균 ± SE(mm³))

처리	용량	N	처리 개시 시 종양 용적 (제0 일) (평균 ± SE)	제12 일에 종양 용적 (평균 ± SE)	평균 종양 성장 저해(%) (종말점: 12 일)	평균 그룹 TVQT (일수)	평균 그룹 TGD (일수)
1. 항체 대조군 (제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일)	200 ug	10	125 ± 5	1983 ± 248	NA	5.2	NA
2. 항 PD1 항체 (제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일)	200 ug	10	126 ± 5	897 ± 82	55	7.6	2.4
3. RSLAIL-2 (제0 일, 제9 일)	0.8 mg/kg	10	127 ± 6	833 ± 176	58	8.2	3.0
4. 항 PD1 항체 (제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일) + RSLAIL-2 (제0 일, 제9 일)	200 ug 0.8 mg/kg	10	123 ± 5	334 ± 109	83	15.6	10.4

[0127] 평균 체중은 제0 일에 17.5 ± 0.2 g 내지 18.1 ± 0.2 g(평균 ± SEM)의 범위에 있었다(도 13). 제12 일에 연구로부터 제외된 그룹 2의 한 마리 동물을 제외하고, 유의한 체중 상실이 관찰되지 않았다(도 14). 피사는 폐장에서 전이성 병변을 나타내었다.

[0128] 단일 제제 중 하나로 처리한 것보다 항-PD-1 및 RSLAIL-2의 조합을 제공한 동물에서 더 큰 종양 성장 저해(TGI) 및 종양 성장 지연(TGD)을 관찰하였다.

[0129] **실시예 7**

[0130] **재시험감염 연구:**

[0131] **RSLAIL-2와 항-CTLA-4를 이용하는 효과적인 조합 면역 요법 후에 EMT6 무린 유방 암종 종양을 지니는 재시험감염 무 종양 동물**

[0132] 본 실시예의 목적은 RSLAIL-2 및 상업적으로 입수가 가능한 설치류 항-CTLA-4 체크포인트 차단 항체를 사용하는 조합 면역요법으로 EMT6 유방 암종 종양을 이식한 마우스를 치료할 때 효능의 정도 및 지속기간을 평가하는 것이었다. 실시예 2 내지 6에서 앞서 입증한 바와 같이, 이 조합은 상당한 무 종양 동물을 수득하며, EMT6 종양 세포 또는 CT26 종양 세포를 지니는 무 종양 동물을 재시험감염함으로써, 종양-특이적 반응을 유발하는 이 조합의 능력을 평가한다.

[0133] 이 재시험감염 연구를 3상으로 수행하였다.

[0134] 연구의 초기 부분("I상")은 EMT6(무린 유방 암종) 종양을 보유하는 80 마리의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였다. 10 마리(10/80) 동물을 무작위로 선택하고 나서 항체 대조군(제0 일, 제4 일, 제9 일, 제13 일, i.p.로 100 µg)으로 할당하였다. 동물의 나머지 (70/80)를 항-CTLA-4 i.p.(제0 일, 제4 일, 제9 일, 제13 일 및 제18 일에 100 µg) 및 RSLAIL-2 i.v.(제4 일, 제13 일 및 제22 일에 0.8 mg/kg)의 조합물로 처리하였다.

[0135] 처리 개시(제0 일)를 복부 영역에서 피하로 주사한 0.1 mL 주사 용적으로 2 x 10⁶ 개 세포/부위로 EMT6 세포의 접종 후 7 일로서 지정하였다. 처리 개시 시 평균 종양 용적은 비히클 대조군 대 처리군 각각에 대해 206 ± 15 및 222 ± 8(평균 ± SE)이었다.

[0136] I상을 제48 일까지 모니터링하였다. 종양 용적(mm³) 및 체중(그램)을 주 당 2 회 내지 3 회 측정하고 나서, 도 15에 제시하였다. 연구 시작 시(제0 일)에 개개 종양 용적에 대해 계산한 값으로 표준화하고 성장 백분율 및 체중의 상대적 변화로서 제시한 대응하는 상대적 종양 용적을 도 16에 요약한다.

[0137] 연구의 I상으로부터의 결과는 73%의 종양 성장 저해(TGI)(P<0.0001)를 나타내고, 제14 일에 대조군 동물(698%) 과 처리군 동물(189%) 사이의 평균 상대적 종양 용적을 사용하여 계산하고(모든 대조군 동물이 존재한 마지막 날), 이어서 웰치스(Welches) 보정 인자에 의한 단측 t-검정(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 이용하여 비교하였다.

[0138] 조합 면역 요법에 대해 완전한 반응을 나타내지 않은 I상에서의 동물(N=39)의 평균 종양 성장 지연(TGD)은 12.7 일이었다(P<0.0001). 종양 용적 4 배 시간(TVQT)을 2차 다항 비선형 회귀 분석(GraphPad Prism)에 의해 400% 성장에 대해 보간된 개개 종양 시간을 사용함으로써 컴퓨터 계산하였다. 무 종양 동물(완전한 반응자)을 TGD에 대한 평가에 포함시키지 않았다.

[0139] I상에서, 제1 및 제2 RSLAIL-2 투여 후 대략 5일에 처리한 동물에서 거친 털(약간)이 관찰되었다. 거친 털은 세 번째 투여 후에 관찰되지 않았다. 유의한 체중 상실은 관찰되지 않았다(도 16).

[0140] 연구의 I상으로부터의 결과의 요약을 표 5에 제공한다.

표 5

I상 결과의 요약(평균 ± SE)

[0141]

처리	용량	N	처리 개시 시 종양 용적(mm ³)	제14 일에 평균 상대적 종양 용적(%)	제14 일에 평균 종양 성장 저해(%)	TVQT (일수)	종양 성장 지연 (일수)	제48 일까지 무 종양 동물
항체 대조군 (제0 일, 제4 일, 제8 일, 제13 일)	NA	10	206 ± 15	698 ± 60	NA	9.7	NA	NA
RSLAIL-2 (제4 일, 제13 일, 제22 일) + 항 CTLA-4 (제0 일, 제4 일, 제9 일, 제13 일, 제18 일)	0.8 mg/kg 100 ug	70	222 ± 8	189 ± 25	73 (P<0.0001)	¹ 22.4	¹ 12.7 (P<0.0001)	31 (44%)

[0142] ¹ 부분적 반응이 있는 동물에 대해서만 보간하였고, 완전한 반응이 있는 동물(즉, 무 종양)은 포함시키지 않았다

[0143] ² 평균 종양 성장 저해(TGI%)를 다음의 식을 사용함으로써 제18 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)에 평가하였다: TGI% = (1 - (상대적 종양 용적(%)^{처리군} ÷ 상대적 종양 용적(%)^{대조군}) × 100

[0144] 다음 연구 부분("II상")을 제49 일에 개시하였다. 총 40 마리의 동물(10 세의 적절한 나이브 동물 및 RSLAIL-2 + 항CTLA-4 조합 면역 요법에 완전히 반응한 30 마리의 동물)을 3 개 그룹에 대해 사용하고, 표 6에 기재한 바와 같이 분포시켰다.

표 6

II상 연구 설계

[0145]

¹ 그룹	N
EMT6 세포로 시험감염시킨 적절한 연령의 나이브 동물	10
CT26으로 재시험감염시킨 EMT6 무 종양 동물	10
EMT6으로 재시험감염시킨 EMT6 무 종양 동물	20

- [0146] ¹ 무 종양 동물은 RSLAIL-2 + 항 CTLA-4 요법에 완전히 반응한 I상으로부터의 EMT6 종양 보유 동물을 지칭함
- [0147] 제49 일에, 동물에 복부 영역에 피하 주사로 EMT6 또는 CT26 종양 세포(0.1 mL 배지에서 2 x 10⁶ 개)를 이식하였다.
- [0148] 동물에 대해 종양 흡수 및 성장을 나타낸 연구의 II상으로부터의 결과는 접종 후 5일(제54 일)에 명확하였다. 그룹 1(적절한 연령의 나이브) 및 그룹 2(CT26으로 재시험감염시킨 EMT6 무 종양 동물)에서의 모든 동물은 각각 167 ± 22 및 177 ± 11(평균 ± SE)의 평균 용적을 지니는 종양을 보유하였다. 접종 후 5일에 그룹 3(EMT6으로 재시험감염시킨 EMT6 무 종양 동물)에서 85%만의 종양 흡수율이 관찰되었다. 종양 용적은 기타 다른 그룹에 대한 종양 용적보다 상대적으로 더 작은 것으로 관찰되었다. 평균 종양 용적은 62 ± 8 mm³였다. 이 그룹에서 20 마리 중 14 마리(70%) 동물은 재시험감염 후 17 일에 무 종양이었고(EMT6 종양 이식물이 완전히 거부됨) II 상의 종료시(제109 일)까지 무 종양으로 남아있었다.
- [0149] 그룹 2의 동물, 즉, I상에서 면역 요법과 조합하고 CT26 종양으로 재시험감염한 후의 EMT6 무 종양 동물은 재시험감염 후 14 일에 평균 종양 용적은 1257 ± 201(평균 ± SE)이었고, 1000 mm³ 용적으로 성장하는 평균 시간은 13.6 ± 0.8이었다. 종양 성장은 면역 반응의 종양 유형 특이성을 나타내는 I상 요법에 의해 영향받는 것으로 나타나지 않았다. 표 7에서 제공하는 연구의 II 상으로부터의 결과의 요약에 참조한다.
- [0150] 그룹 1로부터의 한 마리의 동물은 제14 일에 죽은 것을 확인하였다. 검사는 폐에서 전이성 병변(조직학에 의해 입증되지 않음) 및 흉강 내 혈성 액체가 되는 것으로 나타난 것을 드러내었다. 이것 이외에, 기타 다른 임상적 관찰 또는 유의한 체중 상실은 주목되지 않았다. 도 17을 참조한다.
- [0151] 적절한 연령의 나이브 동물(1541 ± 144 mm³)과 EMT6으로 재시험감염한 EMT6 무 종양 동물(192 ± 107) 사이의 평균 종양 용적(도 18)을 이식 후 21 일에 비교하여 TGI를 평가하였다(87.5%).
- [0152] TVQT는 기준 종양 용적 시작점이 없기 때문에 평가할 수 없었다. 그 위치에서, 종양 성장 지연을 평가하는 것을 돕고 근사치를 내기 위해 각각의 종양 보유 동물에 대해 1000 mm³ 용적까지의 종양 성장에 대한 시간을 보간하였다(그래프패드 프리즘의 2차 다항 비선형 회귀 분석을 사용함). 1000 mm³ 종양 용적까지의 성장을 위해 취한 시간(일수)은 그룹 1 및 그룹 2에 대해 각각 16.9 ± 1 일 및 13.6 ± 0.8 일(평균 ± SE)이었다. 그룹 3에서 EMT6 재시험감염을 완전히 거부하지 않은 동물(6/20)만을 1000 mm³ 성장까지의 시간에 대하여 평가하였고, 이는 30.3 ± 5.5였다. 이들 동물에 대한 1000 mm³ 지연까지의 평균 종양 성장은 13.4 일인 것으로 계산하였다.

표 7

[0153] **II상 결과의 요약(평균 ± SE)**

처리	N	제5일에 평균 종양 용적	1000 mm ³ 까지 성장하는데 걸린 시간 (일수)	종양 성장 지연 (1000 mm ³ 까지의 일수)	종양 이식 후 21 일에 평균 종양 용적 (mm ³)	제21 일에 평균 종양 성장 저해(%)	제109 일까지의 무 종양 동물
EMT6으로 시험감염한 적절한 연령의 나이브 동물	10	167 ± 22	16.9 ± 1	NA	1541 ± 144	NA	NA
CT26으로 재시험감염한 EMT6 무 종양 동물	10	177 ± 11	13.6 ± 0.8	NA	NA	NA	NA
EMT6으로 재시험감염한 EMT6 무 종양 동물	20	62 ± 8	30.3 ± 5.5 (6/20 동물)	13.4 (6/20 동물)	192 ± 107	87.5	14

- [0154] 연구의 마지막 부분(III상)을 제109 일 내지 제168 일에 걸쳐 지정하였다. II상으로부터 EMT6 재시험감염을 완전히 거부한 동물(N=14)을 다시 2 x 10⁶ 개 EMT6 종양 세포로 다시 접종/재시험감염하고(제109 일)(그룹 2), 59 일 동안 모니터링하였다. 적절한 연령의 동물(N=5)을 또한 동시에 대조군(그룹 1)으로 접종하였다.

- [0155] 연구의 최종 부분으로부터, 그룹 1 및 2 각각에 대해 101 ± 14 및 69 ± 6 의 평균 종양 용적으로 접종 3 일 후에 종양 흡수 및 성장이 분명한 것을 관찰하였다. 두 번째 제시험감염을 제공한 동물은 종양 세포 이식의 21 일 후에 완전히 무 종양(완전한 거부)인 반면, 그들의 적절한 연령의 상대 중 5 마리 모두는 평균 종양 용적이 $1550 \pm 401 \text{ mm}^3$ 이었다. 그룹 2의 동물은 연구 종료 날(제168 일)까지 무 종양으로 남아있었고, 유의한 체중 상실은 관찰되지 않았다.
- [0156] 이 연구는 EMT6 무린 유방 암종 종양에서 RSLAIL-2 및 항-CTLA 4를 사용하는 조합 면역 요법의 효능(I상)뿐만 아니라 반응의 지속력 및 특이성, 및 처리에 잘 반응한 동물에서의 요법의 장기간의 효과(II상 및 III상)를 입증한다. 시작부터 종료시까지의 연구 그리고 각각의 상에 대한 개개 종양 성장의 요약에 대해 도 21을 참조한다.
- [0157] **실시예 8**
- [0158] **생체내 고갈 연구:**
- [0159] **RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 또는 항-PD-1를 이용한 효과적인 조합 면역 요법 후에 EMT6 무린 유방 암종 종양에 대해 항-종양 면역에 대한 세포독성 면역 세포 집단 기여의 평가**
- [0160] 이 실시예의 목적은 RSLAIL-2가 CTLA-4 또는 PD-1의 항체 차단을 통해 면역 체크포인트 저해와 조합될 때 항종양 효능에 대한 자연 살해(NK) 세포 및 CD8^+ 세포독성 T 림프구의 상대적 기여를 평가하는 것이었다.
- [0161] 이 연구는 EMT6(무린 유방 암종) 종양을 보유하는 58 마리의 암컷 BALB/c 마우스를 이용하였다. 10 마리(10/58) 동물을 무작위로 선택하고 나서, 비히클 대조군으로 할당하였다(제0 일, 제4 일, 제8 일, i.p.). 8 마리(8/58) 동물을 항-CTLA-4 i.p.(제0 일, 제4 일 및 제8 일에 $100 \mu\text{g}$) 및 RSLAIL-2 i.v.(제4 일에 0.8 mg/kg)의 조합을 받는 처리군으로 할당하였다. 8 마리(8/58) 동물을 CD8 고갈 그룹으로 할당하였고, RSLAIL-2 및 항-CTLA-4의 처리에 추가로, 래트 항-마우스 CD8a 의 연속 주사(제-2 일, 제0 일, 제7 일에 $100 \mu\text{g}$ i.p.)에 의해 CD8 T 세포를 고갈시켰다. 8 마리(8/58)의 추가적인 동물을 NK 고갈 그룹으로 할당하였고, RSLAIL-2 및 항-CTLA-4의 처리에 추가적으로, 토끼 항-소 Asialo-GM1의 연속 주사(제-2 일, 제0 일, 제7 일에 $50 \mu\text{l}$ i.p.)에 의해 NK 세포를 고갈시켰다.
- [0162] 8 마리(8/58) 동물을 항-PD-1 i.p.(제0 일, 제4 일 및 제8 일에 $100 \mu\text{g}$) 및 RSLAIL-2 i.v.(제4 일에 0.8 mg/kg)의 조합을 받는 처리군으로 할당하였다. 8 마리(8/58) 동물을 CD8 고갈 그룹으로 할당하였고, RSLAIL-2 및 항-PD-1의 처리에 추가적으로, CD8 T 세포를 래트 항-마우스 CD8a 의 연속 주사(제-2 일, 제0 일, 제7 일에 $100 \mu\text{g}$ i.p.)에 의해 고갈시켰다. 8 마리(8/58)의 추가적인 동물을 NK 고갈 그룹으로 할당하였고, RSLAIL-2 및 항-PD-1의 처리에 추가적으로, NK 세포를 토끼 항-소 Asialo-GM1의 연속 주사(제-2 일, 제0 일, 제7 일에 $50 \mu\text{l}$ i.p.)에 의해 고갈시켰다.
- [0163] 처리 개시(제0 일)를 복부 영역에서 피하로 주사한 0.1 mL 주사 용적으로 2×10^6 개 세포/부위로 EMT6 세포의 접종 후 7 일로서 지정하였고, 연구는 지속기간이 11 일이었다. 종양 용적(mm^3) 및 체중(그램)을 1 주에 2 회 내지 3 회 측정하였다. 표 8은 제11 일에 각각의 그룹에 대한 초기 및 평균 상대적 종양 용적을 제공한다. RSLAIL-2와 항-CTLA-4의 조합에 대해, 종양 용적 및 체중을 도 22에 제공하는 한편, 제0 일로부터의 상대적 종양 용적 및 체중 백분율 변화를 도 23에 제공한다. RSLAIL-2와 항-PD-1의 조합에 대해, 종양 용적 및 체중을 도 24에 제공하는 한편, 제0 일에 상대적 종양 용적 및 체중 변화 백분율을 도 25에 제공한다.
- [0164] 연구 결과는 일원 ANOVA 및 터키 다중 비교 사후 검정(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 그래프패드 소프트웨어의 윈도우용 그래프패드 프리즘 버전 6.03)을 이용하여 제11 일에 대조군 동물(553%)과 처리군 동물(128%) 사이의 평균 상대적 종양 용적을 계산하여 RSLAIL-2 및 항-CTLA-4 처리군에서 종양 성장 저해(TGI) 76.9%($p < 0.05$)를 나타내었다.
- [0165] RSLAIL-2 및 항-CTLA-4의 처리를 중화 CD8a 항체의 연속 주사와 조합하여 세포독성 CD8 T 세포의 생체내 고갈을 야기하였을 때, 결과는 비히클 대조군에 비해 통계학적 유의도에 도달되지 않은 제11 일에 평균 상대적 종양 용적 520% 및 종양 성장 저해 5.98%를 지니는 치료 효능의 폐기였다.
- [0166] RSLAIL-2 및 항-CTLA-4의 처리를 중화 항-Asialo-GM1 항체의 연속 주사와 조합하여 NK 세포의 생체내 고갈을 야기하였을 때, 결과는 비히클 대조군에 비해 통계학적 유의도에 도달되지 않은 제11 일에 평균 상대적 종양 용적

483% 및 종양 성장 저해 12.7%를 지니는 치료 효능의 폐기였다.

- [0167] RSLAIL-2를 항-PD-1과 조합하였을 때, 제100 일에 평균 상대적 종양 용적은 285%였고 종양 성장 저해(TGI) 48.5%를 야기하였다($p < 0.05$).
- [0168] RSLAIL-2 및 PD-1의 처리를 중화 CD8a 항체의 연속 주사와 조합하였을 때, 결과는 비히클 대조군에 비해 통계학적 유의도에 도달되지 않은 제11 일에 평균 상대적 종양 용적 539% 및 종양 성장 저해 2.53%를 지니는 치료 효능의 폐기였다.
- [0169] RSLAIL-2 및 항-PD-1의 처리를 중화 항-Asialo-GM1 항체의 연속 주사와 조합하였을 때, 결과는 비히클 대조군에 비해 통계학적 유의도에 도달되지 않은 제11 일에 평균 상대적 종양 용적 364% 및 종양 성장 저해 34.2%를 지니는 치료 효능의 폐기였다.
- [0170] 항-CTLA-4 또는 항-PD-1과 조합하였을 때, 또는 처리를 CD8의 첨가 또는 항-Asialo-GM1 항체 제거와 조합하였을 때, RSLAIL-2로부터 유의한 체중 상실이 관찰되지 않았지만, 항-Asialo-GM1과의 조합은 RSLAIL-2 및 항-CTLA-4를 또한 받은 그룹에서 연구 제8 일에 2 마리의 동물이 사망한 것을 발견하였으며, RSLAIL-2 및 항-PD-1을 또한 받은 그룹에서 연구 제8 일에 3 마리의 동물이 사망한 것을 발견하였다.

표 8

I상 결과의 요약(평균 ± SE)

[0171]

처리	용량	N	처리 개시 시 종양 용적 (mm ³)	제11 일에 평균 상대적 종양 용적 (%)	제11 일에 평균 종양 성장 저해 ¹ (%)	p 값 ²
비히클 대조군 (제0 일, 제4 일, 제8 일)	NA	10	177 ± 10	553 ± 49	NA	NA
RSLAIL-2(제4 일) + 항 CTLA-4 (제0 일, 제4 일, 제8 일)	0.8 mg/kg 100 µg	8	198 ± 16	128 ± 24	76.9	<0.05
RSLAIL-2 (제4 일) + 항 CTLA-4 (제0 일, 제4 일, 제8 일) + 항-CD8a(제-2 일, 제0 일, 제7 일)	0.8 mg/kg 100 µg 100 µg	8	195 ± 14	520 ± 46	5.98	NS ³
RSLAIL-2 (제4 일) + 항 CTLA-4 (제0 일, 제4 일, 제8 일) + 항 Asialo-GM1 (제-2 일, 제0 일, 제7 일)	0.8 mg/kg 100 µg 50 µl	8	177 ± 13	483 ± 51	12.7	NS
RSLAIL-2(제4 일) + 항 PD-1 (제0 일, 제4 일, 제8 일)	0.8 mg/kg 100 µg	8	184 ± 10	285 ± 46	48.5	<0.05
RSLAIL-2 (제4 일) + 항 PD-1 (제0 일, 제4 일, 제8 일) + 항-CD8a (제-2 일, 제0 일, 제7 일)	0.8 mg/kg 100 µg 100 µg	8	176 ± 10	539 ± 45	2.53	NS

RSLAIL-2 (제4 일) + 항 PD-1 (제0 일, 제4 일, 제8 일) + 항 Asialo-GM1 (제-2 일, 제0 일, 제7 일)	0.8 mg/kg 100 µg 50 µl	8	223 ± 15	364 ± 65	34.2	NS
--	------------------------------	---	----------	----------	------	----

[0172] ¹평균 종양 성장 저해(TGI%)를 다음의 식을 사용하여 제18 일(대조군 동물이 존재한 마지막 날)에 평가하였다:
 $TGI\% = (1 - \frac{\text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{처리군}}}{\text{상대적 종양 용적}(\%)^{\text{대조군}}}) \times 100$

[0173] ²다중 비교, 터키 사후 검정을 이용하는 일원 ANOVA.

[0174] ³NS는 통계학적 유의도를 달성하지 못하였다.

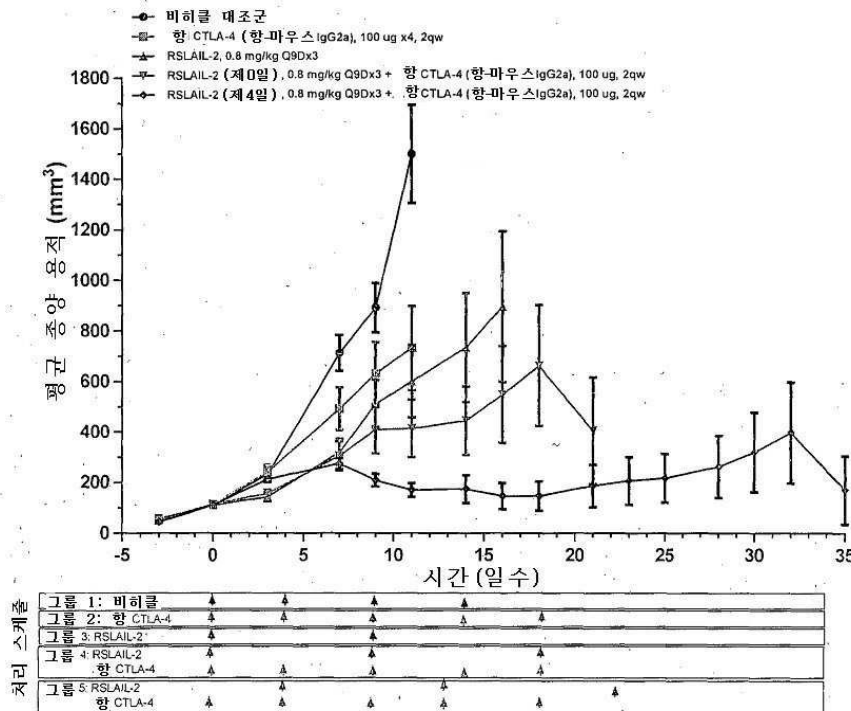
[0175] 이 연구는 EMT6 유방 암종 종양에서 RSLAIL-2와 항-CTLA-4 또는 RSLAIL-2와 항-PD-1을 사용하는 조합 면역 요법의 효능을 입증한다. 추가로, NK 및 CD8 T 세포의 생체내 고갈 후에 항종양 효능의 상실은 이 효능에서 세포 유형 둘 다에 대한 역할을 시사한다.

도면

도면1

종양 용적 (평균 ± SEM)

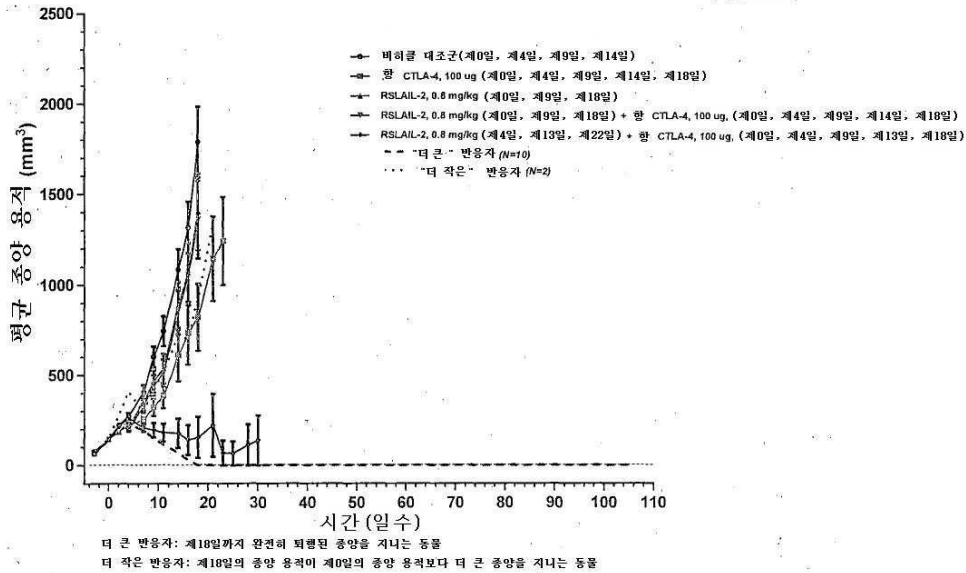
암컷 BALB/C 마우스에서 CT26 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가



도면5

제106일까지의 종양 용적 (평균 ± SEM)

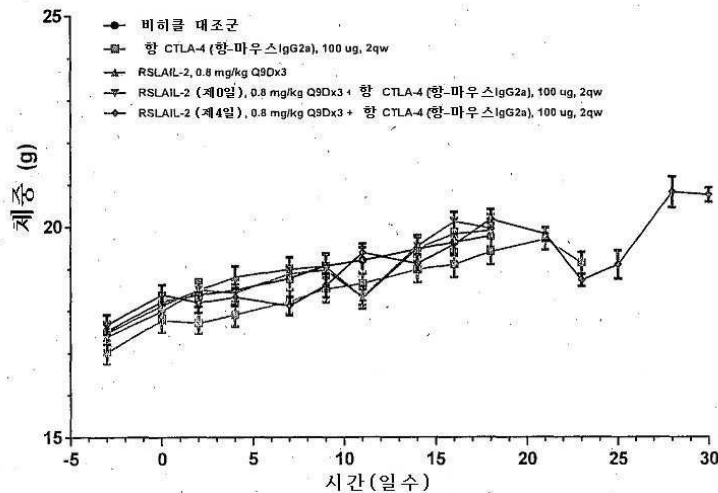
암컷 BALB/C 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가 (평균 ± SE)



도면6

체중 (평균 ± SEM)

암컷 BALB/C 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가 (평균 ± SE)



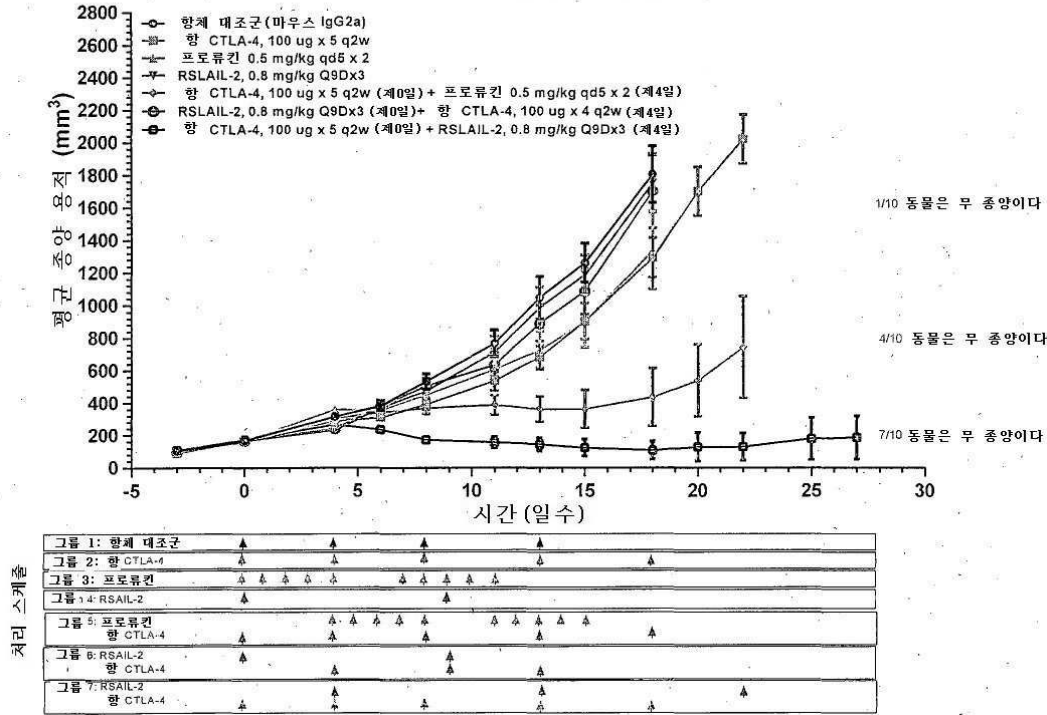
처리 스케줄

그룹 1: 비히클	▲	▲	▲	▲	▲
그룹 2: 항 CTLA-4	▲	▲	▲	▲	▲
그룹 3: RSLAIL-2	▲	▲	▲	▲	▲
그룹 4: RSLAIL-2 항 CTLA-4	▲	▲	▲	▲	▲
그룹 5: RSLAIL-2 항 CTLA-4	▲	▲	▲	▲	▲

도면7

제27일까지의 체중 (평균 ± SEM)

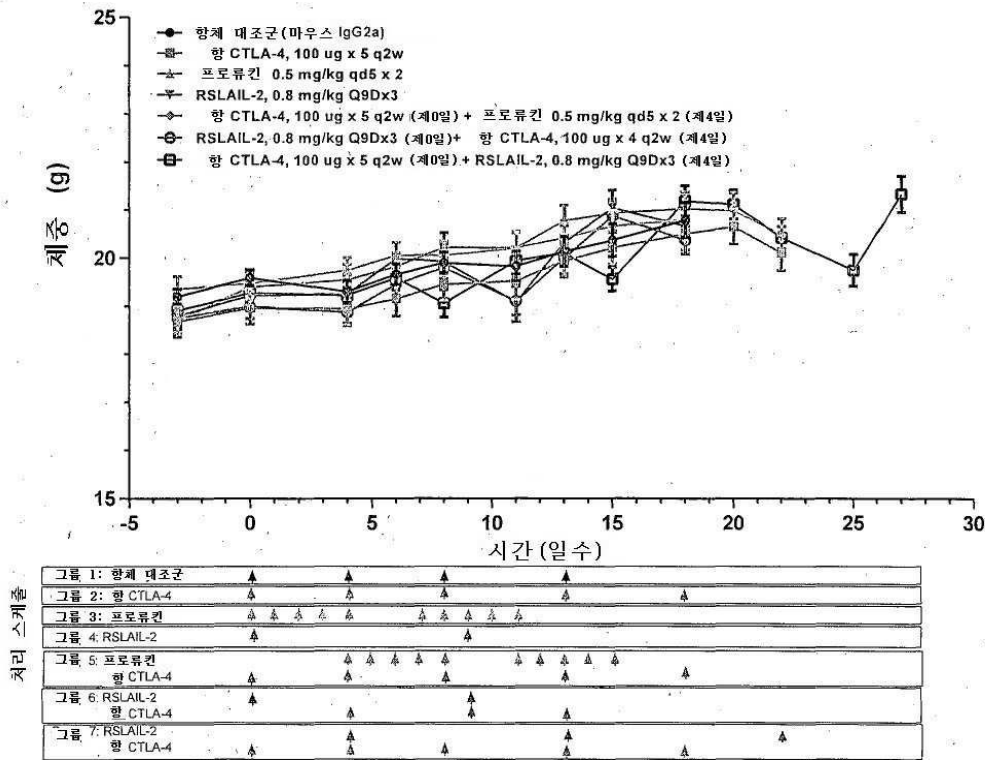
암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한, 항-CTLA-4 항체 처리와 조합한 프로류킨의 효능에 비교한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가



도면8

제27일까지의 체중 (평균 ± SEM)

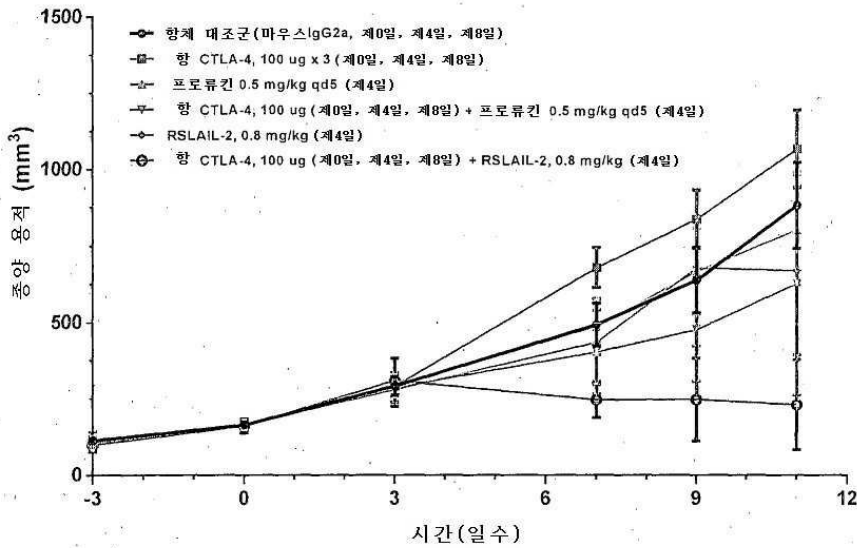
암컷 BALB/c 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한, 항-CTLA-4 항체 처리와 조합한 프로류킨의 효능에 비교한 항-CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2의 효능 평가



도면9

제11일까지의 종양 성장

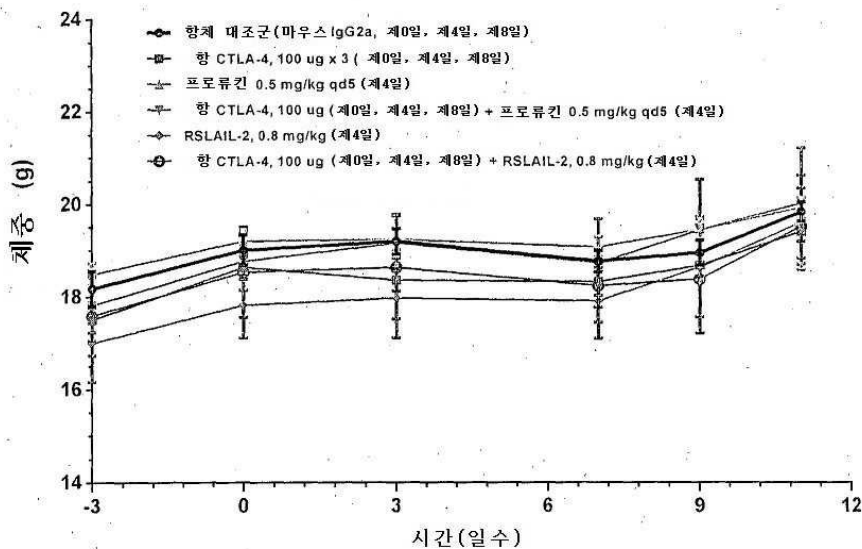
암컷 BALB/C 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한 항 CTLA-4 항체와 조합한 RSLAIL-2를 시험하는 효능 연구



도면10

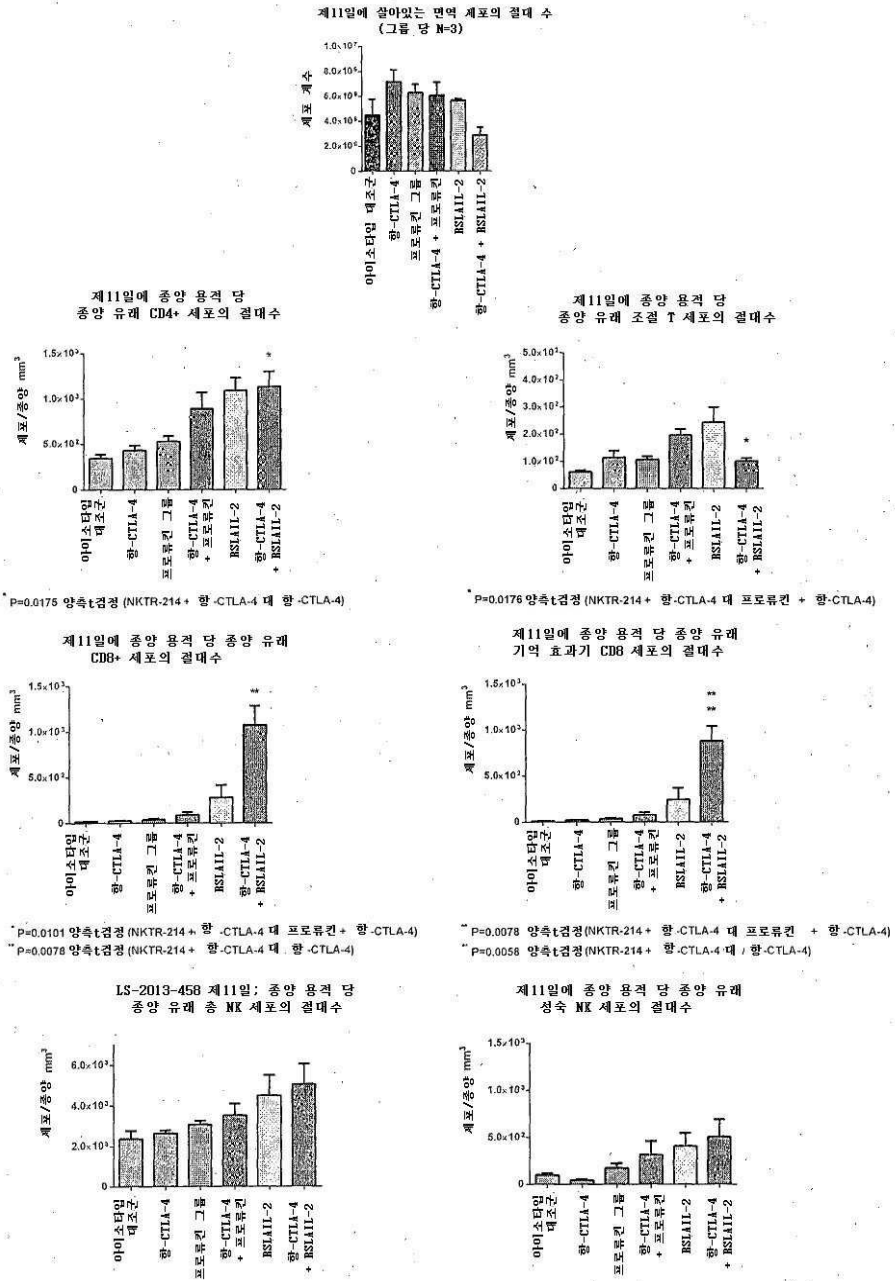
제11일까지의 체중 및 체중%의 변화

암컷 BALB/C 마우스에서 EMT6 종양 모델에 대한 항 CTLA-4와 조합한 RSLAIL-2를 시험하는 효능 연구



도면11

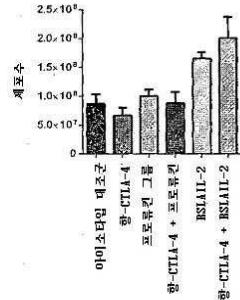
제11일에 종양에서의 면역 세포 집단



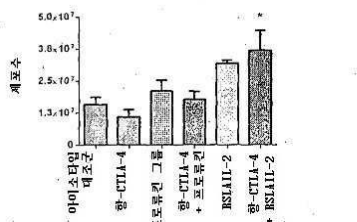
도면12

제11일에 비장에서 면역 세포 집단

LS-2013-458 제11일: 살아있는 면역 세포의 절대수 (그룹 당 N=3)

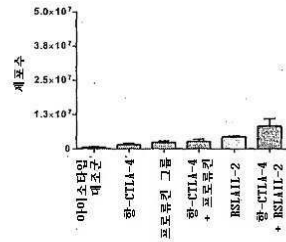


제11일에 비장 유래 CD4+ 세포의 절대수

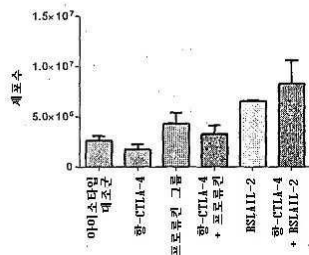


* P=0.0342 양측 t-검정 (NKTR-214 + 항-CTLA-4 대 항-CTLA-4)

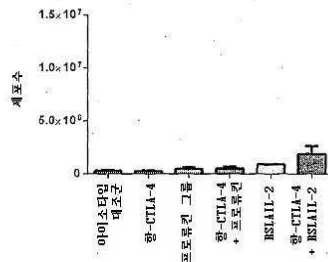
제11일에 비장 유래 조절 T 세포의 절대수



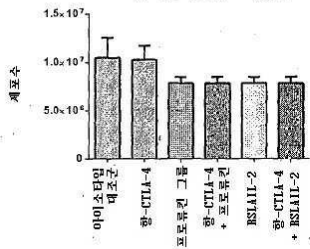
제11일에 비장 유래 CD8+ 세포의 절대수



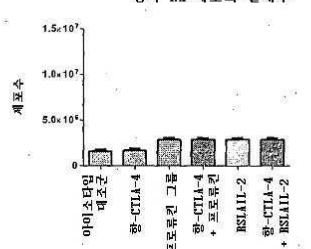
제11일에 비장 유래 기억 효과기 CD8 세포의 절대수



제11일에 비장 유래 총 NK 세포의 절대수



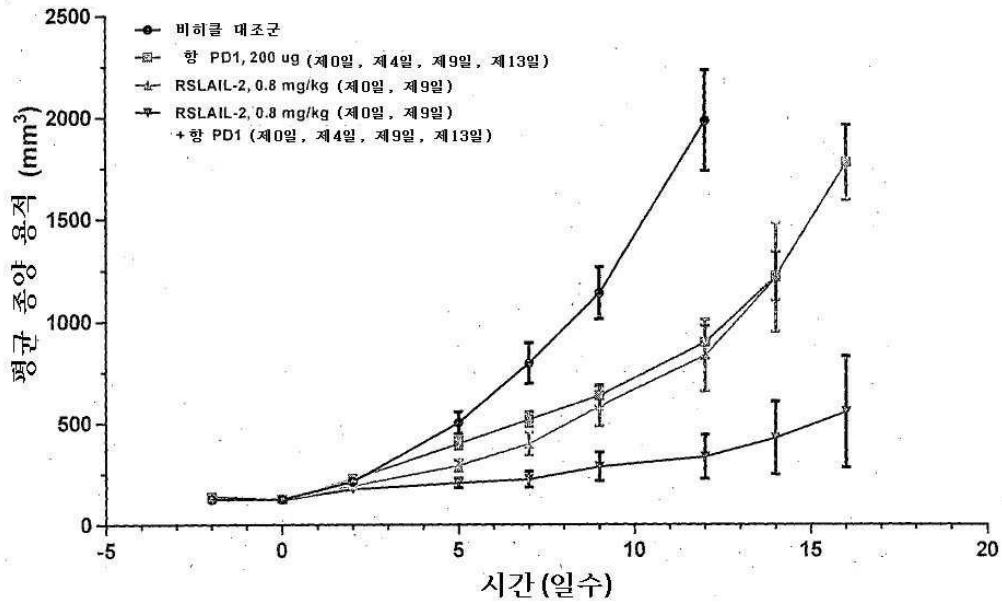
제11일에 비장 유래 성숙 NK 세포의 절대수



도면13

종양 용적 데이터 (평균 ± SEM)

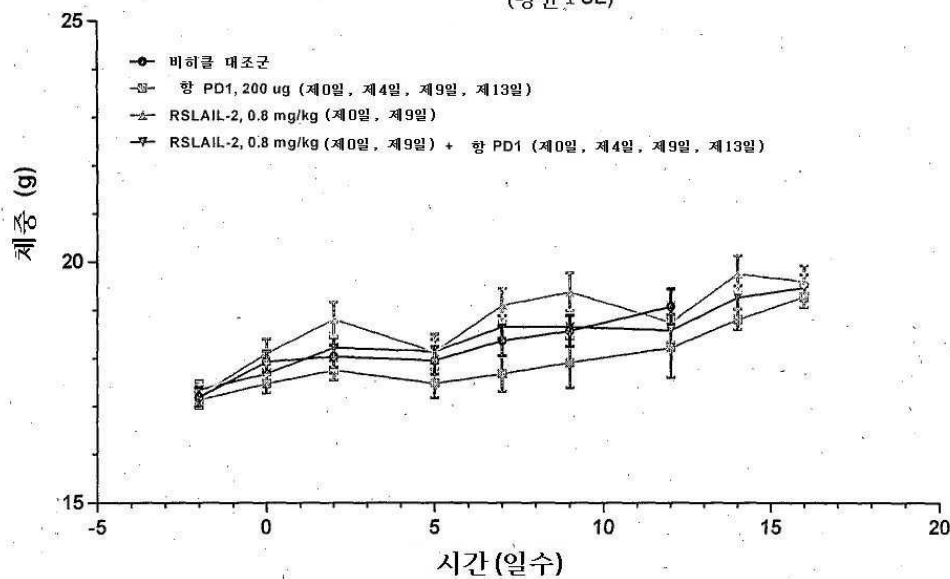
암컷 BALB/C 마우스에서 CT26 무린 결장 암종 종양 성장에 대한 NKTR-214 와 항 PD1 항체를 이용한 조합 면역 요법의 효능 (평균 ± SE)



도면14

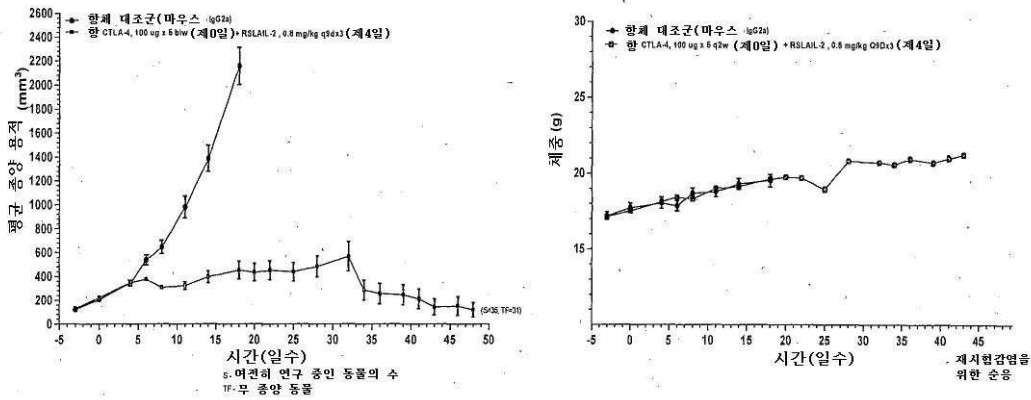
체중 데이터 (평균 ± SEM)

암컷 BALB/C 마우스에서 CT26 무린 결장 암종 종양 성장에 대한 NKTR-214 와 항 PD1 항체를 이용한 조합 면역 요법의 효능 (평균 ± SE)



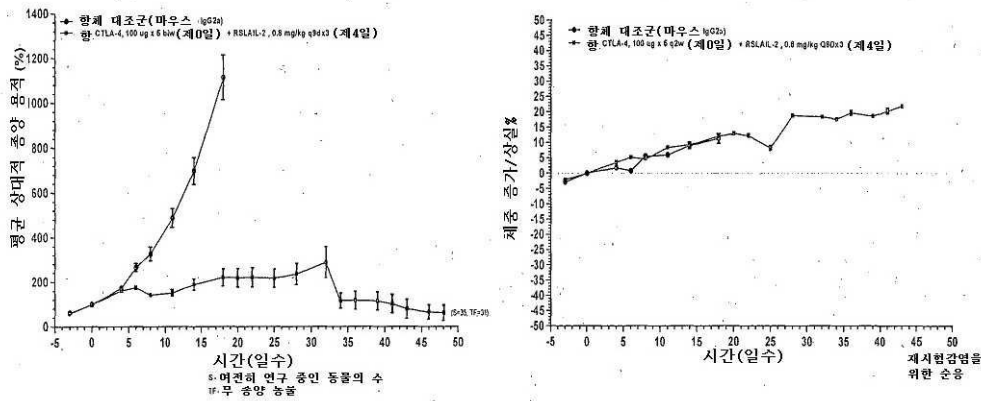
도면15

I상 종양 용적 및 체중 (평균 ± SE)



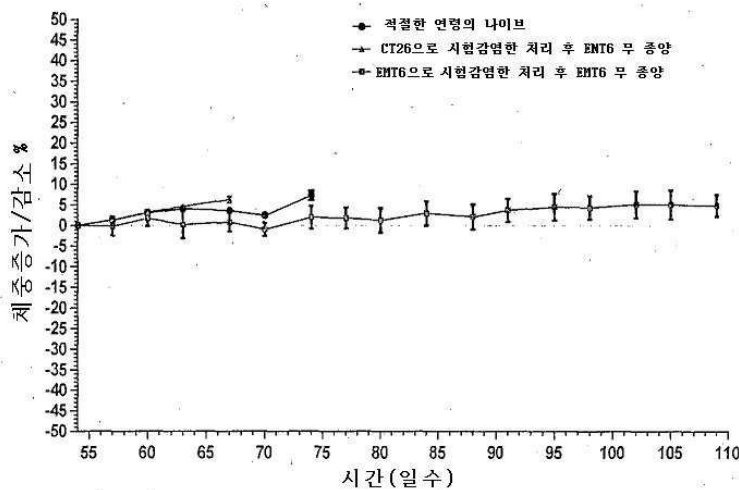
도면16

I상 상대적 종양 용적 및 체중 변화



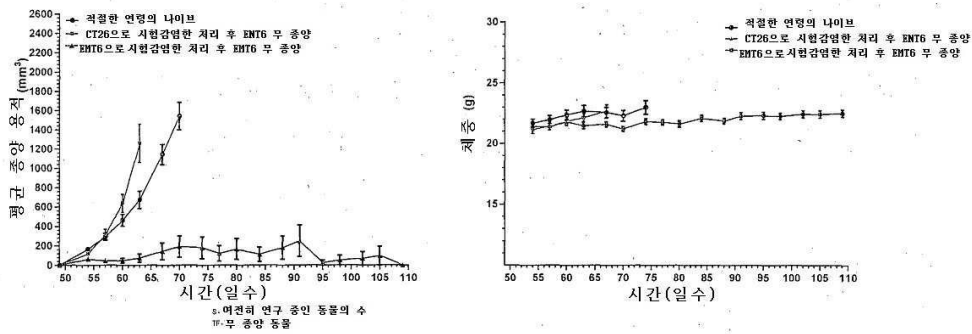
도면17

상대적 체중 변화



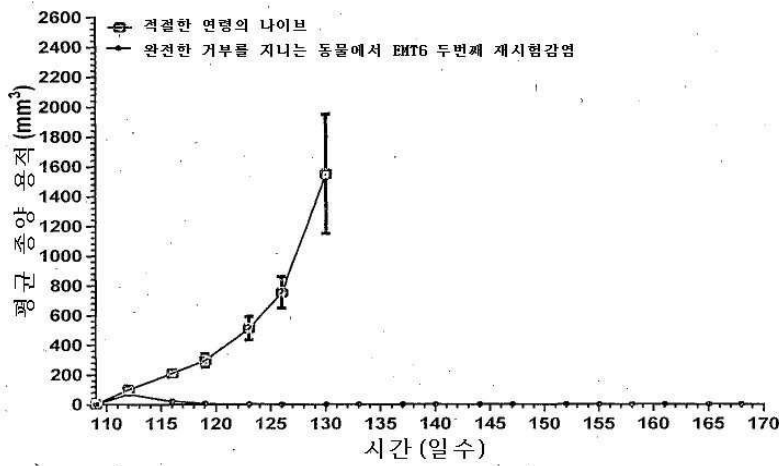
도면18

II상 종양 용적 및 체중 (평균 ± SE)



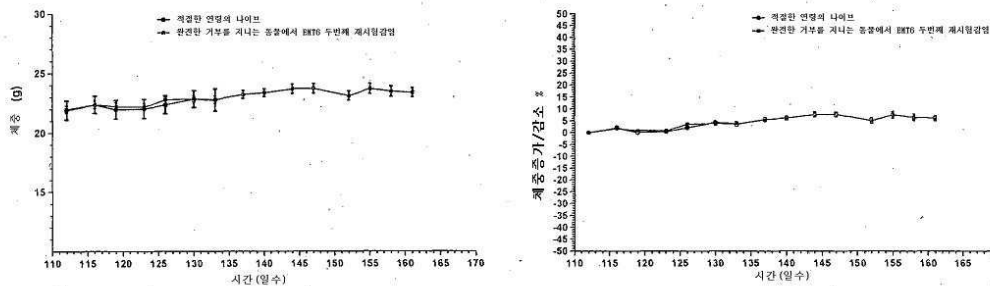
도면19

종양 용적의 III상 요약



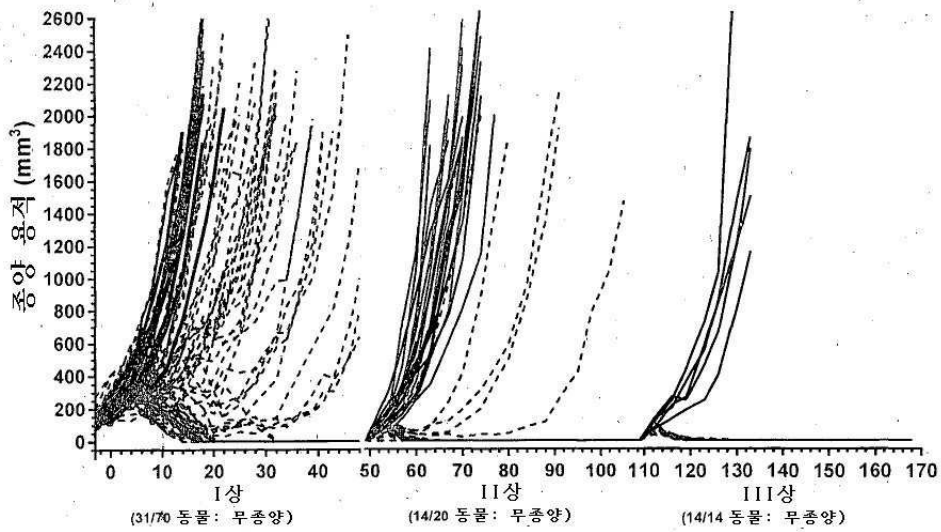
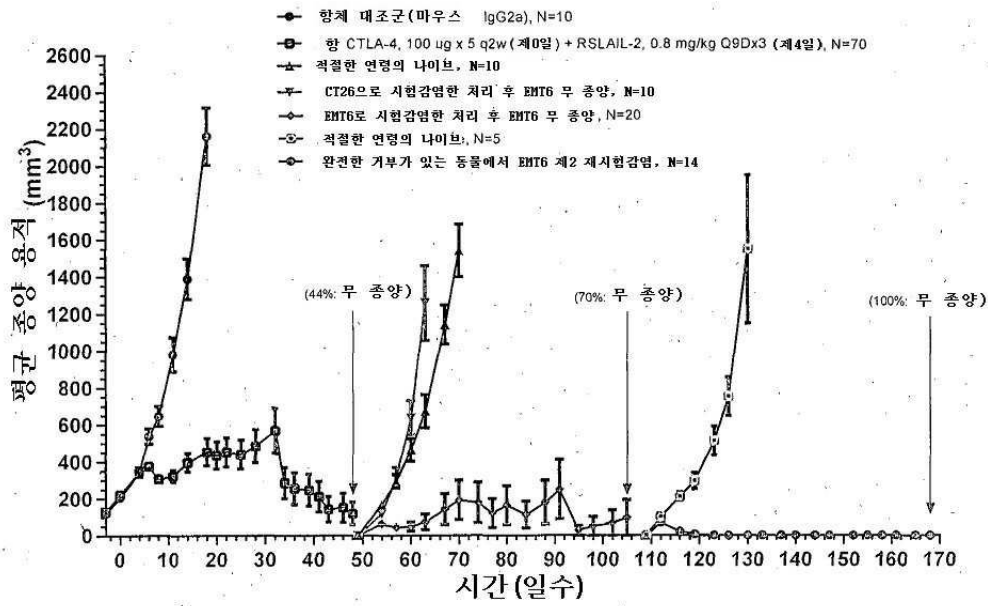
도면20

체중 변화의 III상 요약



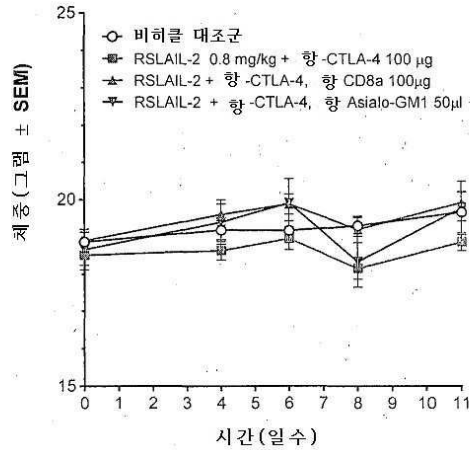
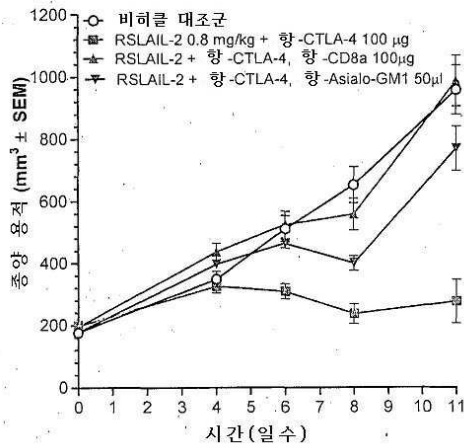
도면21

종양 용적의 완전한 요약 (제-3일 내지 제168일)



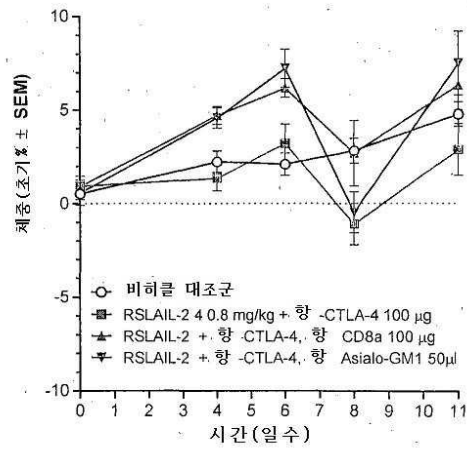
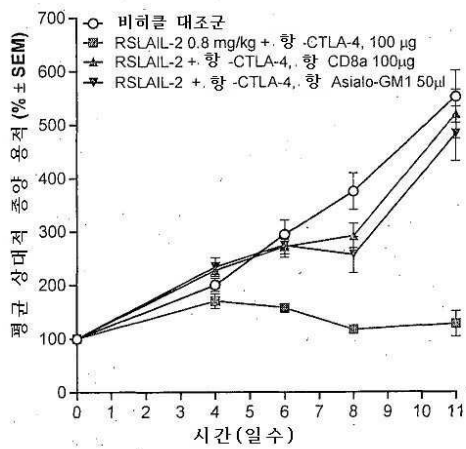
도면22

종양 용적 및 체중, RSLAIL-2와 항-CTLA-4 조합 (평균 ± SEM)



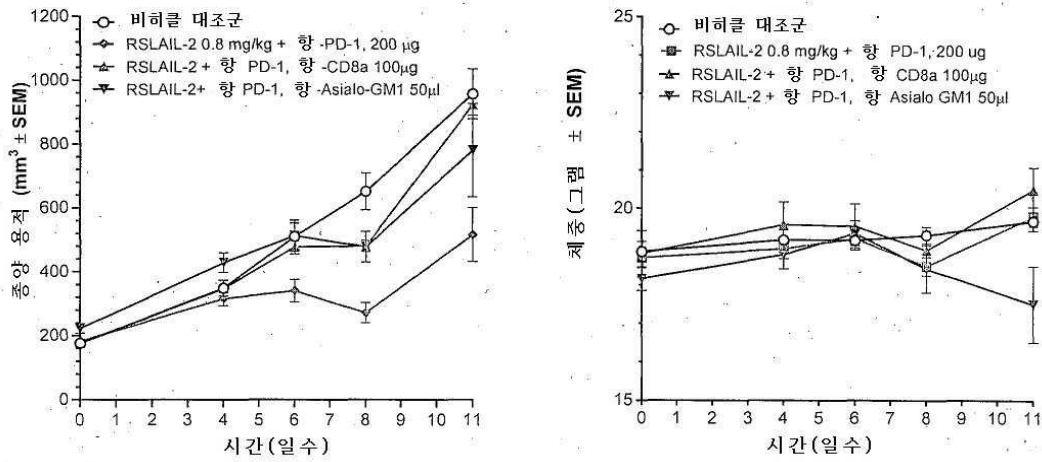
도면23

상대적 종양 용적 및 체중 변화, RSLAIL-2와 항-CTLA-4 조합



도면24

종양 용적 및 체중, RSLAIL-2 와 항-PD-1 조합 (평균 ± SEM)



도면25

상대적 종양 용적 및 체중 변화, RSLAIL-2 와 항-PD-1 조합

