



등록특허 10-2798243



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월18일

(11) 등록번호 10-2798243

(24) 등록일자 2025년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/60 (2017.01) A61K 38/20 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/54 (2024.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 38/2086 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7036787

(22) 출원일자(국제) 2018년05월15일

심사청구일자 2021년04월29일

(85) 번역문제출일자 2019년12월12일

(65) 공개번호 10-2020-0003922

(43) 공개일자 2020년01월10일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/032817

(87) 국제공개번호 WO 2018/213341

국제공개일자 2018년11월22일

(30) 우선권주장

62/506,494 2017년05월15일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170005793 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

넥타르 테라퓨틱스

미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미
션 베이 불러바드 455 스위트 100

(72) 발명자

커크 피터 베네딕트

영국 오엑스14 4제이더블유 애빙턴 드레이턴 하이
스트리트 55

장 명

미국 94030 캘리포니아주 밀브레 마드리드 코트 5

브루어 페이원 쿠오

미국 94070 캘리포니아주 샌 카를로스 클럽 드라
이브 100

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 하재욱

(54) 발명의 명칭 지속 작용성 인터류킨-15 수용체 효현제 및 관련 면역요법 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시내용은 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제, 관련 조성물, 및 제조 및 사용 방법, 예를 들어, 지속적인 면역 활성화 및/또는 항-종양 활성을 제공하기에 효과적인 요법에 반응하는 병태의 치료에서의 사용 방법을 제공한다.

대표도 - 도1

서열번호 1

10	20	30	40	50	60
MNWNVISDL	KKIEDLIQSM	HIDATLYTES	DVHPSCKVTA	MKCFLELQV	ISLESQDASI
70	80	90	100	110	
HDTVENLIL	ANNSLSSNGN	VTEGCKECE	ELEEKNIKEF	LQSFVHIVQM	FINTS

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/5443 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/536,966 2017년07월25일 미국(US)

62/582,186 2017년11월06일 미국(US)

62/648,240 2018년03월26일 미국(US)

명세서

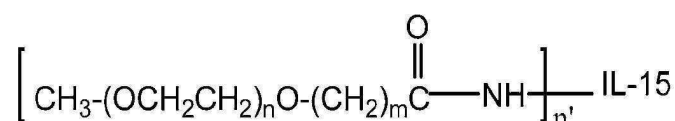
청구범위

청구항 1

암의 치료를 위한 약학 조성물로서,

하기 구조를 갖는 지속 작용성 인터류킨-15 (IL-15) 수용체 효현제, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하고:

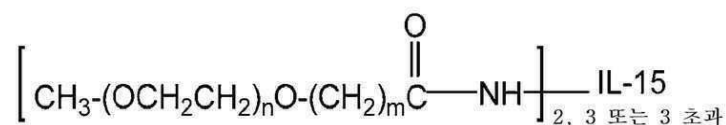
[화학식 I]



(여기서, IL-15는 인터류킨-15 모이어티이고, n은 150 내지 3,000이고 40,000 달톤의 중량 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 중합체에 상응하는 값을 갖는 정수이고; m은 3이고, n'는 1이고, 구조 내의 ~NH~는 IL-15 모이어티의 아미노 기를 나타냄),

하기 화학식을 갖는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 15 몰 퍼센트 이하로 포함하고:

[화학식 II]



(여기서, 화학식 II 와 관련하여, 변수 n 과 m 은 상기 화학식 I 에 대해 정의된 바와 같다),

조성물 중에 포함된 화학식 I 및 화학식 II 의 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 경우, IL-15 아미노 기에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 평균 수가 1.0 내지 1.3의 범위인, 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 화학식 II에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 10 몰 퍼센트 이하로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 화학식 II에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 7 몰 퍼센트 이하로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 화학식 II에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 5 몰 퍼센트 이하로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 조성물 중에 포함된 화학식 I 및 화학식 II 의 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 경우, IL-15 아미노 기에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 평균 수가 1.0, 1.1, 1.2 및 1.3으로부터 선택되는, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)과 비교시 7배 이하로 감소된 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)을 나타내는, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)과 비교시 6.5배 이하, 또는 6배 이하, 또는 5.5배 이하, 또는 5배 이하, 또는 4.5배 이하, 또는 4배 이하, 또는 3.5배 이하, 또는 3배 이하로 감소된 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)을 나타내는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15와 비교시 50% 이하로 감소된 IL-15 α 수용체에 대한 친화력 상수(K_D , pM) 값을 갖는, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15와 비교시 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 또는 30% 이하로 감소된 IL-15 α 수용체에 대한 친화력 상수(K_D , pM) 값을 갖는, 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)과 비교시 7배 이하로 감소된 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)을 나타내고, IL-15의 IL-15 α 수용체에 대한 친화력 상수(K_D , pM) 값과 비교시 50% 이하로 감소된 IL-15 α 수용체에 대한 친화력 상수(K_D , pM) 값을 갖는, 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 조성물 중에 포함된 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 35% 미만 탈아미드화된, 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 화학식 I 에 따른 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 위치 이성질체의 혼합물을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 화학식 I 에 따른 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 위치 이성질체의 혼합물의 경우, 아미노기가 IL-15 모이어티의 N-말단에 있는, 약학 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 화학식 I 및 화학식 II 에 따른 IL-15 모이어티는 재조합 인간 IL-15인, 약학 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 화학식 I 및 화학식 II 에 따른 IL-15 모이어티는 글리코실화되지 않은, 약학 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 화학식 I 및 화학식 II 에 따른 IL-15 모이어티는 서열번호 1 에 제시된 서열을 갖는, 약학 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 비경구 투여용 제제에 포함되는, 약학 조성물.

청구항 18

제1항에 있어서, 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 19

제18항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 완충액인, 약학 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 완충액은 인산칼륨인, 약학 조성물.

청구항 21

제18항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 탄수화물인, 약학 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 탄수화물은 트레할로스인, 약학 조성물.

청구항 23

제18항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 부형제는 계면활성제인, 약학 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20인, 약학 조성물.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 조성물은 수성 매질에 포함되고, 6.5 내지 7.0의 pH를 갖는, 약학 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 조성물은 수성 매질에 포함되고, 6.8의 pH를 갖는, 약학 조성물.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 자연 살해 세포의 활성화 및 증식을 자극하기 위해 포유류 대상체에게 치료 유효량으로 투여시 효과적인, 약학 조성물.

청구항 28

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, CD8 T-세포의 생존 및 기억 형성을 뒷받침하기 위해 대상체에게 치료 유효량으로 투여시 효과적인, 약학 조성물.

청구항 29

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 암을 갖는 대상체에게 투여함으로써 암을 치료하기 위한, 약학 조성물.

청구항 30

제12항에 있어서, 화학식 I 에 따른 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 위치 이성질체의 혼합물의 경우, 아미노기가 IL-15 모이어티의 N-말단에 있는 위치 이성질체가 다른 위치 이성질체들과 비교시 가장 높은 양으로 존재하는, 약학 조성물.

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 미국 가특허출원 번호 62/506,494(2017년 5월 15일 출원); 및 미국 가특허출원 번호 62/536,966(2017년 7월 25일 출원); 및 미국 가특허출원 번호 62/582,186(2017년 11월 6일 출원); 및 미국 가특허출원 번호 62/648,240(2018년 3월 26일 출원)에 대해 35 U.S.C. 119(e) 하에 우선권을 주장하며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 분야

[0004] 본 개시내용은 (특히) 지속 작용성 인터루킨-15("IL-15") 수용체 효현제, 관련 조성물, 그리고 제조 방법 및 사용 방법, 예를 들어, 지속적인 면역 활성화 및 항-종양 활성을 제공하기에 효과적인 요법에 반응하는 병태의 치료 등에서의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 인터루킨-15("IL-15")는 Grabstein 외 다수에 의해 처음 보고된 다면 발현성 사이토카인이다(Grabstein et al. (1994) *Science* 264:965-968). 162-아미노산 전구체로서 분비된 인간 IL-15는 29개 아미노산 리더 서열과 19개 아미노산 전서열을 함유하므로; 성숙한 단백질은 그 길이가 114개 아미노산이다. 사이토카인의 4개 α-나선체 다발군에 속하는 IL-15는 이형삼량체 수용체에 결합하는데, 여기서 독특한 α 서브유닛(IL-15Rα)은 IL-15에 수용체 특이성을 부여하고, 이 수용체의 β 및 γ 서브유닛은 기타 다른 사이토카인 수용체 1개 이상과 공통점을 공유한다. Giri et al. (1995) *EMBO J.* 14:3654-3663.

[0006] 사이토카인으로서 IL-15는 선천적 면역계와 적응 면역계 둘 다에 영향을 준다(DiSabito et al. (2011) *Cytokine Growth Factor Rev.* 22:19-33). (일반적으로 숙주를 외래 침입 물질로부터 방어하는) 선천적 면역계에 대하여, IL-15는, 다른 특성을 갖는 것 외에도, 자연 살해 세포("NK 세포") 및 자연 살해-T 세포("NK-T 세포")의 발달을 야기하고 이들 세포의 생존을 유지한다. 상기 IL-15의 선천적 면역계에서의 역할과 마찬가지로 NK 세포는 침입하는 병원체를 특이적으로 공격하지 않고; 상기 NK 세포는 오히려 면역 약화된 숙주 세포(예를 들어, 종양 세포 또는 바이러스 감염 세포)를 파괴한다. NK-T 세포는 면역 반응의 일반적인 활성화를 초래하는 면역 조절성 사이토카인, 특히 인터페론-γ를 생성한다.

[0007] (숙주가 특정 병원체와 처음 접촉하고 나서, 추후 이 숙주를 특이적 외래 침입 물질로부터 방어하는) 적응 면역계에 대하여, IL-15는 면역 조절성 사이토카인 생성 헬퍼 T 세포의 유지에 필요하다. 중요한 점은, IL-15는 또한 신속하게 증식하는 능력을 가지는, "항원 경험이 있는(antigen-experienced)" 기억 T 세포의 장기간 유지를 지지함으로써 말미암아, 숙주를 침입한 특정 외래 병원체에 다시 노출되었을 때 더 신속하고 더 강력한 면역 반응을 일으킨다는 점이다.

[0008] 마지막으로 선천적 및 적응 면역계 둘 모두 내에서의 IL-15의 특이적인 역할들에도 불구하고, 상기 IL-15는 상기 면역계 카테고리 둘 다에 걸쳐 상당하면서도 광범위한 효과들을 나타낸다. 특히 IL-15는 상기 면역계 카테고리 둘 다에 연관된 다수의 세포류(수지상 세포, 호중구, 호산구, 비만 세포, CD4+ T 세포 및 B 세포를 포함함)의 세포자살(또는 세포 사멸)을 억제 또는 감소시킨다.

[0009] IL-15는 숙주에 대해 외래의 것(또는 "비자기인 것")으로서 나타나는 세포들에 대항하여 싸울 수 있는 면역계에서 다수의 세포들의 증식 및 유지를 자극하므로, 상기 IL-15는 암을 앓고 있는 개체들의 치료에 사용될 것이 제안된 바 있다(Steel et al. (2012) *Trends Pharmacol. Sci.* 33(1):35-41). 예를 들어, IL-15 기반 작동제는 골수종을 치료하는 것으로 제안되었다(Wong et al. (2013) *OncImmunology* 2(11), e26442:1-3). 덧붙여, IL-15 약물요법은 바이러스 감염이 발생한 개체들, 예를 들어 HIV 감염이 발생한 개체들을 치료하기 위한 것으로 제안된 바 있다.

[0010] 다수의 질병이 발병한 개체들의 치료에 있어서 IL-15의 사용 가능성에도 불구하고, IL-15 기반 요법들은 다수의 난제들을 만나게 된다. 예를 들어, IL-15는 혈장으로부터 빨리 없어지고, 생리적 조건 하에서 비교적 불안정적이다. 또한, IL-15의 생체내 신호전달 활성화는 유사하게 수명이 짧고, 분자는 불리하게 최적 활성을 위해 매일 투여 또는 다수일 연속 투입을 필요로 한다. 임의의 접근법들은 이 IL-15와 IL-15 수용체 알파 서브유닛을 복합체화하여 이러한 한계들을 극복하기 위한 노력을 하고 있다. 그러나 이와 같은 접근법은 다수의 세포류들에서 발현되는 IL-15 수용체 알파를 통해서만 유일무이하게 발생하는, 바람직한 신호전달을 방해할 수 있다. 비교적 작은 분자량(5 kDa)의 숙신이미딜 카보네이트-말단화 중합체와의 비유리성 PEG화(non-releasable PEGylation)가 보고된 바 있지만, 이는 IL-15 생물 활성의 상당한 변형을 초래한다(Pettit et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(4):2312-2318).

[0011] 그러나, 상기 접근법에도 불구하고, 개선된 특징 및 프로파일, 예컨대 강력한 면역 자극 효과, 낮은 전신 독성, 안정성 및/또는 개선된 약동학을 갖는 새로운 IL-15 수용체 효현제에 대한 필요성이 남아있다. 따라서, 특히, 본 개시내용은, 당업계에 의해 새롭고 완전히 비-제안된 것으로 여겨지는, 하기에 보다 상세히 기재되는 많은 유리한 특징을 갖는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제뿐만 아니라, 이러한 효현제를 포함하는 조성물 및 키트뿐만 아니라, 본원에 기재된 바와 같은 관련된 제조 방법 및 사용 방법을 제공한다.

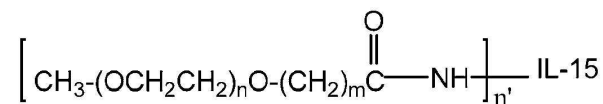
발명의 내용

[0012] 제1 양태에서는, 그의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제가 본원에서 제공된다. 지속 작용성 IL-15 수용체(IL-15 R) 효현제는 아마이드 연결을 통해 IL-15 아미노기에 안정적으로 공유 결합된 적어도 단일 선형 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. IL-15 아미노기에 대한 안정적 아마이드 연결과 선형 PEG 스트랜드 사이에 2 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 선형 비치환된 알킬렌 기($\sim\text{CH}_2\sim$)_m(즉, m=2, 3, 4, 또는 5)가 개재될 수 있다.

[0013] 예를 들어, 일부 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₂이거나; 또는, 일부 추가의 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₃이고; 또한 일부 추가의 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₄이고; 또한 일부 추가의 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₅이다.

[0014] 예를 들어, 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 하기 구조를 갖는다:

[0015] [화학식 I]



[0016] (여기서, IL-15는 인터류킨-15 모이어티이고, n은 약 150 내지 약 3,000의 정수이고; m은 2~5의 정수(예: 2, 3, 4, 또는 5)이고, n'는 1임). 화학식 I은 또한 $[\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{C}(\text{O})-\text{NH}]_{n'}-\text{IL15}$ 로서 표시될 수 있고, 두 화학식이 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 화학식 I(및 본원에서 제공되는 유사한 화학식)에서 구조 내의 $\sim\text{NH}\sim$ 는 IL-15 모이어티의 아미노기를 나타낸다.

[0018] 일부 추가의 구현예에서, n은 약 200 내지 약 2000, 또는 약 400 내지 약 1300, 또는 약 450 내지 약 1200의 정수이다.

[0019] 또한 하나 이상의 추가의 구현예에서, m은 2 또는 3이고, 따라서 IL-15에 대한 안정적 아마이드 연결로부터 PEG 모이어티를 분리하는 선형 알킬렌 기는 $\sim(\text{CH}_2)_2\sim$ 또는 $(\text{CH}_2)_3\sim$ 이다. 일부 바람직한 구현예에서, m은 3이다.

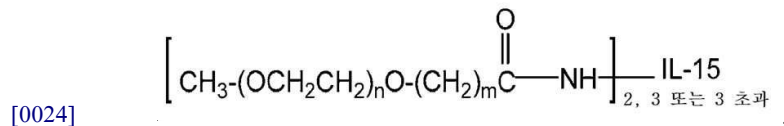
[0020] 하나 이상의 구현예에서, n은 10,000 달톤(예: n은 약 227), 15,000 달톤(예: n은 약 340), 20,000 달톤(예: n

은 약 454), 25,000 달톤(예: n은 약 568), 30,000 달톤(예: n은 약 681), 40,000 달톤(예: n은 약 909), 50,000 달톤(예: n은 약 1136) 및 60,000 달톤(예: n은 약 1364)으로 구성된 군으로부터 선택된 중량 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 중합체에 상응하는 값을 갖는 정수이다.

[0021] 하나 이상의 예시적 구현예에서, 본원에서 제공되는 바와 같은 관련 구현예의 각각을 그리고 모두를 비제한적으로 포함하는, 화학식 I에 따른 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0022] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 약 15 몰 퍼센트 이하로 포함한다:

[0023] [화학식 II]

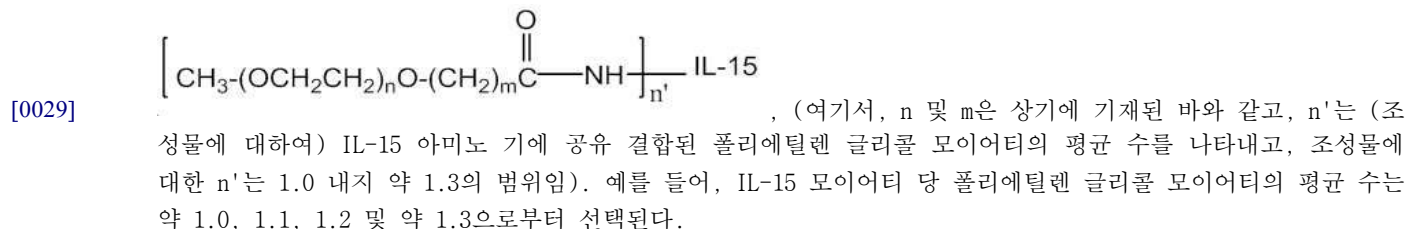


[0025] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 I에 대해 제공된 바와 같음). 다시 말해서, 이러한 조성물의 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 성분과 관련하여, 조성물 중에 포함된 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 약 15 mol% 이하의 화학식 II를 갖는다.

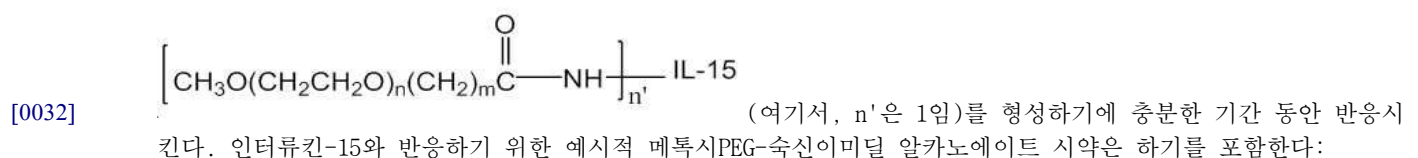
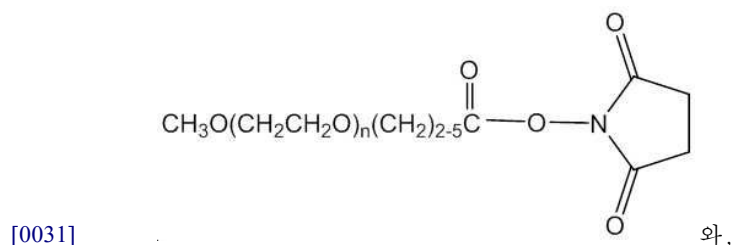
[0026] 예를 들어, 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, 화학식 II에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 약 10 몰 퍼센트 이하로 포함한다.

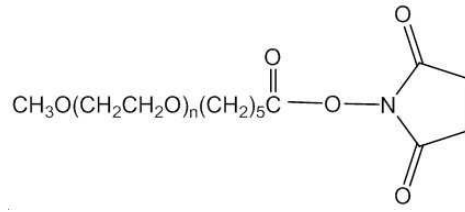
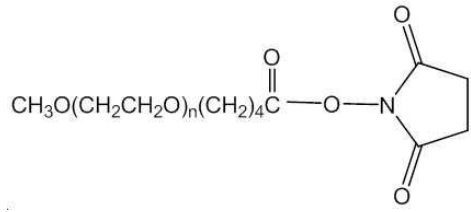
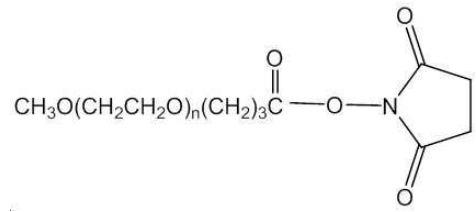
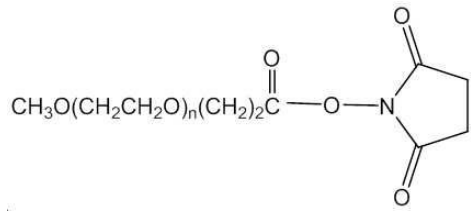
[0027] 상기한 것 중 일부 추가의 구현예에서, 조성물은 n'가 2, 3, 또는 3 초과인 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(즉, 고급 PEGmer, 또한 "high-mer"로서 언급됨)를 약 7 몰 퍼센트 이하로 포함한다. 또한 일부 다른 구현예에서, 조성물은 n'가 2, 3 또는 3 초과인(즉, 2 이상인) 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 약 5 몰 퍼센트, 6 몰 퍼센트, 9 몰 퍼센트 또는 10 몰 퍼센트 이하로 포함한다.

[0028] 일부 추가의 구현예에서, 조성물은 하기 화학식 I에 따른 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 포함한다:

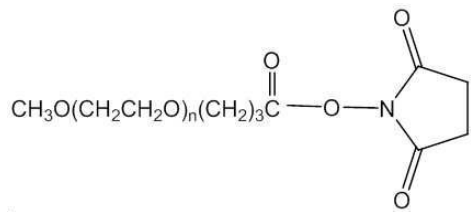


[0030] 또한 또 다른 양태에서는, 화학식 I, 예를 들어 화학식 Ia, Ib, Ic, Id에, 또한 화학식 II, 예를 들어 화학식 IIa, IIb, IIc, 및 IId에 기재된 바와 같은 지속 작용성 인터류킨-15 수용체 효현제의 제조 방법이 본원에서 제공된다. 방법에서는, 인터류킨-15(일반적으로 인산염 완충 식염수 또는 임의의 다른 적합한 완충제 등의 완충제에서 용해됨)를, 약 7(예: 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6)의 pH에서, 활성화된 PEG 시약, 예컨대 하기 구조식에 따른 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트(여기서, n은 약 150 내지 약 3,000의 정수임):





일부 바람직한 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은



, mPEG-숙신이미딜 부타노에이트이다.

일부 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은 약 10,000 달톤(예: n은 약 227), 약 15,000 달톤(예: n은 약 340), 약 20,000 달톤(예: n은 약 454), 약 25,000 달톤(예: n은 약 568), 약 30,000 달톤(예: n은 약 681), 약 40,000 달톤(예: n은 약 909), 약 50,000 달톤(예: n은 약 1136) 및 약 60,000 달톤(예: n은 약 1364)으로 구성된 군으로부터 선택된 중량 평균 분자량을 갖는다.

방법의 하나 이상의 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은 인터류킨-15와 등몰량(즉, 등몰비)으로 첨가된다.

하나 이상의 대안적 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은 인터류킨-15의 몰 과량으로 첨가된다. 일부 특정 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은 2배 몰 과량, 또는 5배 몰 과량, 또는 7배 몰 과량, 또는 10배 몰 과량, 또는 심지어 12배 몰 과량 이상으로 존재한다. 일부 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은 5 내지 10배 몰 과량으로 첨가된다.

일부 구현예에서, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약은 고체로서 첨가된다.

일부 다른 구현예에서는, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약을 적합한 용매 중에 용해시킨다. 특정 구현예에서는, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약을, 예를 들어, 희석 염산과 같은 수성 산 중에 용해시키지만, 임의의 적합한 산이 사용될 수 있다.

방법의 일부 추가의 구현예에서, 인터류킨-15는 초기에, 즉, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약과의 혼합 전에, 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 농도로, 용액 중에 존재한다. 추가의 예시적 농도 범위는, 예를 들어, 약 0.5 mg/mL 내지 약 5 mg/mL 인터류킨-15, 약 0.5 mg/mL 내지 약 3 mg/mL, 및 약 1.0 mg/mL 내지 약 4 mg/mL의 인터류킨-15를 포함한다.

일부 추가의 구현예에서는, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약의 첨가 전에 인터류킨-15 용액의 pH가 약 8.0으로 조정된다.

일부 추가의 구현예에서는, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약의 첨가 후에 반응 혼합물의 pH가 약 8.0으로 조정된다.

일부 추가의 구현예에서는, 생성된 반응 혼합물을 반응물 사이의 반응을 가능하게 하기에 충분한 기간 동안 교반(또는 혼합)한다. 일부 구현예에서는, 반응물을 약 15분 내지 약 10시간(이들 값 포함)까지 혼합한다. 일부 추가의 구현예에서는, 반응물을 약 30분 내지 약 5시간, 또는 약 30분 내지 약 2시간 동안 혼합한다.

일부 구현예에서는, 반응을 대기조건 하에, 예를 들어 실온에서, 즉, 열의 추가 없이 수행한다. 반응을 수행하

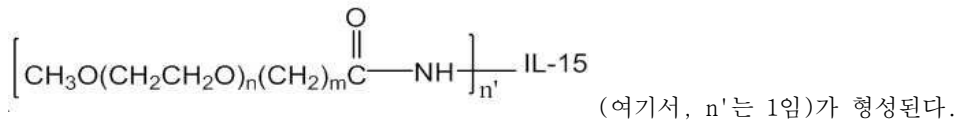
기 위한 예시적 온도 범위는, 예를 들어, 약 5℃ 내지 약 50℃, 또는 약 10℃ 내지 약 40℃, 또는 약 15℃ 내지 약 30℃를 포함한다. 일부 추가의 구현예에서는, 반응을 약 20℃ 내지 약 25℃의 온도에서 수행한다.

[0045] 방법의 일부 구현예에서는, 반응을 아미노산의 첨가에 의해 켄칭시킨다. 일부 관련 구현예에서, 반응을 글리신의 첨가에 의해 켄칭시킨다.

[0046] 방법의 일부 추가의 구현예에서는, 컨쥬게이션 생성물, 즉, 메톡시PEG-알카노에이트-인터류킨-15 컨쥬게이트를 반응 혼합물로부터 분리한다.

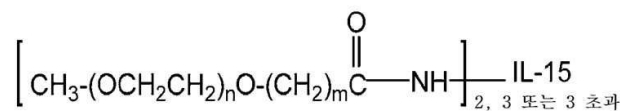
[0047] 일부 추가의 구현예에서는, 메톡시PEG-알카노에이트-인터류킨-15 컨쥬게이트를 포함하는 반응 혼합물을 정제한다.

[0048] 일부 특정 구현예에서는, 반응으로부터



[0050] 일부 추가의 구현예에서, 반응은, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 15 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함하는 조성물을 형성하기에 효과적이다:

[0051] [화학식 II]



[0052] (여기서, n 및 m 의 값은 상기 화학식 I에 대해 제공된 바와 같음).

[0053]

[0054] 또한 일부 추가의 구현예에서, 반응은 20 내지 35% 미만 또는 약 25% 미만 탈아미드화된 폐길화된(PEGylated) 인터류킨-15를 생성하기에 효과적이다.

[0055] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 비개질된(즉, 비컨쥬게이션된) IL-15와 비교시 약 7배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소를 나타낸다. 예를 들어, 하나 이상의 관련 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는, IL-15와 비교시, 약 6.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 6배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 5.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 4.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 4배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 3.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 심지어 약 3배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소를 나타낸다.

[0056] 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는, 예를 들어 수용체 알파 결합 측정에 적합한 기술, 예컨대 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 측정시, 비컨쥬게이션된 IL-15와 비교시, 약 50% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타낸다. 일부 관련 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는, 비컨쥬게이션된 IL-15와 비교시, 약 45% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내거나, 또는 약 40% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내거나, 또는 약 35% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내거나, 또는 심지어 약 30% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타낸다.

[0057] 또한 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는, 비개질된 IL-15와 비교시 약 7배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소 및 IL-15와 비교시 약 50% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소(상기에 기재된 EC50 값 또는 K_D 값의 감소의 임의의 하나 이상의 특정 조합 포함)를 나타낸다.

[0058] 또한 하나 이상의 구현예에서는, 본원에 기재된 바와 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 및 적어도 하나의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0059] 또한 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 조성물은 NK 활성화 및/또는 증식을 자극하기

위해 대상체에게 치료 유효량으로 투여시 효과적이다.

- [0060] 또한 하나 이상의 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 조성물은 CD8 T-세포 생존 및/또는 기억 형성을 뒷받침하기 위해 대상체에게 치료 유효량으로 투여시 효과적이다.
- [0061] 또 다른 양태에서는, IL-15로의 치료에 반응하는 병태를 갖는 대상체에게 치료 유효량의 본원에서 제공되는 바와 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 이러한 효현제를 포함하는 조성물을 투여하는 것에 의한, 상기 병태의 치료 방법이 본원에서 제공된다.
- [0062] 또한 추가의 양태에서는, 암을 갖는 환자에게 치료 유효량의 본원에서 제공되는 바와 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 조성물을 투여하는 것에 의한, 암의 치료 방법이 제공된다.
- [0063] 추가의 양태 및 구현예가 하기 설명 및 청구범위에 기재된다.

도면의 간단한 설명

- [0064] 도 1은, 12.9 kDa의 분자량을 갖는, 115개 아미노산을 함유하는 단일, 비-글리코실화된 폴리펩티드 사슬인, *E. coli*로부터의 예시적 재조합 인간 IL-15의 아미노산 서열(서열번호 1)을 제공한다.
- 도 2는, 실시예 1에 기재된 바와 같은 예시적 컨쥬게이션 반응 혼합물의 RP-HPLC의 분석을 나타내는 크로마토그램이다.
- 도 3은, 실시예 1에 기재된 바와 같은 음이온-교환 크로마토그래피 컬럼으로부터의 FPLC 정제 프로파일이다.
- 도 4는, 실시예 1에 기재된 바와 같은, 예시적 정제된 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제, 모노-mPEG-부탄아미드-IL-15의 SDS-PAGE이다. 레인 1은 지시된 바와 같은 분자량 마커를 제공하고; 레인 2는 비컨쥬게이션된 모(parent) 분자, IL-15이고, 레인 3은 모노-mPEG-부탄아미드-IL-15이다.
- 도 5는, 실시예 1에 기재된 바와 같은, 정제된 모노-mPEG-부탄아미드-IL-15의 RP-HPLC 분석이다.
- 도 6은, 시험 물품(IL-15, 채워진 원, 또는 mPEG2-CAC-FMOC-20K-NHS-IL-15, 또한 N-(2-메톡시PEG-에틸)-7-(4-((2-메톡시PEG-에틸)아미노)-4-옥소부틸)-9-에틸-9 H-플루오렌-4-카르복사미드 카르바메이트-IL-15로서 언급됨, 또는 컨쥬게이트 2, 채워진 정사각형)에 대한, 실시예 6에 기재된 바와 같은 마우스에서의 시험 물품의 단일 정맥내 용량의 투여 후 시간 경과에 따른 혈장 농도의 플롯이다.
- 도 7은, mPEG2-CAC-FMOC-20K-NHS-IL-15, 또한 N-(2-메톡시PEG-에틸)-7-(4-((2-메톡시PEG-에틸)아미노)-4-옥소부틸)-9-에틸-9H-플루오렌-4-카르복사미드 카르바메이트-IL-15로서 언급됨, 또는 컨쥬게이트 2에 대한, 실시예 7에 기재된 바와 같은 0.3(■), 0.15(▲) 및 0.075 mg/kg(●)의 투여량으로 래트에서의 컨쥬게이트 2의 단일 정맥내 용량, 또는 0.15 mg/kg(◆)으로의 컨쥬게이트 2의 단일 피하 용량의 투여 후 시간 경과에 따른 평균 혈장 농도의 플롯이다.
- 도 8a 및 8b는, 실시예 8에 기재된 바와 같은, IL-15(도 8a) 또는 컨쥬게이트 2(0.3 mg/kg, 도 8b)의 단일 i.v. 용량의 투여 후 다양한 림프구, 즉, CD4(■), CD8(▲), 및 NK 세포(▼)에서의 STAT5 인산화의 정도를 나타낸다.
- 도 9a, 9b 및 9c는, 실시예 9에 기재된 바와 같은, 시노물구스 원숭이에서의 컨쥬게이트 2(0.5 mg/kg)의 단일 i.v. 용량의 투여 후, 다양한 림프구, 즉, CD4, CD8, 및 NK 세포 각각에서의 STAT5 인산화의 정도를 나타내는 플롯이다.
- 도 10a 및 10b는, 실시예 10에 상세히 기재된 바와 같은, 인간 PBMC의 NK 서브세트, CD56브라이트(bright)(도 10a) 및 CD56dim(도 10b) NK 세포 각각에서의 신호전달에 의해 측정된 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(컨쥬게이트 1, 3 및 5)의 시험관내 활성을 나타내는 플롯이다.
- 도 11a 및 11b는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클과 비교시, 0.03 mg/kg(저용량, 개방 정사각형), 0.3 mg/kg(중간 용량, 채워진 원, 실선), 또는 1 mg/kg(고용량, 다이아몬드)의 용량으로의 모노-mPEG-SBA40K-IL-15(또한 본원에서 컨쥬게이트 1로서 언급됨)의 i.v. 투여 후 마우스에서의 NK 세포 증식을 나타내는 플롯이다. 도 11a는 시간 경과에 따른 Ki67 발현(백분율로 나타냄)을 나타내며, 도 11b는 샘플 그룹의 각각에 대한 투여 후 시간에 대한 NK 세포 수(세포/u1)를 나타낸다.
- 도 12a~12d는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클(채워진 원, 파선)과 비교시 0.03 mg/kg(저용량, 개방 정

사각형), 0.3 mg/kg(중간 용량, 채워진 원, 실선), 또는 1.0 mg/kg(고용량, 다이아몬드)의 용량으로의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후 마우스에서의 모든 성숙 수준의 NK 세포의 수 증가를 나타내는 플롯이다. NK 세포의 서브 세트는 CD11b 및 CD27 발현에 의해 정의되었다. 도 12a는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 말단 이펙터 세포의 수 증가를 나타내며; 도 12b는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 전-NK 세포의 수 증가를 나타내고; 도 12c는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 고 이펙터 세포의 수 증가를 나타내고, 도 12d는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 조기 NK 세포의 수 증가를 나타낸다.

도 13a 및 13b는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클(채워진 원, 파선)과 비교시 0.03 mg/kg(저용량, 개방 정사각형), 0.3 mg/kg(중간 용량, 채워진 원, 실선), 또는 1 mg/kg(고용량, 다이아몬드)의 용량으로의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후 마우스에서의 NK 세포에 의한 NKG2D(도 13a) 및 그랜자임 B(도 13b)의 발현의 수준을 나타내는 플롯이다.

도 14는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 0.03 mg/kg(저용량), 0.3 mg/kg(중간 용량), 또는 1 mg/kg(고용량)으로의 마우스에서의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후, 투여 전 및 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 CD8 T 세포의 수를 나타내는 플롯이다.

도 15a 및 15b는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클 및 IL-15와 비교한, 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 용량으로의 마우스에서의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후, 투여 후 시간에 대한, T 이펙터 기억 세포 및 T 중심 기억 세포 각각의 시간 경과에 따른 Ki67 발현(백분율로 나타냄)의 수준을 나타내는 플롯이다.

도 16a 및 16b는, 실시예 12에 기재된 바와 같은 500 μ g/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2의 i.v. 투여 후 시노물구스 원숭이에서의 NK 세포 증식을 나타내는 플롯이다. 도 16a는 투여 전 내지 투여 후 15일차의 NK 세포에서의 Ki67 발현(백분율로 나타냄)을 나타내며, 도 16b는 투여 전 내지 투여 후 15일차의 NK 세포 수를 나타낸다.

도 17은, 투여 전 내지 투여 후 14일차의 실시예 12에 기재된 바와 같은 500 μ g/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2의 i.v. 투여 후 시노물구스 원숭이에서의 CD8 T-세포 수(각각의 동물에 대해 나타냄)를 나타내는 플롯이다.

도 18a 및 18b는, 실시예 12에 기재된 바와 같은, 500 μ g/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2의 i.v. 투여 후, 투여 후 시간(투여 전 내지 투여 후 14일차)에 대한, 시노물구스 원숭이에서의 CD8 T 이펙터 기억 세포(T_{EM} 세포) 및 CD8 T 중심 기억 세포(T_{CM}) 각각의 수를 나타내는 플롯이다.

도 19는, 실시예 13에 상세히 기재된 바와 같은, 마우스 CT-26 결장암 세포로 접종 후 하기 시험 물품 중 하나로 치료된 암컷 Balb/c 마우스의 폐에서의 마우스 당 총 병소를 나타낸다: 비히클, 인산염 완충 식염수(그룹 A); 네이티브 IL-15 단독(그룹 B); 0.03 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 C); 0.1 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 D); 0.3 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 E); 1.0 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 F); 3.0 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 G).

도 20은, 실시예 13에 상세히 기재된 바와 같은, 마우스 CT-26 결장암 세포로 접종 후 하기 시험 물품 중 하나로 치료된 암컷 Balb/c 마우스의 폐에서의 마우스 당 총 병소를 나타낸다: 비히클, 인산염 완충 식염수(그룹 A); 0.03 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1(그룹 H); 및 0.3 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1.

도 21은, 실시예 14에 기재된 바와 같은, 1000 ng/mL(정사각형), 3000 ng/mL(원), 300 ng/mL(삼각형), 30 ng/mL(위쪽 X), 3 ng/mL(다이아몬드) 및 비자극(아래쪽 X)에서의 E:T(이펙터:표적) 비율의 함수로서의 퍼센트 특이적 용균을 나타낸다. 이 데이터는 컨쥬게이트 1과의 배양 후 시험관내 NK 세포의 용량-의존적 증가된 세포 독성을 나타낸다.

도 22a-22d는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 및 1.5 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후 마우스에서의 모든 성숙 수준의 NK 세포의 수 증가를 나타내는 플롯이다. 도 22a는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 말단 이펙터 세포의 수 증가를 나타내고; 도 22b는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 전-NK 세포의 수 증가를 나타내고; 도 22c는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 고 이펙터 세포의 수 증가를 나타내고, 도 22d는 투여 후 24시간 내지 120시간의 세포/ μ L로 나타낸 조기 NK 세포의 수 증가를 나타낸다.

도 23은, 실시예 15에 기재된 바와 같은, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 및 1.5 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1로의 치료 후 시간의 함수로서의 그랜자임 B 발현을 나타내는 플롯이다. 이 데이터는 컨쥬게이트 1로의 치료가 NK-세포 그랜자임 B 발현을 증가시킴을 나타낸다.

도 24는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클 IL-15 완충제(개방 원, 파선)와, 0.03 mg/kg(채워진 원, 파선) 및 0.3 mg/kg(채워진 원, 실선)의 용량으로의 마우스에서의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후, 투여 전 및 투여 후 24시간 내지 96시간의 세포/ μ L로 나타낸 마우스 비장으로로부터 단리된 CD8 T 세포의 수를 나타내는 플롯이다.

도 25는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클 IL-15 완충제와 비교한, 0.03 mg/kg 또는 0.3 mg/kg의 용량으로의 마우스에서의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후, 투여 후 시간에 대한 CD49b 세포의 Ki67 발현(백분율로 나타냄)의 수준을 나타내는 플롯이다.

도 26은, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 비히클 IL-15 완충제와 비교한, 0.03 mg/kg 또는 0.3 mg/kg의 용량으로의 마우스에서의 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후, 투여 후 시간에 대한 CD49b 세포의 시간 경과에 따른 그랜자임 B 발현(백분율로 나타냄)의 수준을 나타내는 플롯이다.

도 27은, 실시예 14에 기재된 바와 같은, 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1로의 치료 후 생체내 세포독성 결과를 나타내는 플롯이다. 세포독성을 치료 후 24시간, 48시간, 및 72시간에 평가하였다.

도 28a~28d는, 실시예 11에 기재된 바와 같은, 0.03 mg/kg 및 0.3 mg/kg의 용량으로 단일 용량으로 또는 q7dx3 스케줄에서의 제3 용량에 따른 컨쥬게이트 1의 i.v. 투여 후 마우스에서의 모든 성숙 수준의 NK 세포의 수 증가를 나타내는 플롯이다. 도 28a는 투여 후 24시간 내지 240시간의 Ki67 CD49b 세포의 백분율 증가를 나타내고; 도 28b는 투여 후 24시간 내지 240시간의 그랜자임 B CD49b 세포의 백분율 증가를 나타내고; 도 28c는 투여 후 24시간 내지 240시간의 세포/ μ L로 나타낸 CD49b 세포의 수 증가를 나타내고; 도 28d는 투여 후 24시간 내지 240시간의 granB⁺ MFI CD49b 세포의 백분율 증가를 나타낸다.

도 29a~29c는 실시예 16에 기재된 연구에 관한 플롯이다. **도 29a**는 각각 0.5 및 0.3 mg/kg으로의 balb/c 마우스에서의 시험 물품(IL-15 또는 컨쥬게이트 1)의 단일 정맥내 용량의 투여 후 144시간 시간 과정 동안 시험 물품의 혈장 농도의 플롯이다. 컨쥬게이트 1은 대략 12시간의 반감기를 나타내지만, IL-15는 1시간 미만의 반감기를 가지며 혈장으로부터 빠르게 청소(clearing)된다. **도 29b**는 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 주사 후 마우스에서의 CD8 T 세포 내에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 그래프이다. 컨쥬게이트 1은 두 용량 수준 모두에서 CD8 T 세포의 지속적인 pSTAT5 신호전달을 유도한다. 투여 전을 포함한 120시간 시간 과정을 나타내었다. **도 29c**는 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 주사 후 무린 NK 세포 내에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 그래프이다. 컨쥬게이트 1은 두 용량 수준 모두에서 NK 세포에서의 강력하고 지속적인 pSTAT5 신호전달을 유도한다.

도 30a~30c는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 또는 1.5 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 투여 후, 각각 총 CD8, CD8 중심 기억(Tcm) 및 CD8 이펙터 기억(Tem) 세포 수의 플롯이다. 실시예 17에 기재된 바와 같이 컨쥬게이트 1은 0.03 이상의 용량 수준에서 혈액에서의 총 CD8 T 세포의 현저한 증가를 유도한다. 0.01 mg/kg의 최저 용량은 CD8 Tcm 및 CD8 Tem을 증가시켰다. 0.3 mg/kg에서, 컨쥬게이트 1은 6.4X, 37.9X 및 14.5X만큼 CD8, CD8 Tcm 및 CD8 Tem을 증가시켰다. 특히, 컨쥬게이트 1이 0.3~1.5 mg/kg으로 투여된 경우 CD8 및 CD8 기억 T 세포 수는 주사 후 240시간에 기준선으로 되돌아가지 않았고, 이는 컨쥬게이트 1의 지속적인 PD 효과를 입증한다.

도 30d, 30e 및 30f는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 마우스에서의, 각각 총 CD8, CD8 Tcm 및 CD8 Tem 집단 내에서의 Ki-67 퍼센트 양성의 플롯이다. 컨쥬게이트 1의 단일 용량은, 모든 용량 수준에서, 모든 CD8 및 CD8 부분집단에서의 Ki-67 양성을 증가시킨다.

도 31a, 31b 및 31c는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.03 및 0.3 mg/kg으로 컨쥬게이트 1을 단일(점선) 또는 Q7dx3(실선) 투여한 후 CD8 및 CD8 기억 부분집단 T 세포 수의 플롯이다. 반복 투여는 이들 집단을 더욱 증가시켰으며, CD8, CD8 Tcm, CD8 Tem에서는 각각 35.3X, 183X 및 73.8X만큼 증가하였다. 시간 과정 종료시(0.3 mg/kg으로의 최초 또는 최종 투여 후 240시간), 세포 수는 마우스에서 기준선으로 되돌아가지 않았다.

도 32a 및 32b는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 마우스에서의 0.01 내지 1.5 mg/kg의 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 NK 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성의 플롯이다. NK 세포 수는 모든 용량 수준에서 비히클 대조군 초과로 현저히 증가하고, 투여 후 240시간까지 다시 되돌아간다. 모든 용량 수준이 NK 세포에서 Ki-67 퍼센트 양성의 강력한 증가를 유도한다.

도 32c는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일(실선) 또는 Q7dx3(파선) 투여 후 무린 NK 세포 수의 플롯이다. 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 반복 투여는 단일 용량에 비해 여전

히 현저하지만 약간 적은 NK 세포 수를 유도하였다. 0.03 mg/kg으로의 반복 투여에 대하여 단일 투여에서 유사한 NK 수가 달성되었다.

도 33a는, 실시예 18에 기재된 바와 같은, 마우스에서의 시험 물질 치료 후 NK-매개 표적 세포 용균에서의 변화를 측정하는 시험관내 NK 세포독성 검정을 나타낸다. 0.006, 0.03 또는 0.3 mg/kg 컨쥬게이트 1 또는 1 mg/kg의 IL-15로 치료된 balb/c 마우스로부터 단리된 비장 NK 세포에 의한 YAC-1 세포의 퍼센트 특이적 용균의 지시된 시간에서의 시간 과정을 나타내었다. 비히클이 투여된 마우스로부터의 비장 NK 세포가 대조군으로서 제공되었다. 0.3 mg/kg으로 투여된 컨쥬게이트 1은, 1 mg/kg으로의 IL-15의 단일 주사를 수용한 마우스로부터의 NK 세포에 비해 크기 및 지속시간에서 우수한 NK 세포독성의 상승을 유도하였다.

도 33b는 도 33a에서의 NK 시험관내 세포독성 검정에 제공된 동일한 마우스로부터의 혈액 NK 세포에서의 그랜자임 B 퍼센트 양성의 그래프이다. 0.03 및 0.3 mg/kg으로 투여된 컨쥬게이트 1은 NK 그랜자임 B 발현의 현저한 증가를 유도하였고, 강력하고 지속적인 상승이 0.3 mg/kg에서 나타났다.

도 34a 및 34b는, 실시예 19에 기재된 바와 같은, 정맥내 CT-26 종양 세포 주사, 그 후 0.03 또는 0.3 mg/kg으로, 1주 간격으로 2회 투여된 컨쥬게이트 1 치료를 수용한 balb/c 마우스에서의 퍼센트 폐 결절 억제율을 나타낸다. 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1 주사는 각각 40 및 80%만큼 폐 결절 형성을 억제하였다. 0.3 mg/kg으로 투여된 동일한 마우스가 생존 평가를 위해 종양 세포 주사 후 32일 동안 추적되었다. 컨쥬게이트 1로의 치료는 비히클 대조군을 수용한 종양-주사 마우스에 비해 생존을 현저히 증가시켰다.

도 35는, 실시예 20에 기재된 바와 같은, IgG 대조군(블루), PBS(오렌지), 또는 NK 세포의 항체-매개 고갈을 수용한 컨쥬게이트 2(올리브 그린)로 치료된 CT-26-주사된 마우스에서의 퍼센트 폐 결절 억제의 그래프이다. 데이터를, NK 세포 고갈되지 않은, 그리고 비히클 대조군으로 치료된(블랙) CT-26-주사된 마우스에 대한 퍼센트 폐 결절 억제율로 나타내었다. 이 종양 모델에서 컨쥬게이트 2 효능은, 마우스에 NK 세포가 없는 경우에 무효화되었다.

도 36a 및 36b는, 실시예 21에 기재된 바와 같은, 0.1 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1의 정맥내 투여 후 1마리의 수컷(점선) 및 1마리의 암컷(실선) cyno의 증식의 척도로서의 CD8 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성에 대한 2주 시간 과정을 나타내는 플롯이다. 컨쥬게이트 1은 cyno에서 현저한 CD8 T 세포 증가를 유도하고, 단일 용량 후 7~10X의 세포 수 증가를 갖는다.

도 36c 및 36d는, 실시예 21에 기재된 바와 같은, 컨쥬게이트 1의 단일 주사 후 cyno CD8 Tcm 및 CD8 Tem 세포 수의 증가를 나타낸다. CD8 Tcm 및 Tem 수는 각각 27~30X 및 21~33X 증가하였다.

도 37a 및 37b는, 0.1 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 투여 후 cyno에서의 NK 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성의 그래프이다. 실시예 21 참조. NK 세포는 컨쥬게이트 1로의 치료 후 9~10X 증가하였다.

도 38a 및 38b는, 실시예 22에 기재된 바와 같은, 인간 PBMC의 IL-15(레드, 채워진 원) 대 컨쥬게이트 1(그린, 채워진 정사각형) 치료 및 후속되는 CD8 및 CD56 브라이트 NK 세포에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 측정에 대한 EC50 곡선이다. 컨쥬게이트 1은 각각 관련 CD8 및 CD56 브라이트 NK 세포에서 IL-15에 비해 5.5 및 15X 덜 강력하다. 그러나, 컨쥬게이트 1은 종래의 IL-15와 동일한 최대 반응을 달성한다.

도 39는, 실시예 23에 기재된 바와 같은, 마우스에서의 단일 정맥내 용량의 투여 후 시간 경과에 따른 500 µg/kg으로의 IL-15(그린, 채워진 원) 또는 10 µg/kg(핑크, 채워진 정사각형), 30 µg/kg(퍼플, 채워진 삼각형), 100 µg/kg(레드, 채워진 하향 삼각형), 300 µg/kg(오렌지, 채워진 다이아몬드) 또는 1000 µg/kg(다크 레드, 개방 육각형)으로의 컨쥬게이트 1의 혈장 농도의 플롯이다.

도 40는, 실시예 24에 기재된 바와 같은, 래트에서의 단일 정맥내 용량의 투여 후 시간 경과에 따른 10 µg/kg(핑크, 채워진 정사각형), 75 µg/kg(퍼플, 채워진 하향 삼각형) 또는 150 µg/kg(오렌지, 채워진 하향 삼각형)으로의 컨쥬게이트 1의 혈장 농도의 플롯이다.

도 41는, 실시예 25에 기재된 바와 같은, 시노물구스 원숭이에서의 시험 물질의 단일 정맥내 용량의 투여 후 시간 경과에 따른 50 µg/kg으로의 IL-15(그린, 채워진 원) 또는 10 µg/kg(레드, 채워진 하향 삼각형), 50 µg/kg(블루, 채워진 다이아몬드) 또는 100 µg/kg(오렌지, 채워진 정사각형)으로의 컨쥬게이트 1의 혈장 농도의 플롯이다.

도 42a 및 42b는, 실시예 26에 기재된 바와 같은, 마우스에서의 0.03 mg/kg(블루, 채워진 원) 또는 0.3 mg/kg(오렌지, 채워진 원)의 용량으로의 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 각각 CD4 T 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성의

플롯이다. 비히클(블랙) 및 투여 전(개방 원) 세포 수준을 또한 나타내었다. 모든 용량 수준이 투여 후 240시간까지 기준선으로 되돌아갔다. 0.3 mg/kg 용량 수준은 CD4 T 세포에서 Ki-67 퍼센트 양성의 강력한 증가를 유도하였다.

도 43은, 실시예 26에 기재된 바와 같은, 0.03 mg/kg(오렌지, 채워진 원) 또는 0.3 mg/kg(블루, 채워진 정사각형)으로의 컨쥬게이트 1의 단일 주사 후 마우스에서의 CD4 T 세포 내에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 그래프이다. 컨쥬게이트 1은 두 용량 수준 모두에서 CD4 T 세포에서의 증가된 pSTAT5 신호전달을 유도하였고, 0.3 mg/kg은 보다 큰 증가를 유도하였다. 비히클(블랙) 및 투여 전(개방 원)을 포함한 120-시간 시간 과정을 나타내었다.

도 44a, 44b 및 44c는, 실시예 27에 기재된 바와 같은, 0.003 mg/kg(블루, 하향 삼각형), 0.01 mg/kg(그린, 다이아몬드) 또는 0.1 mg/kg(오렌지, 채워진 정사각형)의 용량으로의 컨쥬게이트 1 또는 비히클(블랙)의 i.v. 투여 후 시노물구스 원숭이에서의 NK 세포(도 44a), CD8 T 세포(도 44b) 및 CD4 T 세포(도 44c)의 투여 후 시간에 대한 세포 수를 나타내는 플롯이다.

도 45a, 45b 및 45c는, 실시예 27에 기재된 바와 같은, 시노물구스 원숭이에서의 0.001 mg/kg(퍼플, 채워진 정사각형), 0.003 mg/kg(블루, 하향 삼각형) 또는 0.1 mg/kg(오렌지, 채워진 정사각형)의 용량으로의 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 Ki-67 퍼센트 양성을 나타내는 플롯이다. 비히클(블랙) 수준을 또한 나타내었다. 모든 용량 수준이 투여 후 적어도 17일차까지 기준선으로 되돌아갔다. 0.1 mg/kg 및 0.003 mg/kg 용량 수준은 NK 세포 및 CD8 T 세포에서 Ki-67 퍼센트 양성의 강력한 증가를 유도하였다. 0.1 mg/kg 용량 수준은 시험된 모든 세포 유형에서 Ki-67 퍼센트 양성의 증가를 유도하였다.

도 46a, 46b 및 46c는, 실시예 27에 기재된 바와 같은, 시노물구스 원숭이에서의 0.001 mg/kg(퍼플, 채워진 정사각형), 0.01 mg/kg(그린, 다이아몬드) 또는 0.1 mg/kg(오렌지, 채워진 정사각형)의 컨쥬게이트 1 또는 비히클(블랙)의 단일 i.v. 용량의 투여 후 NK 세포(도 46a), CD8 T 세포(도 46b) 및 CD4 T 세포(도 46c) 림프구에서의 STAT5 인산화의 정도를 나타낸다.

도 47a~47d는, 실시예 27에 기재된 바와 같은, 시노물구스 원숭이에서의 0.001 mg/kg(퍼플, 채워진 정사각형), 0.01 mg/kg(그린, 다이아몬드) 또는 0.1 mg/kg(오렌지, 채워진 정사각형) 용량으로의 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 Ki-67 퍼센트 양성을 나타내는 플롯이다. 비히클(블랙) 수준을 또한 나타내었다. 도 47a는 CD8 T_{naive} 세포에 대한 결과를 나타내고, 도 47b는 CD8 T_{scm} 세포에 대한 결과를 나타낸다. 도 47c는 CD8 T_{cm} 세포에 대한 결과를 나타낸다. 도 47d는 CD8 T_{em} 세포에 대한 결과를 나타낸다.

도 48a, 48b, 및 48c는, 실시예 28에 기재된 바와 같은, 0.001 mg/kg(도 48a), 0.01 mg/kg(도 48b) 및 0.1 mg/kg(도 48c)의 용량으로의 컨쥬게이트 1로의 치료 후 시간의 함수로서의 그랜자임 B 발현을 나타내는 플롯이다. 이 데이터는, 컨쥬게이트 1로의 치료가 비-인간 영장류(NHP)에서 NK 세포에서의 그랜자임 B의 수준을 증가시킴을 나타낸다.

도 49a, 49b, 및 49c는, 실시예 28에 기재된 바와 같은, 0.001 mg/kg(도 49a), 0.01 mg/kg(도 49b) 및 0.1 mg/kg(도 49c)의 용량으로의 컨쥬게이트 1로의 치료 후 시간의 함수로서의 퍼포린 발현을 나타내는 플롯이다. 이 데이터는, 컨쥬게이트 1로의 치료가 NHP에서 NK 세포에서의 퍼포린의 수준을 증가시킴을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0065] 본 개시내용의 하나 이상의 양태 또는 구현예를 상세히 기재하기 전에, 제시된 개시내용은 특정 합성 기술, IL-15 모이어티 등으로 제한하려는 것이 아니며, 이에 따라 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 달라질 수 있음을 인지하여야 한다.
- [0066] 본 개시내용의 특정 특징을 기재하고 청구함에 있어, 하기 용어가 달리 지시되지 않는 한 하기에 기재된 정의에 따라 사용될 것이다.
- [0067] 본 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 문맥이 분명하게 다르게 지시하지 않는다면 복수의 지시대상물을 포함하는 것을 주의해야 한다.
- [0068] 하나 이상의 구현예를 기술하고 청구하는 것에서, 다음 용어는 하기에 기술된 정의에 따라서 사용될 것이다.
- [0069] "생리학적으로 절단가능한" 또는 "가수분해가능한" 또는 "분해가능한" 결합은 생리학적 조건 하에 물과 반응하는(즉, 가수분해되는) 비교적 불안정한 결합이다. 결합이 물에서 가수분해되는 경향성은 주어진 분자 내의 두

원자를 연결하는 연결의 일반적 유형뿐만 아니라 이들 원자에 결합된 치환체에 따라 달라질 수 있다. 적절한 가수분해적으로 불안정적인 또는 약한 연결은 카르복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 또는 오르토에스테르, 펩티드, 올리고뉴클레오타이드, 티오에스테르, 및 카르보네이트를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

- [0070] "효소적으로 분해가능한 연결"은 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 연결을 의미한다.
- [0071] "안정적" 연결 또는 결합은 물 중에서 실질적으로 안정적인, 다시 말해서, 생리학적 조건 하에 연장된 기간에 걸쳐 임의의 감지가가능한 정도로 가수분해에 놓이지 않는 화학 결합을 지칭한다. 가수분해적으로 안정적인 연결의 예는 일반적으로 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 탄소-탄소 결합(예를 들어 지방족 사슬에서), 에테르, 아마이드, 아민 등. 일반적으로, 안정적 연결은 생리학적 조건 하에 1일 당 약 1~2% 미만의 가수분해 속도를 나타내는 것이다. 대표적 화학 결합의 가수분해 속도는 대부분의 표준 화학 교과서에서 찾아볼 수 있다.
- [0072] 예를 들어, 인터류킨-15과 같은 활성 모이어티에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜과 관련하여, 공유 "이탈가능" 연결은, 생리학적 조건 하에, 예를 들어 임의의 적합한 메커니즘에 의해, 임상적으로 유용한 속도로, 활성 모이어티로부터 폴리에틸렌 글리콜 중합체를 이탈 또는 탈착시키는 것이며, 이는, 예를 들어, 또한 비제한적으로, 가수분해가능한 결합 및 효소적으로 분해가능한 연결을 포함한다.
- [0073] "실질적으로" 또는 "본질적으로"는, 거의 전체적으로 또는 완전히, 예를 들어, 주어진 양의 95% 이상을 의미한다.
- [0074] 유사하게, 본원에서 사용되는 바와 같은 "약" 또는 "대략"은 주어진 양의 플러스 또는 마이너스 5% 이내를 의미한다.
- [0075] "선택적인" 또는 "선택적으로"는, 후속 기재되는 상황이 일어날 수 있으나 반드시 일어나야 하는 것은 아님을 의미하며, 따라서 이 기재는 상황이 일어나는 경우 및 그렇지 않은 경우를 포함한다.
- [0076] "약학적으로 허용가능한 부형제" 또는 "약학적으로 허용가능한 담체"는 본원에 기재된 바와 같은 조성물 중에 포함될 수 있으며 대상체에게 현저한 불리한 독성 효과를 일으키지 않는 성분을 지칭한다.
- [0077] 어구 "약학적 유효량" 및 "약리학상 유효량" 및 "치료 유효량" 및 "생리학상 유효량"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 요망되는 생물학적 또는 의학적 반응을 생성하기 위한 혈류 또는 표적 세포 내의 물질의 요망되는 수준을 제공하기 위해 필요한 본원에서 제공되는 바와 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 양을 지칭한다. 예를 들어, 이러한 반응은 표적 암 세포를 파괴하는 또는 대상체에서의 암의 진행을 지연 또는 저지시키는 것일 수 있다. 이 용어는 또한 표적 세포에서의 특정 반응을 유도하는 용량에 적용된다. 정확한 양은, 예를 들어, 치료되는 특정 병태, 의도된 환자 집단, 개개의 환자 고려사항, 투여되는 치료 조성물의 성분 및 물리적 특징 등과 같은 수많은 요인에 따라 달라질 것이다.
- [0078] 본원에서 기재된 바와 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 언급은 그의 약학적으로 허용가능한 염 형태를 포함하고자 한다.
- [0079] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "환자", 또는 "대상체"는, 본원에서 제공되는 바와 같은 화합물 또는 조성물의 투여에 의해 예방되거나 치료될 수 있는 병태를 앓고 있는 또는 병태의 경향이 있는 살아있는 유기체를 지칭한다. 대상체는 포유류(예: 뮌, 원숭이, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)를 포함하나, 이에 제한되지는 않고, 바람직하게는 인간이다.
- [0080] PEG와 같은 수용성 중합체의 맥락에서 분자량은 수 평균 분자량 또는 중량 평균 분자량으로서 표현될 수 있다. 다르게 지시되지 않는다면, 본원에서 분자량에 대한 모든 언급은 중량 평균 분자량을 말한다. 수 평균 및 중량 평균의 두 가지 분자량 결정 모두 겔 투과 크로마토그래피 또는 기타 다른 액체 크로마토그래피 기법(예를 들어 겔 여과 크로마토그래피)을 사용하여 측정될 수 있다. 가장 통상적으로 사용되는 것은 겔 투과 크로마토그래피 및 겔 여과 크로마토그래피이다. 분자량을 결정하기 위한 다른 방법은 말단기(end-group) 분석법 또는 수 평균 분자량을 결정하는 총괄적 특성(예를 들어, 어는점 하락, 끓는점 상승, 또는 삼투압), 또는 중량 평균 분자량을 결정하는 광 산란 기법, 초원심분리, MALDI TOF, 또는 점도계의 사용을 포함한다. PEG 중합체는 통상적으로 다분산이고(즉, 중합체의 수 평균 분자량 및 중량 평균 분자량은 동등하지 않음), 바람직하게는 약 1.2 미만, 보다 바람직하게는 약 1.15 미만, 보다 더 바람직하게는 약 1.10 미만, 훨씬 더 바람직하게는 약 1.05 미만, 및 가장 바람직하게는 약 1.03 미만의 낮은 다분산 값을 가진다.
- [0081] 특정 작용기와 함께 사용될 때 용어 "활성", "반응성" 또는 "활성화"는 다른 분자 상에서 친전자체

(electrophile) 또는 친핵체(nucleophile)와 용이하게 반응하는 반응성 작용기를 말한다. 이는 반응하기 위하여 강한 촉매 또는 매우 비현실적인 반응 조건을 필요로 하는 기들(즉, "비반응성" 또는 "불활성"기)과 반대이다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "작용기" 또는 이의 임의의 동의어는 이의 보호된 형태뿐만 아니라 비 보호된 형태도 포함하는 것으로 의미한다.

[0083] 용어 "스페이스 모이어티", "연결" 및 "링크"는 본원에서 선택적으로 중합체 시약의 말단 및 IL-15 모이어티와 같은 상호 결합하는(interconnecting) 모이어티를 결합하는 데 사용되는 결합 또는 원자 또는 원자의 집합을 지칭하는 것으로 사용될 수 있다. 스페이스 모이어티는 가수분해적으로 안정적일 수 있거나 또는 생리적으로 가수분해되거나 효소로 분해가능하거나 그렇지 않으면 이탈가능 연결을 포함할 수 있다. 문맥이 다르게 분명하게 지시하지 않는다면, 스페이스 모이어티는 선택적으로 화합물의 임의의 두 가지 요소 사이에 존재한다(예를 들어, IL-15 모이어티 및 수용성 중합체, 예컨대 PEG는 직접적으로 또는 스페이스 모이어티를 통해 간접적으로 부착될 수 있다).

[0084] "알킬"은 통상적으로 길이가 약 1개 내지 15개 원자의 범위인 탄화수소 사슬을 말한다. 이와 같은 탄화수소 사슬은 필수적이지는 않지만 바람직하게는 포화되어 있고 분지형 또는 직선형 사슬일 수 있지만 통상적으로 직쇄가 바람직하다. 예시적인 알킬기로서는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 3-메틸펜틸 등을 포함한다.

[0085] "저급 알킬"은 1개 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 알킬기를 말하고, 메틸, 에틸, *n*-부틸, *i*-부틸, 및 *t*-부틸로 예시되는 바와 같이 직쇄 또는 분지형일 수 있다.

[0086] "알콕시"는 -OR기를 말하며, 여기서 R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C₁₋₆ 알킬(예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로필옥시 등)이다.

[0087] 예를 들어 "치환된 알킬"에서와 같이, 용어 "치환된"은 하나 이상의 비간섭(noninterfering) 치환기, 예를 들어 이로 한정되지 않지만 알킬, 예를 들어 사이클로프로필, 사이클로부틸 등과 같은 C₃₋₈ 사이클로알킬; 예를 들어 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오드와 같은 할로; 시아노; 알콕시, 저급 페닐; 치환된 페닐; 등으로 치환되는 모이어티(예를 들어, 알킬기)를 말한다. "치환된 아릴"은 치환기로서 하나 이상의 비간섭기를 가지는 아릴이다. 페닐 고리상에서의 치환에 대하여, 치환기는 임의의 방향(즉, 오르토, 메타 또는 파라)으로 있을 수 있다.

[0088] "비간섭 치환기"는 분자 내에 존재할 때 통상적으로 분자 내에 포함되는 기타 다른 작용기와 반응하지 않는 기들이다.

[0089] "아릴"은 각각 5개 또는 6개의 코어 탄소 원자를 가지는 하나 이상의 방향족 고리를 의미한다. 아릴은 나프틸에서와 같이 융합될 수 있거나 또는 바이페닐에서와 같이 융합되지 않을 수 있는 다수의 아릴 고리를 포함한다. 또한 아릴 고리는 하나 이상의 사이클릭 탄화수소, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릭 고리와 융합되거나 또는 융합되지 않을 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아릴"은 헤테로아릴을 포함한다.

[0090] "헤테로아릴"은 바람직하게 황, 산소, 또는 질소, 또는 이들의 조합인, 1개 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 아릴기이다. 또한 헤테로아릴 고리는 하나 이상의 사이클릭 탄화수소, 헤테로사이클릭, 아릴, 또는 헤테로아릴 고리와 융합될 수 있다.

[0091] "헤테로사이클" 또는 "헤테로사이클릭"은 불포화 또는 방향족 특징을 가지거나 가지지 않으며, 탄소가 아닌 적어도 하나의 고리 원자를 가지는 5개 내지 12개 원자, 바람직하게는 5개 내지 7개 원자의 하나 이상의 고리를 의미한다. 바람직한 헤테로원자는 황, 산소, 및 질소를 포함한다.

[0092] "치환된 헤테로아릴"은 치환기로서 하나 이상의 비간섭기를 가지는 헤테로아릴이다.

[0093] "치환된 헤테로사이클"은 비간섭 치환기로 형성된 하나 이상의 측쇄를 가지는 헤테로사이클이다.

[0094] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "유기 라디칼"은 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 및 치환된 아릴을 포함할 것이다.

[0095] "약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체"는 본 발명의 조성물 내에 선택적으로 포함될 수 있고 환자에게 어떤 상당한 부정적인 독성 효과를 야기하지 않는 부형제를 말한다.

[0096] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "IL-15 모이어티"는 인간 IL-15 활성을 가지는 펩티드 또는 단백질 모이어티를 말한다. 덧붙여, 용어 "IL-15 모이어티"는 접합 이전의 IL-15 모이어티와 접합 후의 IL-15 모이어티 잔기 둘 다를 포함한다. 하기에서 보다 상세히 설명될 바와 같이, 당업자는 임의의 주어진 모이어티가 IL-15 활성을 가지

는지 여부를 결정할 수 있다. 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 IL-15 모이어티일 뿐만 아니라, 상기 서열들에 실질적으로 상동성인 임의의 단백질 또는 폴리펩티드이다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 "IL-15 모이어티"는, 예를 들어 부위 지정 돌연 변이 유발법 또는 우발적 통과 돌연 변이(accidentally through mutation)에 의해 고의적으로 변형된 펩티드 및 단백질을 포함한다. 이러한 용어는 또한 1개 내지 6개의 부가 글리코실화 부위를 가지는 유사체, 펩티드 또는 단백질의 카복시 말단에 적어도 하나의 부가 아미노산(여기서, 부가 아미노산(들)은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함함)을 가지는 유사체, 그리고 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 유사체를 포함한다. 상기 용어는 자연적으로 생성되는 모이어티, 재조합에 의해 생성되는 모이어티 및 합성으로 생성되는 모이어티를 포함한다.

[0097] 용어 "실질적으로 상동성인" 또는 "실질적으로 동일한"은 특정 주제 서열, 예를 들어 돌연 변이 서열이 하나 이상의 치환, 결실 또는 부가에 의해 기준 서열과 차이가 나지만, 그 순 효과가 기준 서열과 주제 서열 간 비유사성의 기능적 불리함을 가져오지 않는 것을 의미한다. 본원의 목적상, 주어진 서열과 95% 초과 상동성(동일성), 동등한 생물학적 활성(반드시 동등한 생물학적 활성의 강도는 아니더라도), 및 동등한 발현 특징을 갖는 서열은 실질적으로 상동성인(동일한) 것으로 고려된다. 상동성 결정을 위해, 성숙 서열의 절단은 무시되어야 한다. 본원에서의 사용을 위한 예시적 IL-15 폴리펩티드는 서열번호 1과 실질적으로 상동성인 서열을 포함한다. 서열번호2는, 서열번호2가 *E. coli*의 번역을 개시하기 위해 필요한 서열의 개시에서 메티오닌을 갖는 것을 제외하고는 서열번호 1과 거의 동일하다.

[0098] 용어 "단편"은, IL-15 모이어티의 부분 또는 단편의 아미노산 서열을 갖는, 그리고 IL-15의 생물학적 활성, 또는 실질적으로 생물학적 활성을 갖는 임의의 단백질 또는 폴리펩티드를 의미한다. 단편은 IL-15 모이어티의 단백질 분해 분해에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩티드뿐만 아니라, 당업계에서 통상적인 방법에 의한 화학적 합성에 의해 생성된 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0099] 펩티드 내의 아미노산 잔기는 다음과 같이 축약된다: 페닐알라닌은 Phe 또는 F이고; 류신은 Leu 또는 L이며; 이소류신은 Ile 또는 I이고; 메티오닌은 Met 또는 M이며; 발린은 Val 또는 V이고; 세린은 Ser 또는 S이며; 프롤린은 Pro 또는 P이고; 트레오닌은 Thr 또는 T이며; 알라닌은 Ala 또는 A이고; 티로신은 Tyr 또는 Y이며; 히스티딘은 His 또는 H이고; 글루타민은 Gln 또는 Q이며; 아스파라긴은 Asn 또는 N이고; 리신은 Lys 또는 K이며; 아스파르트산은 Asp 또는 D이고; 글루탐산은 Glu 또는 E이며; 시스테인은 Cys 또는 C이고; 트립토판은 Trp 또는 W이며; 아르기닌은 Arg 또는 R이고; 글리신은 Gly 또는 G이다.

[0100] 개요

[0101] 본 개시내용은 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 제공에 관한 것이다. 이러한 효현제는 이상적으로, 예를 들어, 하기 중 더 많이는 아니더라도 적어도 하나와 같은 여러 유리한 그리고 예측 불가능한 특징을 가질 것이다: (i) 매일 투여의 필요 없이 측정가능한 약역학적 효과를 제공함으로써 지속적인 IL-15 활성을 전달할 수 있는 능력, (ii) IL-15 수용체 α 에 대한 결합을 높은 정도로 유지함(즉, IL-15에 비해), (iii) NK 세포 활성화 및/또는 증식을 자극함, 및/또는 (iv) CD8 T-세포 생존 및/또는 기억 형성을 뒷받침함, 및 (v) 종양 성장의 억제를 제공함. 놀랍게도, 본 출원인은, 하기에서 보다 상세히 기재될, 유리한 특성의 독특한 조합을 갖는 지속 작용성 IL-15 R 효현제에 도달하였다.

[0102] 지속 작용성 IL-15 R 효현제 및 관련 조성물

[0103] 일반적으로, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 형태는 아마이드 연결을 통해 IL-15 아미노기에 안정적으로 공유 결합된 단일 선형 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. IL-15 아미노기에 대한 안정적 아마이드 연결과 PEG 모이어티 사이에 2 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 선형 비치환된 알킬렌 기($\sim\text{CH}_2\sim$)_m(즉, m=2, 3, 4, 또는 5)가 개재된다.

[0104] IL-15 모이어티를 고려할 때, 용어 "IL-15 모이어티"는 컨쥬게이션 전의 IL-15 모이어티뿐만 아니라 비-펩티드, 수용성 중합체, 예컨대 폴리(알킬렌 옥사이드)(예: 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 PEG)에 대한 결합 후의 IL-15 모이어티를 지칭한다. 이하에서 비-펩티드 수용성 중합체로서 PEG를 구체적으로 언급하지만, 개시내용은 일반적으로 비-펩티드 수용성 중합체 또는 폴리(알킬렌 글리콜)에 관한 것임을 이해할 것이다. 그러나, 원래의 IL-15 모이어티가 폴리에틸렌 글리콜 모이어티에 결합된 경우, IL-15 모이어티는 중합체(들)에 대한 연결과 관련된 하나 이상의 공유 결합의 존재로 인해 약간 변경된다.

[0105] IL-15 모이어티는 비재조합 방법에서 및 재조합 방법에서 유래할 수 있고 본 개시내용은 이와 관련하여 한정되지 않는다. 덧붙여, IL-15 모이어티는 인간 출처, 동물 출처(곤충을 포함함), 진균 출처(효모를 포함함), 및 식

물 출처로부터 유래할 수 있다.

- [0106] IL-15 모이어티는 예를 들어, Grabstein 외 다수에 의해 기술된 절차에 따라서 수득될 수 있다. 문헌[Grabstein et al. (1994) *Science* 264:965-968]을 참조한다. IL-15 모이어티는 또한, 예를 들어, EP 특허 번호 0 772 624 B2(Immunex Corporation)에 기재된 것들과 같은 재조합 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 대안적으로, IL-15 모이어티는, 예를 들어 GenScript USA Inc.(Piscataway, NJ) 및 Peprotech(Rockyhill, NJ)로부터 상업적으로 구입될 수 있다.
- [0107] IL-15 모이어티는 박테리아, 예를 들어 이.콜라이(*E. coli*)[예를 들어, 문헌[Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. Biotechnol.* 21(3):295-311] 참조], 포유류[예를 들어, 문헌[Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304] 참조], 효모, 예를 들어 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)[예를 들어, 문헌[Morel et al. (1997) *Biochem. J.* 328(1):121-129] 참조], 그리고 식물[예를 들어, 문헌[Mor et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266] 참조] 발현 시스템 내에서 발현될 수 있다. 발현은 외부 발현(숙주 세포가 자연적으로 원하는 유전 암호를 포함할 때)을 통하거나 내부 발현을 통하여 일어날 수 있다.
- [0108] 단백질을 제조하기 위한 재조합에 기초한 방법이 상이할 수 있더라도, 재조합 방법은 통상적으로 원하는 폴리펩티드 또는 단편을 암호화하는 핵산을 구성하는 단계, 상기 핵산을 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 숙주 세포(예를 들어, 식물, 박테리아, 효모, 유전자이식 동물 세포, 또는 차이나이즈 햄스터 난소 세포 또는 아기 햄스터 신장 세포와 같은 포유류 세포)를 형질변환시키는 단계, 및 핵산을 발현시켜 원하는 폴리펩티드 또는 단편을 생성하는 단계를 포함한다. 시험관내에서 및 원핵 및 진핵 숙주 세포에서 재조합 폴리펩티드를 생성 및 발현하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.
- [0109] 재조합 폴리펩티드의 확인 및 정제를 용이하게 하기 위하여, 에피토프 태그(epitope tag) 또는 기타 다른 친화성 결합 서열에 대하여 암호화하는 핵산 서열은 암호화 서열과 함께 프레임 내에 삽입되거나 부가될 수 있고, 그렇게 함으로써 원하는 폴리펩티드 및 결합에 적합한 폴리펩티드로 구성된 융합 단백질을 생성한다. 융합 단백질은 융합 단백질 내에서 에피토프 태그 또는 기타 다른 결합 서열에 대해 지시된 결합 부분(예를 들어, 항체)을 가지는 친화성 결합을 통해 융합 단백질을 포함하는 혼합물을 먼저 러닝(running)하고 그렇게 하여 컬럼 내에 융합 단백질을 결합시킴으로써 확인 및 정제할 수 있다. 그 후에, 적절한 용액(예를 들어, 산)으로 컬럼을 세척하여 결합된 융합 단백질을 이탈시킴으로써 융합 단백질을 회수할 수 있다. 재조합 폴리펩티드는 또한 숙주 세포를 용균시키고, 폴리펩티드를 예를 들어 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 결합 접근법, 소수성 상호 작용 접근법에 의해 분리한 후, MALDI 또는 웨스턴 블롯에 의해 확인한 다음, 폴리펩티드를 수집함으로써 정제될 수 있다. 재조합 폴리펩티드를 확인 및 정제하는 상기와 같은 방법과 기타 다른 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 그러나, 하나 이상의 구현예에서, IL-15 모이어티는 융합 단백질의 형태가 아니다.
- [0110] IL-15 활성을 가지는 단백질을 발현하는 데 사용되는 시스템에 따라서, IL-15 모이어티는 글리코실화되지 않을 수 있거나 글리코실화될 수 있으며, 또한 글리코실화되지 않은 IL-15 모이어티 또는 글리코실화된 IL-15 모이어티 중 어느 하나가 사용될 수 있다. 다시 말해서, IL-15 모이어티는 글리코실화되지 않을 수 있거나, IL-15 모이어티는 글리코실화될 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, IL-15 모이어티는 글리코실화되지 않는다.
- [0111] 유리하게, IL-15 모이어티는 아미노산 측쇄 내부 원자에의 중합체의 용이한 부착을 제공하기 위하여, 하나 이상의 아미노산 잔기, 예를 들어 리신, 시스테인 및/또는 아르기닌을 포함하고/포함하거나 치환하도록 변형될 수 있다. IL-15 모이어티의 치환에 관한 일례가 미국 특허 번호 6,177,079에 기술되어 있다. 덧붙여, IL-15 모이어티는 자연적으로 생성되지 않는 아미노산 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 아미노산 잔기 및 자연적으로 생성되지 않는 아미노산 잔기를 부가하는 기법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 문헌[J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley Interscience, 1992), and *Bioinformatics for Geneticists* (eds. Michael R. Barnes and Ian C Gray), 2003 John Wiley & Sons, Ltd, Chapter 14, *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions*, Betts, M.J., and Russell, R. B.]을 참조한다.
- [0112] 덧붙여, 유리하게 IL-15 모이어티는 작용기의 부착을 포함하도록 변형될 수 있다(작용기 포함 아미노산 잔기를 부가함으로써 인하여 변형되는 경우 제외). 예를 들어, IL-15 모이어티는 티올기를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-15 모이어티는 N-말단 알파 탄소를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-15 모이어티는 하나 이상의 탄수화물 모이어티를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-15 모이어티는 알데히드기를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-15 모이어티는 케톤기를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 몇몇 구현예에서, IL-15 모이어티는 티올기, N-말단 알파 탄소, 탄수화물, 알데히드기 및 케톤기 중 하나 이상을 포함하도록 변형

되지 않는 것이 바람직하다.

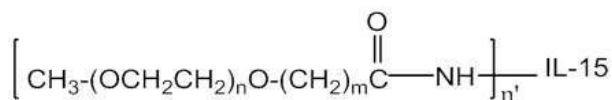
- [0113] 예시적인 IL-15 모이어티들은 본원, 문헌, 그리고, 예를 들어 미국 특허 출원 공개 번호 US 2006/0104945, 문헌 [Pettit et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(4):2312-2318], 및 [Wong et al. (2013) *OncoImmunology* 2(11), e26442:1-3]에 기술되어 있다. 바람직한 IL-15 모이어티들은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열들, 그리고 이 서열들과 실질적으로 상동성인 서열들을 포함하는 아미노산 서열을 가지는 것들을 포함한다(여기서 만일 서열번호 2 및 3, 그리고 이에 실질적으로 상동성인 서열들이 본원에 제공된 IL-15 모이어티의 시험관내 활성 기준을 충족하지 않으면, 본 발명을 위해서 상기 서열들은 또한 "IL-15 모이어티들"인 것으로 이해될 것임). 바람직한 IL-15 모이어티는 서열번호 1에 상응하는 아미노산 서열을 가진다. 일부 구현예에서, IL-15 모이어티는 서열번호 1~3 중 어느 하나와 적어도 약 85% 또는 적어도 약 90% 동일성을 갖는 기능적 상동체이다. 일부 구현예에서, IL-15 모이어티는 서열번호 1-3 중 어느 하나와 적어도 약 95%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 기능적 상동체이다.
- [0114] 몇몇 예에서, IL-15 모이어티는 "단량체" 형태를 가질 것인데, 여기서 상응하는 펩티드의 단일 발현은 불연속적 단위로 조직화된다. 다른 예에서, IL-15 모이어티는 단백질의 단량체 형태들 2개가 서로 결합되어 있는 "이량체"(예를 들어, 재조합 IL-15의 이량체)의 형태를 가질 것이다.
- [0115] 덧붙여, IL-15의 전구체 형태는 IL-15 모이어티로서 사용될 수 있다. IL-15의 예시적인 전구체 형태는 서열번호 3의 서열을 가진다.
- [0116] 전술한 서열들 중 임의의 것의 절단된 형태, 잡종 변이체, 그리고 펩티드 모의체도 또한 IL-15 모이어티로서 사용될 수 있다. IL-15 활성을 적어도 어느 정도 유지하는 전술한 서열들 중 임의의 것의 생물학적으로 활성인 단편, 결실 변이체, 치환 변이체 또는 부가 변이체도 또한 IL-15 모이어티로서 사용될 수 있다.
- [0117] 임의의 주어진 펩티드, 단백질 모이어티 또는 컨쥬게이트에 있어서, 해당 펩티드, 단백질 모이어티 또는 컨쥬게이트가 IL-15 활성을 가지는지 여부를 측정하는 것이 가능하다. 시험관 내 IL-15 활성을 측정하기 위한 다양한 방법들이 업계에 기술되어 있다. 예시적인 접근법은 pSTAT 분석법을 기반으로 한다. 요약하면, 만일 IL-15 의존적 CTLL-2 세포가 IL-15 활성을 가지는 시험 물질에 노출되면, 정량적으로 측정될 수 있는, 694번 티로신 잔기(Tyr694)에서의 STAT5 인산화를 포함하는 신호전달 캐스케이드가 개시된다. 분석법 프로토콜들과 키트들은 공지되어 있으며, 예를 들어 MSD Phospho(Tyr694)/Total STATa,b Whole Cell Lysate Kit(Meso Scal Diagnostics, LLC, 미국 메릴랜드주 게이터스버그 소재)를 포함한다. 예를 들어, 이 접근법이 사용되면, 약 300 ng/ml 이하(보다 바람직하게는 약 150 ng/ml 이하)에서 5분 또는 10분 중 적어도 하나의 시간에 pSTAT5 EC₅₀값을 나타내는, 제안된 IL-15 모이어티는 본 개시내용과 연계되어 "IL-15 모이어티"로 간주된다. 그러나, (적어도 5분 또는 10분 중 하나의 시간에 pSTAT5 EC₅₀값이 150 ng/ml 미만, 예를 들어 적어도 5분 또는 10분 중 하나의 시간에 pSTAT5 EC₅₀값이 약 1 ng/ml 미만, 훨씬 더 바람직하게 0.5 ng/ml 미만인) 사용된 IL-15 모이어티가 더욱 강력한 것이 바람직하다.
- [0118] 전기 분석법, 분광분석법, 크로마토그래피 및 방사 측정 방법을 비롯하여 당업계에 공지된 기타 다른 방법들은 또한 IL-15 기능을 평가하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나의 부가적 유형의 분석법에 대한 문헌(Ring et al. (2012) *Nat. Immunol.* 13(12):1187-1195)을 참조한다.
- [0119] IL-15 모이어티의 활성 측정과 관련하여 사용하기 위한 검정을 사용하여 본원에 기재된 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 활성을 측정할 수도 있다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 지지 실시예를 참조한다.
- [0120] 대상체에게 투여 후, 효현제가 IL-15의 투여 경우에 비해 더 긴 시간 동안 생체내에서 IL-15 아고니즘(agonism)을 나타내는 한, 화합물이 본 개시내용에 따른 지속 작용성, IL-15 R 효현제인 것으로 고려된다. 화합물의 방사선표지, 화합물의 생체내 투여, 및 그의 청소를 결정하는 것들과 같은 종래의 접근법을 사용하여, 지속 작용성, IL-15 R 효현제로 제안된 화합물이 "지속 작용성"인지(즉, 동일한 생체내 시스템에서 투여된 IL-15의 경우에 비해 더 긴 청소를 갖는지)의 여부를 평가할 수 있다. 본원에서의 목적상, 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 지속 작용성 성질은, 마우스에서 평가될 효현제의 투여 후 다양한 시점에 림프구에서의 STAT5 인산화를 측정하는 유동 세포계측법을 사용하여 결정될 수 있고, 통상적으로 유동 세포계측법을 사용하여 결정된다. 참조로서, IL-15에서는 약 24시간까지 신호가 사라지지만, 지속 작용성 IL-15 효현제에 대한 것보다 긴 기간 동안 지속적이다.
- [0121] 이전에 논의된 바와 같이, 바람직한 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 일반적으로 아미드 연결을 통해 IL-15 아미

노 기에 안정적으로 공유 결합된 단일 선형 PEG(폴리에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함할 것이다. IL-15 아미노 기에 대한 안정적 아마이드 연결과 PEG 모이어티 사이에 2 내지 5개의 탄소 원자를 갖는 선형 비치환된 알킬렌 기 ($\sim\text{CH}_2\sim$)_m(즉, m=2, 3, 4, 또는 5)가 개재된다.

[0122] 예를 들어, 일부 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₂이거나; 또는, 일부 추가의 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₃이고; 또한 일부 추가의 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₄이고; 또한 일부 추가의 구현예에서, 비치환된 알킬렌 기는 ($\sim\text{CH}_2\sim$)₅이다.

[0123] 예를 들어, 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 하기 구조를 갖는다:

[0124] [화학식 I]

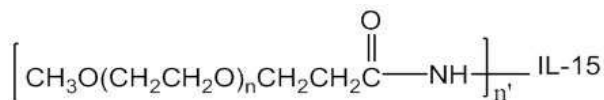


[0125]

[0126] (여기서, IL-15는 인터류킨-15 모이어티이고, n은 약 150 내지 약 3,000의 정수이고; m은 2~5의 정수(예: 2, 3, 4, 또는 5)이고, n'는 1임). 화학식 I에서(그리고 본원에서 제공되는 유사한 화학식에서), 구조 내의 $\sim\text{NH}\sim$ 는 IL-15 모이어티의 아미노 기를 나타낸다. 화학식 I은 또한 하기와 같이 도시될 수 있고, 여기서 괄호는 말단

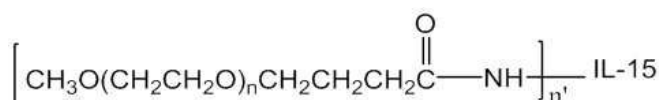
PEG 메톡시 기를 반영하기 위해 이동되어 있고: $\left[\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH} \right]_{n'} \text{IL-15}$, 두 화학식은 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 예시적 화합물의 예는 화학식 I에 포함되는 하기의 것들을 포함한다:

[0127] [화학식 Ia]



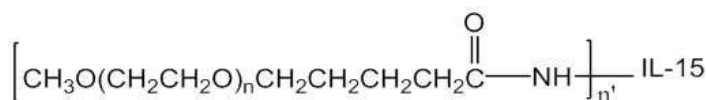
[0128]

[0129] [화학식 Ib]



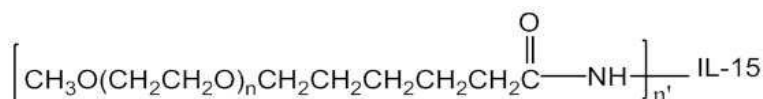
[0130]

[0131] [화학식 Ic]



[0132]

[0133] [화학식 Id]



[0134]

[0135] 일부 바람직한 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 화학식 Ia 또는 화학식 Ib에 상응한다. 일부 특히 바람직한 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 화학식 Ib에 상응한다.

[0136] 일부 추가의 구현예에서, 본원에 기재된 구조 및 화학식과 관련하여, n은 약 200 내지 약 2000, 또는 약 400 내지 약 1300, 또는 약 450 내지 약 1200의 정수이다. 다시 말해서, 일부 구현예에서, n은 약 200 내지 약 2000의 정수이다. 또한 일부 추가의 구현예에서, n은 약 400 내지 약 1300의 정수이다. 또한 일부 추가의 구현예에서, n은 약 450 내지 약 1200의 정수이다.

[0137] n 값의 상기 범위 중 어느 하나에 상응하는 분자량을 갖는 PEG가 일반적으로 바람직하다.

[0138] 하나 이상의 구현예에서, n은, 약 10,000 달톤(여기서, n은 약 227), 또는 약 15,000 달톤(여기서, n은 약 340), 또는 약 20,000 달톤(여기서, n은 약 454), 또는 약 25,000 달톤(여기서, n은 약 568), 또는 약 30,000 달톤(여기서, n은 약 681), 또는 약 40,000 달톤(여기서, n은 약 909), 또는 약 50,000 달톤(여기서, n은 약 1136) 또는 심지어 약 60,000 달톤(여기서, n은 약 1364) 또는 그 초과로 구성된 군으로부터 선택된 중량 평균 분자량을 갖는 폴리에틸렌 글리콜 중합체에 상응하는 값을 갖는 정수이다.

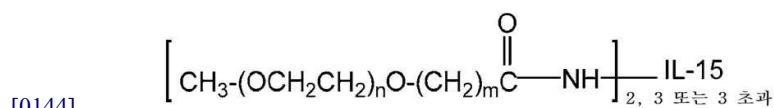
[0139] 상기에 추가로, 화합물의 폴리에틸렌 글리콜 부분에 대한 추가의 예시적 중량-평균 분자량은, 약 11,000 달톤, 약 12,000 달톤, 약 13,000 달톤, 약 14,000 달톤, 약 22,500 달톤, 약 35,000 달톤, 약 45,000 달톤, 약 55,000 달톤, 약 65,000 달톤, 약 70,000 달톤, 및 약 75,000 달톤을 포함한다.

[0140] 일부 바람직한 구현예에서, 화합물의 폴리에틸렌 글리콜 중합체 부분의 중량-평균 분자량은 약 40,000 달톤이다.

[0141] PEG 모이어티가 바람직하게는 메톡시 기로 상기 화학식 I에 나타낸 바와 같이 말단-캡핑되지만, PEG 모이어티는 그의 말단에서 임의의 저급 C₁₋₆ 알콕시 기로 캡핑될 수 있거나, 또는 히드록실 기, 또는 다른 적합한 말단-캡핑 기로 종결될 수 있다.

[0142] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 20 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함한다:

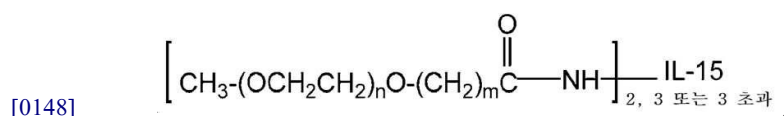
[0143] [화학식 II]



[0145] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 I에 대해 제공된 바와 같음). 다시 말해서, 이러한 조성물의 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제 성분과 관련하여, 조성물 중에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제의 약 20 몰 퍼센트 이하가 화학식 II를 갖는다.

[0146] 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 15 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함한다:

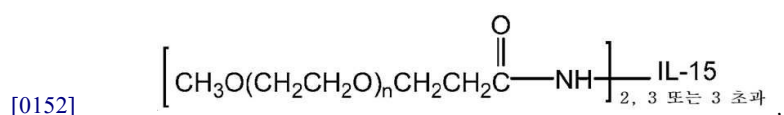
[0147] [화학식 II]



[0149] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 I에 대해 제공된 바와 같음). 다시 말해서, 이러한 조성물의 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제 성분과 관련하여, 조성물 중에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제의 약 15 mol% 이하가 화학식 II를 갖는다. 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제 조성물은 약 0.1~20 mol% 이하의 화학식 II의 화합물을 포함한다. 구현예에서, 조성물은 약 0.1~15, 0.1~10, 0.1~5, 0.1~1, 1~20, 1~15, 1~10, 1~5, 5~20, 5~15, 5~10, 10~20, 10~15, 또는 15~20 mol% 이하의 화학식 II의 화합물을 포함한다.

[0150] 상기와 관련된 일부 특정 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제 조성물은, 화학식 Ia와 관련하여, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효연제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 15 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함한다:

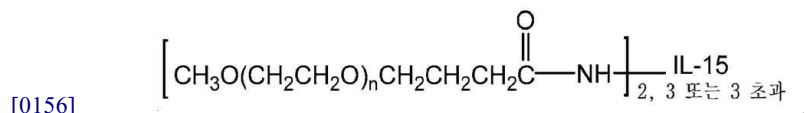
[0151] [화학식 IIa]



[0153] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 Ia에 대해 제공된 바와 같음).

[0154] 일부 다른 바람직한 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 화학식 Ib와 관련하여, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 15 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함한다:

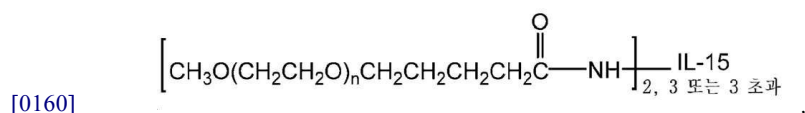
[0155] [화학식 IIb]



[0157] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 Ib에 대해 제공된 바와 같음).

[0158] 일부 다른 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 화학식 Ic와 관련하여, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 15 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함한다:

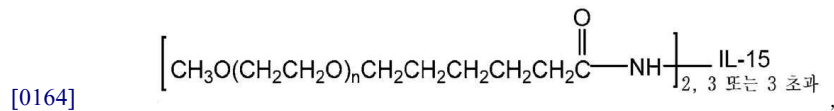
[0159] [화학식 IIc]



[0161] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 Ic에 대해 제공된 바와 같음).

[0162] 일부 다른 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 화학식 Id와 관련하여, 총체적으로 고려할 때, 하기 화학식에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 15 몰 퍼센트(mol%) 이하로 포함한다:

[0163] [화학식 IId]



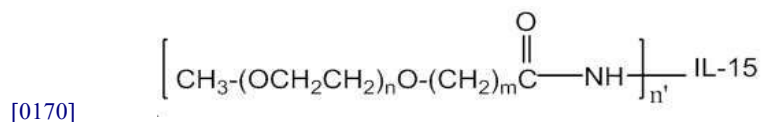
[0165] (여기서, n 및 m의 값은 상기 화학식 Id에 대해 제공된 바와 같음).

[0166] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은 약 0.1~20 mol% 이하의 화학식 II의 화합물(화학식 IIa, IIb, IIc, 및 IId의 화합물 포함)을 포함한다. 일부 추가의 구현예에서, 조성물은 약 0.1~15, 0.1~10, 0.1~5, 0.1~1, 1~20, 1~15, 1~10, 1~5, 5~20, 5~15, 5~10, 10~20, 10~15, 또는 15~20 mol% 이하의 화학식 II의 화합물(화학식 IIa, IIb, IIc, 및 IId의 화합물 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 약 0.1, 1, 5, 10, 15, 또는 20 mol% 이하의 화학식 II의 화합물(화학식 IIa, IIb, IIc, 및 IId의 화합물 포함)을 포함한다. 조성물은, 화학식 II의 화합물이 조성물 중에 존재하지 않거나, 미량 존재하거나, 또는 실질적으로 존재하지 않게 하는 화학식 I의 화합물에 대하여 당업계에 알려진 방법에 의해 정제될 수 있음을 인지할 것이다.

[0167] 예를 들어, 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, 화학식 II에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(화학식 IIa, IIb, IIc, 및 IId의 화합물 포함)를 약 12 몰 퍼센트 이하, 또는 약 10 몰 퍼센트 이하로 포함한다.

[0168] 상기한 것 중 일부 추가의 구현예에서, 조성물은 n'가 2, 3, 또는 3 초과인 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(즉, 고급 PEGmer)를 약 7 mol% 이하로 포함한다. 또한 일부 다른 구현예에서, 조성물은 n'가 2, 3, 또는 3 초과(즉, 2 이상)인 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 약 5 mol% 이하로 포함한다.

[0169] 일부 추가의 구현예에서, 조성물은 하기 화학식 I에 따른 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 포함한다:



- [0171] (여기서, n 및 m 은 상기에 기재된 바와 같고, n' 는 (조성물에 대하여) IL-15 아미노 기에 공유 결합된 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 평균 수를 나타내고, 조성물에 대하여 n' 는 1.0 내지 약 1.3의 범위임). 예를 들어, IL-15 모이어티 당 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 평균 수는 약 1.0, 1.1, 1.2 및 약 1.3으로부터 선택된다. 다시 말해서, 화학식 I에 따른 바람직한 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 본원에서 "모노페길화된" 것으로 언급될 수 있고, 여기서는 상기에 기재된 바와 같은 페길화 정도와 관련하여 일부 가변성이 존재함을 이해하여야 한다. 본원에 기재된 화학식과 관련하여 일부 바람직한 구현예에서, " m "은 3이다.
- [0172] 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 조성물은 n' 가 약 1인 단일 종을 포함할 수 있고, PEG 모이어티는 조성물 중의 실질적으로 모든 IL-15 컨주게이트에 대하여 동일한 위치에서 결합되거나, 또는 대안적으로, 선형 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 결합이 인터류킨-15 모이어티 상의 상이한 자리에서 나타나는, 다시 말해서, 특정 결합 자리가 조성물 중에 포함된 모든 모노페길화된 IL-15 종에 대해 동일하지 않은 모노페길화된 컨주게이트 종의 혼합물을 포함할 수 있다. 따라서, 이러한 조성물은 IL-15에 결합된 PEG 모이어티의 수와 관련하여 실질적으로 균질하지만(예: 1-mer), IL-15분이자 상의 아미노 기 결합 위치와 관련하여서는 불균질하다.
- [0173] 지속 작용성 IL-15 R 효현제에 도달하기 위해 추가의 PEG 아키텍처 및 연결 화학이 사용될 수 있지만, 앞서 기재된 것과 같은 화합물이 하나 이상의 구현예에서 바람직하며, 이는 지지 실시예에 비추어 고려할 때 명백해질 것이다. 그러나, 본원에서 제공되는 바와 같은 구조를 갖는 추가의 지속 작용성 IL-15 R 효현제가 또한 고려된다.
- [0174] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, 화학식 I(화학식 Ia 내지 Id 포함)에 포함되는 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 적어도 약 80 mol%로 포함한다. 하나 이상의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은 적어도 약 85 mol%, 90 mol%, 95 mol%, 98 mol% 또는 99 mol%의 화학식 I의 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 포함한다.
- [0175] 상기에 기재된 바와 같이, 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 통상적으로, 이러한 염은 약학적으로 허용가능한 산 또는 산 등가물과의 반응에 의해 형성된다. 이와 관련하여 용어 "약학적으로 허용가능한 염"은, 일반적으로 비교적 비-독성, 무기 및 유기 산 부가 염을 지칭할 것이다. 이들 염은 투여 비히클 또는 투여 형태 제조 공정에서 원위치에서(in situ) 제조될 수 있거나, 또는 별도로 본원에 기재된 바와 같은 지속 작용성 인터류킨-15 수용체 효현제를 적합한 유기 또는 무기 산과 반응시키고, 이렇게 형성된 염을 단리함으로써 제조될 수 있다. 대표적 염은 히드로브로마이드, 히드로클로라이드, 술페이트, 비술페이트, 포스페이트, 니트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올레에이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 옥실레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트, 및 라우릴술포네이트 염 등을 포함한다. (예를 들어, 문헌[Berge et al.(1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 따라서, 기재된 바와 같은 염은 무기 산, 예컨대 염산, 브롬화수소산, 황산, 술폰산, 인산, 질산 등으로부터 유래될 수 있거나; 또는 유기 산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 락트산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 히드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 술폰산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔술폰산, 메탄술폰산, 에탄 디술폰산, 옥살산, 이소티온산 등으로부터 제조될 수 있다.
- [0176] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 조성물은, 총체적으로 고려할 때, (조성물 중의 IL-15 함유 분자에 대하여) 약 1~5 mol% 이하의 유리 IL-15 단백질을 포함한다. 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 효현제 조성물은 약 0.5 mol%, 1 mol%, 2 mol%, 3 mol%, 4 mol%, 또는 5 mol% 이하의 유리(즉, 비컨주게이션된) IL-15를 포함한다.
- [0177] 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제를 제조하기 위해, IL-15 모이어티를, 예를 들어, 그의 아미노 기(예: 리신 또는 N-말단)에서 숙신이미딜 기(또는 다른 활성화된 에스테르 기)로 관능화된 PEG 시약에 컨주게이션시킬 수 있다. 이 접근법을 사용하여, 숙신이미딜 활성화된 PEG를 약 7.0 내지 9.0의 pH의 수성 매질 중에서 IL-15 모이어티 상의 아미노 기에 결합시킬 수 있지만, 상이한 반응 조건(예: 보다 낮은 pH, 예컨대 6 내지 7 또는 7 내지 8, 또는 상이한 온도 및/또는 15°C 미만)을 사용하여 IL-15 모이어티 상의 상이한 위치에 PEG 모이어티를 결합시킬 수 있다.
- [0178] 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 예를 들어, 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 일반적으로, 인터류킨-15, 예를 들어, 정제된 IL-15, 예컨대 재조합 IL-15를, 활성화된 PEG 시약, 예컨대 활성화된 에스테르, 메톡시PEG-숙신이미딜 부타노에이트, mPEG-SBA와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 다

른 적합한 활성화된 PEG 시약은 메톡시PEG-숙신이미딜 프로피오네이트, 메톡시PEG-숙신이미딜 펜타노에이트, 및 메톡시PEG-숙신이미딜 헥사노에이트를 포함한다. 숙신이미딜 활성화 기가 통상적으로 사용되지만, 임의의 적합한 활성 에스테르 또는 활성화 기가 사용될 수 있고, 여기서 이러한 반응 기는 요망되는 안정적 아마이드 연결을 형성하기에 적합하다. 일반적으로, 인터류킨-15를, 예를 들어, 인산염 완충 식염수(PBS)와 같은 적합한 완충제 중에 용해시킨다. PEG 시약을, 일반적으로 적합한 완충제 중의 용액으로, (인터류킨-15의 몰량에 대하여) IL-15와 등몰비로, 또는 (IL-15의 몰량을 기준으로 하여) 약 15배 몰 과량 이하로, 예를 들어 2배 몰 과량, 또는 5배 몰 과량, 또는 7배 몰 과량, 또는 10배 몰 과량, 또는 심지어 12배 몰 과량 또는 그 초과인 몰 과량으로 첨가할 수 있다. 일부 구현예에서는, PEG 시약을 약 5 내지 10배의 몰 과량으로 첨가한다. PEG 시약을 고체 형태로, 또는 적합한 용매 중의, 예를 들어 수성 산, 예컨대 희석 염산 중의 용액으로서 첨가할 수 있다.

[0179] 방법의 일부 추가의 구현예에서, 인터류킨-15는 초기에, 즉, 메톡시PEG-숙신이미딜 알카노에이트 시약과의 혼합 전에, 약 0.5 mg/mL 내지 약 10 mg/mL의 농도로 용액 중에 존재한다. 추가의 예시적 농도 범위는, 예를 들어, 용액 중의 약 0.5~5 mg/mL, 약 0.5~4 mg/mL, 약 0.5~3 mg/mL, 약 0.5~2 mg/mL, 약 0.5~1.5 mg/mL, 약 0.5~1 mg/mL, 약 1~10 mg/mL, 약 1~5 mg/mL, 약 1~4 mg/mL, 약 1~3 mg/mL, 약 1~2 mg/mL, 약 1~1.5 mg/mL, 약 1.5~10 mg/mL, 1.5~5 mg/mL, 약 1.5~4 mg/mL, 약 1.5~3 mg/mL, 약 1.5~2 mg/mL, 약 2~10 mg/mL, 약 2~5 mg/mL, 약 2~4 mg/mL, 약 2~3 mg/mL, 약 3~10 mg/mL, 약 3~5 mg/mL, 약 3~4 mg/mL, 약 4~10 mg/mL, 약 4~5 mg/mL 또는 약 5~10 mg/mL 인터류킨-15를 포함한다. 일부 구체적인, 그러나 비제한적인 구현예에서, 용액 중의 인터류킨-15의 농도는 약 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 1.5 mg/mL, 2 mg/mL, 2.5 mg/mL, 3 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 또는 10 mg/mL이다.

[0180] 임의의 적합한 완충제가 사용되거나 반응 혼합물에 첨가될 수 있음을 인지할 것이다. 일부 예시적 완충제는 나트륨 포스페이트(NaPi), 나트륨 아세테이트(NaAc), 보레이트, 비신, 시트레이트, 및 비스-TRIS 완충제를 포함한다.

[0181] 일부 구현예에서는, PEG 시약의 첨가 전에 IL-15 용액의 pH를 약 pH 8로 조정한다.

[0182] PEG 시약의 첨가 후, 이어서 반응 혼합물을, 필요한 경우, 적합한 pH, 예를 들어, 약 7.0~8.5, 또는 약 8.0으로 조정할 수 있다. 일부 구현예에서는, 반응 혼합물을 약 7.0~8.0 또는 약 7.4~8.5의 pH로 조정한다. 일부 특정 구현예에서는, 반응 혼합물을 약 8.0의 pH로 조정한다. 요망되는 pH를 달성하기 위해 필수적인 경우, pH를 PEG 시약의 첨가 전 또는 후에 조정할 수 있음을 인지할 것이다.

[0183] 인터류킨-15는, 많은 단백질과 같이, 특히 보다 높은 pH에서 탈아미드화에 적용되지만, 보다 낮은 pH 수준도, 예를 들어, 엡실론(ϵ) 아민에서의 보다 낮은 컨주게이션 정도, 및/또는 증가된 및/또는 바람직하지 않은 위치 이소형뿐만 아니라 단백질 응집과 같은 많은 가능한 단점을 초래할 수 있다. 탈아미드화는 단백질 내로 음전하를 도입하고, 이는 단백질의 활성, 구조, 기능, 안정성 변화를 초래할 수 있고/있거나 단백질의 분해에 대한 감수성을 변화시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 효현제에 의해 다루어지는 도전 및 관련 방법 중 하나는, 다른 고려사항들 중에서도 특히, 적어도 (i) 요망되는 컨주게이션 정도, (ii) 대상 PEG 시약과의 컨주게이션 전후 둘 다의, 인터류킨-15 모이어티의 낮은 양의 탈아미드화(이는, 예를 들어, 감소된 인터류킨-15 활성을 초래할 수 있음), 및 (iii) 단백질 응집(예: 컨주게이션 전후 둘 다)을 균형화하면서, 충분한 활성도를 유지하는(즉, 치료적으로 유용한) 지속 작용성 인터류킨-15 수용체 효현제를 제공하는 것이었다.

[0184] 본원에 기재된 바와 같은 지속 작용성 인터류킨-15 수용체 효현제의 제조에 대한 반응 파라미터와 관련된 경쟁적 및 상충적 도전에 기초하여, (PEG 시약과의 반응 전 또는 후에) 인터류킨-15 용액, 및/또는 IL-15-PEG 시약 반응 혼합물의 pH를 조정함으로써, 본원에 기재된 바와 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제를 제공하는(예를 들어, ϵ 아민뿐만 아니라 N-말단에서의) 인터류킨-15 모이어티에 대한 PEG 모이어티의 컨주게이션을 여전히 촉진시키면서, 최적의(보다 낮은 수준의) 탈아미드화에 도달할 수 있다는 것이 본 출원인에 의해 발견되었다. 이론에 의해 국한되지 않지만, 많은 반응 파라미터가 변하는 일련의 반응에 기초하여, 약 7.0 내지 약 8.5, 또는 약 7.5 내지 약 8.2, 또는 약 7.8 내지 약 8.2, 또는 약 8.0의 pH 범위가, 본원에 기재된 바와 같은 생성물을 형성하는 PEG 모이어티의 컨주게이션을 여전히 촉진시키면서, 또한 바람직한 치료 프로파일을 유지하는, 생성물에서 보다 낮은 수준의 탈아미드화를 제공하기에 효과적이다.

[0185] 예를 들어, 본원에 기재된 방법은 약 35% 미만 탈아미드화된, 또는 일부 구현예에서, 약 30% 미만 탈아미드화된, 또는 약 25% 미만 탈아미드화된, 또는 약 20% 미만 탈아미드화된 폐결화된 인터류킨-15를 생성하기에 효과적이다. 일부 구현예에서, 생성물의 탈아미드화 수준은 약 20~35%의 범위, 또는 약 20~25%의 범위, 또는 약 25~35%의 범위, 또는 약 25~30%의 범위이다. 대안적으로, 일부 구현예에서는, 상기에 언급된 것 미만의

탈아미드화 정도를 갖는 폐길화된 인터류킨-15가 고려된다. 실시예 1의 실험 2에 나타난 바와 같이, 약 7.0~8.5 범위의 pH 조정은 21.29%(조성물 1) 또는 33.26%(조성물 2)의 탈아미드화 수준을 제공하였다.

[0186] 반응물을 일반적으로, 약 5 내지 10시간(이들 값 포함)까지 혼합한다. 일부 구현예에서는, 반응물을 약 2 내지 5시간(이들 값 포함)까지 혼합한다. 일부 구현예에서는, 반응물을 약 2시간(이 값 포함)까지 혼합한다. 일부 예시적 구현예에서는, 반응물을 약 30분 내지 약 3.0시간, 또는 약 30분 내지 2.5시간, 또는 약 30분 내지 2시간, 또는 약 30분 내지 1.5시간, 또는 약 45분 내지 약 3.0시간, 또는 약 45분 내지 약 2.5시간, 또는 약 45분 내지 약 2.0시간, 또는 약 45분 내지 약 1.5시간, 또는 약 45분 내지 약 1.0시간 동안 혼합한다. 혼합은 일반적으로 온화한 조건 하에, 예를 들어 약 20℃ 내지 약 65℃, 또는 약 20℃ 내지 약 40℃, 또는 상온 또는 실온(예: 약 22℃)에서 수행된다. 보다 저온을 사용하여 보다 낮은 폐길화를 유리하게 할 수 있다. 반응을, 예를 들어, 아미노 산, 예컨대 글리신의 첨가에 의해 켄칭시킬 수 있다.

[0187] 구현예에서는, 조성물의 pH를 추가로 조정하여 탈아미드화를 경감시킬 수 있다. 일부 구현예에서는, 조성물을 약 6.5~7.5 또는 6.5~7.0의 pH로 조정한다. 일부 구현예에서는, 조성물을 약 6.5, 6.8, 7.0 또는 7.5의 pH로 조정한다.

[0188] 이어서, 폐길화된 rIL-15 반응 생성물을, 일반적으로 예를 들어, 이온 교환 크로마토그래피와 같은 임의의 적합한 방법에 의해 정제하여 요망되는 생성물을 얻을 수 있다. 예를 들어, 음이온 교환 크로마토그래피가 사용될 수 있다. 이어서, 크로마토그래피 생성물 풀(pool)을 농축시키고, 예를 들어, 접선 유동 여과(TFF)를 사용하여, 적합한 제제 완충제(예를 들어, 수크로스와 아세트산나트륨 완충제)로 정용여과(diafiltering)할 수 있다. 분석은, 예를 들어, SDS-PAGE, 역상 HPLC 또는 임의의 다른 적합한 분석 방법과 같은 임의의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0189] 앞서 기재된 바와 같이, IL-15 모이어티 상의 아미노기는, 화학식 I에 포함되는 것과 같은 지속 작용성 IL-15 R 효현제를 제공하는 IL-15 모이어티와 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 사이의 결합 자리를 제공한다. 예를 들어, 본원에서 제공되는 예시적 IL-15 아미노 산 서열을 고려하면, 컨주게이션을 위해 이용가능할 수 있는 ε-아미노산을 각각 갖는 7개의 리신 잔기가 존재함이 명백하다. 또한, 메티오닌의 N-말단 아민이 PEG 모이어티에 대한 결합점으로서 제공될 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 리신 또는 N-말단 아민 위치 중 임의의 하나 이상에서 결합될 수 있음을 인지할 것이다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 결합 자리는 하나 이상의 Lys¹⁰ 및 Lys¹¹ (일례로서 서열번호 2에 나타난 바와 같은 넘버링 사용 또는 서열번호 1 사용시 Lys¹¹ 및 Lys¹²)에 있다. 일부 구현예에서, 폴리에틸렌 글리콜 모이어티는 N-말단 아민에서 결합된다. 임의의 리신 자리가 PEG 모이어티에 대한 결합 자리로서 적합할 수 있음(예: 서열번호 1의 Lys³⁷ 또는 Lys⁴²)을 인지할 것이다. 일부 구현예에서, 지속 작용성 인터류킨-15 수용체 효현제는 위치 이성질체의 혼합물을 포함하며, 여기서 폴리에틸렌 글리콜 모이어티의 공유 결합은 주로 N-말단에 있다(다시 말해서, 위치 이성질체에서 총체적으로, N-말단에서 결합된 PEG 모이어티를 갖는 이성질체가 다른 위치 이성질체와 비교시 가장 높은 양으로 존재함).

[0190] 요망되는 경우, 생성물 풀을 추가로, 적합한 컬럼(예: Amersham Biosciences 등의 회사로부터 구매가능한 C18 컬럼 or C3 컬럼 또는 Vydac)을 사용하여 역상-고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)에 의해 또는 이온 교환 컬럼, 예를 들어 Amersham Biosciences로부터 입수가능한 Sepharose™ 이온 교환 컬럼을 사용하여 이온 교환 크로마토그래피에 의해 위치 이성질체로 분리할 수 있다. 두 접근법 모두 동일한 분자량을 갖는 PEG-인터류킨-15 위치 이성질체(즉, 위치 이성형)를 분리하는 데 사용될 수 있다.

[0191] 이러한 유형의 분리를 수행하는데 적합한 겔 여과 컬럼은 GE Healthcare(영국 버킹엄셔 소재)로부터 이용가능한 Superdex™ 및 Sephadex™ 컬럼을 포함한다. 특정 컬럼의 선별은 원하는 분별 범위에 따라 다를 것이다. 용출은 일반적으로 포스페이트, 아세테이트 등과 같은 적합한 완충액을 사용하여 수행할 수 있다. 수집된 분획물은, 예를 들어 (i) 단백질 함량에 대하여 280 nm에서의 흡광도, (ii) 표준으로서 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 염색에 기초한 단백질 분석, (iii) PEG 함량에 대하여 요오드 시험(Sims et al. (1980) *Anal. Biochem.* 107:60-63), (iv) 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS PAGE) 후 마름 요오다이드로 염색, 및 (v) 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 같은 다수의 상이한 방법으로 분석할 수 있다.

[0192] 본 발명의 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 특정 주목할 만한 유리한 특징을 갖는 것으로 발견되었다. 하기에 기재되는 특징이 본원에서 제공되는 바와 같은, 또한 화학식 I에 포함되는 화합물에 일반적으로 적용되는 것으로 믿어지지만, 하기 하나 이상의 특징은 특히 화학식 Ib, 또한 더 나아가 화학식 IIb에 따른 화합물에 의해 나타날 수 있다. 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 하기 특징 중 하나 이상을 가질 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에

서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는, 비개질된 IL-15와 비교시, 약 7배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소를 나타낸다. 예를 들어, 하나 이상의 관련 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는, IL-15와 비교시, 약 6.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 6배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 5.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 4.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 4배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 약 3.5배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 또는 심지어 약 3배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소를 나타낸다. 상기 특징에 따른 예시적 지속 작용성 IL-15 R 효현제가 본원에서, 그리고 첨부 실시예에서 기재된다.

[0193] 실시예 10에 기재된 바와 같이, 예시적 컨쥬게이트(1, 3, 및 5)의 시험관내 활성은 huPBMC에서 IL-15 신호전달을 유도하고, 컨쥬게이트 1은 이러한 신호전달을 강력하게 유도한다. 인간 CD8 T 세포, NK 세포 및 CD4 T 세포(실시예 16, 22 및 26~27)에 대한 컨쥬게이트 1의 시험관내 활성을 조사하기 위해 추가의 실험을 수행하였다. 도 10a~10b에 나타난 바와 같이, 적어도 컨쥬게이트 1은 CD56브라이트 및 CD56로우(low) 세포에서 IL-15에 비해 유사한 또는 증가된 신호전달을 유도하였다. 컨쥬게이트 1은 관련 CD8 및 CD56 브라이트 NK 세포에서 IL-15보다 덜 강력하였지만(실시예 22), 컨쥬게이트 1은 종래의 IL-15와 동일한 최대 반응을 달성하였음을 주목하는 것이 중요하다(도 38a~38b 참조). 실시예 16에서 마우스 모델에 대해 기재된 바와 같이, 두 가지 상이한 용량으로 컨쥬게이트 1의 단일 주사는 CD8 및 NK 세포에서 지속적인 pSTAT 신호전달을 유도하였다. 실시예 26의 마우스 모델에서 기재된 바와 같이, 컨쥬게이트 1의 단일 주사는 IL-15에 비해 %pSTAT5의 증가를 제공하였다. 마우스 모델에서, NK 세포는 컨쥬게이트의 단일 용량에 대해 가장 민감하였고, 그 다음이 CD8 T 세포였고, CD4 T 세포는 시험된 세포에 대해 가장 덜 민감하였다.

[0194] 컨쥬게이트 1은 또한 비-인간 영장류 모델(실시예 27에서 시노몰구스 원숭이 모델)에서 NK 세포, CD8 T 세포 및 CD4 T 세포에서 신호전달을 유도하였다. 무린 모델과 같이, NK 세포는 컨쥬게이트 1에 의한 유도에 가장 민감하였다.

[0195] 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15와 비교시 약 50% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타낸다. 다시 말해서, 일부 관련 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 IL-15와 비교시 약 45% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내거나, 또는 약 40% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내거나, 또는 약 35% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내거나, 또는 심지어 약 30% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타낸다.

[0196] 바람직하게는, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 비개질된 IL-15와 비교시 약 7배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소 및 IL-15와 비교시 약 50% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타내고, 이는 상기에 기재된 EC50 값 또는 K_D 값의 감소의 임의의 하나 이상의 특정 조합을 포함한다.

[0197] 선택적으로, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 조성물 중에 포함된다. 예시적인 부형제는 이에 한정되지 않지만, 탄수화물, 무기염, 향균제, 항산화제, 계면활성제, 완충액, 산, 염기, 아미노산, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들을 포함한다.

[0198] 당과 같은 탄수화물, 알디톨, 알도산, 에스테르화된 당 및/또는 당 중합체와 같은 유도체화 당은 부형제로서 존재할 수 있다. 구체적인 탄수화물 부형제로서는 예를 들어 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등과 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등과 같은 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토텍스트린, 텍스트란, 전분 등과 같은 다당류; 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨, 소르비톨(글루시톨), 피라노실 소르비톨, 미오이노시톨, 사이클로텍스트린 등과 같은 알디톨을 포함한다.

[0199] 또한 부형제로서는 시트르산, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 질산칼륨, 제1인산나트륨, 제2인산나트륨, 및 이의 조합과 같은 무기염 또는 완충액을 포함할 수 있다.

[0200] 또한 조성물은 미생물 성장을 방지 또는 막기 위한 향균제를 포함할 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 구현예에 적합한 향균제의 제한적이지 않는 예는 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄, 벤질 알코올, 염화세틸피리디늄, 클로로부탄올, 페놀, 페닐에틸 알코올, 질산 페닐수은, 타이메로솔(thimersol), 및 이의 조합을 포함한다.

[0201] 항산화제도 또한 상기 조성물 내에 존재할 수 있다. 항산화제는 산화를 방지하는 데 사용되어, 컨쥬게이트 또는 제조물의 기타 다른 성분의 악화를 방지한다. 본 발명의 하나 이상의 구현예에서의 사용에 적합한 항산화제로서

는 예를 들어 팔미트산아스코빌, 부틸 하이드록시아니솔, 부틸 하이드록시톨루엔, 차아인산(hypophosphorous acid), 모노티오글리세롤, 갈산프로필(propyl gallate), 아황산수소나트륨(sodium bisulfite), 소듐 포름알데히드 설폭실레이트(sodium formaldehyde sulfoxylate), 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite), 및 이의 조합을 포함한다.

[0202] 계면활성제는 부형제로서 존재할 수 있다. 예시적인 계면활성제는 "트윈 20" 및 "트윈 80"과 같은 폴리소르베이트, F68 및 F88(둘 다 BASF(미국 뉴저지주 마운트 올리브 소재)에서 시판 중임)과 같은 플루로닉(pluronic); 소르비탄 에스테르; 레시틴 및 기타 다른 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민(바람직하게는 리포솜 형태로 있지 않음)과 같은 인지질, 지방산 및 지방 에스테르와 같은 지질; 콜레스테롤과 같은 스테로이드; 및 EDTA, 아연 및 기타 다른 적합한 양이온과 같은 IL-15 킬레이트화제를 포함한다.

[0203] 산 또는 염기는 상기 조성물 내에 부형제로서 존재할 수 있다. 사용할 수 있는 산의 제한적이지 않는 예로서는 염산, 아세트산, 인산, 시트르산, 말산, 락트산, 포름산, 트리클로로아세트산, 질산, 과염소산(perchloric acid), 인산, 황산, 푸마르산, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 산들을 포함한다. 적합한 염기의 예로서는 이에 한정되지 않지만, 수산화나트륨, 아세트산나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 아세트산암모늄, 아세트산칼륨, 인산나트륨, 인산칼륨, 시트르산나트륨, 포름산나트륨, 황산나트륨, 황산칼륨, 푸마르산칼륨(potassium fumarate), 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기들을 포함한다.

[0204] 하나 이상의 아미노산은 본원에 기술된 조성물 중 부형제로서 존재할 수 있다. 이와 관련하여, 예시적인 아미노산으로서는 아르기닌, 리신 및 글리신을 포함한다. 추가의 적합한 약학적으로 허용가능한 부형제는, 예를 들어, 문헌[Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th ed., Rowe, R.C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012]에 기재된 것들을 포함한다.

[0205] 상기 조성물 내에 포함되는 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 양은 다수의 인자에 따라 다양할 것이지만, 최적으로 조성물이 단위 투약 용기(unit dose container)(예를 들어, 바이알) 내에 저장될 때 치료상으로 효과적인 용량일 것이다. 덧붙여, 약학적 제조물은 주사기 내에 수용될 수 있다. 치료상으로 효과적인 용량은 본원에 기재된 바와 같이 임상적으로 원하는 종점을 제공하는 양을 결정하기 위하여 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 양을 증가시키면서 반복된 투여에 의해 실험적으로 결정할 수 있다.

[0206] 상기 조성물 내에서 임의의 개별적인 부형제의 양은 부형제의 활성 및 조성물의 특정 수요에 따라 다를 것이다. 통상적으로, 임의의 개별적인 부형제의 최적량은 통상적인 실험을 통해, 즉 (낮은 양에서 높은 양의 범위) 부형제의 양을 달리하면서 포함하는 조성물을 제조, 안정성 및 기타 다른 파라미터를 시험, 및 그 다음 유의한 부작용이 없는 최적의 성능을 이루는 범위를 결정함으로써 결정된다.

[0207] 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 인터류킨-15으로의 치료에 반응하는 병태를 앓고 있는 환자에게 투여하기에 적합하다. 방법은, 환자에게, 일반적으로 비경구로, 치료 유효량의 지속 작용성 IL-15 R 효현제(바람직하게는 약학적 조성물의 부분으로 제공됨)를 투여하는 것을 포함한다. 앞서 기재된 바와 같이, 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 비경구로(예: 근육내로, 피하로, 정맥내로, 또는 복강내로) 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위해 적합한 제제 유형은, 특히, 주사-준비 용액, 사용 전에 용매와 조합되는 건조 분말, 주사 준비 현탁액, 사용 전에 비히클과 조합되는 건조 불용성 조성물, 및 에멀전 및 투여 전에 희석되는 액체 농축물을 포함한다. 일부 특정 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 정맥내 투여에 적합한 제제 중에 제공되고, 정맥내로 투여된다. 일부 다른 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제는 피하 투여에 적합한 제제 중에 제공되고, 피하로 투여된다.

[0208] 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(예: 약학적 조성물의 부분으로서 제공됨)의 투여 방법은 선택적으로, 효현제를 특정 영역에 국소화시키도록 수행될 수 있다. 예를 들어, 효현제를 포함하는 액체, 겔 및 고체 제제는 또한 질환을 갖는 영역에(예컨대 종양 내에, 종양 근처에, 염증이 생긴 영역 내에, 그리고 염증이 생긴 영역 근처에) 외과적으로 이식될 수 있다. 편리하게는, 요망되는 위치가 컨จู게이트에 더 잘 노출되도록 보장하기 위해 기관 및 조직을 이미징화할 수도 있다.

[0209] 투여 방법은, 예를 들어 암과 같은, 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 투여에 의해 완화되거나 예방될 수 있는 임의의 병태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, IL-15 요법에 반응할 수 있는 병태(예를 들어 암 등)를 앓고 있는 환자를 치료하기 위해 지속 작용성 효현제를 단독으로 또는 또 다른 약물요법과 조합하여 사용할 수 있다.

[0210] 본원에서 사용되는 바와 같이 암을 갖는 대상체의 치료와 관련하여, 용어 "치료", "치료하다", 및

"치료하는"은, 암의 하나 이상의 증상을 경감, 둔화, 중단, 또는 역전시키기 위한 또는 암이 실제로 제거되지 않더라도 암의 진행을 지연시키기 위한, 조합 투여와 같은, 대상체가 앓고 있는 암에 대한 모든 개입 스펙트럼을 포함하고자 한다. 치료는, 예를 들어, 증상의 중증도, 증상의 수, 또는 재발 빈도수의 감소, 예를 들어 종양 성장의 억제, 종양 성장의 저지, 또는 이미 존재하는 종양의 퇴행을 포함할 수 있다.

[0211] 예를 들어, 암 또는 암-관련 질환에서의 개선은 완전한 또는 부분적 반응으로서 특성화될 수 있다. "완전한 반응"은, 임의의 이전의 비정상적 방사선사진 연구, 골수, 및 뇌척수액(CSF) 또는 비정상적 모노클로날 단백질 측정의 정규화와 함께 임상적으로 검출가능한 질환의 부재를 지칭한다. "부분적 반응"은 새로운 병소의 부재 하에 모든 측정가능한 종양 존재량(즉, 대상체 내에 존재하는 악성 세포의 수, 또는 종양 덩어리의 측정된 벌크 또는 비정상적 모노클로날 단백질의 양)의 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 감소를 지칭한다. 용어 "치료"는 완전한 및 부분적 반응 둘 다를 고려한다.

[0212] 용어 "암" 및 "암성"은, 통상적으로 비조절된 세포 성장에 의해 특성화되는 포유류에서의 생리학적 병태를 지칭하거나 나타낸다.

[0213] 본원에서 사용되는 바와 같이, "종양" 및 "충실성 종양"은, 악성이든 양성이든 모든 병소 및 신생물 세포 성장 및 증식, 및 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다.

[0214] 예시적 병태는, 예를 들어, 섬유 육종, 근육 육종, 지방 육종, 연골 육종, 골육종, 척색종, 혈관 육종, 내피 육종, 림프관 육종, 림프혈관내피육종, 활막종, 중피종, 유방 종양(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 췌장암, 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 편평세포암, 기저세포암, 두경부암, 선암, 땀샘암, 피지샘암, 유두암, 유두모양샘암종, 낭샘암종, 골수암, 기관지암, 신장세포암, 간암, 담관암, 용모암종, 정상피종, 배아암, 빌름스 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암, 고환암, 폐암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 방광암, 상피암, 신경교종, 성상세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 희소돌기아교세포종, 수막종, 흑색종(예를 들어, 포도막 흑색종, 점막 흑색종, 및 연수막 흑색종), 신경모세포종, 망막모세포종, 및 백혈병 등의 암이다.

[0215] 하나의 특정 방법에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 혈액 악성종양, 예컨대 백혈병 또는 림프종의 치료에 사용된다. 또한 또 다른 방법에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제는 충실성 암의 치료에 사용된다.

[0216] 일부 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 조성물은 NK 활성화 및/또는 증식을 자극하기 위해 대상체에게 치료 유효량으로 투여시 효과적이다.

[0217] 실시예 11에 기재된 바와 같은 예시적 마우스 모델에서, 컨쥬게이트 1은, 세포 수의 증가(도 12b~12c에 나타난 바와 같은 세포/ μ)뿐만 아니라 %Ki67의 증가(예: 도 11a)에 의해 나타나는 바와 같이 NK 세포의 증식 및 지속적인 수 증가를 유도하기에 효과적이었다. %Ki67은 세포 증식에 대한 마커로서 사용된다. 도 12a~12d에서 보이는 바와 같이, 세포 수의 증가는 모든 성숙 수준의 NK 세포(말단 이펙터 세포, 전-NK 세포, 고 이펙터 세포 및 초기 NK 세포)에서 보였다. 실시예 17에 나타난 바와 같이, NK 세포 수 증가는 적어도 96시간 동안 모든 용량 수준에서 지속적이었고, 중간 및 고용량 수준은 적어도 144시간 동안 지속적이었다. 마우스 모델에서 컨쥬게이트 1의 투여는, 비히클에 비해, 모든 용량 수준에서 %Ki67의 증가를 유도하였고, 이는 적어도 120시간 동안 지속적이었다. %Ki67적어도 중간 용량 범위(예: 0.1 mg/kg 및 0.3 mg/kg)는 %Ki67의 증가를 유도하였고, 이는 적어도 144시간 동안 지속적이었다.

[0218] 컨쥬게이트 1의 효과는 단일 용량으로 유도될 수 있고 지속적이었다. 실시예 11에 기재된 바와 같은 예시적 무린 모델에서, 세포 수의 증가는 컨쥬게이트 1의 단일 용량의 투여에서 유도되었고 지속적이었다. 단일 용량은 동일한 수준으로의 반복(예: Q7dx3) 투여와 유사한 무린 CD49b 세포에서의 %Ki67 수준을 유도하였고 지속시켰다(도 28a 참조).

[0219] 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 조성물은, NK 세포에 의한 세포독성 프로테아제 발현의 증가에 의해 입증되는 바와 같이 NK 세포 활성화를 증가시키기 위해 치료 유효량으로 투여시 효과적이다. 실시예 28에 기재된 바와 같은 예시적 비-인간 영장류 모델에서, 컨쥬게이트 1의 단일 용량에 의해 NK 세포용해 효소 그랜자임 B 및 퍼포린의 발현이 유도되고 향상되었다. 도 48a~48c에서 보이는 바와 같이, 모든 용량 수준은 그랜자임 B 발현을 증가시켰고, 중간/고용량은 적어도 발현(MFI)을 투여 전 수준에 비해 3배로 만들었다. 도 49a~49c에서 보이는 바와 같이, 모든 용량 수준은 퍼포린 발현을 증가시켰고, 중간/고용량은 발현(MFI)을 투여 전 수준에 비해 2배로 만들었다. 따라서, 컨쥬게이트 1은 NK 세포의 세포독성을 증가시키기에 효과적이다.

[0220] 또한 일부 추가의 구현예에서, 지속 작용성 IL-15 R 효현제 또는 조성물은 CD8 T-세포 생존 및 기억 형성을 뒷

받침하기 위해 대상체에게 치료 유효량으로 투여시 효과적이다.

- [0221] 예시적 마우스 모델에서, 컨쥬게이트 1의 모든 용량 수준에서의 단일 용량은, CD8 세포에서의 $\%Ki-67$ 양성(도 30d)뿐만 아니라, 중심 기억 및 이펙터 기억 CD8 부분집단(도 30e~30f)의 증가에 의해 나타나는 바와 같이 세포 증식을 증가시킨다. 실시예 17에 나타난 바와 같이, 무린 모델에서 컨쥬게이트 1의 투여는 혈액 내 총 CD8 T 세포의 현저한 증가를 유도하였다(도 30a 참조). 최저 용량은 CD8 Tcm 및 CD8 Tem을 증가시켰다(도 30b~30c 참조). 예시적 무린 모델에서, 컨쥬게이트 1의 단일 iv 주사는, 적어도 240시간 동안, 비히클의 투여에 비해, 증가된 세포 수를 유지시켰다(예를 들어 도 30a 참조). 특히, CD8 및 CD8 기억 T 세포 수는, 컨쥬게이트 1을 일부 용량 수준으로 투여하였을 때, 주사 후 240시간에 기준선으로 되돌아가지 않았다. 따라서, 컨쥬게이트 1은 연장된 기간 동안 CD8+ 기억 T 세포의 집단을 유지시킨다. 컨쥬게이트 1의 단일 용량은, 모든 용량 수준에서, 모든 CD8 및 CD8 부분집단에서의 Ki-67 양성을 또한 증가시켰고, 이는 이들 세포의 증가된 증식을 나타낸다. 컨쥬게이트 1의 반복 투여는 CD8, CD8 Tcm, 및 CD8 Tem 집단의 추가의 증가를 제공하였다(도 31a~31c 참조). 반복 투여는 또한, 마우스에서 CD8, CD8 Tcm, 및 CD8 Tem 집단 각각에 대하여 적어도 240시간의 세포 증식의 장기간 증가를 제공하였다.
- [0222] 컨쥬게이트 1은 또한, 비히클의 투여에 비해, 비-인간 영장류 모델(실시예 27에서 시노몰구스 원숭이 모델)에서 NK 세포 및 CD8 T 세포의 증식 및 지속적인 수 증가를 유도하였다. 컨쥬게이트 1의 각각의 용량 수준은 적어도 14일 동안 NK 세포 수 증가를 유도하고 지속시켰다(도 44a 참조). 컨쥬게이트 1은 각각의 용량 수준에서 적어도 10일 동안 CD8 T 세포 수 증가를 유도하고 지속시켰다.
- [0223] 또한 하나 이상의 추가의 구현예에서, IL-15 R 효현제는 정맥내로 투여된다. 또한 추가의 구현예에서, IL-15 R 효현제는 피하로 투여된다.
- [0224] 또한 일부 추가의 구현예에서, IL-15 R 효현제는, 투여에 따라, CD8 T-세포의 증식 및/또는 CD8 중심 기억 집단의 우선적 확장을 제공하는 림프구에서의 지속적인 신호전달을 유도하기에 효과적이다.
- [0225] 투여될 실제 용량은 피험체의 연령, 체중 및 전체적인 상태뿐만 아니라, 치료중인 병태의 심각성, 건강 관리 전문가의 판단, 그리고 투여되는 컨쥬게이트에 따라서 달라질 것이다. 치료 유효량은 당업자들에게 공지되어 있으며/있거나 관련된 참조 문서 및 문헌에 기술되어 있다. 일반적으로 치료적 유효량은 약 0.001 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.01 mg/일 내지 75 mg/일의 용량으로, 보다 바람직하게는 0.10 mg/일 내지 50 mg/일의 용량의 범위일 것이다. 주어진 용량은, 예를 들어 임상이가 적절한 중점에 이르렀다고(예를 들어 치료, 퇴행, 부분 퇴행 등이 이루어졌다고) 결정할 때까지 주기적으로 투여될 수 있다.
- [0226] 일부 구현예에서, 치료 유효량은 약 0.25~25 mcg/kg의 범위이다. 다른 구현예에서, 치료 유효량은 약 0.25 mcg/kg 내지 약 0.1 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg/일 또는 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg/일의 범위이다. 다른 구현예에서, 치료 유효량은 약 1~10 mcg/kg, 약 0.03 mg/kg 내지 약 0.1 mg/kg의 범위이다. 일부 구체적인, 그러나 비제한적인 구현예에서, 치료 유효량은 약 0.25 mcg/kg, 0.3 mcg/kg, 0.5 mcg/kg, 1 mcg/kg, 2 mcg/kg, 3 mcg/kg, 5 mcg/kg, 6 mcg/kg, 7 mcg/kg, 10 mcg/kg, 15 mcg/kg, 20 mcg/kg, 25 mcg/kg, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.05 mg/kg, 또는 0.1 mg/kg이다. 본원 실시예에서 참조된 용량과 관련하여, 당업자는 당업계에 알려진 바와 같은 환산(예: Nair et al., J. Basic and Clin. Pharmacy(2016) 7:27-31)을 사용하여 동물 용량(예: 마우스)을 인간에서의 상응하는 용량으로 환산할 수 있다.
- [0227] 임의의 주어진 컨쥬게이트(또한, 바람직하게는 약학적 제조물의 부분으로서 제공됨)의 단위 복용량은 임상의의 판단, 환자의 수요 등에 따라 다양한 투여 스케줄로 투여될 수 있다. 구체적인 투여 스케줄은 당업자에게 공지되어 있거나 또는 통상적인 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 예시적인 투여 스케줄은 이에 한정되지 않지만, 하루에 1번, 일주일에 3번, 일주일에 2번, 일주일에 1번, 한달에 2번(예를 들어, q/14일), 한달에 1번(예를 들어 q/30 또는 31일 또는 q/21일) 투여 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 일단 원하는 임상 중점을 성취하면, 조성물의 투여는 중단 또는 감소시킨다. 일부 구현예에서, 임의의 주어진 컨쥬게이트의 단위 용량은 지속적인 효과를 제공하도록 1회 투여될 수 있다.
- [0228] 본 발명은 이의 바람직한 특이적 구현예와 함께 기술되어 있고, 상기한 기술뿐만 아니라 후술하는 실시예는 본 발명을 예시하는 것이고 본 발명의 범주를 제한하는 것이 아닌 것으로 의도됨을 이해해야 한다. 본 개시내용의 범주 내에서의 다른 양태, 이점 및 변형은 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련된 자들에게 명백할 것이다.
- [0229] 본원에서 참조한 모든 논문, 서적, 특허 및 기타 다른 간행물은 참조로서 전체가 포함된다. 본 명세서와 참조로 포함된 문헌의 교시내용 사이에 모순이 있을 경우, 본 명세서에서의 교시내용 및 정의의 의미가 (특히 본원에

첨부된 청구범위에서 사용된 용어와 관련하여) 우선할 것이다. 예를 들어, 본 출원 및 참조로 포함된 공개문헌이 동일한 용어를 상이하게 정의하는 경우, 용어의 정의는 정의가 위치하는 문서의 교시내용 내에서 보존될 것이다.

[0230] 실시예

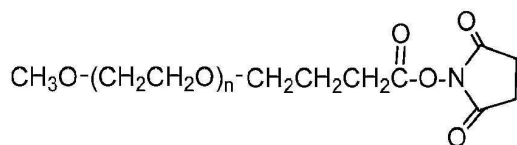
[0231] 상기 설명뿐만 아니라 하기 실시예는 본원에서 제공되는 본 발명(들)의 범위를 예시하며 제한하지 않고자 함을 이해하여야 한다. 다른 양태, 이점 및 변형은 당업자에게 명백할 것이다.

[0232] 다음의 실시예에서, 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)에 대하여 정확성을 확보하기 위하여 노력하였으나, 몇몇 실험적 오차 및 편차를 고려하여야 한다. 다르게 지시되지 않는다면, 온도는 섭씨이고 압력은 해수면에서의 대기압 또는 대기압 근처이다. 하기 실시예의 각각은 본원에 기술된 하나 이상의 구현예를 수행하는 데 당업자에게 도움이 될 것으로 고려된다.

[0233] 재료 및 방법

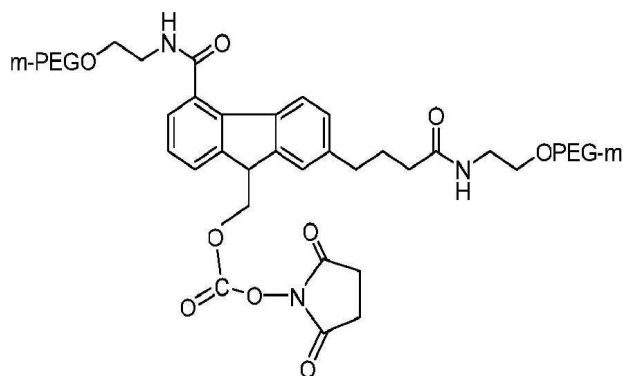
[0234] 종래 기술을 사용하여 제조된 재조합 IL-15("rIL-15") 서열번호 1(도 1에 제공된 바와 같음)을 하기 실시예에서 사용하였지만, 임의의 적합한 IL-15 모이어티가 유사하게 사용될 수 있다. 서열번호 1, *E. coli*로부터의 재조합 인간 IL-15는 12.9 kDa의 분자량을 갖는, 115개 아미노산을 함유하는 단일, 비-글리코실화된 폴리펩티드 사슬이다.

[0235] 반응성 중합체 시약, 선형 mPEG-숙신이미딜 부타노에이트, 40 kDa("mPEG-SBA")는 하기 구조를 갖는다:



[0236] (여기서, n은 약 40 킬로달톤의 중량 평균 분자량을 갖는 중합체를 제공하는 단량체 서브유닛의 수에 상응하며, 즉, n은 약 909임). 사용에 적합한 추가의 mPEG-숙신이미딜 부타노에이트 시약은, 예를 들어, 약 10 kD, 15 kD, 20 kD, 25 kD, 30 kD, 40 kD, 50 kD 또는 60 kD의 중량 평균 분자량을 갖는 것들을 포함한다. 이 활성화된 중합체 시약은, IL-15의 아미노 기(예: 리신 또는 N-말단)와 반응시, IL-15 모이어티와 폴리에틸렌 글리콜 모이어티 사이의 안정적 아미드 연결을 형성하기에 효과적이다.

[0238] 반응성 플루오레닐-PEG 시약, PEG2-CAC-FMOC-20kD-NHS는 하기 구조를 갖는다:

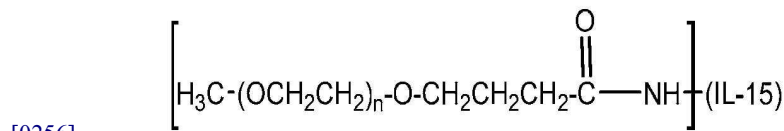


[0239] (여기서, mPEG는 메톡시(폴리에틸렌 글리콜)이고, 중합체 시약의 중량 평균 분자량은 약 20 킬로달톤임(즉, 각각의 mPEG 모이어티는 약 10 킬로달톤의 중량 평균 분자량을 가짐)). 상이한 분자량을 갖는 추가의 PEG2-CAC-FMOC 시약이 그에 따라 명명되며, 예를 들어 PEG2-CAC-FMOC-10kD-NHS, PEG2-CAC-FMOC-15kD-NHS, PEG2-CAC-FMOC-30kD-NHS, PEG2-CAC-FMOC-40kD-NHS이고, 여기서 이러한 시약은 상기에 나타난 구조를 가지며 단지 FMOC 코어에 결합된 "mPEG" 모이어티의 분자량에 있어 상이하다.

[0241] **SDS-PAGE 분석** Invitrogen 겔 전기 영동 시스템(XCell SureLock Mini-Cell)을 사용하는 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(SDS-PAGE)에 의해 시료를 분석하였다. 시료를 시료 완충액과 혼합하였다. 그 다음, 제조된 시료들을 NuPAGE Novex 예비 주조 겔 상에 로딩한 후, 약 30분 동안 전개시켰다.

- [0242] RP-HPLC 분석
- [0243] 역상 크로마토그래피(RP-HPLC) 분석을 Agilent 1200 HPLC 시스템(Agilent) 상에서 수행하였다. 샘플을 60℃에서 Poroshell 300SB-C3 컬럼(2.1 x 75 mm, Agilent)을 사용하여 분석하였다. 사용된 이동 상은 0.1%TFA/H₂O(A) 및 0.1%TFA/CH₃CN(B)이었다. 컬럼에 대한 유량은 0.5 ml/분이었다. 용리된 단백질 및 PEG-단백질 컨쥬게이트를 280 nm에서 UV를 사용하여 검출하였다.
- [0244] 생물검정
- [0245] CTLL-2 세포에서의 STAT5 인산화에 기초한 효능 검정(마우스 T 세포)
- [0246] 수용체 결합에 따른 포스포-STAT5 검정에서, 하류 세포 신호전달은 이후에 인산화를 통해 STAT5(Signal Transducer and Activator of Transcription 5)를 활성화시켜 세포 증식을 유도하는 유전자 발현을 촉진시킬 수 있다. 포스포-STAT5의 활성화는, 약 10분 동안 샘플 및 참조 처리에 반응하는, 포스포-STAT5/총 STAT5 다중화된 검정(Meso Scale Discovery, 미국 메릴랜드주 소재)을 사용하여, CTLL-2 세포, 무린 T 림프구 세포주에서 측정된다.
- [0247] 분석 하루 전에 CTLL-2 세포들을 신선한 생장 배지[10% FBS, 10% T-세포 배양 보충제(카탈로그 #354115, Corning, Inc., 미국 매사추세츠주 텍스베리 소재), 2 mM L-글루타민, 그리고 1 mM 피루브산나트륨으로 보충된 RPMI 1640]에 나누어 넣었다. 분석 당일에 세포들을 적어도 4 시간 동안 분석 배지(1% FBS, 2 mM L-글루타민, 그리고 1 mM 피루브산나트륨으로 보충된 RPMI 1640) 중에서 예비 항온처리한 다음, 이를 96-웰 평판 내 분석 배지에 50,000 세포/웰이 되도록 넣었다. 분석 직전에 적절한 완충액 중 시험 물질 희석액들을 제조하였다. 25 배 시험 물질 용액을, CTLL-2 세포를 함유하는 3개의 웰에 첨가하여 CTLL-2 세포 자극을 개시하였다. 평판들을 37℃, 5% CO₂에서 10분 동안 항온처리한 다음, 세포 용해에 의해 반응을 중지시켰다. MSD Phospho(Tyr694)/Total STATa,b Whole Cell Lysate Kit(Meso Scale Discovery, 미국 메릴랜드주 소재)를 사용하여 세포 용해물 중 Phospho-STAT5 및 Total STAT5 단백질 수준의 검출을 실행하였다. 10분간 처리를 수행한 후, PeproTech로부터 얻은 재조합 인간 IL-15는, CTLL-2 세포에서 STAT5 인산화를 유도함으로써 IL-15 활성(평균 EC₅₀ 27 ng/ml)을 나타내었다(대조군으로 사용함).
- [0248] HuPBMC-pStat5 검정
- [0249] 다양한 인간 림프구 부분집단에 대한 IL-15 또는 지속 작용성 IL-15 R 효현제의 효능을 포스포-STAT5(Y694) 용량 반응 검정에 의해 측정하였다. 다수의 공여체로부터의 동결된 인간 PBMC가 AllCells에 의해 공급되었다. 1x10⁶ 세포/100ul를 완전 RPMI 배지에서 2시간 동안 배양하고, 이어서 지시된 농도(10,000ng/ml~0.001ng/ml의 일련의 희석)의 IL-15 또는 컨쥬게이트로 37℃에서 20분 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 세포를 고정시키고(BD Cytotfix 사용) 침투화하고(100% 사전-냉각된 메탄올 사용), CD3, CD4, CD8, CD4-Tregs(CD4+CD25+Foxp3+), CD56 및 인산화된 STAT5(Y694)에 대하여 항체로 염색한 후, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 농도-반응 관계를 사용하여 EC₅₀ 값을 계산하였다.
- [0250] IL-15Rα에 대한 지속 작용성 rIL-15 수용체 효현제의 수용체 친화력
- [0251] BIAcore™ SPR 시스템을 사용하는 표면 플라즈몬 공명법(Surface Plasmon Resonance; "SPR")을 사용하여 IL-15 및 예시적인 지속 작용성 rIL-15 수용체 효현제들의 친화도를 측정하였다. 간단히 말해서, NHS:EDC의 1:1 혼합물을 사용하여 Biacore CM5 센서 칩의 표면을 활성화하여 활성 NHS 에스테르를 생성하였다. 10 mM 아세트산나트륨(pH 4) 중에서 염소 항-인간 Fc 항체를 5분 동안 주사하여 상기 표면에 이 항체를 공유 부착시켰다. 상기 표면에 결합된 항체들은 약 8000 RU 존재하였다. 그 다음, 임의의 잔여 NHS 에스테르를 에탄올아민으로 급랭시켰다.
- [0252] PBSP 중 5분간의 주사 단계에 의해 각각의 주사 주기 개시시, IL-15-Rα-Fc를 센서 칩 채널에 포착시켰다. 통상적으로 수용체 150 RU 내지 200 RU가 표면에 결합되었다.
- [0253] 지속 작용성 rIL-15 수용체 효현제 시험 물품을 PBS(0.05% Tween 20 및 0.1 mg/ml BSA 함유) 중에서 10 μM로 희석하였다. 일련의 3배 희석액을 제조하고, IL-15Rα로 코팅된 센서 칩 상에 주입하였다. k_a 및 k_d 속도를 별도로 구함으로써 친화력을 측정하고, k_d와 k_a 사이의 비율을 사용하여 K_d 값을 계산하였다.
- [0254] **실시예 1**

[0255] 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 제조,



[0257] 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)_{40kD} 인터류킨-15

[0258] 실험 1: IL-15의 2.7 ml 용액(1.23 mg/ml, PBS 완충제 중, pH 7.4)을 소형 반응 바이알 내로 전달하였다. 300 μ l의 0.6M 보레이트 완충제(pH 8)를 첨가하여 pH를 pH 8로 조정하였다. 질소 하에 -20℃에서 저장된 mPEG-SBA, 40 kDa를 상온으로 가온시켰다. 10배 과량(IL-15의 몰량에 대하여)의 mPEG-SBA-40K를 2 mM HCl 중에 용해시켜 10% PEG 시약 용액을 형성하였다. 10% PEG 시약 용액을 빠르게 IL-15 용액에 첨가하고 잘 혼합하였다. mPEG-SBA-40K의 첨가 후, 반응 혼합물의 pH를 측정하고, 종래 기술을 사용하여 pH 8로 조정하였다. IL-15에 대한 mPEG-SBA-40K의 커플링(즉, 안정적 아미드 연결의 형성을 통해)을 가능하게 하기 위해, 반응 용액을 저속 실험 실 회전장치(Slow Speed Lab Rotator) 상에 1.5시간 동안 배치하여 실온에서 컨쥬게이션을 용이하게 하였다. 글리신의 용액 첨가에 의해 반응을 쉐킷시켰다.

[0259] 도 2는 컨쥬게이션 반응 혼합물의 RP-HPLC 분석에 따른 크로마토그램을 나타낸다. 반응으로부터 40% 모노-컨쥬게이트(즉, IL-15에 결합된 단일 PEG 모이어티를 가짐), 24% 디-컨쥬게이트(IL-15에 결합된 2개의 PEG를 가짐) 및 6% 트리-컨쥬게이트(IL-15에 결합된 3개의 PEG를 가짐) 중을 수득하였다. 반응 조건이 최적화되지 않았음에도 대략 30%의 미반응 IL-15가 반응 혼합물 중에 남아있었다.

[0260] Q 세파로즈 고성능 컬럼 및 용리액 상으로서 인산나트륨 완충제를 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피에 의해 요망되는 모노-컨쥬게이트를 분리/단리하였다. 정제된 모노-mPEG-SBA40K-IL-15 컨쥬게이트(또한 본원에서 모노-mPEG-부탄아미드-40K-IL-15 또는 모노(메톡시PEG-N-부탄아미드)_{40kD} 인터류킨-15, 또는 모노-mPEG_{40K}-C4-아미드-IL-15로서 언급됨)를 HPLC 및 SDS-PAGE에 의해 특성화하였다. 실시예의 나머지 부분에서, 정제된 모노-mPEG-SBA40K-IL-15는 컨쥬게이트 1로서 언급된다.

[0261] 도 3은 음이온-교환 크로마토그래피 컬럼으로부터의 FPLC 정제 프로파일을 제공한다. 도 4는 정제된 모노-mPEG-SBA-40K-IL-15 컨쥬게이트의 SDS 겔을 나타낸다. 겔에 의해 나타나는 바와 같이, 정제된 컨쥬게이트는 높은 수준의 순도를 갖고 미반응 IL-15를 갖지 않는다. 도 5는 정제된 모노-mPEG-SBA-40K-IL-15의 RP-HPLC 분석을 나타낸다. HPLC 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 정제된 모노-mPEG-SBA-40K-IL-15 조성물은 약 10%(몰량) 미만의 디- 또는 고급 수준 컨쥬게이트를 함유한다.

[0262] 이러한 동일한 접근법을 사용하여, 상이한 중량 평균 분자량을 갖는 mPEG-SBA를 사용하여 모노-mPEG-SBA-10K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-15K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-20K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-25K-IL-15, 모노-mPEG-SBA-30K-IL-15; 모노-mPEG-SBA-40K-IL-15; 모노-mPEG-SBA-50K-IL-15; 및 모노-mPEG-SBA-60K-IL-15 등의 컨쥬게이트를 제조한다.

[0263] 실험 2: 완충제(50 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 10% 수크로스, pH 7.4) 중의 IL-15의 대략 2 mg/ml 용액을 2개의 상이한 반응 용기 각각으로 옮겼다(본원에서 조성물 1 및 조성물 2로서 언급됨). pH를 8.0으로 조정하기 위해, pH 8의 보레이트 완충제(0.4M 또는 0.6M)를 첨가하였다. 2 mM HCl 중에서 희석된 10배 과량(IL-15의 몰량에 대하여)의 mPEG-SBA-40K(mPEG-SBA, 40 kDa)를 IL-15 용액 각각에 첨가하고 잘 혼합하였다. mPEG-SBA-40K의 첨가 후, 반응 혼합물의 pH는 pH 8인 것으로 측정되었거나, 또는 필요한 경우 추가의 보레이트 완충제의 사용에 의해 조정되었다. 반응에서 IL-15의 최종 농도를, 필요한 경우 추가의 희석제(50 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 10% 수크로스를 함유하는 완충제(pH 7.4)를 조성물 1에 대해 사용하였고, 물을 조성물 2에 대해 사용하였음)를 사용하여, 1 g/L에 대해 표적화하였다. IL-15에 대한 mPEG-SBA-40K의 커플링(즉, 주로 안정적 아미드 연결을 통해)을 가능하게 하기 위해, 각각 조성물 1 또는 조성물 2에 대하여 반응 용액을 45 또는 60분 동안 혼합하여 실온에서 컨쥬게이션을 용이하게 하였다. pH 8.0에서 30분 동안 71배 과량의 글리신(반응에 초기에 첨가된 PEG의 몰량에 대하여) 첨가에 의해 반응을 쉐킷시켰다. 조성물 1에 대해서는, 0.2 M 인산을 사용하여 pH 7.0으로 적정함으로써 pH를 조정하였다.

[0264] 생성된 조성물을 역상 HPLC(RP-HPLC), SDS-PAGE, 및 이온 교환 HPLC(IEH-HPLC)에 의해 특성화하였다. RP-HPLC 분석의 결과를 하기 표 1A에 제공한다.

[0265] [표 1A]

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

RRT는 상대적 체류 시간임.

[0266]

[0267] SEC-HPLC 분석의 결과를 하기 표 1B에 제공한다.

[0268] [표 1B]

	성분	평균 % 면적
조성물 1	HMW 중	5.56
	디-mPEG IL-15(이량체)	15.46
	모노-mPEG IL-15 (단량체)	78.98
조성물 2	HMW mPEG 중	5.25
	디-mPEG IL-15	6.62
	모노-mPEG IL-15	88.14

HMW= 인터류킨-15에 공유 결합된 3개 이상의 PEG를 갖는 고분자량 mPEG-IL-15
컨쥬게이트.

[0269]

[0270] IEX-HPLC 분석의 결과를 하기 표 1B에 제공한다.

[0271] [표 1C]

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

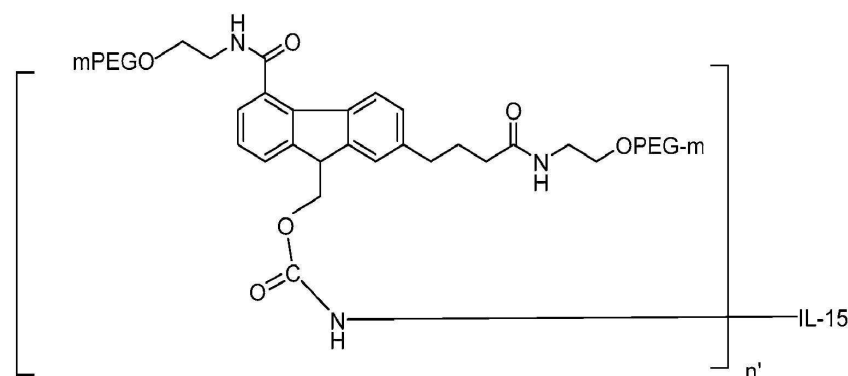
[0272]

[0273] 제조된 조성물은 주로 mPEG-SBA-40K 모노페길화된 종을 포함하였고, 10% 미만의 PEG 이량체(즉, IL-15에 결합된 2개의 PEG 모이어티를 가짐) 및 훨씬 더 낮은 양의 고급 PEG 종(즉, IL-15에 결합된 3개 이상의 PEG 모이어티를 가짐)을 포함하였다.

[0274] 또한, 조성물은 비교적 낮은 정도의 탈아미드화(표 1C에서 "산성 영역"으로 규명됨)를 가졌다. 조성물 1은 21.29% 탈아미드화되었고, 조성물 2는 33.26% 탈아미드화되었다.

[0275] 실시예 2

[0276] 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 제조,



[0277]

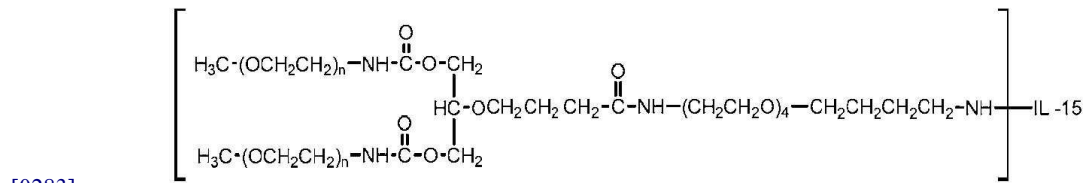
[0278] 질소 하에 -80°C 에서 저장된 mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS를, 질소 퍼징 하에 상온으로 가온시켰다. mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS의 스톱 용액(200 mg/mL)을 2 mM HCl 중에서 제조하고, mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS를, 5:1 내지 100:1 범위의 mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS 대 rIL-15의 물비로 rIL-15에 첨가하였다. 혼합물 중의 rIL-15의 최종 농도는 0.5 mg/mL(0.031 mM)였다. 중탄산나트륨 완충제(1 M, pH 8.0)를 혼합물에 첨가하여 100 mM의 최종 농도에 도달하였고, 컨쥬게이션을 30분 동안 진행시켜 [mPEG2-CAC-fmoc-20K-NHS]-[rIL-15] 컨쥬게이트(여기서, 컨쥬게이트의 비공식 명칭은 컨쥬게이트 제조에 사용된 중합체 시약을 반영하며, 생성된 생성물(들)에 대해서는, 중합체 시약에서의 반응성 모이어티가 연결에 의해, 이 경우에는, IL-15로 대체되었음을 이해함)를 제공하였다. 30분 후, 반응 혼합물에 1 M 글리신(pH 6.0)을 첨가하여 100 mM의 최종 농도를 달성함으로써 켄칭을 달성하였다. 이어서, 빙초산을 사용하여 켄칭된 반응 혼합물의 pH를 4.0으로 조정한 후 컬럼 크로마토그래피 정제 및 특성화를 수행하였다.

[0279] 반응 혼합물을 RP-HPLC 분석에 의해 분석하였다. SDS-PAGE에 의하면, 반응 혼합물은 약 10~20% 모노-컨쥬게이트, 약 50~70% 디-컨쥬게이트, 및 약 20~30% 트리-컨쥬게이트를 함유하였으며, 다시 말해서, 반응 혼합물은 주로 디-컨쥬게이트 종을 함유하였다. Q 세파로즈 고성능 컬럼 및 용리액 상으로서 인산나트륨 완충제를 사용하여 음이온-교환 크로마토그래피에 의해 컨쥬게이트 혼합물을 분리/단리하여, 평균 페길화도가 약 2인(페길화도가 약 1.7 내지 2.5 범위인) 정제된 [mPEG2-CAC-FMOC-20kD-NHS]-IL-15를 제공하였고, 그에 따라 정제된 조성물에 대하여 상기 구조에서 n'는 약 2이다.

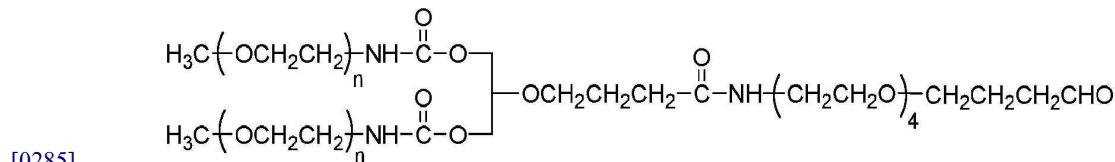
[0280] 실시예의 나머지 부분에서, 정제된 [mPEG2-CAC-FMOC-20kD-NHS]-IL-15는 컨쥬게이트 2로서 언급될 것이다.

[0281] 실시예 3

[0282] 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제, [모노-PEG2-RU-ButryALD-40K]-IL15의 제조



[0283]
[0284] 분지화된 mPEG-부티르알데히드 PEG 시약, 모노-PEG2-RU-ButryALD-40K,



[0285]
[0286] 를 사용하여 대상 지속 작용성 IL-15 R 효현제를 제조하였고, 여기서 효현제 제조에 사용된 PEG 시약의 중량 평균 분자량은 약 40,000 달톤이었다.

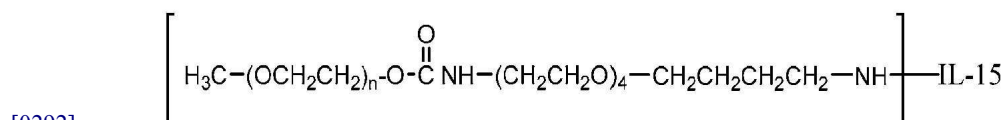
[0287] 2.7 ml의 IL-15(1.23 mg/ml, PBS 완충제 중, pH 7.4)를 소형 반응 바이알 내로 전달하고, 0.3 ml의 1M 아세트 산나트륨 완충제(pH 5)를 첨가하여 pH를 pH 6으로 조정하였다. 질소 하에 -20℃에서 저장된 mPEG2-ru-ButyrALD, 40kDa를 상온으로 가온시켰다. 15배 과량(IL-15의 양에 대하여)의 mPEG2-ru-ButyrALD를 MilliQ H2O 중에 용해 시켜 10% 시약 용액을 형성하였다. 10% 시약 용액을 빠르게 IL-15 용액에 첨가하고 잘 혼합하고, RotoMixer 상에 15분 동안 셋팅하였다. 이어서, 1/100 부피의 1 M NaCNBH3/H2O를 반응 혼합물에 첨가하였다. 2급 아민 연결을 통한 IL-15에 대한 mPEG2-ru-ButyrALD의 커플링을 가능하게 하기 위해, 반응 용액을 4℃에서 17시간 동안 RotoMixer 상에 배치하고, 이어서 글리신 용액으로 켄칭시켰다. 폐길화 반응을 산성 pH에서 수행하였기 때문에, IL-15에 대한 PEG 유도체의 결합은 N 말단에 대해 보다 선택적이었다. Q 세파로즈 고성능 컬럼 및 인산나트륨 완충제를 사용한 음이온-교환 크로마토그래피 방법을 또한 진행하여 컨쥬게이트를 정제하였다. 정제된 모노-mPEG2-ru-ButyrALD-40K-IL-15 컨쥬게이트를 HPLC 및 SDS-PAGE에 의해 특성화하였다.

[0288] 실시예의 나머지 부분 및 동반되는 개시내용에서, 정제된 [모노-PEG2-RU-ButryALD-40K]-IL-15(즉, 아민 연결을 통해 IL-15에 공유 결합된 상기에 나타난 구조를 갖는 단일 PEG 모이어티를 가짐)는 컨쥬게이트 3으로서 언급될 것이다.

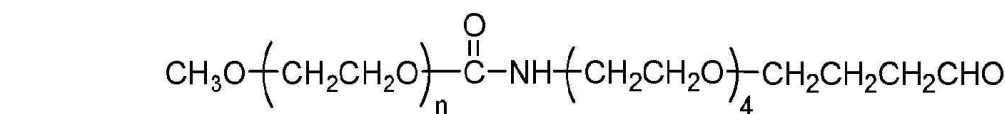
[0289] 이러한 동일한 접근법을 사용하여, 상이한 중량 평균 분자량을 갖는 PEG2-RU-ButryALD-를 사용하여 컨쥬게이트를 제조한다. 예를 들어, 20 kD 중합체 시약을 사용하여 상기에 기재된 바와 같이 모노-PEG2-RU-ButryALD-20K]-IL-15(본원에서 컨쥬게이트 4로서 언급됨)를 제조하였다.

[0290] 실시예 4

[0291] 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제, 모노-mPEG-ButyrALD-40K-IL-15의 제조



[0292]
[0293] 하기 구조를 갖는, PEG 시약, 선형 mPEG-부티르알데히드, 40kDa("mPEG-ButyrALD"):



[0294]
[0295] 를 사용하여 대상 지속 작용성 IL-15 R 효현제를 제조하였고, 여기서 효현제 제조에 사용된 PEG 시약의 중량 평균 분자량은 약 40,000 달톤이었다.

[0296] 2.7 ml의 IL-15(1.23 mg/ml, PBS 완충제 중, pH 7.4)를 소형 반응 바이알 내로 전달하고, 0.3 ml의 1M 아세트산나트륨 완충제(pH 5)를 첨가하여 pH를 pH 6으로 조정하였다. 질소 하에 -20℃에서 저장된 mPEG-ButyrALD, 40kDa를 상온으로 가온시켰다. 10배 과량(IL-15의 양에 대하여)의 mPEG-ButyrALD를 MilliQ H2O 중에 용해시켜 10% 시약 용액을 형성하였다. 10% 시약 용액을 빠르게 IL-15 용액에 첨가하고 잘 혼합하고, RotoMixer 상에 15 분 동안 셋팅하였다. 이어서, 1/100 부피의 1 M NaCNBH3/H2O를 반응 혼합물에 첨가하였다. 2급 아민 연결을 통한 IL-15에 대한 mPEG-ButyrALD의 커플링을 가능하게 하기 위해, 반응 용액을 4℃에서 17시간 동안 RotoMixer 상에 배치하고, 이어서 글리신 용액으로 켄칭시켰다. 폐길화 반응을 산성 pH에서 수행하였기 때문에, IL-15에 대한 PEG 유도체의 결합은 N 말단에 대해 보다 선택적이었다. Q 세파로즈 고성능 컬럼 및 인산나트륨 완충제를 사용한 음이온-교환 크로마토그래피 방법을 또한 진행하여 컨쥬게이트를 정제하였다. 정제된 모노-mPEG-ButyrALD-40K-IL-15 컨쥬게이트를 HPLC 및 SDS-PAGE에 의해 특성화하였다.

[0297] 실시예의 나머지 부분에서, 모노-mPEG-ButryALD-40k-IL-15는 컨쥬게이트 5로서 언급될 것이다.

[0298] 실시예 5

[0299] IL-15R α에 대한 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 수용체 바이어스 평가

[0300] IL-15 α 수용체에 대한 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(시험 물품)의 친화력을 측정하고 IL-15와 비교하였다. 친화력은 고정화된 항-Fc에 의해 포획된 IL-15R α:Fc를 사용하여 BIAcore에 의해 측정하였다.

[0301] 시험 물품을 PBS(0.05% Tween 20 및 0.1 mg/ml BSA 함유) 중에서 10 μM로 희석하였다. 일련의 3배 희석액을 제조하고, IL-15R α로 코팅된 센서 칩 상에 주입하였다. k_a 및 k_d 속도를 별도로 구함으로써 친화력을 측정하고, k_d 와 k_a 사이의 비율을 사용하여 K_d 값을 계산하였다.

[0302] 바람직한 컨쥬게이트는, 일반적으로, 비개질된 IL-15에 비해 폐길화 후 IL-15 R α 친화력을 가능한 한 많이 보유하는 것들이다. 달리 언급하면, 바람직한 컨쥬게이트는, 일반적으로, IL-15 R α에 대한 친화력이 비개질된 IL-15의 경우로부터 가장 적게 감소하는 것들이다.

[0303] 예를 들어, 일부 구현예에서, 바람직한 컨쥬게이트는 IL-15에 비해 약 7배 이하의 EC50 값(ng/mL, CTLL-2 pSTAT5)의 감소, 및 약 50% 이하의 수용체 알파 결합(K_D , pM)의 감소를 나타낸다. 예를 들어, 컨쥬게이트 1은 IL-15와 비교시 효능의 약 2배 감소를 갖고, IL-15의 알파 수용체 친화력의 약 80%를 보유한다.

[0304] [표 2A]

시험 물품	$k_a(M^{-1}sec^{-1})$	$K_d(sec^{-1})$	$K_D(pM)$
IL-15	5.78×10^5	1.49×10^{-4}	258
컨쥬게이트 1	4.92×10^5	1.03×10^{-4}	209

[0305]

[0306] 상기 표에 나타난 바와 같이, 컨쥬게이트 1은, 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제에 있어 특히 바람직한 특징인, IL-15 α 수용체에 대한 그의 높은 친화력(즉, IL-15와 비교시)을 보유한다. 친화력 상수(K_D)(pM 단위)를 하기 에 추가의 컨쥬게이트에 대하여 제공한다.

[0307] [표 2B] 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 추가의 특징

시험 물품	EC50(ng/mL) CTLL-2 pSTAT5	IL-15R α K _D (pM)	PK(MRT), h
IL-15	0.27	258	
컨쥬게이트 1	0.62	201/209	21
컨쥬게이트 3	16.80	411	30
컨쥬게이트 4	6.21	215	
컨쥬게이트 5	1.45	144	25

[0308]

[0309] 실시예 6

[0310] 생체내 연구: 마우스에서의 단일 용량 PK 연구

[0311] C57BL/6 마우스(n=3/그룹)에 0.3 mg/kg으로 IL-15(대조군)의 단일 정맥내 용량을, 또는 0.3 mg/kg의 용량으로 컨쥬게이트 2를 투여하였다. 투여 후, 혈액 샘플을 투여 후 다양한 시점(24시간, 48시간, 78시간, 96시간)에 수집하였다. 샘플을 모으고, 유동 세포계측법에 의해 림프구 세포 집단에 대한 약물 작용의 약역학적 분석을 위해 평가하고, 이를 비히클 대조군에 대한 배수 변화로서 나타내었다(결과는 하기 이후 실시예에 기재됨). 세포 수 변화에 추가로, 기능적 마커 및 활성의 마커를 정량화하였다. 마지막으로, 각각의 시점에, 약물의 혈장 농도를 측정하였다. 도 6 참조.

[0312] 도 6에 나타난 바와 같이, 투여 후 비-지속 작용성 IL-15에 대해 관찰된 혈장 수준에서의 빠른 강하와 달리(채워진 원), 컨쥬게이트 2는 연장된 기간에 걸쳐, 예를 들어 1주 초과 동안 혈장 중에서 측정가능한 농도를 유지하였으며(채워진 정사각형), 이는 약 20~30시간의 T_{1/2}을 가졌다.

[0313] 실시예 7

[0314] 생체내 연구: 래트에서의 단일 용량 PK 연구

[0315] 래트(n=3/그룹)에 0.3, 0.15 및 0.075 mg/kg의 투여량으로 컨쥬게이트 2의 단일 정맥내 용량을, 또는 0.15 mg/kg으로 컨쥬게이트 2의 단일 피하 용량을 투여하였다. 투여 후, 혈액을 투여 후 1~7일차에 수집하였다(다중 샘플을 투여 후 최초 24시간에 걸쳐 수집함). 각 시점에, 약물의 혈장 농도를 측정하였다. 도 7 참조.

[0316] 도 7에 나타난 바와 같이, 그리고 마우스에 대한 도 6에 나타난 결과와 유사하게, 컨쥬게이트 2의 투여는 약물 에 대해 지속적인, 그리고 용량-비례적인 노출을 제공하였다.

[0317] 실시예 8

[0318] 마우스에서의 생체내 IL-15 신호전달 연구

[0319] 마우스에 상기 실시예 6에 기재된 바와 같이 투여하여 생체내 신호전달을 STAT5 인산화 정도에 의해 평가하였다. 다양한 림프구(CD4, CD8, 및 NK 세포)에서의 STAT5 인산화의 정도를, pSTAT5 및 백혈구 표면 마커에 대한 전혈 염색 후 유동 세포계측법에 의한 측정에 의해 평가하였다. 결과를 각각 IL-15 및 컨쥬게이트 2에 대해 도 8a 및 8b에 나타내었다.

[0320] STAT5 인산화는 IL-15/IL-2 수용체 신호전달에서 조기 및 일시적 이벤트이다. 도 8a에서 보이는 바와 같이, 생체내 신호전달 활성은 IL-15에서는 극히 짧은 수명을 갖지만, 예시적 컨쥬게이트 2는, 가장 특히 NK 세포(뒤집힌 채워진 삼각형 ▼)에서, 또한 CD8 세포(정상적 채워진 삼각형 ▲)에서 지속적인 STAT5 인산화를 유도하고, 측정가능한 STAT5 인산화 활성이 72시간을 넘어 NK 및 CD8 세포에서 나타난다. CD4 세포에 대한 STAT5 인산화 활성을 또한 나타내었다(폐쇄 정사각형 ■).

[0321] 실시예 9

[0322] 비-인간 영장류에서의 생체내 IL-15 신호전달 연구

[0323] 연구에서, 시노물구스 원숭이(cyno), 암컷 1마리 및 수컷 1마리 각각에 컨쥬게이트 2의 단일 용량(0.5 mg/kg)을 정맥내로 투여하였다. 다양한 유형의 림프구(CD4, CD8, 및 NK 세포)에서의 STAT5 인산화의 유동 세포계측법에 의한 평가를 위해 치료 전(-6일차 및 -1일차) 및 치료 후 다수의 간격으로 각각의 동물로부터 일련의 혈액 샘플을 취하였다. 결과를 도 9a(CD4), 9b(CD8), 및 9c(NK)에 제공하였다.

[0324] 도 9a~9c에 나타난 바와 같이, 결과는 마우스에서 나타난 것들(실시예 7)과 유사하지만, 비-인간 영장류에서, STAT5 인산화는 CD4 세포에서도 나타났다(도 9a). 세 가지 세포 유형 각각에서 STAT5 인산화는 투여 후에 상당히 상승하고, 예시적 지속 작용성 IL-15 효현제의 투여 후 약 3 내지 4일차에 최대 수준에 도달하며 약 5~10일 차까지 d-1 수준(즉, 투여 전) 근처로 되돌아간다. 실시예 7과 유사하게, 이들 결과는 활성 IL-15 종의 지속적인 존재를 나타낸다.

[0325] 실시예 10

[0326] 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 NK 서브세트에서의 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 시험관내 IL-15 활성

[0327] 도 10a(CD56브라이트 세포) 및 10b(CD56dim 세포)에 나타난 바와 같이 인간 PBMC의 NK 세포 서브세트에서의 신호전달을 조사함으로써 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제(예: 컨쥬게이트 1, 3 및 5)의 시험관내 활성의 평가를 수행하였다. STAT5 인산화를 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 IL-15 신호전달 활성 평가에 대하여 앞서 기재된 바와 같이 평가하였다.

[0328] [표 3]

화합물	EC50(ng/ml) pSTAT5 CD56브라이트 NK
IL-15	0.4
컨쥬게이트 1	2.4
컨쥬게이트 3	69.76
컨쥬게이트 5	32.26

[0329]

[0330] 결과를 도 10a(CD56브라이트) 및 10b(CD56dim)에 나타내었다.

[0331] 볼 수 있는 바와 같이, 예시적 컨쥬게이트는 각각 huPBMC에서 IL-15 신호전달을 유도하며, 컨쥬게이트 1은 이러한 신호전달을 강력히 유도한다. 시험된 컨쥬게이트 중(모든 데이터를 나타내지는 않음), 컨쥬게이트 1은 huPBMC에 대하여 최고 효능/활성을 나타내었다. 데이터는, 동일한 폐길화도(즉, PEG 모이어티의 수) 및 IL-15 단백질 당 동일한 크기의 PEG 모이어티를 유지하는 경우에도, 상이한 PEG 아키텍처 및 링커가 생성된 컨쥬게이트에서 생물활성에 매우 상이한 효과를 이끌어낼 수 있음을 보여준다.

[0332] 컨쥬게이트 1 및 컨쥬게이트 5, IL-15에 대한 두 공여체(CD3, CD4, CD8, CD56(브라이트 및 dim) 및 CD4-Tregs(CD25+Foxp3+))로부터 얻어진 인간 PBMC의 pStat5 반응을 조사/비교하기 위해 제2 연구를 수행하였다. 0.001~10000 ng/ml의 용량 범위로 10배 희석 및 20분 자극을 사용하여 11-점 용량 반응을 검사하였다. 시험 물품 각각을 IL-15 완충제 + 0.1% BSA 중에서 희석하였다. 결과를 하기 표에 제공한다.

[0333] [표 4] CD3 및 CD4 세포에서의 %pSTAT5 및 pSTAT5 MFI

화합물	EC50(ng/ml)-%pSTAT5				EC50(ng/ml)-MFI			
	CD3		CD4		CD3		CD4	
	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2
IL-15	0.17	0.17	0.177	0.20	4.0	5.22	3.6	5.8
컨쥬게이트 1	0.75	1.1	0.75	0.83	22.1	108.8	23.54	106.5
컨쥬게이트 5	1.3	1.7	1.3	1.14	84.73	154.2	84.21	98.18

[0334]

[0335] 상기 표 3에서의 데이터에 기초하여, IL-15는 CD3 및 CD4 유도 둘 다에 대하여 컨쥬게이트 1에 비해 약 4~6배 더 강력한 것으로 나타나며; 컨쥬게이트 1 및 컨쥬게이트 5의 효능은 CD3 및 CD4 유도에 대하여 유사한 것으로 나타난다.

[0336] [표 5] CD4-Treg 및 CD8 세포에서의 %pSTAT5 및 pSTAT5 MFI

화합물	EC50(ng/ml)-%pSTAT5				EC50(ng/ml)-MFI			
	Treg		CD8		Treg		CD8	
	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2
IL-15	0.08	0.084	0.17	0.15	0.6	0.71	3.5	5.5
컨쥬게이트 1	0.23	0.37	0.76	1.54	2.5	2.9	16.73	99.76
컨쥬게이트 5	0.44	0.45	1.4	2.5	3.5	5.4	53.7	204.6

[0337]

[0338] 상기 표 5에서의 데이터에 기초하여, IL-15는 Treg 및 CD8 유도에 대하여 컨쥬게이트 1에 비해 대략 3~5배 더 강력한 것으로 나타나고; 컨쥬게이트 1 및 5의 효능은 CD4 및 CD8 유도에 대하여 실질적으로 유사한 것으로 나타난다.

[0339] [표 6] CD56브라이트 및 CD56dim 세포에서의 %pSTAT5 및 pSTAT5 MFI

화합물	EC50(ng/ml)-%pSTAT5				EC50(ng/ml)-MFI			
	CD56브라이트		CD56dim		CD56브라이트		CD56dim	
	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2	공여체1	공여체2
IL-15	0.11	0.19	0.26	0.54	0.49	0.96	1.4	3.7
컨쥬게이트 1	1.4	1.9	2.9	5.9	7.8	12.4	23.25	73.05
컨쥬게이트 5	5.1	4.5	16.48	27.12	24.86	56.9	97.51	283.4

[0340]

[0341] 상기 표 6에서의 데이터에 기초하여, IL-15는 CD56 유도에 대하여 컨쥬게이트 1에 비해 약 10배 더 강력한 것으로 나타난다. 그러나, 컨쥬게이트 1은 CD56 브라이트 및 CD56dim 유도에 있어 컨쥬게이트 5에 비해 더 강력한 것으로 나타난다.

[0342] 이전 데이터에 기초하여, IL-15, 컨쥬게이트 1 및 컨쥬게이트 5는 모든 세포 집단에 대하여 유사한 pSTAT5 유도를 나타내었고, 최대 반응은 CD56브라이트 및 Treg 세포에 대하여 더 높은 것으로 나타난다.

[0343] [표 7] 요약 표

화합물	EC50(ng/ml)-%pSTAT5					
	CD3	CD4	Treg	CD8	CD56브라이트	CD56dim
IL-15	0.17	0.177	0.08	0.17	0.11	0.26
컨쥬게이트 1	0.75	0.75	0.23	0.76	1.4	2.9
컨쥬게이트 5	1.3	1.3	0.44	1.4	5.1	16.48

[0344]

[0345] 상기 데이터에 기초하여, IL-15는 CD3, CD4, CD8 및 Treg 세포 유도에 있어 컨쥬게이트 1에 비해 대략 3~4배 더 강력하고 컨쥬게이트 5에 비해 대략 5~8배 더 강력하며, IL-15는 CD56브라이트 및 CD56dim 세포 유도에 있어 컨쥬게이트 1에 비해 대략 12배 더 강력하고 컨쥬게이트 5에 비해 대략 40~60배 더 강력하며, 이는 컨쥬게이트 1의 특정한 예상치 못한 특히 유리한 특징을 가리킨다.

[0346] 실시예 11

[0347] 생체내 연구: 마우스에서의 단일-용량 PD 연구 - 세포 증식 및 활성화

[0348] Balb/c 마우스(n=3/그룹)에 단일 정맥내 용량으로 비히클(50mM 인산나트륨, 100mM 염화나트륨, 10% 수크로스, pH 7.4) 또는 0.03 mg/kg(도 11, 저용량), 0.3 mg/kg(도 11, 중간 용량) 또는 1 mg/kg(도 11, 고용량)의 용량으로 컨쥬게이트 1을 투여하였다. 투여 후, 혈액 샘플을 투여 후 다양한 시점(24시간, 48시간, 78시간, 96시간, 120시간)에 수집하였다. 각각의 마우스로부터의 샘플을 유동 세포계측법에 의해 림프구 세포 집단에 대한 약물 작용의 약역학적 분석에 적용하였다. 세포 수 변화에 추가로, 기능적 마커 및 활성의 마커를 검사하였다.

[0349] 컨쥬게이트 1의 추가 투여를 0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 및 1.5 mg/kg의 용량으로 수행하였다.

[0350] 컨쥬게이트 1이 0.03 mg/kg(도 11, 저용량), 0.3 mg/kg(도 11, 중간 용량), 및 1 mg/kg(도 11, 고용량) 각각으로 투여된 마우스에서의 NK 세포의 증식을 나타내는 결과를 도 11a 및 11b에 제공하였다.

[0351] NK 세포 및 이들의 증식이 CD45+CD3-CD49b+ 및 CD45+CD3-CD49b+Ki67+ 마커 조합을 사용하여 정의되었다. 투여 후, 혈액 샘플을 FACS DIVA 소프트웨어로 진행되는 Fortessa 유동 세포계측기 상에서 얻었다. Flowjo 소프트웨어를 분석에 사용하였고, NK 세포 절대 값 및 NK 세포 내에서의 Ki67% 양성을 Prism을 사용하여 플롯팅하였다.

[0352] 도 11a는 시간 경과에 따른 Ki67 발현(백분율로서)의 플롯이며; 도 11b는 시간 경과에 따른 NK 세포 수를 제공한다. 플롯은 컨쥬게이트 1이 마우스에서 지속적인 NK 세포 증식을 유도하는 능력을 나타낸다.

[0353] 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제의 효과를 모든 성숙 수준의 NK 세포 상에서 탐구하였다. 말초 NK 세포 풀은 CD27의 발현에 의해 기술될 수 있으며, CD27^{lo/-} NK 세포는 CD27^{high} NK 세포에 비해 더 세포독성이고 더 많은 시토카인을 생성한다(Hayakawa Y, et al., *J Immunol.* 2006; 176:1517-1524). 성숙 말초 NK 세포 집단은 4 단계의 성숙으로 추가로 세분화되고, CD11b 발현의 순차적 상향조절 후 CD27의 하향조절에 의해 정의되었으며, 가장 미성숙된 NK 세포는 CD27⁻CD11b⁻이고, 가장 성숙된 NK 세포는 CD27⁻CD11b⁺이다(Chiossone L., et al., *Blood*, 2009; 113:5488-5496).

[0354] 마우스에서, NK 세포의 4개의 상이한 성숙 상태가 CD27 및 CD11b 발현에 의해 정의된다. NK 마커(CD49b+), 자연 활성화 NK 수용체(NKp46+) 및 IL-15/IL-2RB(CD122+) 삼중 양성 세포가 규명되었고, 미성숙(CD11b-CD27-), 조기(CD11b-CD27+), 고 이펙터(CD11b+CD27+) 및 말단 이펙터(CD11b+CD27-) NK 세포를 유동 세포계측법에 의해 정량화하였다.

[0355] 다양한 성숙 상태의 NK 세포를, 단일 투여를 수용한 마우스에서, 또는 q7dx3 스케줄의 제3 용량 후, 상기에 기재된 바와 같은 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 및 1.5 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1에 대하여 정량화하였다. 유동 세포계측법을 사용하여, 관심 NK 집단을 CD49b, NKp46 및 CD122 양성에 의해 규명하였다. 이어서, CD11b 및 CD27을 사용하여 미성숙(CD11b-CD27-), 조기 NK(CD11b- CD27+), 고 이펙터(CD11b+CD27+) 및 말단 이펙터(CD11b+CD27-) 부분집단에서의 NK 집단에서 추가로 분화하였다. 말초 혈액을 Fortessa 유동 세포계측기 상에서 진행시키고, BD FACS DIVA 소프트웨어를 사용하여 샘플 획득 동안 비드 카운팅을 사용하여 각각의 집단에 대한 절대 값을 측정하였다. Flowjo 소프트웨어를 사용하여 유동 세포계측 분석을 수행하고, 데이터를 Prism에서 플

못팅하였다.

- [0356] 결과를 도 12a~12d에 나타내었다. 추가의 결과를 도 22a~22d에 나타내었다. q7dx3 결과를 도 28a~28d에 나타내었다. 플롯으로부터 볼 수 있는 바와 같이, 컨쥬게이트 1은 모든 성숙 수준의 NK 세포(말단 이펙터 세포, 전-NK 세포, 고 이펙터 세포 및 조기 NK 세포)의 수를 증가시키기에 효과적이었다. 모든 성숙 부분-집단에서의 NK 세포의 용량-의존적 증가가 나타났고, 효과는 적어도 120시간 동안 지속되었다.
- [0357] NK 세포에서 평균 형광 강도(MFI)로서 나타나는 항-NKG2D 신호의 유동 세포계측 분석을 사용하여 NKG2D의 표면 발현을 수행하였다. 유사하게, 또한 NK 세포에서 MFI로서 나타나는, 항-그랜자임 B tlsgh의 유동 세포계측법-기반 검출을 사용하여 세포내 그랜자임 B의 수준을 수행하였다. Fortessa 유동 세포계측기 및 FACS Diva 소프트웨어를 사용한 NKG2D 및 그랜자임 B 신호의 검출 후, Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석을 수행하였다. Prism을 사용하여 MFI 값을 플롯팅하였다. 결과를 도 13a 및 13b에 나타내었고, 이는 추가로, 가장 특히 중간 및 높은 투여량에서, 비히클에 비해 NK 세포에 의한 NKG2D 및 그랜자임 B(전-세포자멸(pro-apoptotic) 세린 프로테아제) 발현 둘 다에서의 지속적인 증가를 달성하는 그의 능력에 의해 입증되는 바와 같이 컨쥬게이트 1이 NK 세포 활성화를 증가시키는 능력을 나타낸다. 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 두 NK 활성화 마커에서의 용량-의존적 증가가 나타났다.
- [0358] 마우스에서, CD8 T 세포는 CD45+CD3+CD4-CD8+로서 정의되었다. 마우스로부터의 혈액 및 비장을 Fortessa 유동 세포계측기를 사용한 면역표현형검사(immunophenotyping)에 적용하고 Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 도 14(혈액) 및 도 24(비장)에 나타난 바와 같이 절대 CD8 세포 수를 Prism에서 플롯팅하였다. 도 14 및 도 24는, 컨쥬게이트 1이 상기에 기재된 투여량 각각으로의 마우스에서의 단일 i.v. 투여 후 CD8 T-세포의 증식 및 지속적인 수 증가를 유도하는 능력을 나타낸다. 영향은 중간(0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg) 및 높은(1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg) 투여량에서 가장 주목할 만하다.
- [0359] 마우스에서, CD8 이펙터 기억(Tem) 및 CD8 중심 기억(Tcm) T 세포는 CD45+CD3+CD4-CD8+CD44+CD62- 및 CD45+CD3+CD4-CD8+CD44+CD62L+로서 규명되었다. Ki-67 양성을 사용하여 이들 기억 집단의 증식을 수행하였다. 컨쥬게이트 1 또는 IL-15의 단일 용량 후, 혈액 및 비장을, Fortessa 유동 세포계측기, DIVA 획득 소프트웨어 및 Flowjo 분석 소프트웨어를 사용한 면역표현형검사에 적용하였다. 그래프를 Prism에서 플롯팅하였다. 컨쥬게이트 1은 이펙터 및 중심 기억 CD8 T 세포 둘 다에서 용량-의존적 증가를 유도하는 반면, 단일 용량 IL-15는 그렇지 않다(혈액에 대하여 도 15a 및 15b에 나타냄). 컨쥬게이트 1은 Ki67 및 그랜자임 B 둘 다에서 용량-의존적 증가를 유도하는 반면, 단일 용량 IL-15는 그렇지 않다(비장에 대하여 도 25 및 26에 나타냄). 이펙터 및 중심 기억 집단 둘 다 예시적 지속 작용성 IL-15 효현제인 컨쥬게이트 1의 투여에 반응하여 증식한다.
- [0360] **실시예 12**
- [0361] **생체내 연구: 비-인간 영장류에서의 단일-용량 PD 연구**
- [0362] 연구에서, 시노물구스 원숭이, 암컷 1마리 및 수컷 1마리에 컨쥬게이트 2를 500 µg/kg으로 정맥내로 투여하였다. 림프구 세포 수(NK 세포, CD8 T-세포 등) 및 활성화의 유동 세포계측법에 의한 평가를 위해 치료 전(-6일차 및 -1일차) 및 단일 용량 치료 후 다수의 간격으로 각각의 동물로부터 일련의 혈액 샘플을 취하였다.
- [0363] NK 세포 수를 측정하여, 예시적 컨쥬게이트 2가 비-인간 영장류에서 지속적인 NK 세포 증식을 유도하는 능력을 평가하였고; 결과를 도 16a 및 16b에 나타내었다. 시노물구스 원숭이로부터의 혈액에서 NK 세포 및 이들의 증식을 유동 세포계측법에 의해 규명하였다. BD FACS DIVA 소프트웨어를 사용하여 NK 세포(CD45+ CD3- CD16+) 및 이들의 증식 상태(CD45+CD3-CD16+ Ki67+)의 획득 및 분석을 수행하였다. 증식하는 NK 세포 및 NK 세포에 대한 절대 값을 사용하여 NK 집단 내에서의 %Ki67 양성을 계산하였다. Prism을 사용하여 치료 전 및 치료 후 값을 플롯팅하였다.
- [0364] 여기서 나타난 바와 같이, 컨쥬게이트 2의 단일 용량 투여는 비-인간 영장류에서 지속적인 NK 세포 증식을 유도하기에 효과적이었다.
- [0365] 또한, 투여 전 내지 투여 후 14일차에 각각의 동물에 대하여 도 17에 나타난 바와 같이 CD8 T 세포 수를 측정하였다. 구체적으로, CD8 T 세포는 CD45+CD3+CD4-CD8+로서 정의되었다. 원숭이로부터의 혈액을 또한 앞서 기재된 바와 같이 면역표현형검사에 적용하였다. 원숭이에서, CD8 T 세포는 지속적인 방식으로 증가하였고, 효과는 적어도 10일 동안 지속되었다. 이 플롯은 추가로, 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제, 컨쥬게이트 2가 투여 후 CD8 T-세포의 증식 및 지속적인 수 증가를 유도하는 능력을 예시한다.

- [0366] 원숭이에서, CD8 T_{EM} 세포는 CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra~cD197-로서 정의되었고, CD8 T_{CM}은 CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra~cD197+로서 정의되었다. DIVA 소프트웨어 상의 샘플 획득 및 Flowjo 소프트웨어 상의 데이터 분석을 사용하여 유동 세포계측법에 의해 면역표현형검사를 수행하였다. Prism을 사용하여 그래프를 플롯팅하였다. 각각 도 18a 및 18b에 나타난 바와 같이 투여 전 내지 투여 후 14일차에 각각의 동물에 대하여 CD8 T 이펙터 기억 세포(T_{EM} 세포) 및 CD8 T 중심 기억 세포(T_{CM}) 카운트를 측정하였다. 컨쥬게이트 2는 시노물구스 원숭이에서 CD8 이펙터 및 중심 기억 T 세포 집단에서의 현저하고 지속적인 증가를 유도한다. 도면은, CD8 이펙터 및 중심 기억 T 세포 집단 둘 다 예시적 컨쥬게이트 2에 반응하여 증식함을 나타낸다.
- [0367] 실시예 13
- [0368] BALB/C 마우스에서 CT26-유도된 폐하 폐 전이종양 모델에서의 항종양 활성의 평가
- [0369] 0일차에, 6~8주령 암컷 Balb/c 마우스에 꼬리 정맥 주사에 의해 1×10^5 마우스 CT-26 세포를 접종하였다. 1일차에, CT-26 세포 투여 24 h 후, 마우스를 10개 그룹으로 분할하였다. 각각의 그룹은 6~9마리의 동물(컨쥬게이트 2에 대해) 또는 9~12마리의 동물(컨쥬게이트 1에 대해)로 구성되었다. (컨쥬게이트 1 및 컨쥬게이트 2의 투여에 대하여 두 가지 별도의 연구를 수행하였지만, 연구 프로토콜은 두 연구 모두에서 본질적으로 동일하였음). 각각의 그룹은 하기와 같은 개입에 배정되었다: 비히클, 인산염 완충 식염수(그룹 A); 네이티브 IL-15 단독(그룹 B); 0.03 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 C); 0.1 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 D); 0.3 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 E); 1.0 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 F); 3.0 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 2(그룹 G); 컨쥬게이트 1에 대하여: 비히클, 인산염 완충 식염수(그룹 H); 0.03 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1(그룹 I) 및 0.3 mg/kg의 용량으로의 컨쥬게이트 1(그룹 J). 동물에게 1, 5, 및 10일차에 투여하였다.
- [0370] CT-26 종양 세포 투여일로부터 13일 후, 마우스를 마취시키고, 면역표현형 마커의 추가 분석을 위해 혈액 및 비장 세포를 수집하면서, 폐를 피크르산 및 포르말데히드를 함유하는 Bouins 용액 중에 24~48 h 동안 고정시켰다.
- [0371] 각각의 폐마다 절개 하에 폐 종양 결절의 수를 카운팅하고, 각각의 그룹에 대한 폐 결절의 평균을 측정하였다. 언페어드 스튜던츠 t 시험(unpaired students t test)을 사용하여 비히클 그룹 vs 개입 그룹 사이의 통계적 유의성을 또한 얻었다.
- [0372] 폐 전이 결과를 각각 컨쥬게이트 2 및 컨쥬게이트 1에 상응하는 치료 그룹에 대하여 도 19 및 20에 나타내었다. 두 예시적 지속 작용성 IL-15 수용체 효현제 모두 폐 전이의 감소 촉진에 있어 효과적이었지만, 컨쥬게이트 2는 비히클에 비해 65%의 전이 감소를 제공하였으며, 컨쥬게이트 1은 85%의 전이 감소를 제공하였다.
- [0373] 혈액 및 비장세포를 유동 세포계측법을 사용한 면역표현형 마커 및 다양한 형광색소와 컨쥬게이션된 마커 항체에서의 변화에 대하여 13일차에 분석하였다. 0.3, 1, 및 3 mg/kg으로 투여된 컨쥬게이트 2는 각각 혈액에서 비히클에 비해 1.5, 2.5, 및 3.3배의 CD8 T 세포의 용량-의존적 증가를 유도하였다. 비장에서도, 비히클에 비해 0.3, 1, 및 3 mg/kg 용량 수준에서 1.3, 1.7, 및 2.2배의 증가로 유사하게 나타났다. Ki-67 면역표현형검사는, 비히클에 비해 동일한 저, 중간, 및 고용량 수준에서, 혈액에서는 1.7, 4.6, 및 5.3배 변화 및 비장에서는 2.5, 5.7, 및 6.9배 변화로 CD8 T 세포 증식의 현저한 용량-의존적 증가를 드러내었다. 추가로, 컨쥬게이트 2 치료는 혈액 및 비장 둘 다에서 CD8에서의 전-생존 Bcl-2+ MFI를 1.5배만큼 증가시켰다.

[0374] [표 8]

그룹	시험 물품	용량 (mg/kg)	스케줄	경로	동물 수
A	비히클 대조군		1회	i.v.	6
B	IL-15	0.3	1, 5 및 10일차	i.v.	9
C	컨쥬게이트 2	0.03	1, 5 및 10일차	i.v.	8
D	컨쥬게이트 2	0.1	1, 5 및 10일차	i.v.	8
E	컨쥬게이트 2	0.3	1, 5 및 10일차	i.v.	9
F	컨쥬게이트 2	1.0	1, 5 및 10일차	i.v.	9
G	컨쥬게이트 2	3.0	1, 5 및 10일차	i.v.	9
H	비히클 대조군		1회	i.v.	9
I	컨쥬게이트 1	0.03	1, 5 및 10일차	i.v.	12
J	컨쥬게이트 1	0.3	1 및 5일차(단지 2 용량)	i.v.	9

[0375]

[0376] 실시예 14

[0377] 컨쥬게이트 1로의 치료 후 NK 세포의 시험관내 및 생체내 세포독성

[0378] 유동 세포계측법-기반 검정을 사용하여 시험관내에서 표적 종양 세포에 대한 NK 세포-매개 세포독성을 평가하였다. 음성-선택 자성 세포 분리(마우스 NK 세포 풍부화 키트, Stemcell Technologies)를 사용하여 Balb/c 마우스의 비장으로부터 NK 세포를 분리하고, 이펙터 세포로서 사용하였다. 시험관내 연구를 위해, 분리된 NK 세포를 세포독성 검정에서의 사용 전에 37°C, 5% CO₂에서 습윤화된 인큐베이터 내에서 밤새 3000, 1000, 300, 30, 3, 또는 0(비자극) ng/mL의 농도의 컨쥬게이트 1로 자극하였다. 생체내 연구를 위해, 마우스에 0.3 mg/kg 컨쥬게이트 1를 투여하고, 비장 NK 세포를 투여 후 24, 48, 및 72 h에 분리하고, 세포독성 검정에서 직접 사용하였다.

[0379] PKH26으로 표지된 YAC-1 T-세포를 표적 세포로서 사용하였다. NK 세포 세포독성을 모니터링하기 위해, NK 및 YAC-1 세포를 다양한 이펙터:표적 비율(50:1, 25:1, 및 12.5:1)로 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 공동-배양하고, 이어서 7-AAD로 10분 동안 염색하여 사망 세포를 표지하였다. 유동 세포계측법을 사용하여 세포를 즉시 분석하였다. 용균된 표적 세포를 PKH26⁺7-AAD⁺로서 규명하였다.

[0380] 시험관내 결과: 4시간 동안 공동-배양 후, 유동 세포계측법에 의해 세포독성을 평가하였다. 결과를 도 21에 제공하였다.

[0381] 생체내 결과: 0.3 mg/kg으로의 치료 후, 24시간, 48시간, 및 72시간 후에 세포독성을 평가하였다. 결과를 도 27에 제공하였다.

[0382] 이 데이터는, 컨쥬게이트 1로의 치료 후 시험관내 및 생체내에서의 NK 세포의 용량-의존적 증가된 세포독성을 나타낸다.

[0383] 실시예 15

[0384] 컨쥬게이트 1에 의한 그랜자임 B의 유도

[0385] 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 및 1.5 mg/kg의 용량으로 컨쥬게이트 1로의 치료 후

시간의 함수로서의 NK-세포 그랜자임 B 발현을 측정하였다. 면역표현형검사를 위해 투여 후 24 내지 240시간에 전혈을 수집하였다. 적혈구가 용균되면, 백혈구를 CD45, CD3 및 CD49b에 대해 특이적인 생존력 염료 및 마커로 표지하여 살아있는 NK 세포를 규명하였다. 이어서, 세포를 동시에 고정시키고 세포내 그랜자임 B 염색을 위해 침투화하였다. 염색된 혈액을 Fortessa 유동 세포계측기 상에서 진행시키고, DIVA 소프트웨어에 의해 획득하고, Flowjo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 데이터를 그랜자임 B 발현에 대해 양성인 NK 세포의 퍼센트로서 나타내었다.

[0386] 결과를 도 23에 제공하였다. 이 데이터는 컨쥬게이트 1로의 치료가 NK-세포 그랜자임 B 발현을 증가시킴을 나타낸다.

[0387] **실시예 16**

[0388] **생체내 연구: 마우스에서의 단일 용량 IL-15 및 컨쥬게이트 1 PK 및 JAK/STAT 신호전달 연구**

[0389] PK 분석을 위해, balb/c 마우스(n=3)에서 컨쥬게이트 1을 0.3 mg/kg으로 단일 정맥내 용량으로서 투여하였다. 투여 후, 마우스를 인도적으로 희생시키고, 치료 후 24, 48, 72, 96, 120 및 144시간에 혈장을 수집하였다. 별도의 연구로부터, 마우스에 IL-15의 단일 정맥내 용량(0.5 mg/kg)을 투여하였다. 이들 마우스로부터의 샘플을 치료 6시간 내에 지시된 시점에 수집하였다. [PK 방법은 본원에서 이전에 기재됨]. 약역학적 검사를 위해, balb/c 마우스(n=그룹)에 0.03 또는 0.3 mg/kg의 컨쥬게이트 1 또는 비히클(50mM 인산나트륨, 100mM 염화나트륨, 10% 수크로스, pH 7.4)을 i.v. 주사하고, 투여 전 및 치료 후 15분, 1, 24, 48, 72, 96 및 120시간에 혈액을 수집하였다. 샘플을 유동 세포계측법에 의해 개별적으로 분석하고, CD8 및 NK 세포 내에서의 pSTAT5 퍼센트 양성으로서 나타내었다.

[0390] 도 29a는 각각 0.5 및 0.3 mg/kg으로의 balb/c 마우스에서의 시험 물품(IL-15 또는 컨쥬게이트 1)의 단일 정맥내 용량의 투여 후 144시간 시간 과정 동안 시험 물품의 혈장 농도의 플롯이다.

[0391] 결과: 컨쥬게이트 1은 대략 12시간의 반감기를 나타내는 반면, IL-15는 1시간 미만의 반감기로 혈장으로부터 빠르게 청소된다.

[0392] 도 29b는 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 주사 후 마우스에서의 CD8 T 세포 내에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 그래프이다.

[0393] 결과: 컨쥬게이트 1은 두 용량 수준 모두에서 CD8 T 세포에서의 지속적인 pSTAT5 신호전달을 유도한다. 투여 전을 포함한 120-시간 시간 과정을 나타내었다.

[0394] 도 29c는 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 주사 후 무린 NK 세포 내에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 그래프이다.

[0395] 결과: 컨쥬게이트 1은 두 용량 수준 모두에서 NK 세포에서의 강력하고 지속적인 pSTAT5 신호전달을 유도한다.

[0396] **실시예 17**

[0397] **마우스에서의 생체내 단일 및 Q7DX3 약역학적 연구 - 세포 수 및 증식**

[0398] Balb/c 마우스(n=3/그룹)에 단일 용량 또는 매주 용량(3회)으로, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 또는 1.5 mg/kg의 컨쥬게이트 1 또는 비히클을 투여하였다. 마우스를 희생시키고, 투여 후 다양한 시점(24, 48, 72, 96, 120, 144, 240시간)에 혈액을 수집하였다. 각각의 마우스로부터의 샘플을 유동 세포계측 분석에 적용하여 림프구 집단 및 관심 기능적 마커 내에서의 약역학적 효과(CD8 T 세포, CD8 기억 T 세포 및 NK 세포의 세포 수 및 각각의 집단 내에서의 Ki-67의 퍼센트 양성)를 검사하였다. 결과를 도 30a~30f, 31a~31c, 및 32a~32c에 나타내었다.

[0399] 도 30a~30c는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 또는 1.5 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일 투여 후, 각각 총 CD8, CD8 중심 기억(Tcm) 및 CD8 이펙터 기억(Tem) 세포 수의 플롯이다. 실시예 17에 기재된 바와 같이 컨쥬게이트 1은 0.03 이상의 용량 수준에서 혈액에서의 총 CD8 T 세포의 현저한 증가를 유도한다. 0.01 mg/kg의 최저 용량은 CD8 Tcm 및 CD8 Tem을 증가시켰다. 0.3 mg/kg에서, 컨쥬게이트 1은 6.4X, 37.9X 및 14.5X만큼 CD8, CD8 Tcm 및 CD8 Tem을 증가시켰다. 특히, 컨쥬게이트 1이 0.3~1.5 mg/kg으로 투여된 경우 CD8 및 CD8 기억 T 세포 수는 주사 후 240시간에 기준선으로 되돌아가지 않았고, 이는 컨쥬게이트 1의 지속적인 PD 효과를 입증한다.

[0400] 도 30d, 30e 및 30f는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 마우스에서의, 각각 총 CD8, CD8 Tcm 및 CD8 Tem 집단

내에서의 Ki-67 퍼센트 양성의 플롯이다. 컨쥬게이트 1의 단일 용량은, 모든 용량 수준에서, 모든 CD8 및 CD8 부분집단에서의 Ki-67 양성을 증가시킨다.

[0401] 도 31a, 31b 및 31c는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.03 및 0.3 mg/kg으로 컨쥬게이트 1을 단일(점선) 또는 Q7dx3(실선) 투여한 후 CD8 및 CD8 기억 부분집단 T 세포 수의 플롯이다. 반복 투여는 이들 집단을 더욱 증가시켰으며, CD8, CD8 Tcm, CD8 Tem은 각각 35.3X, 183X 및 73.8X만큼 증가하였다. 시간 과정 종료시(0.3 mg/kg으로의 최초 또는 최종 투여 후 240시간), 세포 수는 마우스에서 기준선으로 되돌아가지 않았다.

[0402] 도 32a 및 32b는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.01 내지 1.5 mg/kg의 컨쥬게이트 1의 단일 투여 후 NK 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성의 플롯이다. NK 세포 수는 모든 용량 수준에서 비히클 대조군 초과로 현저히 증가하고, 투여 후 240시간까지 다시 되돌아간다. 모든 용량 수준이 NK 세포에서 Ki-67 퍼센트 양성의 강력한 증가를 유도한다.

[0403] 도 32c는, 실시예 17에 기재된 바와 같은, 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 단일(실선) 또는 Q7dx3(파선) 투여 후 뮤린 NK 세포 수의 플롯이다. 0.3 mg/kg으로의 컨쥬게이트 1의 반복 투여는 단일 투여에 비해 여전히 현저하지만 약간 적은 NK 세포 수를 유도하였다. 0.03 mg/kg으로의 반복 투여에 대하여 단일 투여에서 유사한 NK 수가 달성되었다.

[0404] 결과: 컨쥬게이트 1은 0.03 이상의 용량 수준에서 혈액에서의 총 CD8 T 세포의 현저한 증가를 유도한다. 0.01 mg/kg의 최저 용량은 CD8 Tcm(중심 기억) 및 CD8 Tem(이펙터 기억)을 증가시켰다. 0.3 mg/kg에서, 컨쥬게이트 1은 각각 6.4X, 37.9X 및 14.5X만큼 CD8, CD8 Tcm 및 CD8 Tem을 증가시켰다. 특히, 컨쥬게이트 1이 0.3~1.5 mg/kg으로 투여된 경우 CD8 및 CD8 기억 T 세포 수는 주사 후 240시간에 기준선으로 되돌아가지 않았고, 이는 컨쥬게이트 1의 유익한 지속적인 PD 효과를 입증한다.

[0405] **실시예 18**

[0406] **컨쥬게이트 1로 치료된 마우스에서의 시험관내 NK 세포독성의 측정 및 혈액 NK 세포 그랜자임 B 분석**

[0407] Balb/c 마우스(n=2/그룹)를 컨쥬게이트 1(0.006, 0.03 또는 0.3 mg/kg), IL-15(1 mg/kg) 또는 비히클 대조군으로 치료하였다. 치료 후, NK 세포 단리를 위해 비장을 24, 72, 및 96시간에 단리하였다. NK 세포를 자석-기반 음성-선택 방법에 의해 단리하고, 12.5:1, 25:1 및 50:1 NK(이펙터) 대 YAC-1(표적 세포) 비율(E:T)로 37C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션시켰다. YAC-1 표적 세포를 사전-표지하고, 이어서 NK 세포 인큐베이션 후 7AAD로 염색하였다. 용균된(7AAD+) 표적 세포(PKH26+)의 검출을 유동 세포계측법에 의해 수행하였다. 이들 마우스로부터의 혈액을 또한 동시에 수집하고, 그랜자임 B의 NK 세포 발현의 유동 세포계측 측정에 적용하였다. 결과를 도 33a 및 33b에 나타내었다.

[0408] 도 33a는 마우스에서의 시험 물품 치료 후 NK-매개 표적 세포 용균에서의 변화를 측정하는 시험관내 NK 세포독성 검정을 나타낸다. 0.006, 0.03 또는 0.3 mg/kg 컨쥬게이트 1 또는 1 mg/kg의 IL-15로 치료된 balb/c 마우스로부터 단리된 비장 NK 세포에 의한 YAC-1 세포의 퍼센트 특이적 용균의 지시된 시간에서의 시간 과정을 나타내었다. 비히클이 투여된 마우스로부터의 비장 NK 세포가 대조군으로서 제공되었다.

[0409] 결과: 0.3 mg/kg으로 투여된 컨쥬게이트 1은, 1 mg/kg으로의 IL-15의 단일 주사를 수용한 마우스로부터의 NK 세포에 비해 크기 및 지속기간에서 우수한 NK 세포독성의 상승을 유도하였다.

[0410] 도 33b는 도 33a에서의 NK 시험관내 세포독성 검정에 제공된 동일한 마우스로부터의 혈액 NK 세포에서의 그랜자임 B 퍼센트 양성의 그래프이다.

[0411] 결과: 0.03 및 0.3 mg/kg으로 투여된 컨쥬게이트 1은 NK 그랜자임 B 발현의 현저한 증가를 유도하였고, 강력하고 지속적인 상승이 0.3 mg/kg에서 나타났다.

[0412] **실시예 19**

[0413] **CT-26 폐 전이 모델에서의 컨쥬게이트 1 단일 작용제 효능**

[0414] Balb/c 마우스에 1×10^5 CT-26 결장직장 암종 세포를 꼬리 정맥 주사하였다. 다음 날, 마우스(n=9/그룹)를 매주 2회로 컨쥬게이트 1(0.03 또는 0.3 mg/kg) 또는 비히클 대조군으로 치료하였다. 제2 주사 후 5일차에, 마우스를 인도적으로 희생시키고, 폐 결절을 카운팅하였다. 결과를 도 34a 및 34b에 제공하였다.

[0415] 도 34a 및 34b는, 정맥내 CT-26 종양 세포 주사, 그 후 0.03 또는 0.3 mg/kg으로, 1주 간격으로 2회 투여된 컨

쥬게이트 1 치료를 수용한 balb/c 마우스에서의 퍼센트 폐 결절 억제를 나타낸다.

[0416] 결과: 0.03 및 0.3 mg/kg으로의 쥬게이트 1 주사는 각각 40% 및 80%만큼 폐 결절 형성을 억제하였다. 0.3 mg/kg으로 투여된 동일한 마우스가 생존 평가를 위해 종양 세포 주사 후 32일 동안 추적되었다. 쥬게이트 1로 의 치료는 비히클 대조군을 수용한 종양-주사 마우스에 비해 생존을 현저히 증가시켰다.

[0417] 실시예 20

[0418] CT-26 폐 전이 모델에서의 쥬게이트 2 효능의 NK 세포-의존성의 평가

[0419] CT-26 마우스(n=7~11/그룹)에 NK 세포 고갈을 위해 항-아시알로 GM1 또는 2개의 상이한 대조군(IgG 또는 PBS), 이어서 1×10^5 CT-26 종양 세포를 주사하였다. 이어서, 마우스를 종양 세포 주사 후 1, 5 및 10일차에 0.3 mg/kg 의 쥬게이트 2 또는 비히클 대조군으로 치료하였다. 최종 치료일 후 3일차에 마우스를 희생시키고 폐 결절을 카운팅하였다. 결과를 도 35에 나타내었다.

[0420] 도 35는, IgG 대조군(블루), PBS(오렌지), 또는 NK 세포의 항체-매개 고갈을 수용한 쥬게이트 2(올리브 그 린)로 치료된 CT-26-주사된 마우스에서의 퍼센트 폐 결절 억제를 나타내는 그래프이다. 데이터들, NK 세포 고갈 되지 않은, 그리고 비히클 대조군으로 치료된(블랙) CT-26-주사된 마우스에 대한 퍼센트 폐 결절 억제로서 나타 내었다. 이 종양 모델에서 쥬게이트 2 효능은, 마우스에 NK 세포가 없는 경우에 무효화되었다.

[0421] 실시예 21

[0422] 비-인간 영장류에서의 쥬게이트 1 단일 용량의 생체내 약역학적 연구

[0423] 이 연구에서, 시노몰구스 원숭이(cyno), 암컷 1마리 및 수컷 1마리 각각에 쥬게이트 1의 단일 용량(0.1 mg/kg)을 정맥내로 투여하였다. 14-일 시간 과정에 걸쳐 각각의 동물로부터 일련의 혈액 샘플을 취하고, 다양한 림프구의 유동 세포계측법 분석(CD8 T 세포, 총 CD8, CD8 중심 기억 T 세포(Tcm) 및 CD8 이펙터 기억 T 세포 (Tem) 내에서의 Ki-67 퍼센트 양성, NK 세포 및 NK 세포의 Ki-67 퍼센트 양성)에 적용하였다. 결과를 도 36a~36d 및 37a~37b에 제공하였다.

[0424] 도 36a 및 36b는, 0.1 mg/kg의 용량으로의 쥬게이트 1의 정맥내 투여 후 1마리의 수컷(점선) 및 1마리의 암컷 (실선) cyno의 증식의 척도로서의 CD8 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성에 대한 2주 시간 과정을 나타내는 플롯이 다. 볼 수 있는 바와 같이, 쥬게이트 1은 cyno에서 현저한 CD8 T 세포 증가를 유도하고, 단일 용량 후 7~10X 의 세포 수 증가를 갖는다.

[0425] 도 36c 및 36d는 쥬게이트 1의 단일 주사 후 cyno CD8 Tcm 및 CD8 Tem 세포 수의 증가를 나타낸다. CD8 Tcm 및 Tem 수는 각각 27~30X 및 21~33X 증가하였다.

[0426] 도 37a 및 37b는, 0.1 mg/kg으로의 쥬게이트 1의 단일 투여 후 cyno에서의 NK 세포 수 및 Ki-67 퍼센트 양성 의 그래프이다. NK 세포는 쥬게이트 1로 치료 후 9~10X 증가하였다.

[0427] 실시예 22

[0428] 인간 PBMC에서 CD8 및 CD56 브라이트 NK 세포에서의 IL-15 및 쥬게이트 1의 시험관내 활성의 비교

[0429] 인간 PBMC를 IL-15 또는 0.001~10000 ng/ml의 용량 범위의 쥬게이트 1로 치료한 후 NK 및 CD8 JAK/STAT 신호 전달을 조사함으로써 쥬게이트 1의 시험관내 활성의 평가를 수행하였다. STAT5 인산화를 앞서 기재된 바와 같 이 평가하였다.

[0430] [표 9]

화합물	EC50(mg/ml) - % pSTAT5	
	CD8	CD56 브라이트
IL-15	0.16	0.11
화합물 1	0.87	1.7

[0431]

[0432] 결과를 도 38a 및 38b에 제공하였고; 이들 도면은 인간 PBMC의 IL-15(●) 대 쥬게이트 1(■) 치료 및 후속되 는 CD8 및 CD56 브라이트 NK 세포에서의 pSTAT5 퍼센트 양성의 측정에 대한 EC50 곡선이다.

- [0433] 결과: 컨쥬게이트 1은 각각 관련 CD8 및 CD56 브라이트 NK 세포에서의 IL-15보다 5.5X 및 15X 덜 강력하다. 그러나, 중요하게, 컨쥬게이트 1은 종래의 IL-15와 동일한 최대 반응을 달성한다.
- [0434] **실시예 23**
- [0435] **생체내 연구: 마우스에서의 단일 용량 PK 연구**
- [0436] Balb/c 마우스(n=3/그룹)에 단일 정맥내 용량으로 IL-15(500ug/kg) 또는 10, 30, 100, 300 및 1000 μ g/kg의 컨쥬게이트 1을 투여하였다. 투여 후 지시된 시점(컨쥬게이트 1: 24, 48, 72, 96, 120, 144, 240시간; IL-15 대조군: 0.03, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 시간)에 혈액 샘플을 수집하고, 약물의 혈장 농도를 측정하였다. 도 39 참조.
- [0437] 도 39에 나타난 바와 같이, 컨쥬게이트 1은, 빠르게 청소된 비-지속 작용성 IL-15에 대해 나타난 혈장 수준에 비해, 대략 14시간의 반감기를 가지며 혈장 내에서 측정가능한 농도, 연장된 약동학을 나타내었다.
- [0438] **실시예 24**
- [0439] **생체내 연구: 래트에서의 단일 용량 PK 연구**
- [0440] 스프래그 돌리(Sprague Dawley) 래트(n=3)에 단일 정맥내 용량으로 컨쥬게이트 1을 10, 75 및 150 μ g/kg으로 투여하였다. 주사 후 지시된 시점(0.03, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144시간)에 약물의 혈장 농도를 측정하였다. 도 40 참조.
- [0441] 도 40에 나타난 바와 같이, 컨쥬게이트 1은, 도 40에 나타난, 빠르게 청소된, 투여 후 비-지속 작용성 IL-15에 대해 나타난 혈장 수준에 비해, 대략 18시간의 반감기를 가지며 혈장 내에서 측정가능한 농도, 지속적인 약동학을 나타낸다.
- [0442] **실시예 25**
- [0443] **생체내 연구: 비-인간 영장류에서의 단일 용량 PK 연구**
- [0444] 시노물구스 원숭이(n=2, 1마리 수컷 및 1마리 암컷)에 단일 정맥내 용량으로 컨쥬게이트 1을 10, 50 및 100 μ g/kg으로 투여하였다. IL-15를 대조군으로서 50 μ g/kg으로 단일 정맥내 용량으로서 투여하였다. 주사 후 지시된 시점(0.03, 0.25, 1, 4, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168시간)에 약물의 혈장 농도를 측정하였다. 도 41 참조.
- [0445] 도 41에 나타난 바와 같이, 컨쥬게이트 1은, 혈장으로부터 빠르게 청소된 비-지속 작용성 IL-15에 비해, 100 μ g/kg 용량에 대해 대략 30시간의 반감기를 가지며 혈장 내에서 측정가능한 농도, 지속적인 약동학을 나타낸다.
- [0446] 컨쥬게이트 1은 단일 용량 후 다수의 종(마우스, 래트 및 시노물구스 원숭이)에 걸쳐 연장된 그리고 지속적인 혈장 노출을 달성하였다(도 39~41 참조).
- [0447] **실시예 26**
- [0448] **생체내 연구: 마우스에서의 단일 용량 PD 연구 - 세포 수, 증식 및 JAK/STAT 신호전달의 관련**
- [0449] Balb/c 마우스(n=3/그룹)에 단일 정맥내 용량으로 비히클(실시예 11에 기재된 바와 같음) 또는 0.3 mg/kg 또는 0.03 mg/kg의 용량의 컨쥬게이트 1을 투여하였다. 투여 후, 투여 후 시점(24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 120시간, 144시간 및 240시간)에 혈액 샘플을 수집하였다. 샘플을 지시된 시점에 CD4 T 세포 수(도 42a 참조) 및 η Ki-67(도 42b 참조)에 대한 면역표현형검사에 적용하였다.
- [0450] CD4 T 세포 및 이들의 증식은 각각 CD45+CD3+CD4+CD8- 및 CD45+CD3+CD4+CD8-Ki-67+ 마커에 의해 정의되었다. 도 42a는 CD4 T 세포 수의 플롯이고, 도 42b는 시간 경과에 따른 η Ki-67 양성에 의해 측정된 CD4 T 세포 증식의 플롯이다. CD4 T 세포는, CD8 및 NK 세포(예를 들어 실시예 11 참조)에 비해 비교적 작게 증가한 수 및 η Ki-67 발현(투여 후 72~144시간에 나타남)을 가지며 컨쥬게이트 1 치료에 대해 가장 덜 민감한 집단이었다. NK 세포는 마우스에서 CD4 T 세포 또는 CD8 T 세포에 비해 컨쥬게이트 1의 단일 용량 투여에 의한 증식 반응에서 자극에 대해 더 민감하였다.
- [0451] CD3+CD4+CD8- pSTAT5+ 마커 조합을 사용하여 CD4 T 세포에서의 STAT5 인산화를 측정하였다. 도 43은, 0.03 mg/kg(블루, 채워진 정사각형) 또는 0.3 mg/kg(오렌지, 채워진 원)의 용량에서의 시간 경과에 따른(투여 후 0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96 및 120시간) CD4 T 세포 내에서의 pSTAT5 인산화 퍼센트 양성의 플롯이다. 시간

경과에 따른 비히클(블랙) 및 투여 전(개방 원) 수준을 또한 나타내었다.

- [0452] 결과: CD4 T 세포는 CD8 및 NK 세포에 비해 비교적 낮게 증가한 pSTAT5 발현(투여 후 0.25 내지 72시간에 나타남)을 가지며 컨쥬게이트 1 치료에 대해 가장 덜 민감한 집단이다. NK 세포는 마우스에서 CD8 T 세포 또는 CD4 T 세포에 비해 증식 반응에서 단일 용량의 컨쥬게이트 1 자극에 대해 더 민감하다.
- [0453] 실시예 27
- [0454] 생체내-연구: 비-인간 영장류(NHP)에서의 최소 유효 용량 연구
- [0455] 시노몰구스 원숭이(n=3~4 수컷)에, 단일 정맥내 주사로 0.003, 0.01, 0.1 mg/kg의 컨쥬게이트 1 또는 비히클 대조군을 투여하였다. 투여 전 및 투여 후 지시된 시점(-5, -2, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 17일차)에 혈액 샘플을 수집하고, 유동 세포계측 분석에 적용하여 림프구 집단 내에서의 약역학적 효과를 검사하였다. NK, CD8 T, 및 CD4 T 세포의 세포 수를 검사하였고, 결과를 도 44a~44c에 나타내었다. NK 세포, CD8 T 세포, 및 CD4 T 세포에 대한 증식(%Ki-67) 및 JAK/STAT 신호전달(%pSTAT5)을 검사하였고, 결과를 각각 도 45a~45c 및 도 46a~46c에 나타내었다. CD8 부분집단(T_{naive} , T_{em} , T_{cm} 및 T_{scm})의 증식(%Ki-67)을 검사하였고, 결과를 도 47a~47d에 나타내었다.
- [0456] NHP에서, 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 NK(CD45+CD3-CD16+) 세포 수는 상당히, 그리고 용량-의존적 방식으로 증가하였다. 0.1 및 0.01 mg/kg 용량 수준에서 최대 세포 수는 투여 후 5일차에 나타났고 14일차까지 지속되었다. NK 세포의 현저한 증가를 제공하는 최저 용량 수준은 0.01 mg/kg이었다. NK 세포 수에서의 관찰을 보강하며, 컨쥬게이트 1은 또한 Ki-67 발현의 용량-의존적이고 강력한 유도를 제공하고, 이는 치료 후 대략 3 내지 4일차에 최대에 도달하고 약 14일차까지 지속될 수 있다. %Ki-67의 현저한 증가가 0.001 mg/kg 용량 수준 후에 검출될 수 있다. 컨쥬게이트 1은 또한, 0.001 mg/kg만큼 낮은 용량 수준에서 검출될 수 있는 %pSTAT5의 용량-의존적 증가와 함께, NK 세포에서 JAK/STAT 신호전달 경로에 강력하게 관련된다.
- [0457] 도 44a, 45a 및 46a는 각각 컨쥬게이트 1 치료 후 시간 경과에 따른 NK 세포 수, %Ki-67 및 %pSTAT5의 플롯이다.
- [0458] NHP에서, 컨쥬게이트 1은, 치료 후 약 5일차에 최대 세포 수를 달성하면서, 총 CD8 T 세포(CD45+CD3+CD4-CD8+로서 정의됨)의 상당한 증가를 유도한다. 이 효과는 7일에 걸쳐 지속되고, 투여 후 10 내지 14일차에 기준선으로 되돌아간다. 총 CD8 세포 수에 대한 컨쥬게이트 1의 효과는 0.003 mg/kg에서 검출될 수 있다. 이들 결과의 뒷받침으로, 컨쥬게이트 1은, 0.01 mg/kg의 저용량에서 검출가능한, CD8 T 세포에서의 풍부한 %Ki-67 양성을 유도한다. JAK/STAT 신호전달 경로에 대한 컨쥬게이트 1의 관련 또한 0.1 및 0.01 mg/kg 용량 수준에서 pSTAT5의 용량-의존적 증가와 함께 CD8 T 세포에서 강력하다.
- [0459] 도 44b, 45b 및 46b는 각각 컨쥬게이트 1 치료 후 시간 경과에 따른 CD8 세포 수, %Ki-67 및 %pSTAT5의 플롯이다.
- [0460] 컨쥬게이트 1은, NK 및 CD8 T 세포에 비해, NHP에서 총 CD4 T 세포(CD45+CD3+CD4+CD8-로서 정의됨)에 대해 비교적 작은 효과를 갖는다. 0.1 mg/kg의 최고 용량 수준으로 투여된 컨쥬게이트 1은 작게 증가한 CD4 T 세포 수, %Ki-67 및 %STAT5를 유도하였다.
- [0461] 도 44c, 45c 및 46c는 각각 컨쥬게이트 1 치료 후 시간 경과에 따른 CD4 T 세포 수, %Ki-67 및 pSTAT5의 플롯이다.
- [0462] NK 세포는 NHP에서 생체내에서 CD8 T 세포 또는 CD4 T 세포에 비해 컨쥬게이트 1 용량 반응에 있어 가장 민감하다.
- [0463] 시노몰구스 원숭이에서, CD8 나이트 및 기억 부분집단은 CD45Ra, CD197 및 CD95에 의해 정의되었다. CD8 T나이트(CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra+CD197+), CD8 Tscm(CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra+CD197+CD95+), CD8 Tem(CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra~cD197-) 및 CD8 Tcm(CD45+CD3+CD4-CD8+CD45Ra~cD197+)의 증식(%Ki-67)의 검사는, CD8 나이트 T 세포에 비해 컨쥬게이트 1에 대한 CD8 기억 부분집단의 증가된 민감성을 드러내었다. CD8 Tem, Tcm 및 Tscm 집단 내에서, 컨쥬게이트 1은, 2일만큼 조기에 시작되어 5일차에 최대에 도달하며 10~14일차에 기준선으로 되돌아가는 증식 마커 양성의 검출가능한 증가와 함께 용량 의존적 방식으로 강력한 %Ki-67 발현을 유도하였다. CD8 집단 내에서의 Ki-67 발현 및 동역학은 실시예 27 및 도 47a~47d에 나타낸 CD8 T 세포 수의 지속적인 증가를 뒷받침한다.

[0464] 도 47a~47d는 컨쥬게이트 1 치료 후 시간 경과에 따른 CD8 T_{나이프}, T_{scm}, T_{cm} 및 T_{em} 집단의 %Ki-67의 플롯이다. 도에서 보이는 바와 같이, CD8 T 세포 기억 집단은 NHP에서 생체내에서 나이브 CD8 T 세포에 비해 컨쥬게이트 1의 단일 용량에 대하여 증가된 민감성을 나타내었다.

[0465] 실시예 28

[0466] 컨쥬게이트 1에 의한 그랜자임 B 또는 퍼포린의 유도

[0467] NK 세포용해 효소, 그랜자임 B 및 퍼포린의 발현을, 컨쥬게이트 1의 단일 용량 후 시노몰구스 원숭이에서 검사하였다. 그랜자임 B 및 퍼포린의 발현 수준을 0.001 mg/kg, 0.01 mg/kg 또는 0.1 mg/kg 용량 수준에서 NK 세포 내에서의 평균 형광 강도(MFI)에 의해 정량화하였다. 컨쥬게이트 1은 0.01 및 0.1 mg/kg에서 대략 3배만큼(피크 대 투여 전) 그랜자임 B의 MFI를 증가시켰다. 컨쥬게이트 1은 또한 0.01 및 0.1 mg/kg에서 대략 2배만큼(피크 대 투여 전) 퍼포린의 MFI를 증가시켰다. 전체적으로, 컨쥬게이트 1은 NK 세포의 강력한 확장을 유도하였을 뿐만 아니라 이들의 기능을 향상시킬 수 있다.

[0468] 도 48a~48c는 그랜자임 B의 플롯이고, 도 49a~49c는 NHP에서 투여 전(기준선) 및 컨쥬게이트 1 치료 (0.0001~0.1 mg/kg) 후 피크 수준의 시간의 퍼포린 MFI의 플롯이다.

[0469] 컨쥬게이트 1은, NHP NK 세포에서 구성적으로 발현되는 그랜자임 B 및 퍼포린과 같은 세포독성 효소의 단백질 수준을 증가시킨다.

[0470] 서열 목록

서열번호 1 (chIL-15)

```

      10      20      30      40      50      60
NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
      70      80      90     100     110
DTVENLIILA NNSLSSNGNV TSGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

```

서열번호 2

```

-1      10      20      30      40      50      60
M NWVNVISDLK KIEDLIQSMH IDATLYTESD VHPCKVTAM KCFLLELQVI SLESGDASIH
      70      80      90     100     110
DTVENLIILA NNSLSSNGNV TSGCKECEE LEEKNIKEFL QSFVHIVQMF INTS

```

서열번호 3

```

      10      20      30      40      50      60
MRISKPHLRS ISIQYLCLL LNSHFLTEAG IHVFILGCFs AGLEKTEANW VNVISDLKKI
      70      80      90     100     110     120
EDLIQSMHID ATLYTESDVH PCKVTAMKC FLELQVISL ESGDASIHDT VENLIILANN
      130     140     150     160
SLSSNGNVTE SGCKECEELE EKNIKEFLQS FVHIVQMFIN TS

```

[0471]

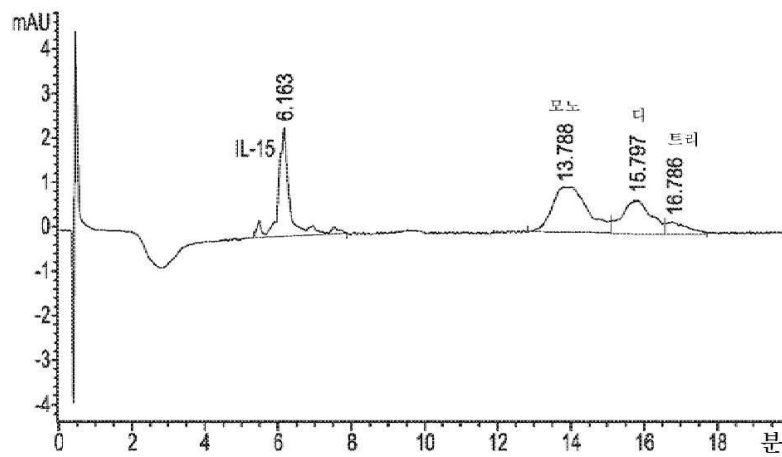
도면

도면1

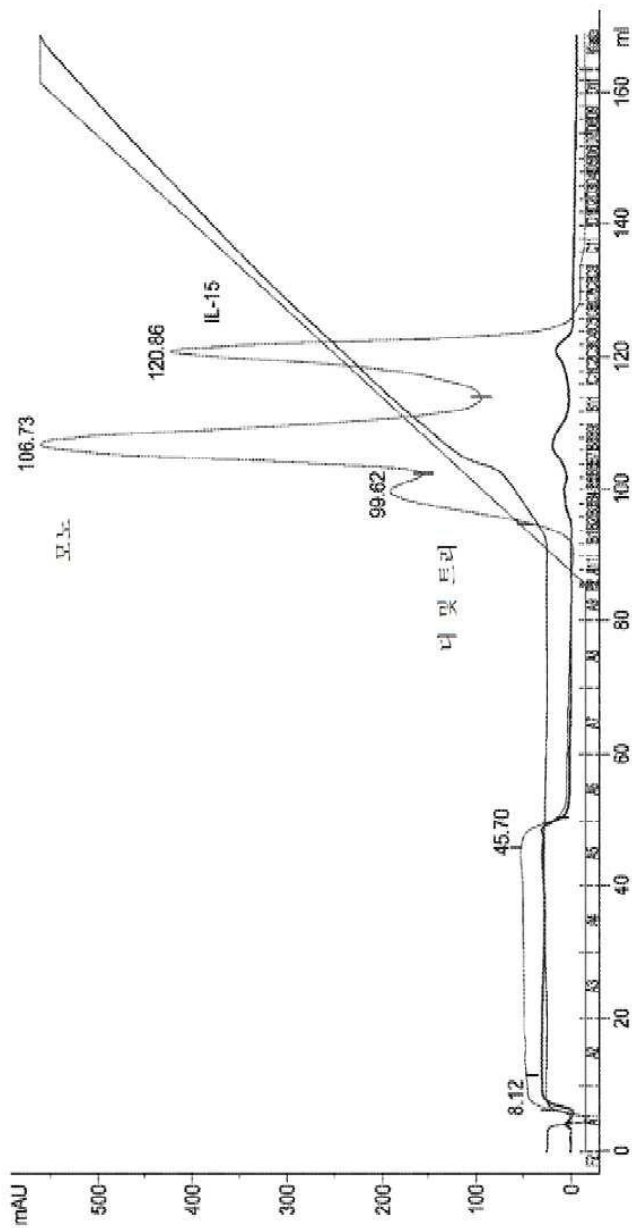
서열번호 1

10 20 30 40 50 60
 MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI
 70 80 90 100 110
 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS

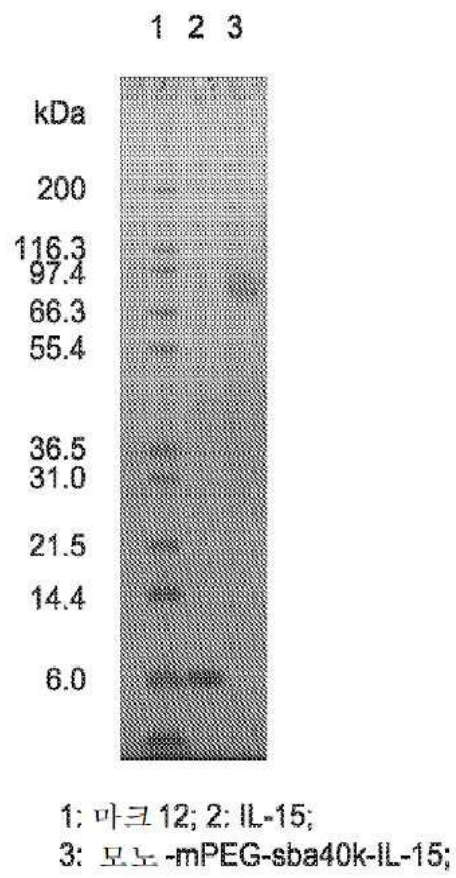
도면2



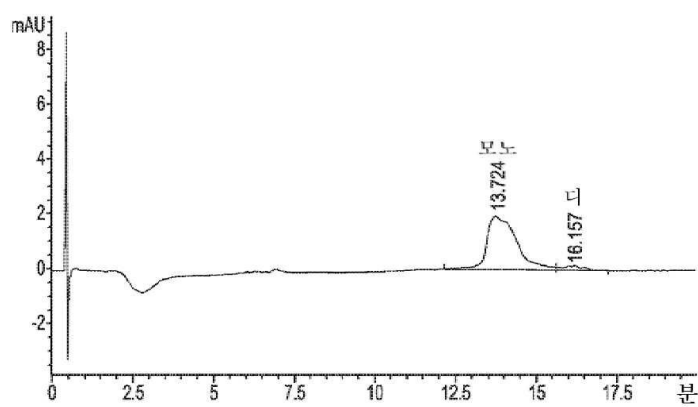
도면3



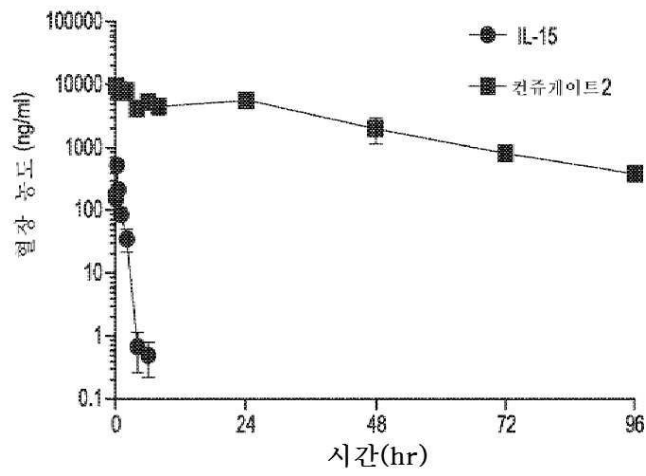
도면4



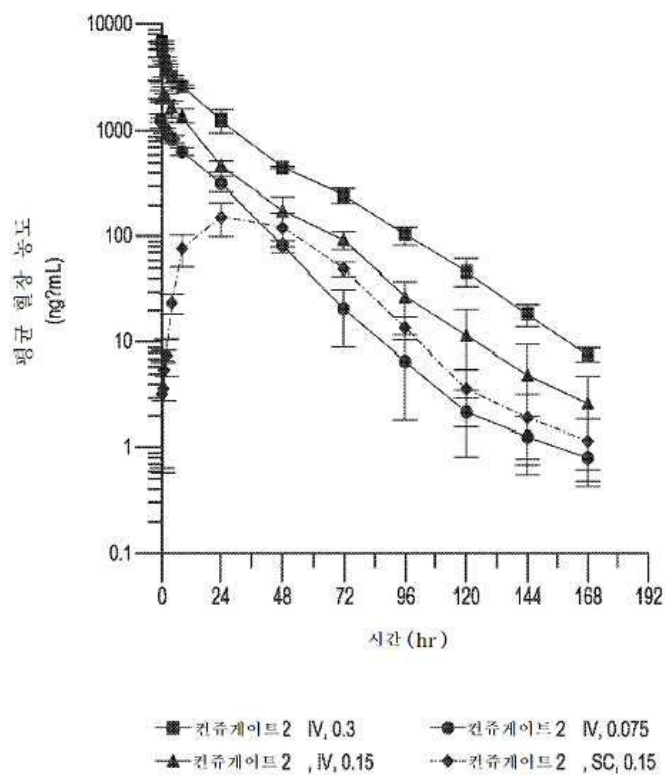
도면5



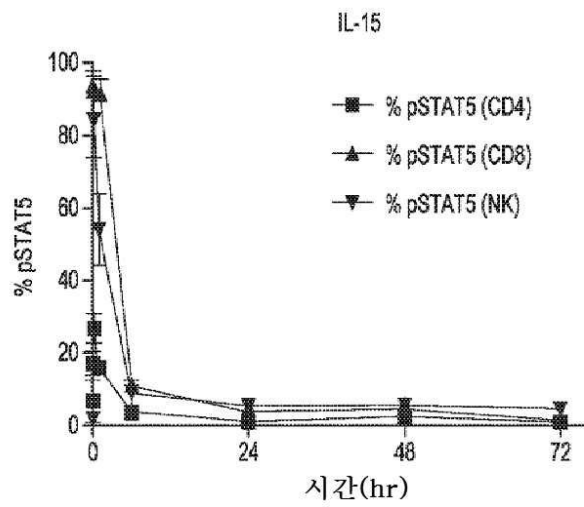
도면6



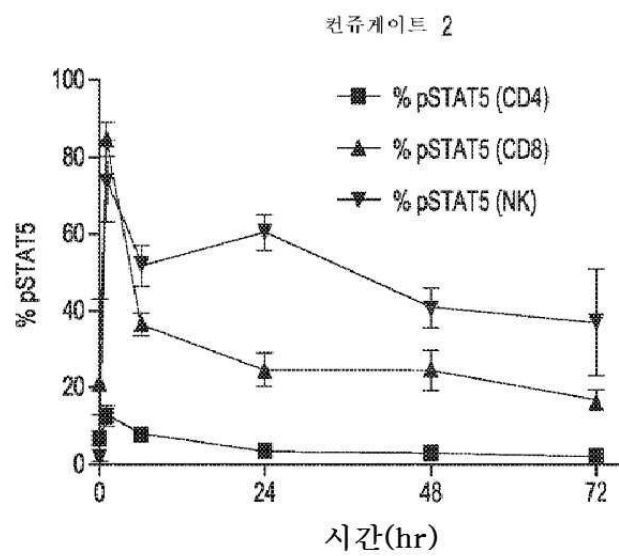
도면7



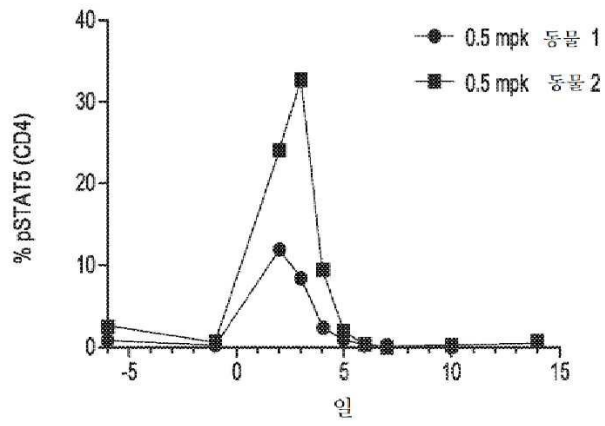
도면8a



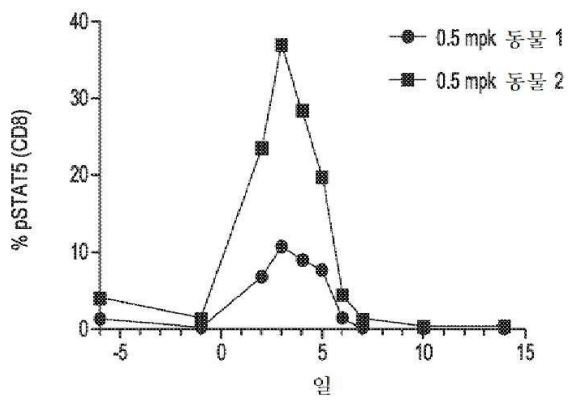
도면8b



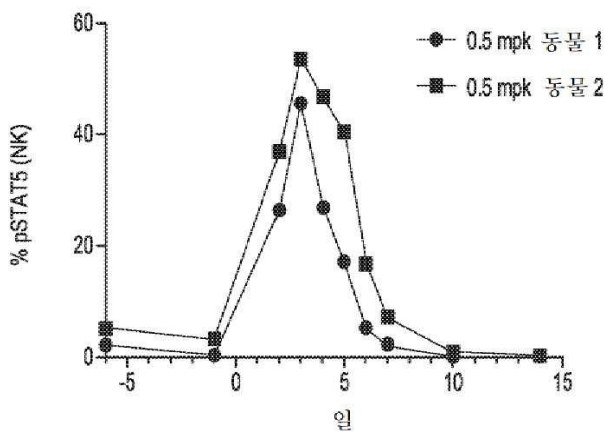
도면9a



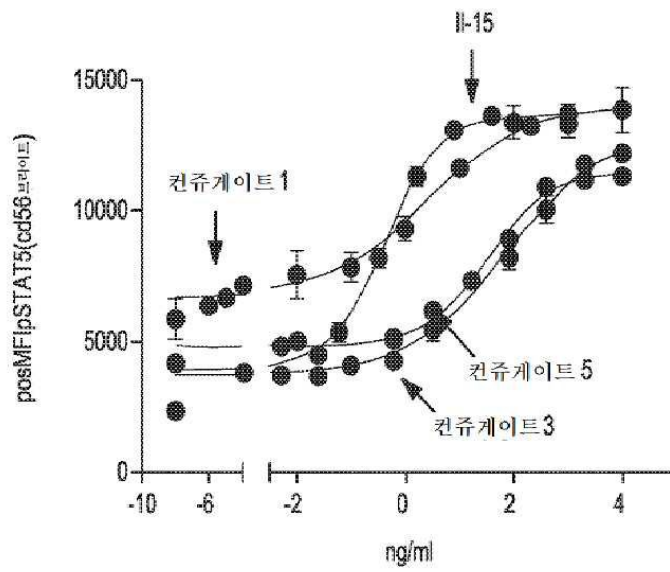
도면9b



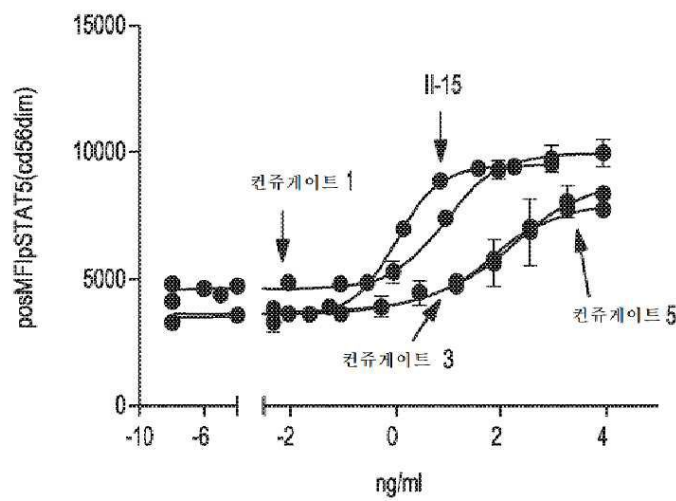
도면9c



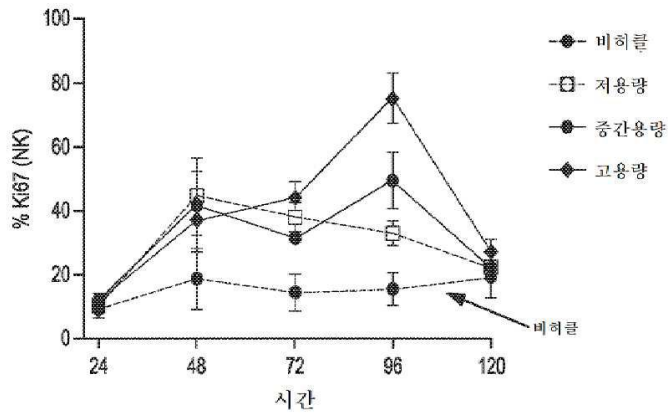
도면10a



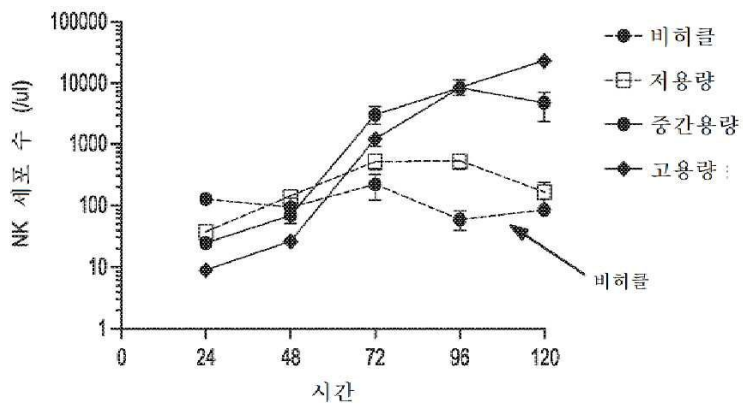
도면10b



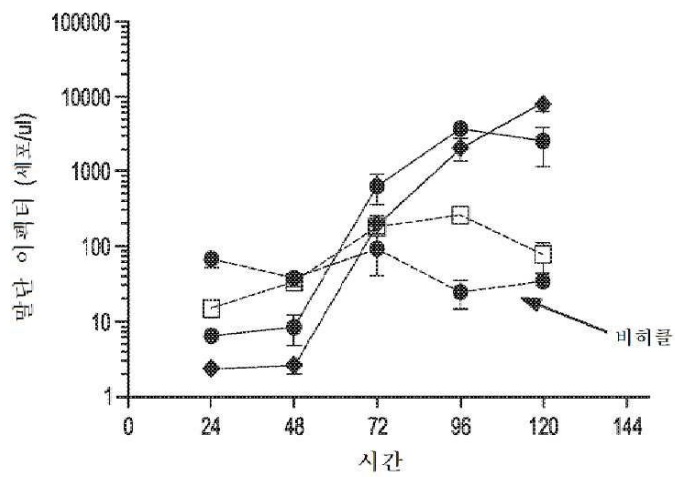
도면11a



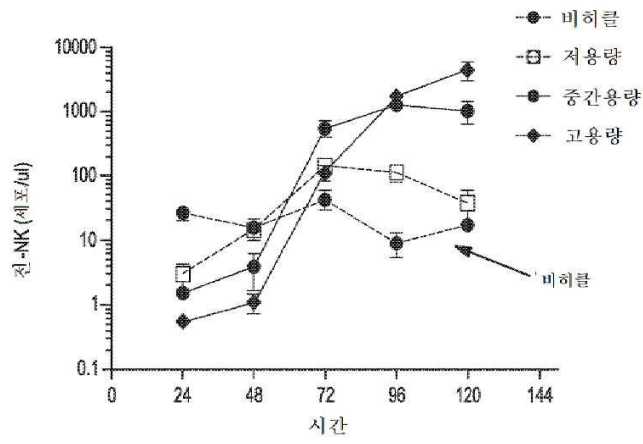
도면11b



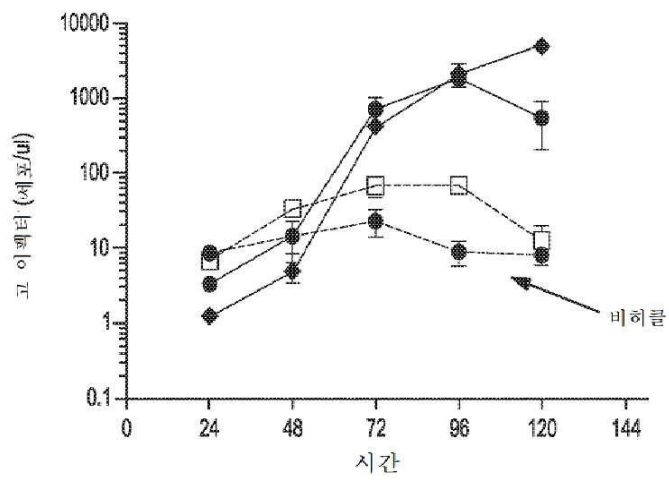
도면12a



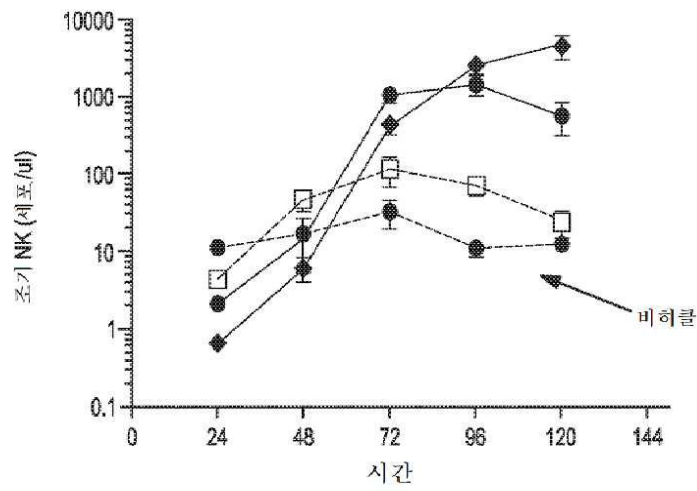
도면12b



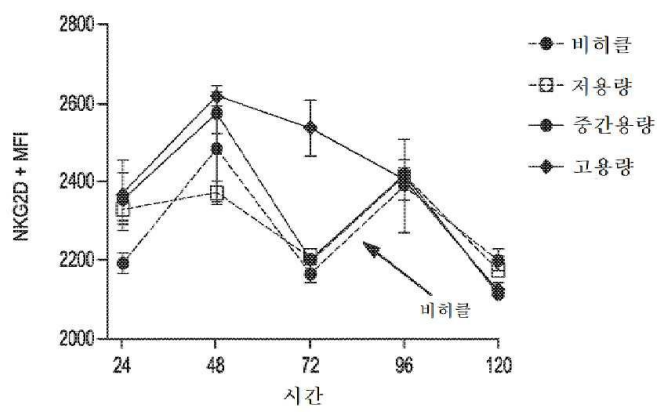
도면12c



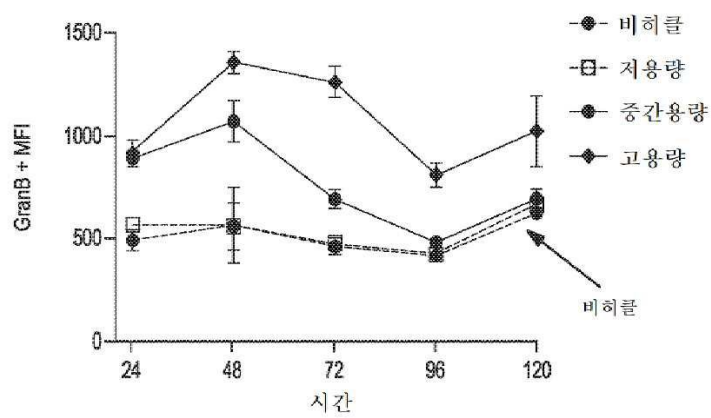
도면12d



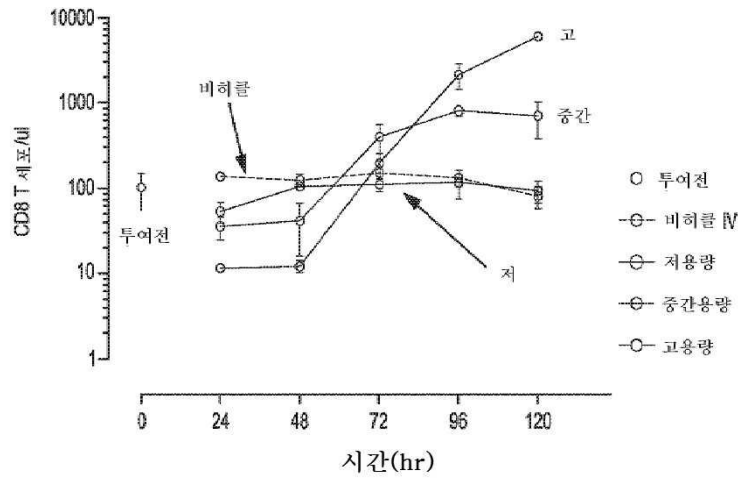
도면13a



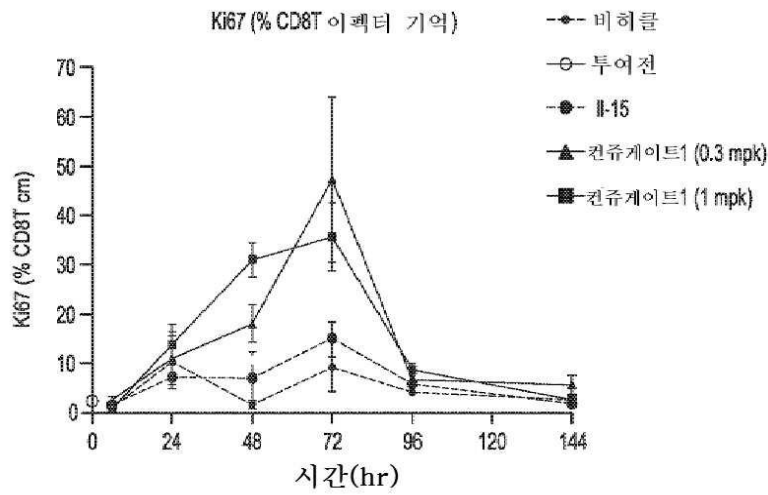
도면13b



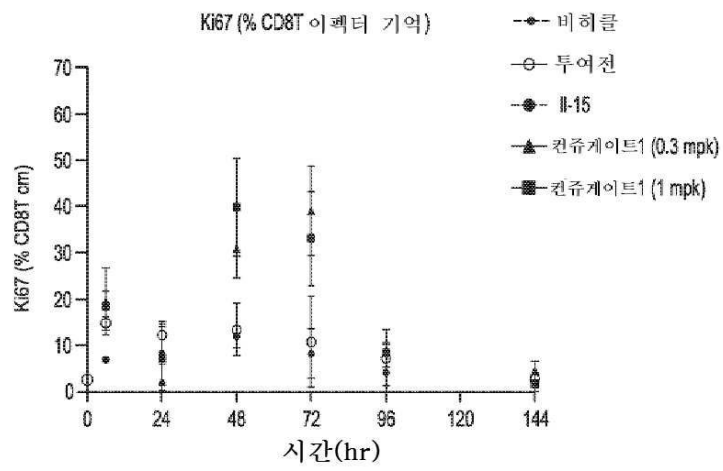
도면14



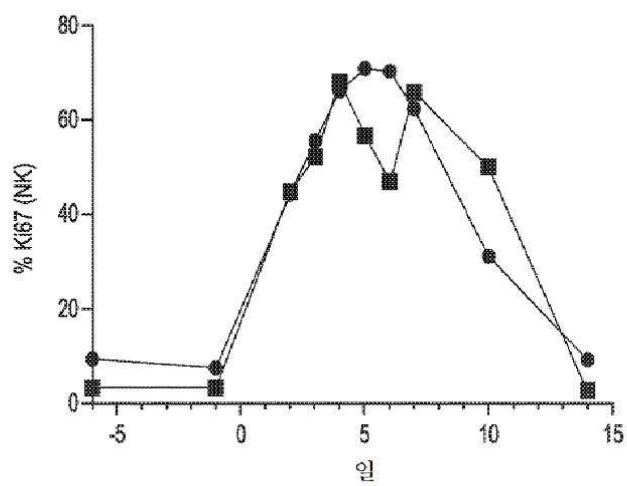
도면15a



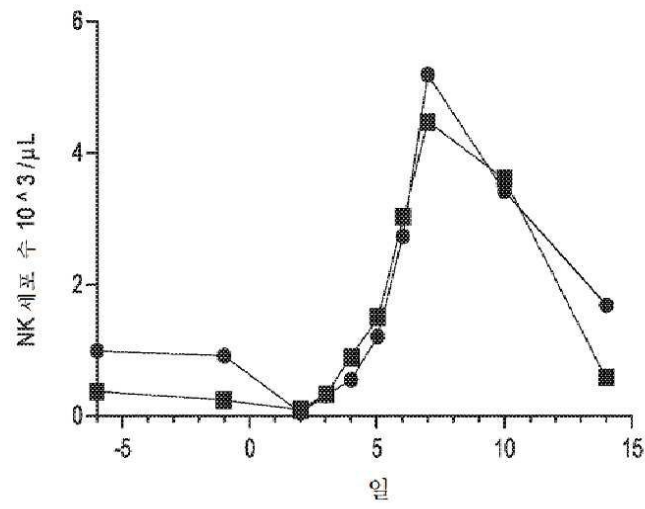
도면15b



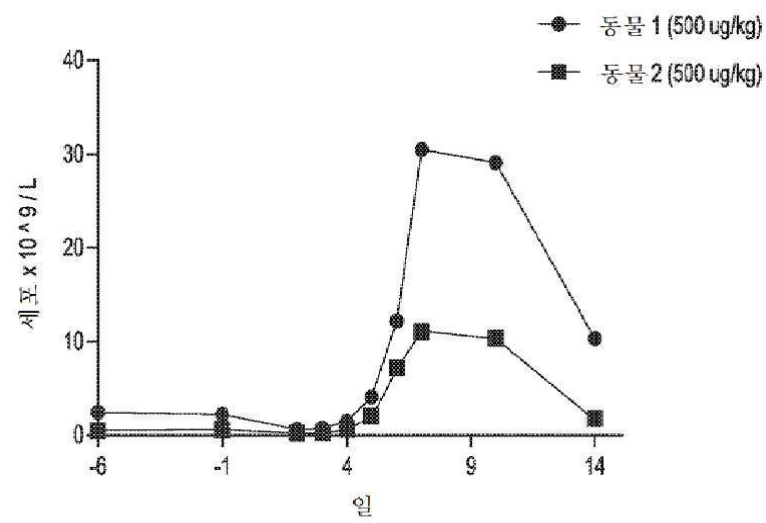
도면16a



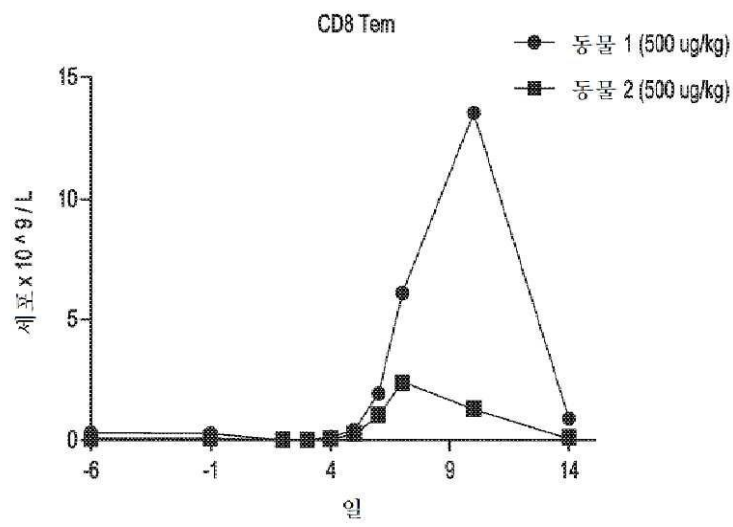
도면16b



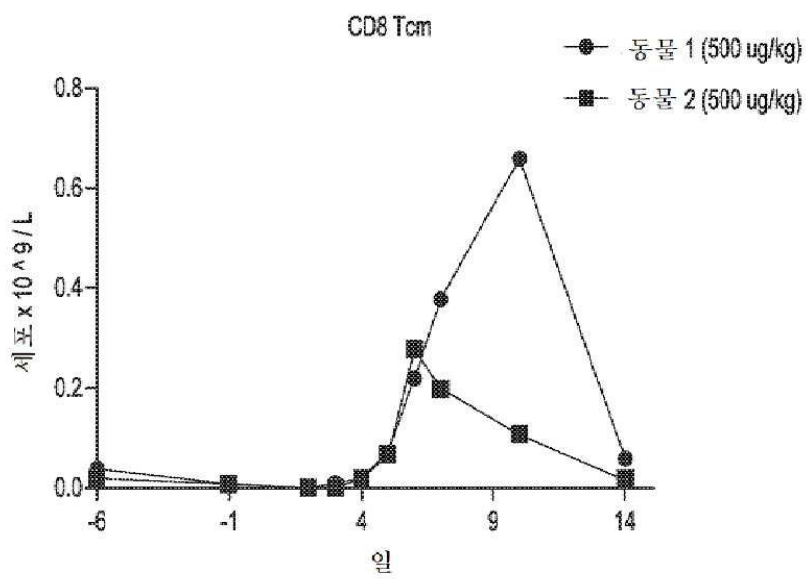
도면17



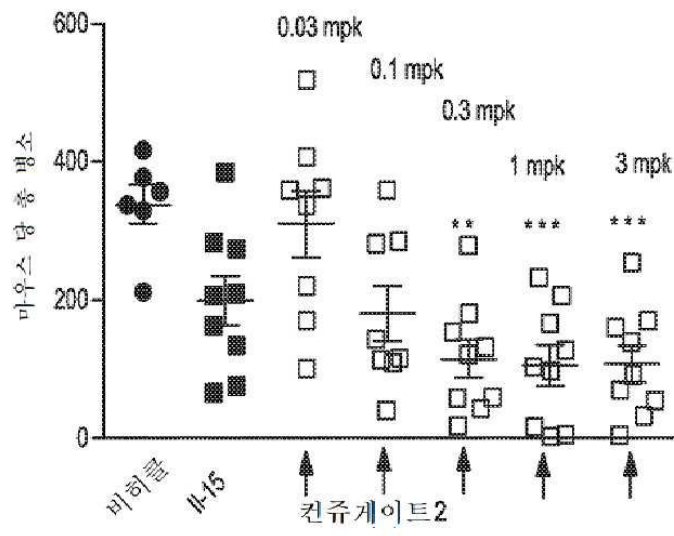
도면18a



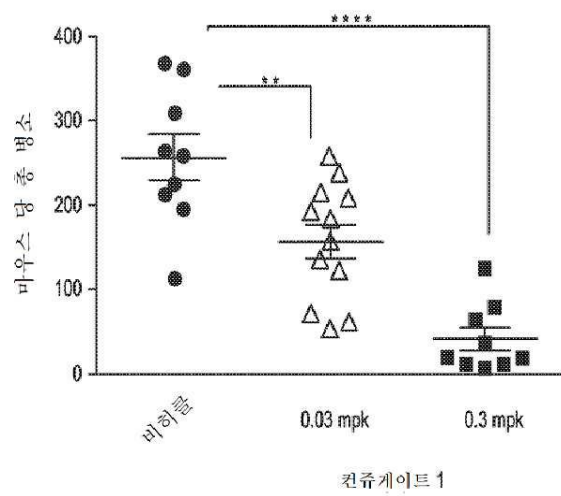
도면18b



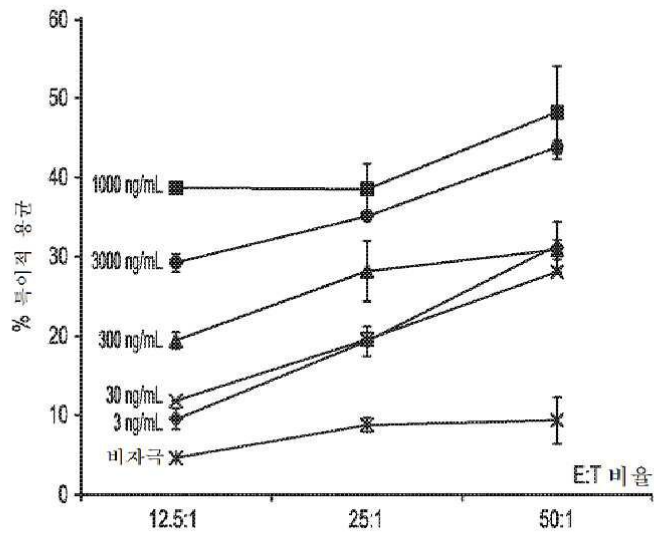
도면19



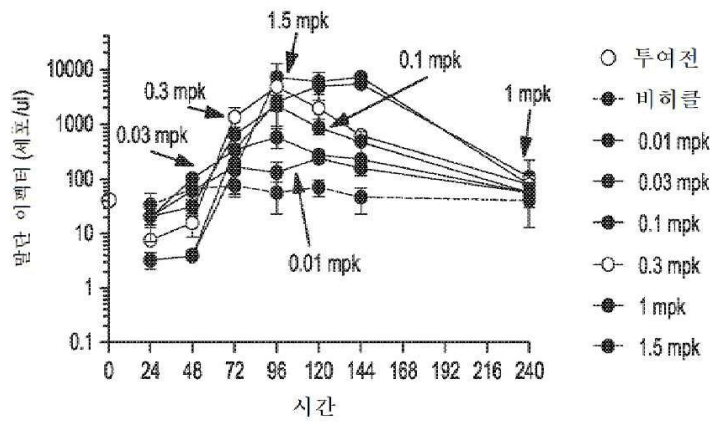
도면20



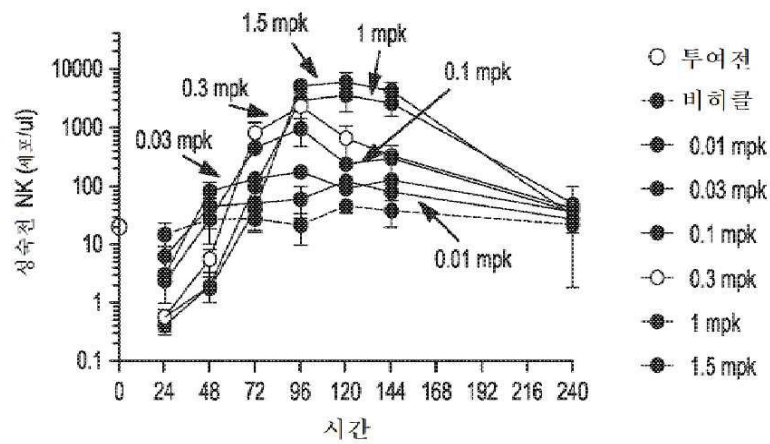
도면21



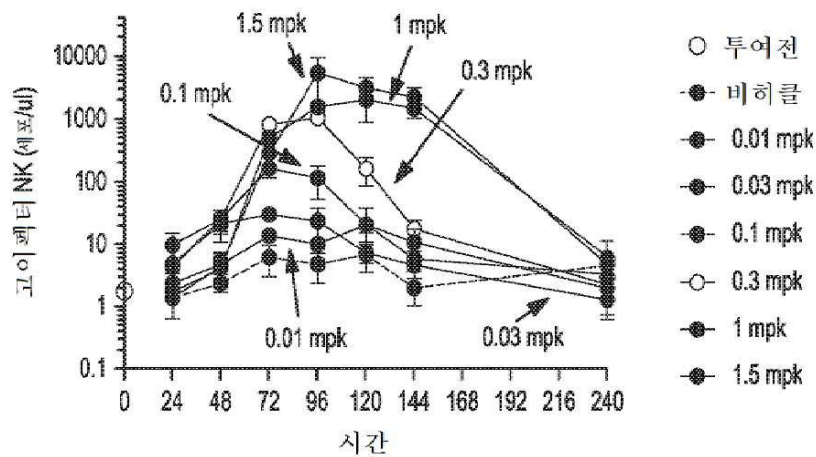
도면22a



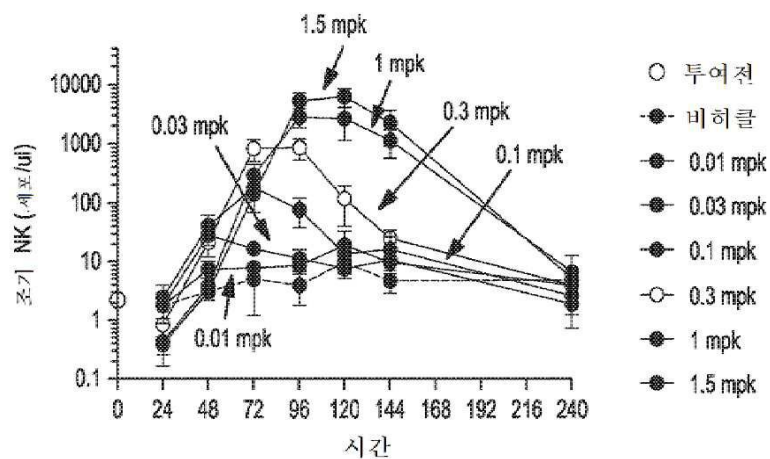
도면22b



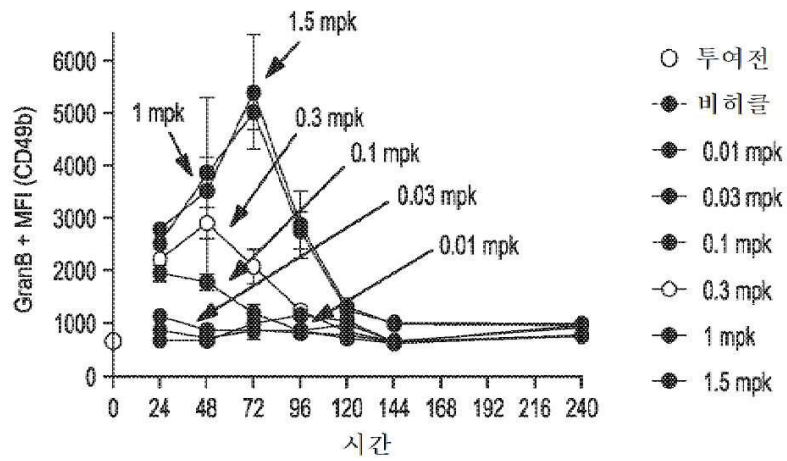
도면22c



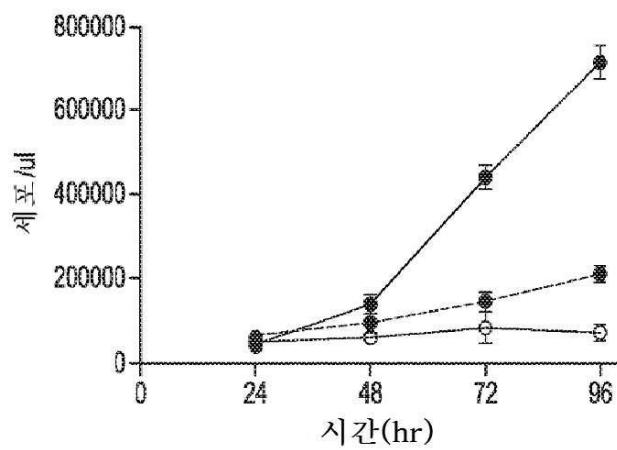
도면22d



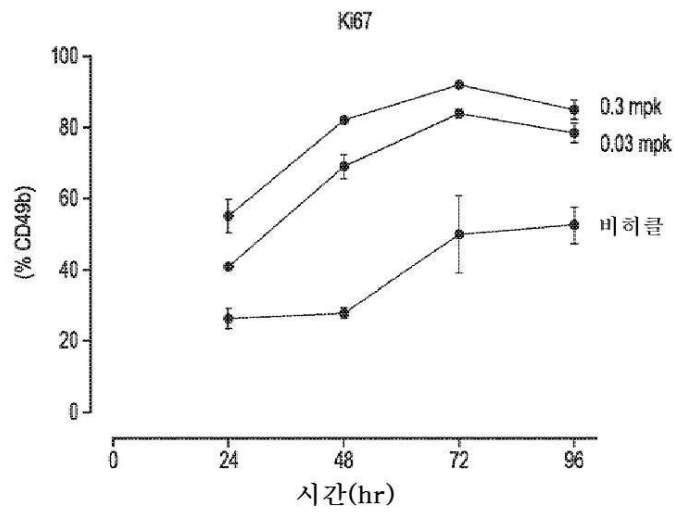
도면23



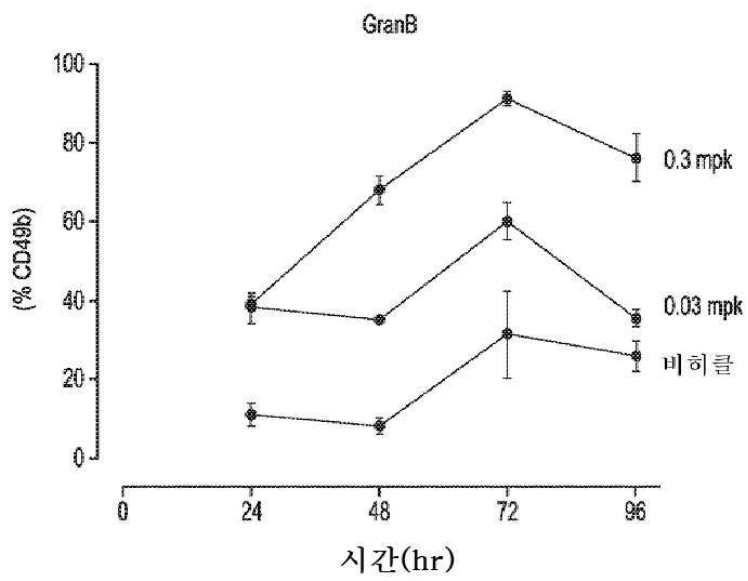
도면24



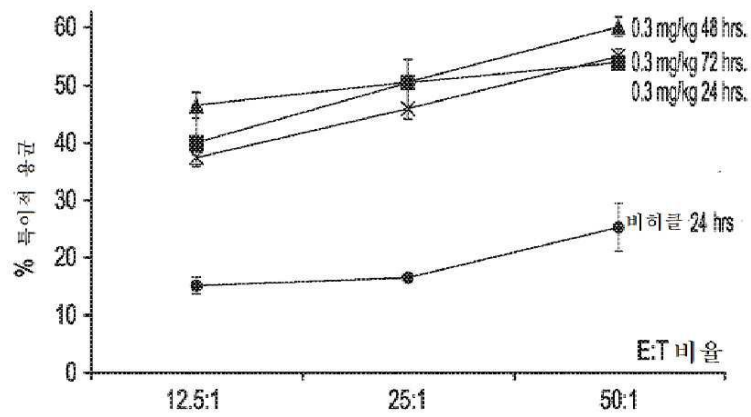
도면25



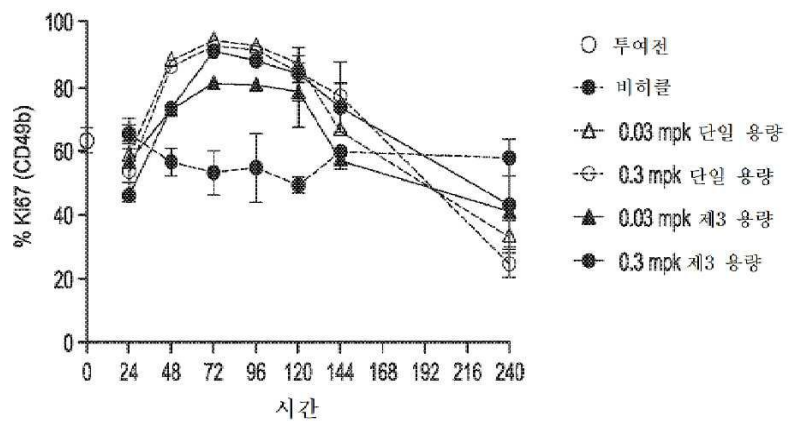
도면26



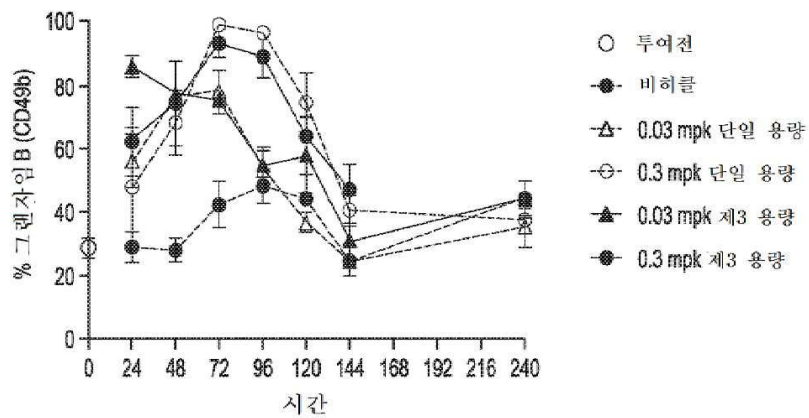
도면27



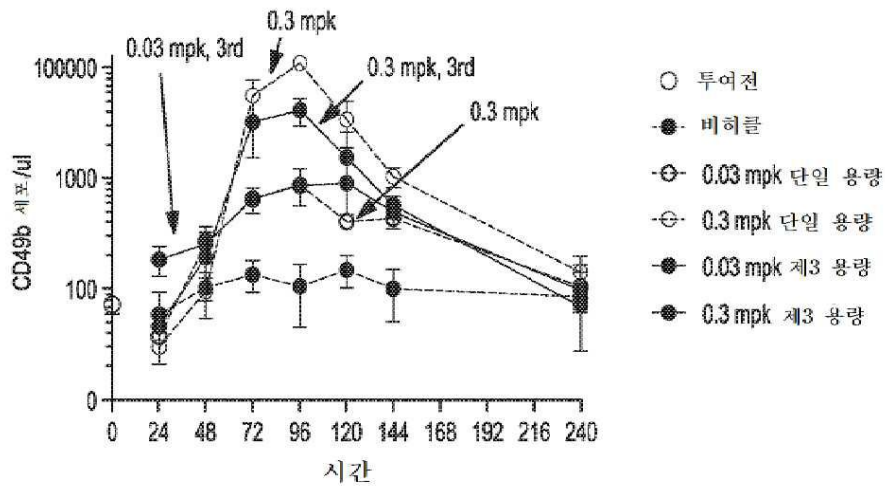
도면28a



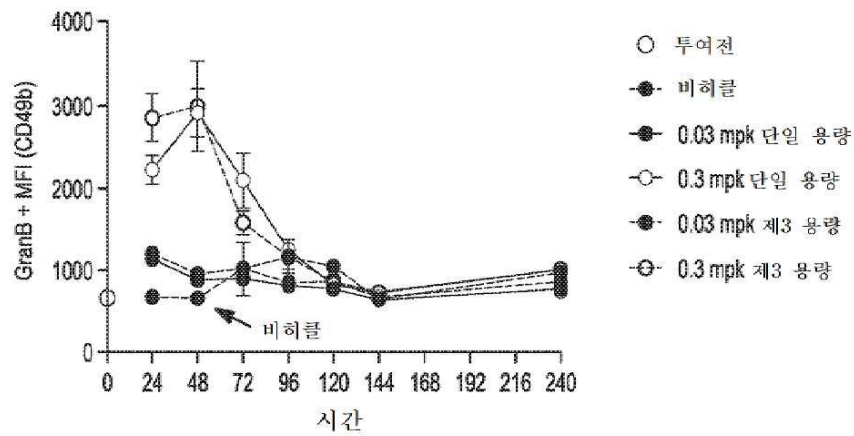
도면28b



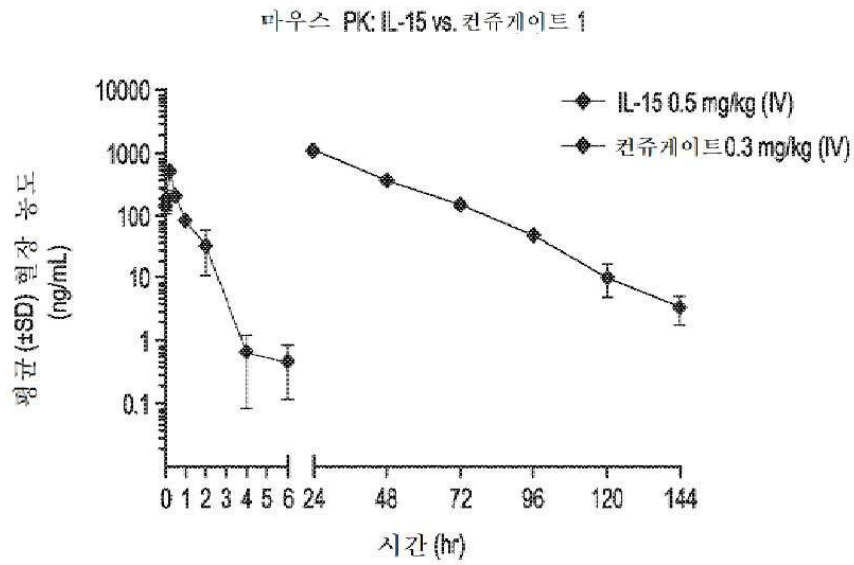
도면28c



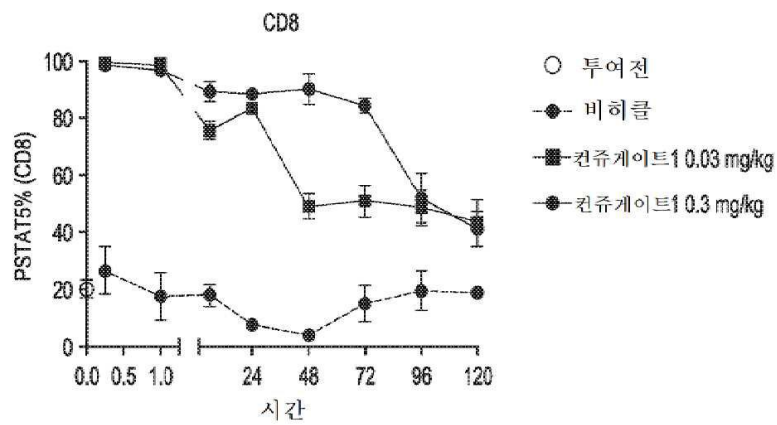
도면28d



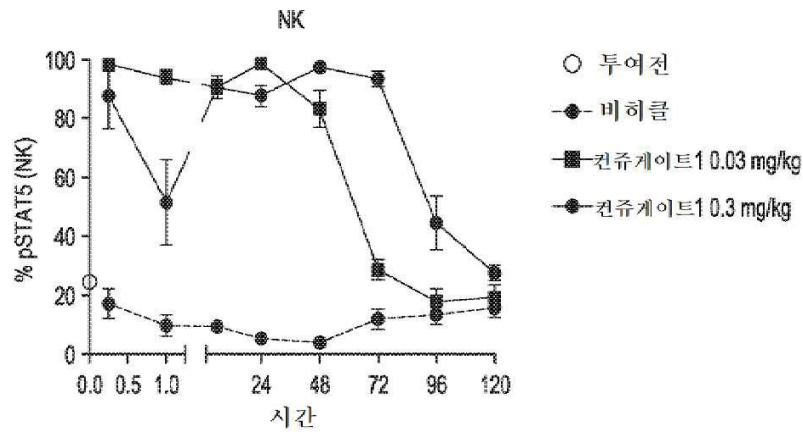
도면29a



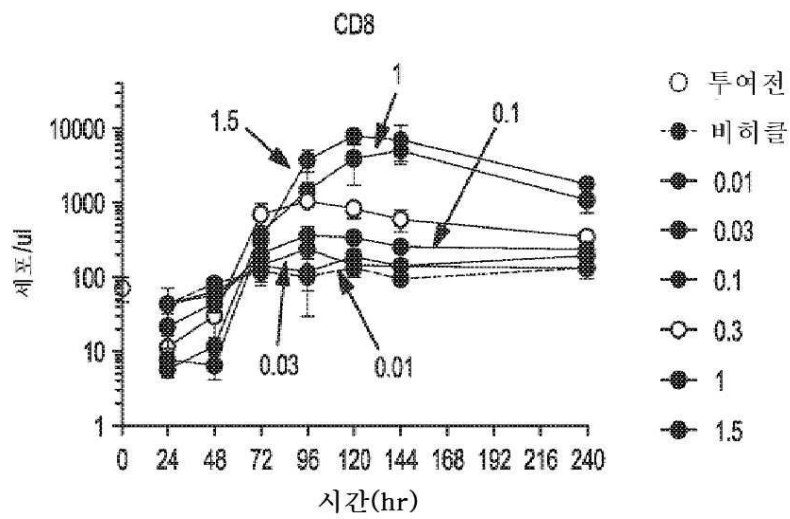
도면29b



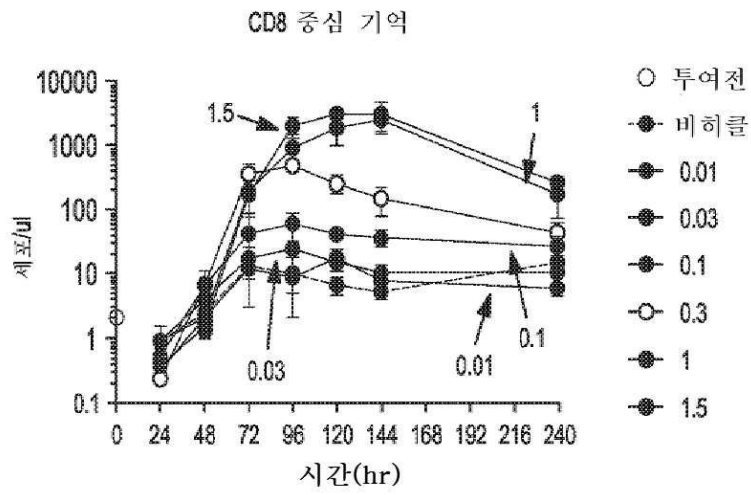
도면29c



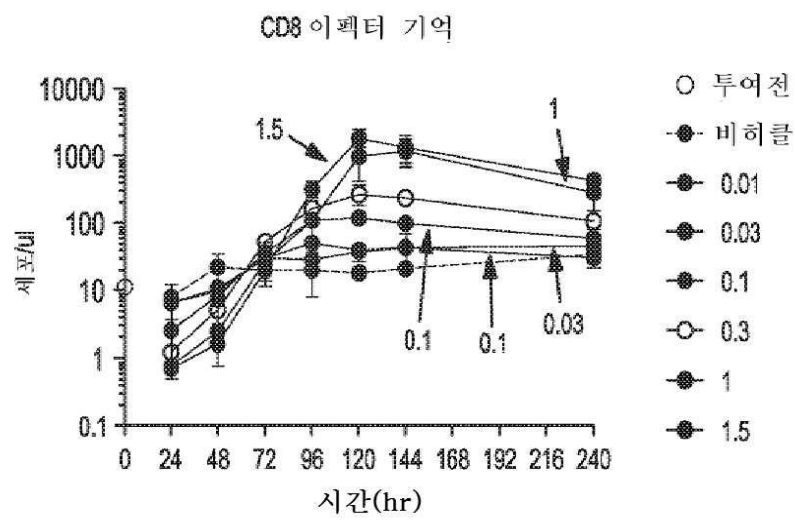
도면30a



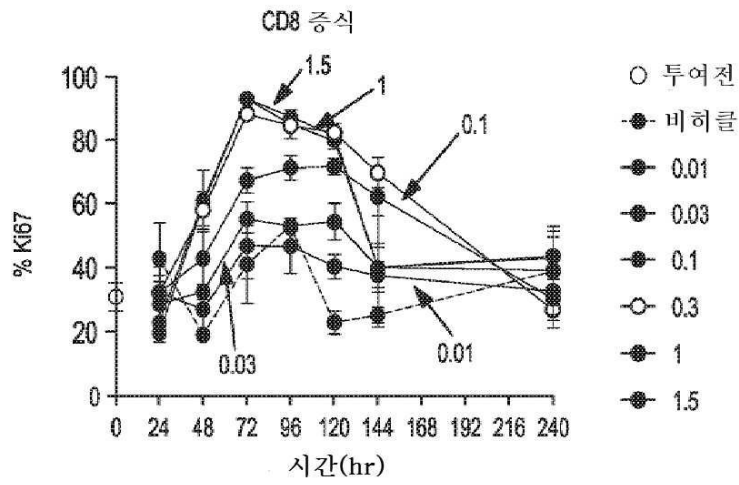
도면30b



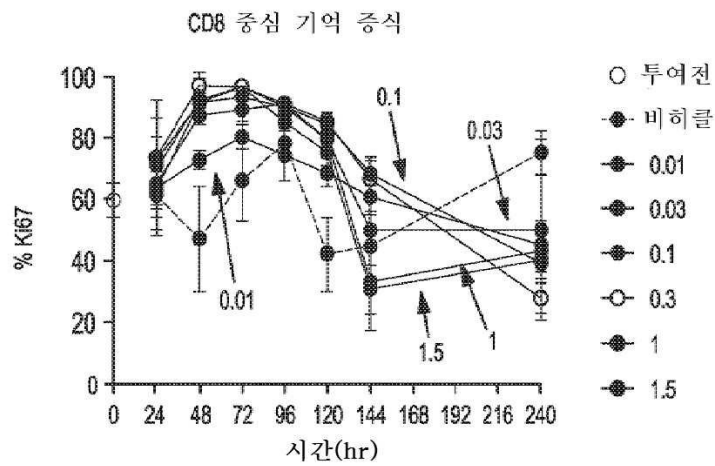
도면30c



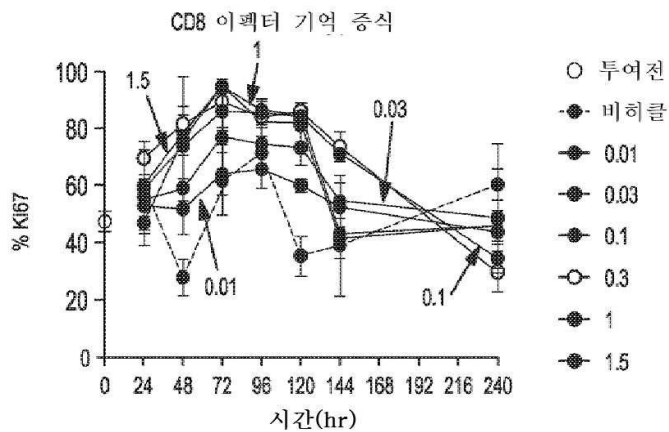
도면30d



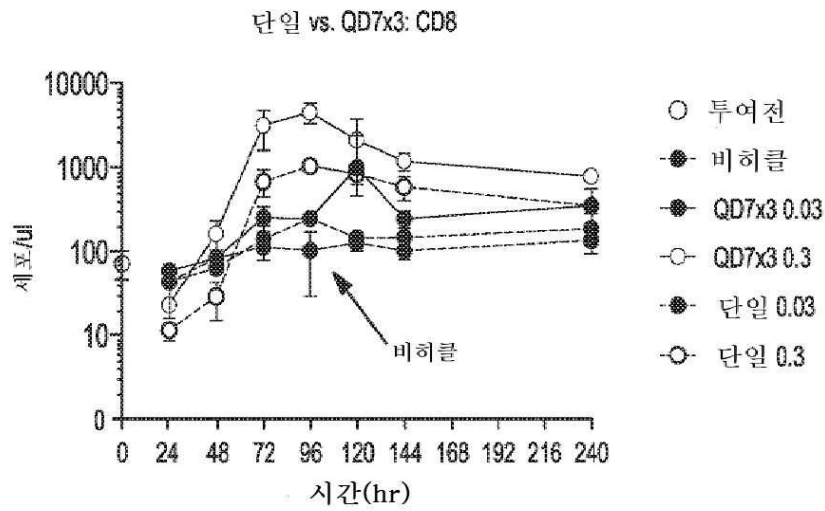
도면30e



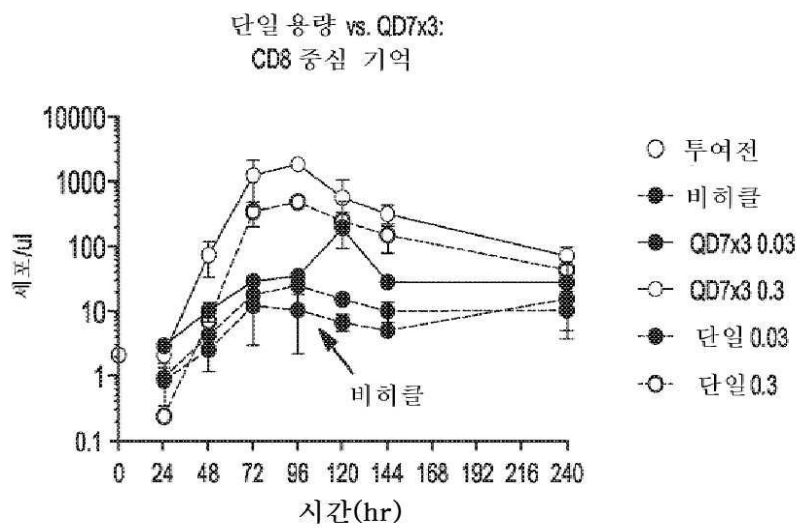
도면30f



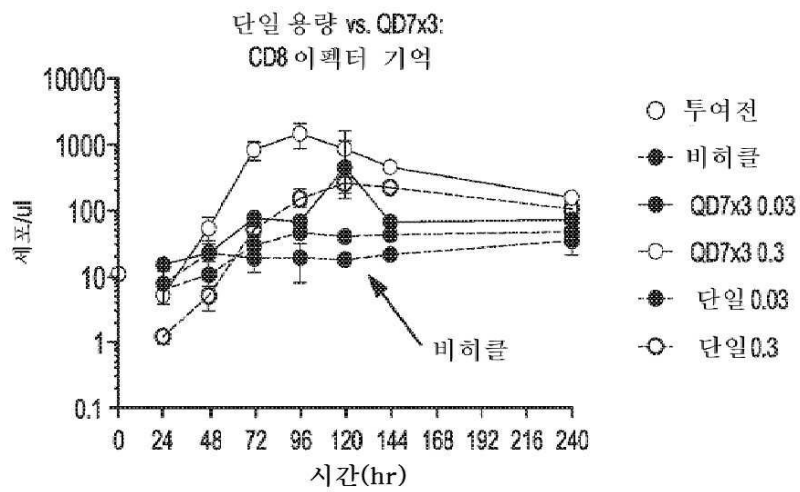
도면31a



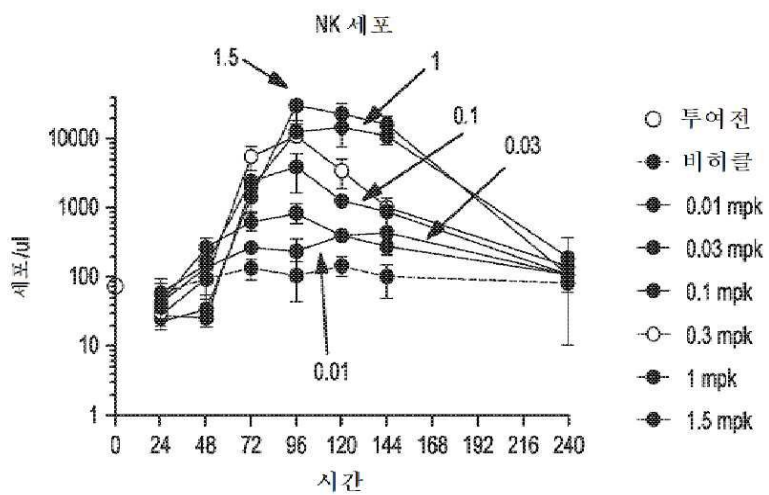
도면31b



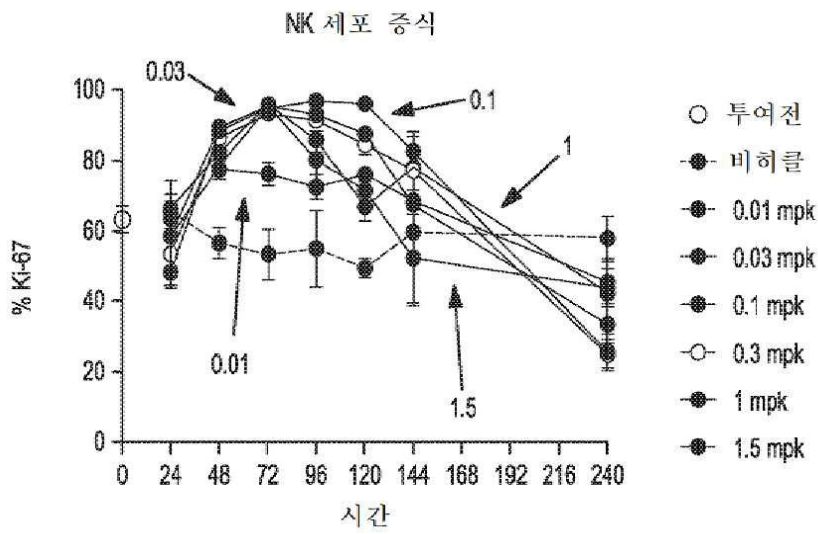
도면31c



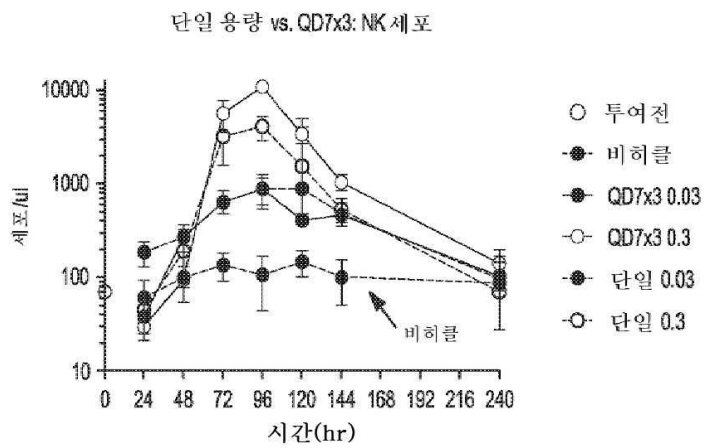
도면32a



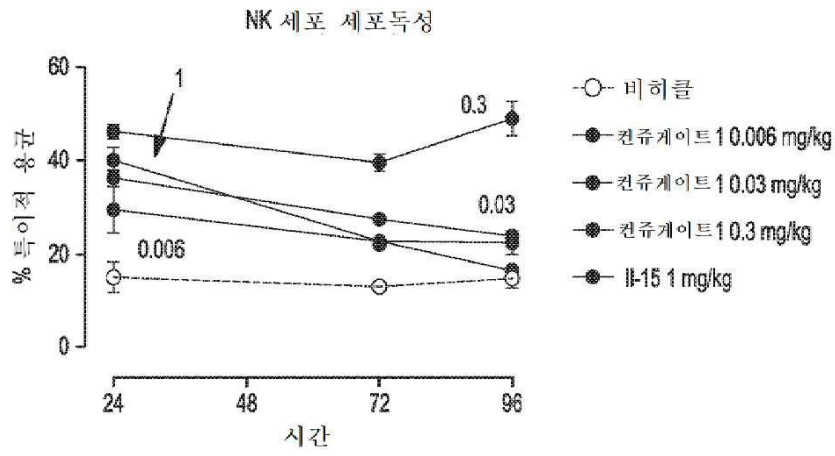
도면32b



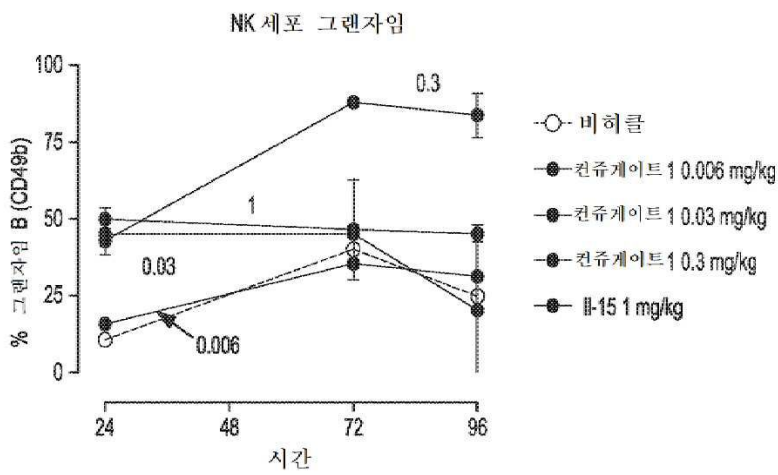
도면32c



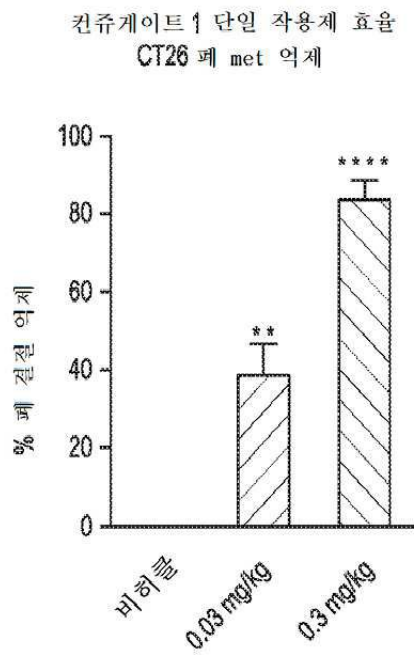
도면33a



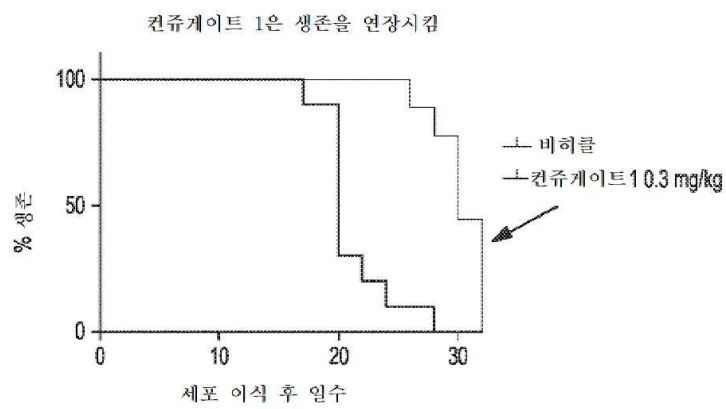
도면33b



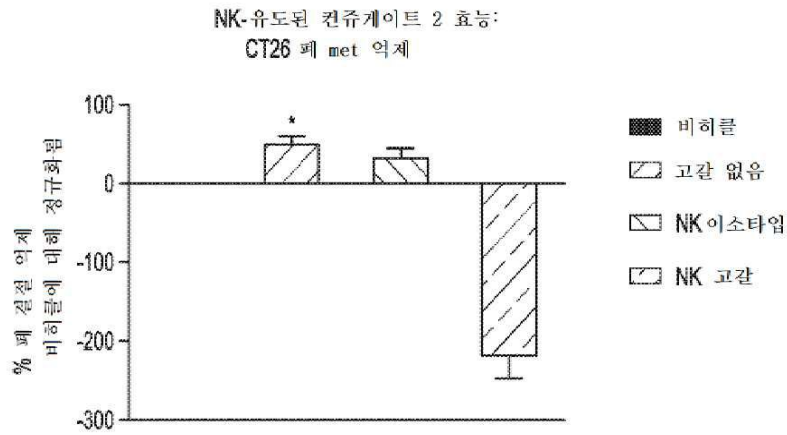
도면34a



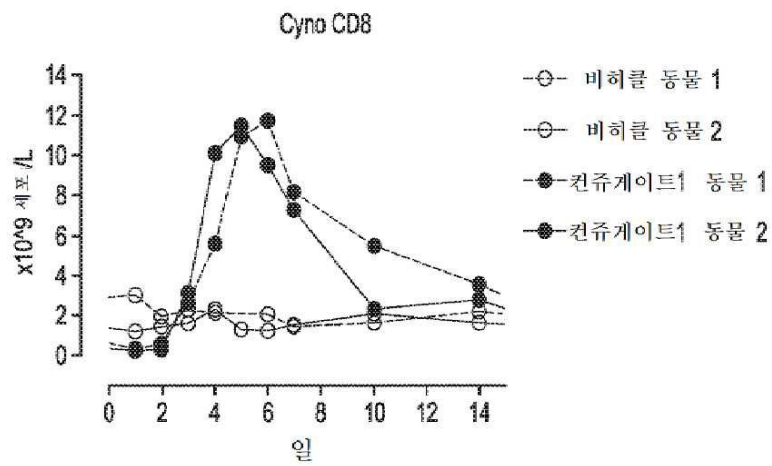
도면34b



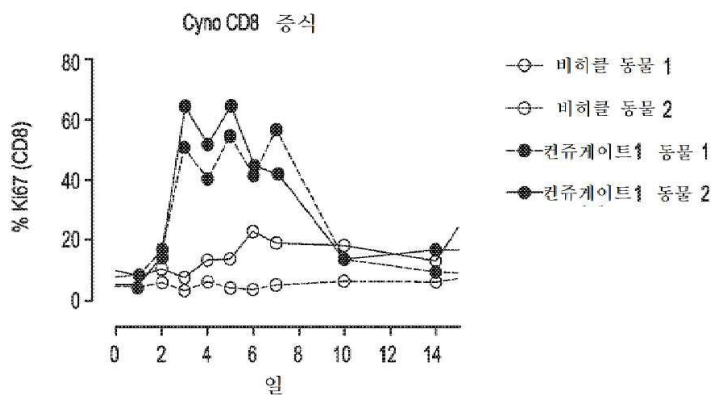
도면35



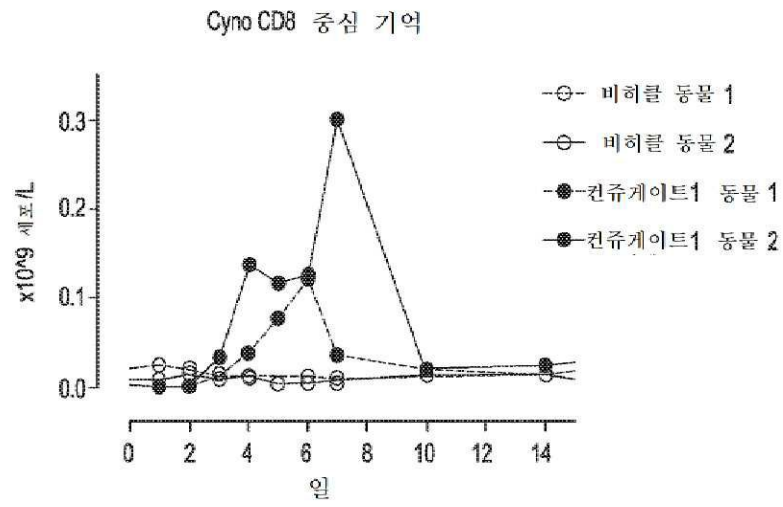
도면36a



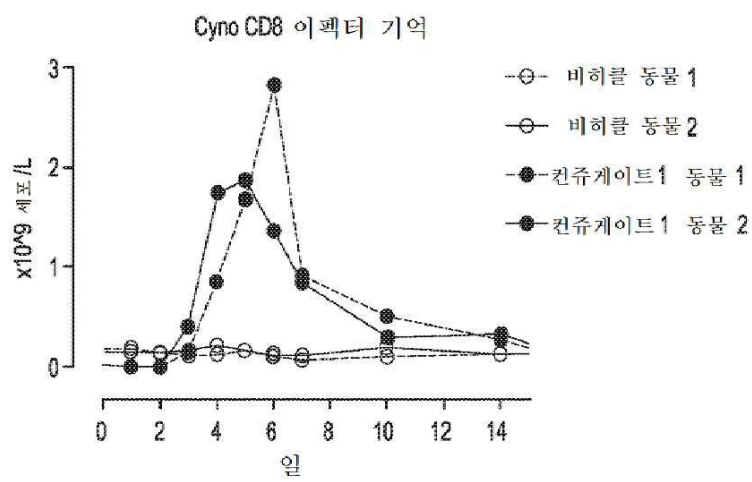
도면36b



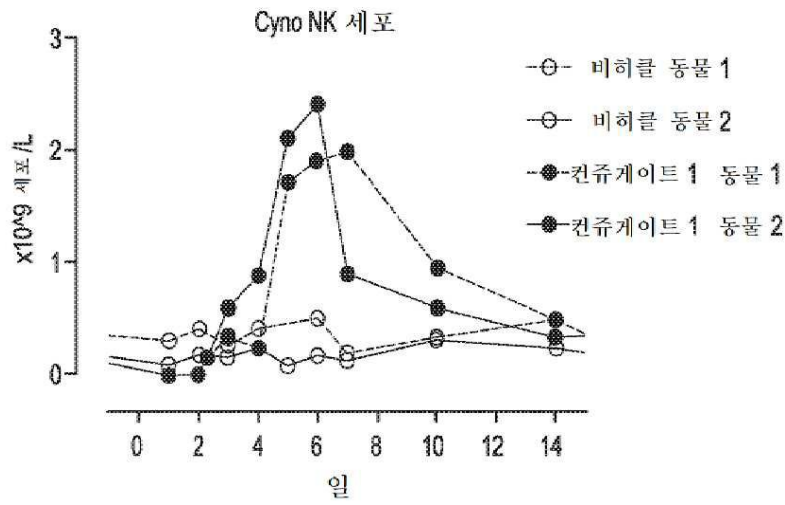
도면36c



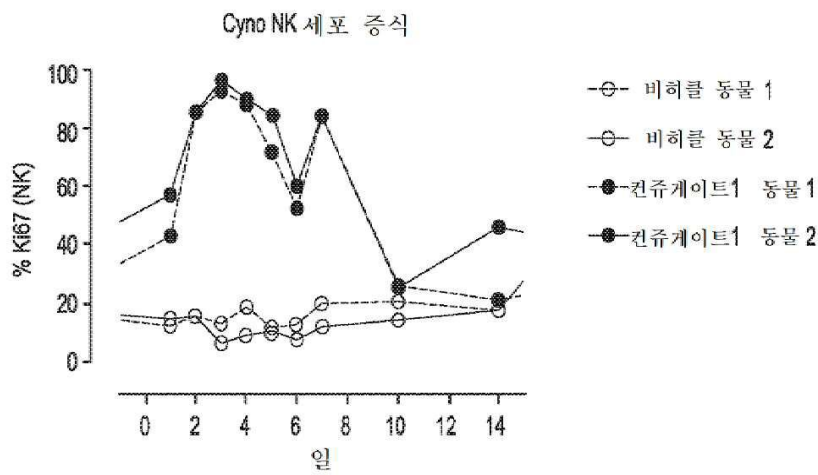
도면36d



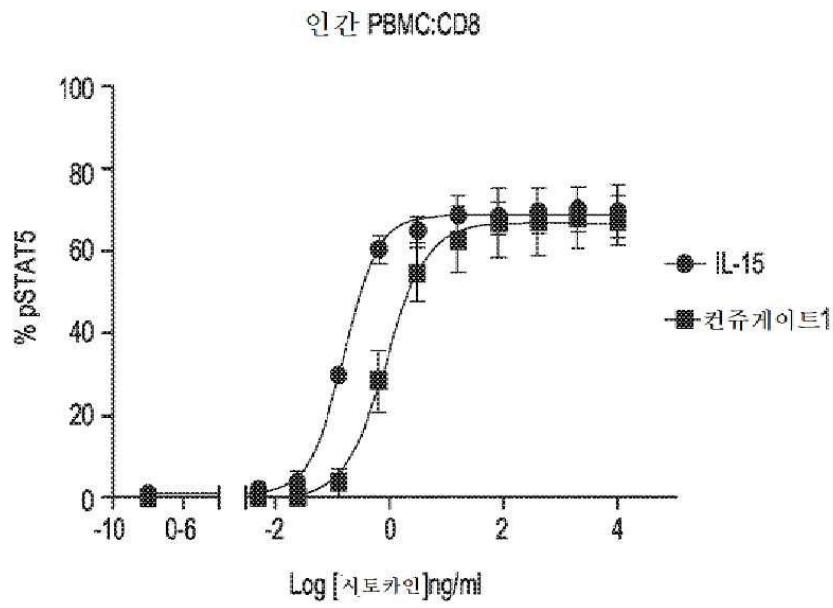
도면37a



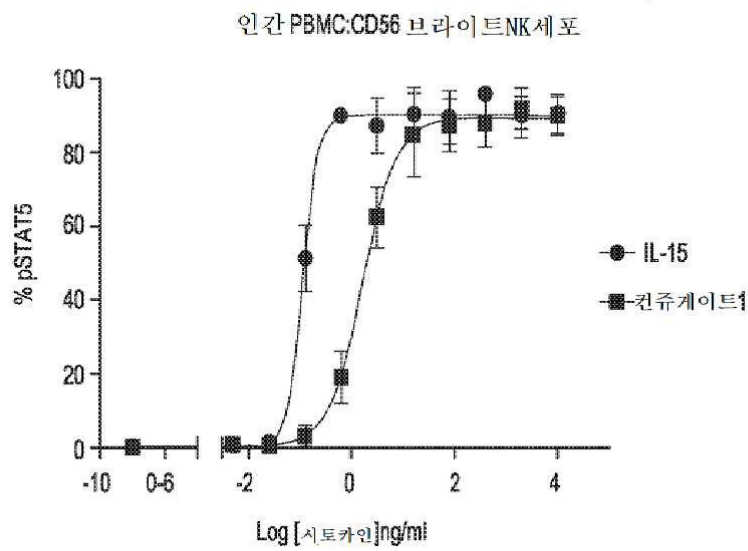
도면37b



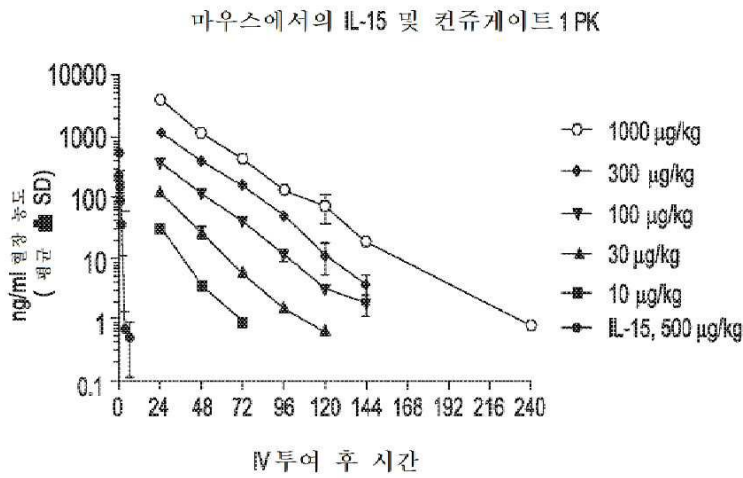
도면38a



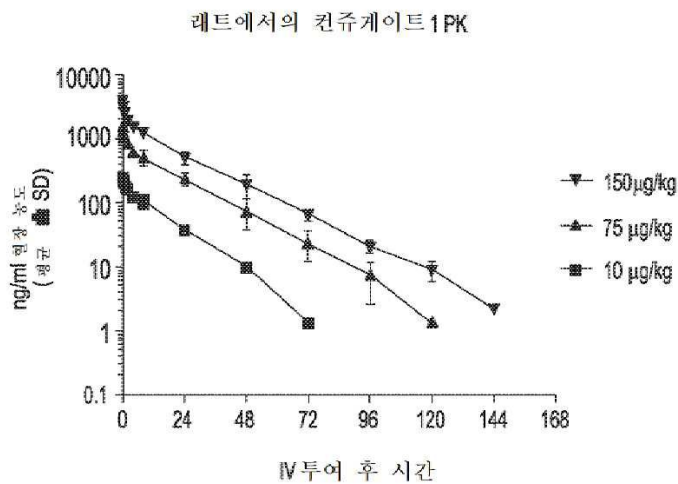
도면38b



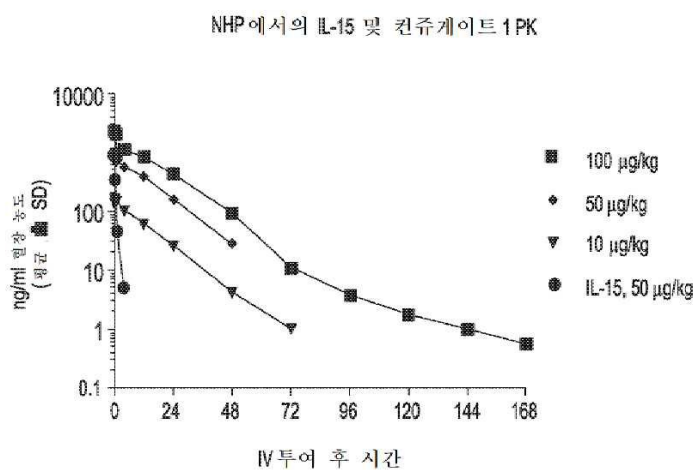
도면39



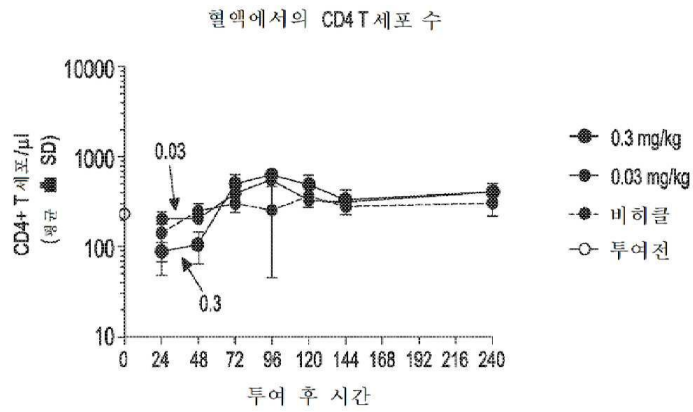
도면40



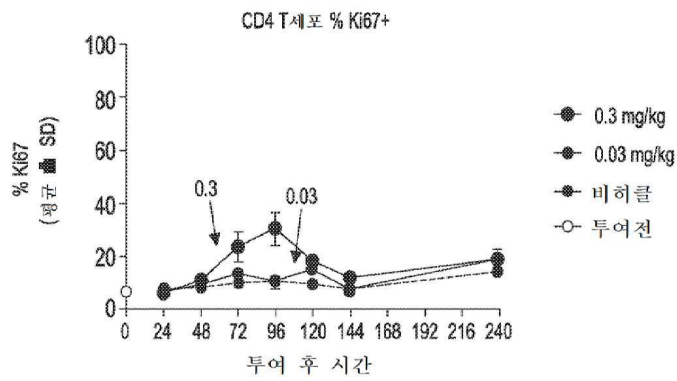
도면41



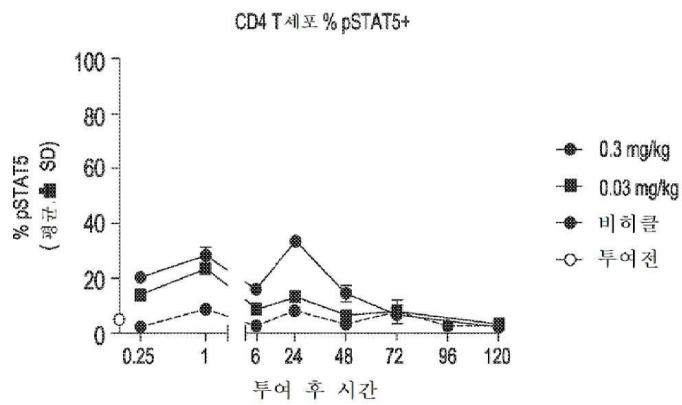
도면42a



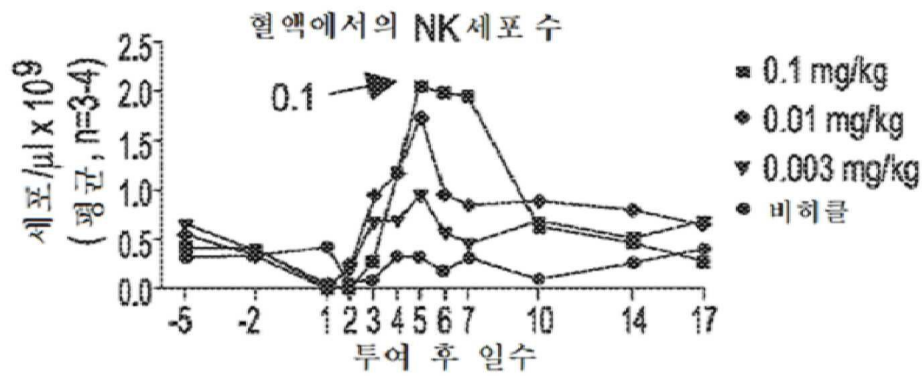
도면42b



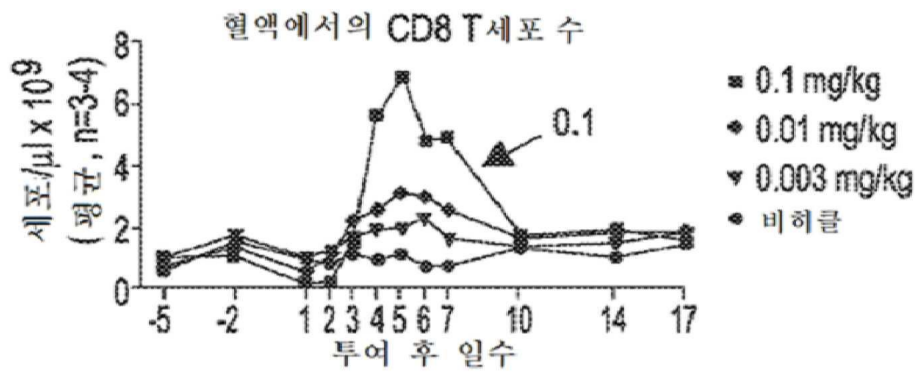
도면43



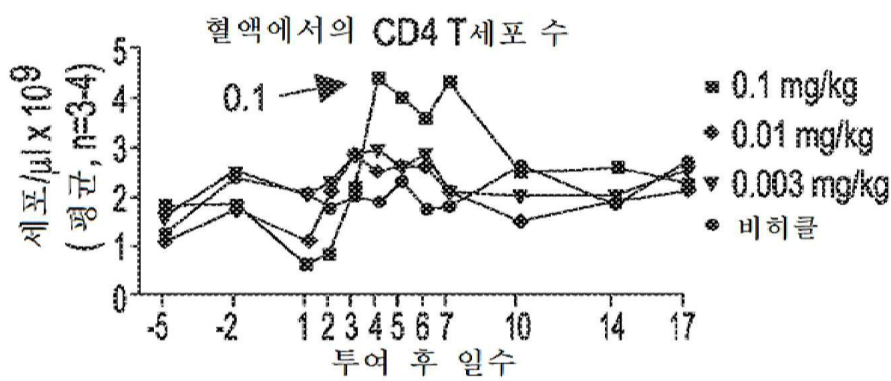
도면44a



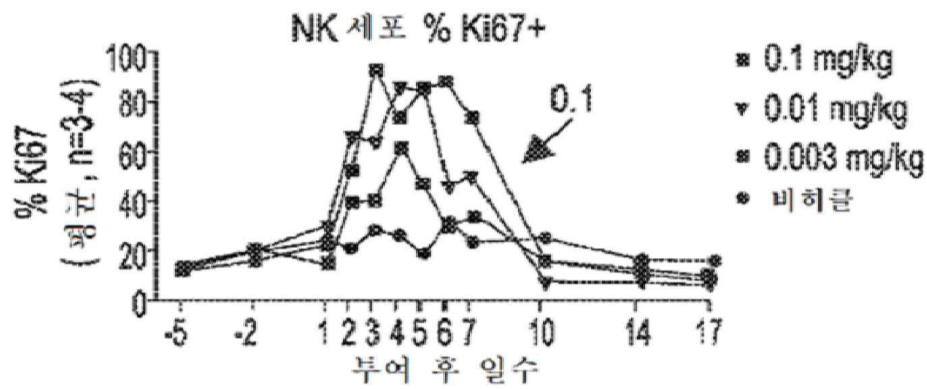
도면44b



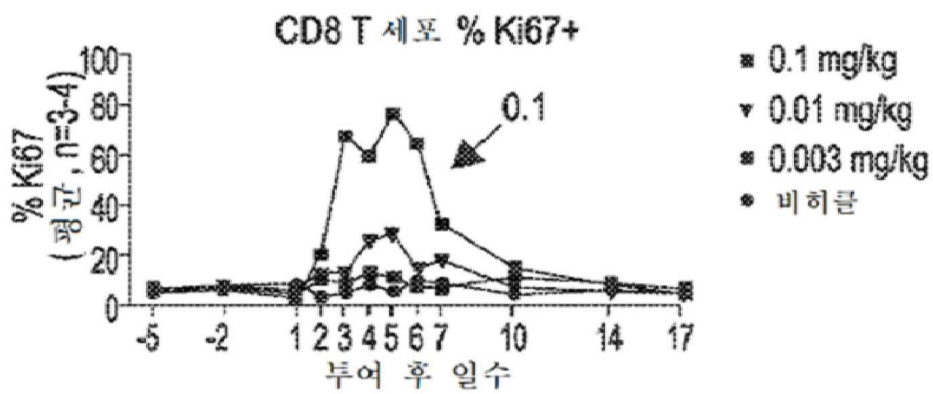
도면44c



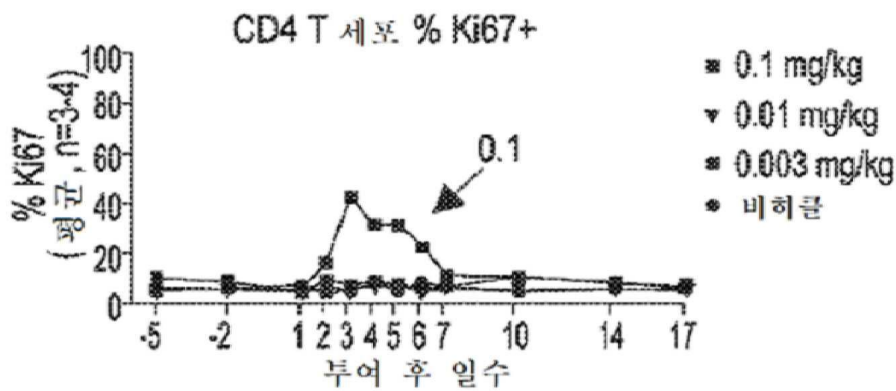
도면45a



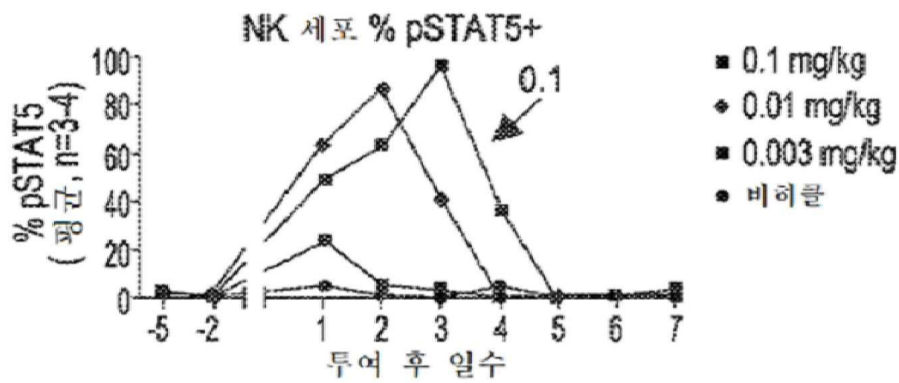
도면45b



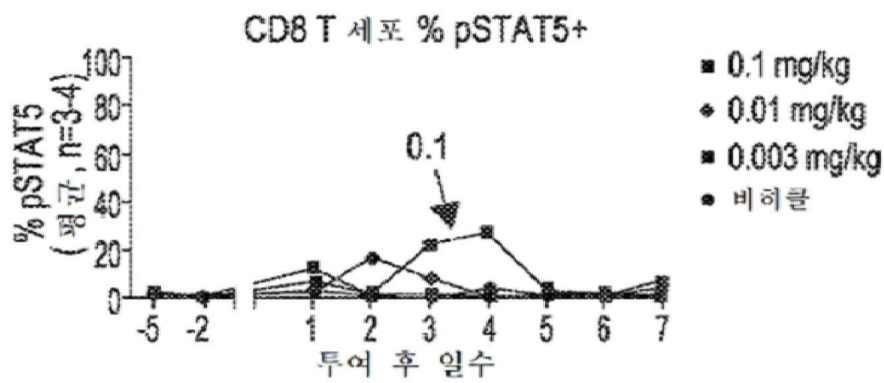
도면45c



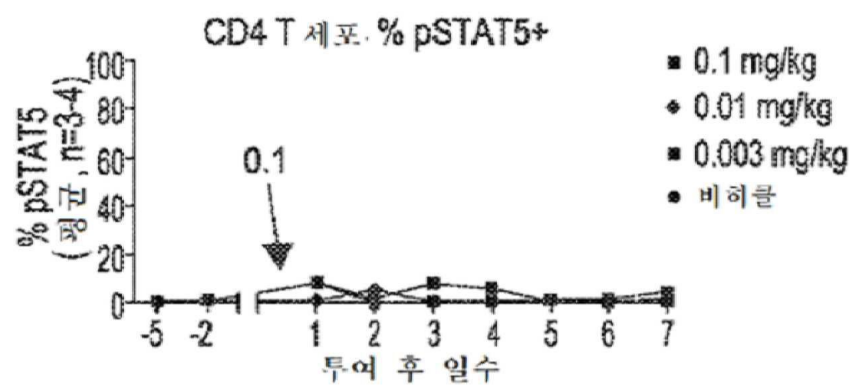
도면46a



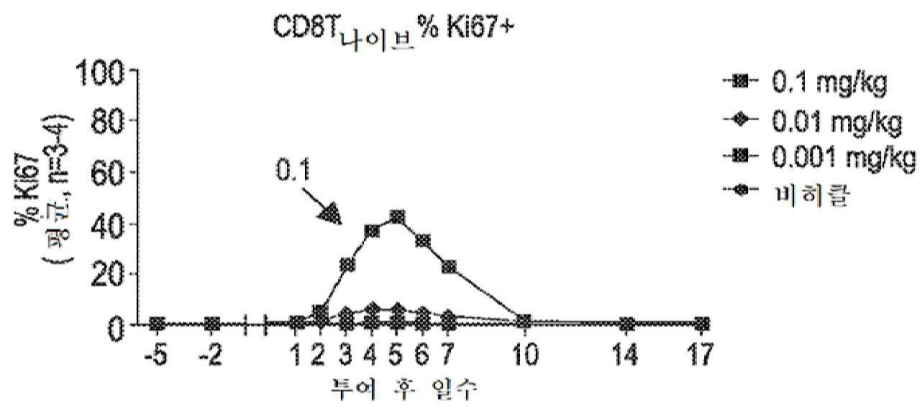
도면46b



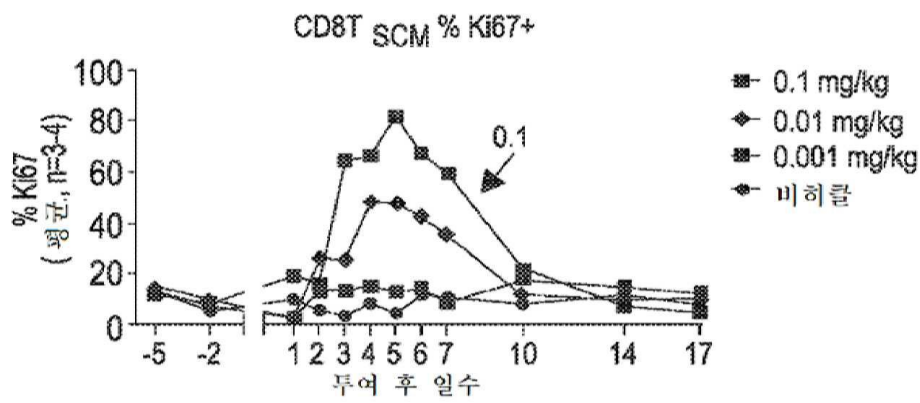
도면46c



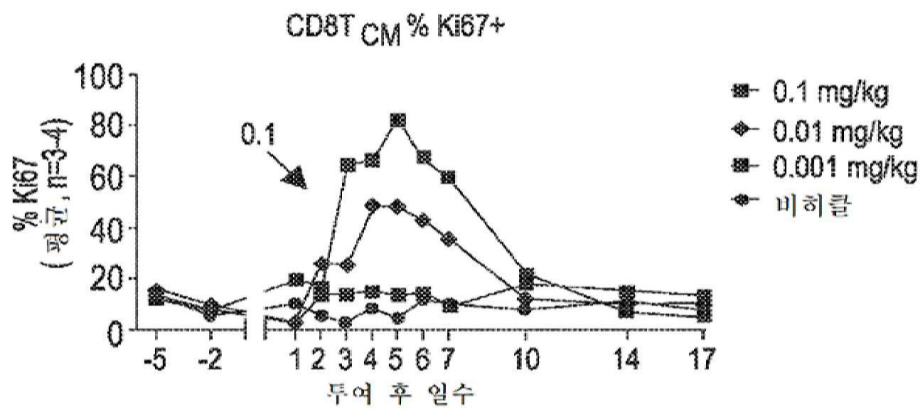
도면47a



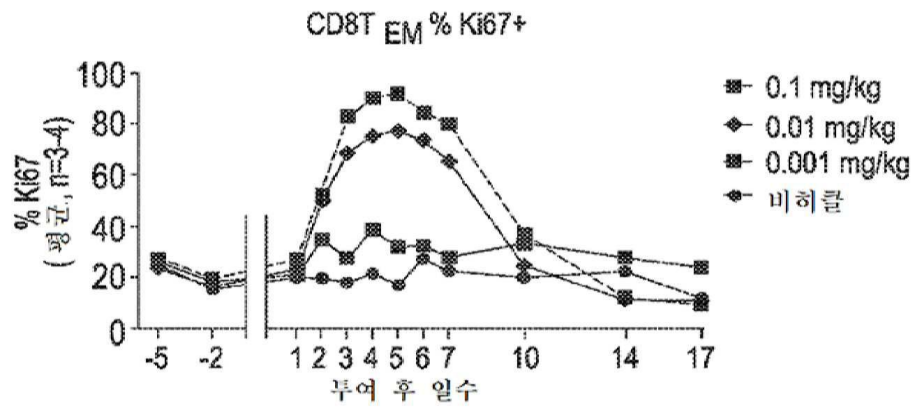
도면47b



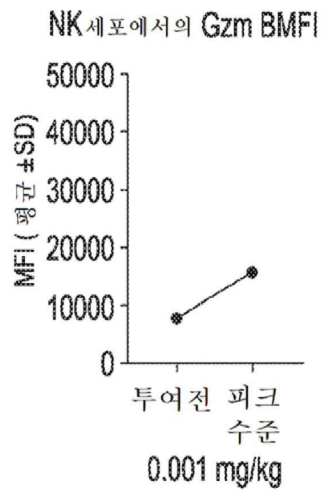
도면47c



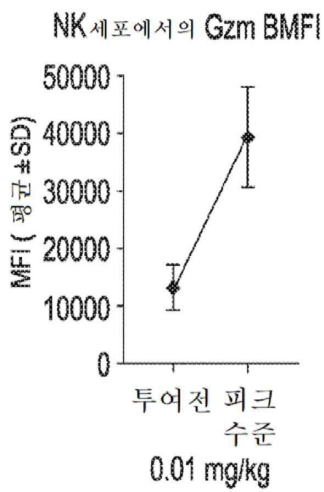
도면47d



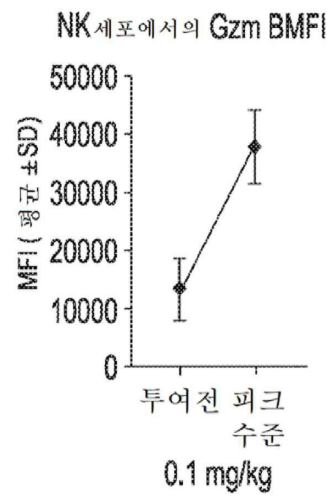
도면48a



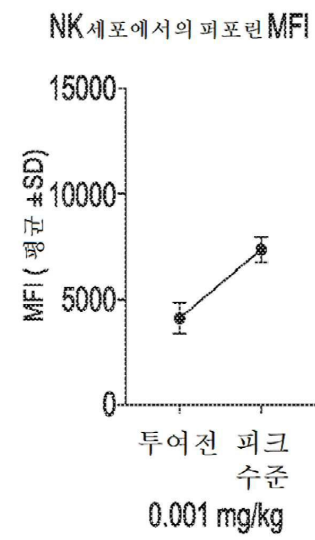
도면48b



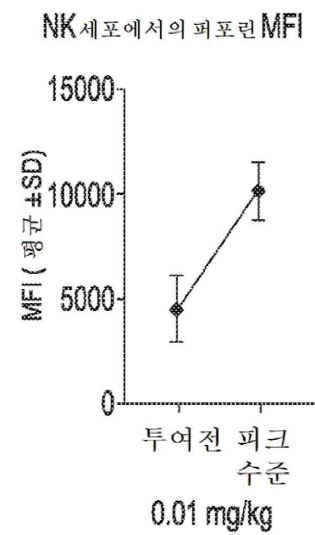
도면48c



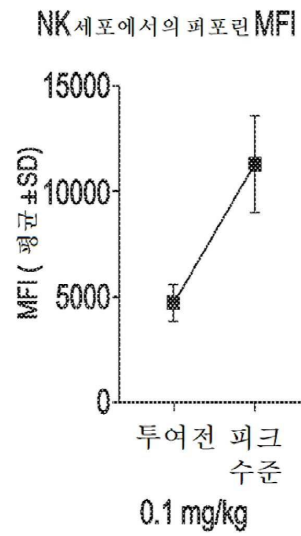
도면49a



도면49b



도면49c



서열 목록

- <110> NEKTAR THERAPEUTICS
- <120> LONG-ACTING INTERLEUKIN-15 RECEPTOR AGONISTS AND RELATED IMMUNOTHERAPEUTIC COMPOSITIONS AND METHODS
- <130> SHE0546.PCT
- <140> PCT/US2018/032817
- <141> 2018-05-15
- <150> 62/648,240
- <151> 2018-03-26
- <150> 62/582,186
- <151> 2017-11-06
- <150> 62/536,966
- <151> 2017-07-25
- <150> 62/506,494
- <151> 2017-05-15
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Ser

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80
Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn

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

100 105 110

Asn Thr Ser

115

 $\langle 210 \rangle$ 3

<211> 162

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145	150	155	160
Thr Ser			