(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0121773
(43) 공개일자 2019년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 38/2013 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7024673
(22) 출원일자(국제) 2018년03월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년08월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/020514
(87) 국제공개번호 WO 2018/160877
국제공개일자 2018년09월07일
(30) 우선권주장
62/465,506 2017년03월01일 미국(US)
62/480,971 2017년04월03일 미국(US)

(71) 출원인
넥타르 테라퓨틱스
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미션 베이 불러바드 455 스위트 100
더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미국 94607-5200 캘리포니아주 오클랜드 플랭크린 스트리트 1111 12층
(72) 발명자
체리치 데보라 에이치
미국 94706 캘리포니아주 올버니 테일러 스트리트 909
리바스 안토니
미국 90024 캘리포니아주 로스앤젤레스 윌셔 불러바드 10724
패리시 줄리아
미국 90025 캘리포니아주 로스앤젤레스 사우스 솔테어 애비뉴 1419
(74) 대리인
특허법인코리아나

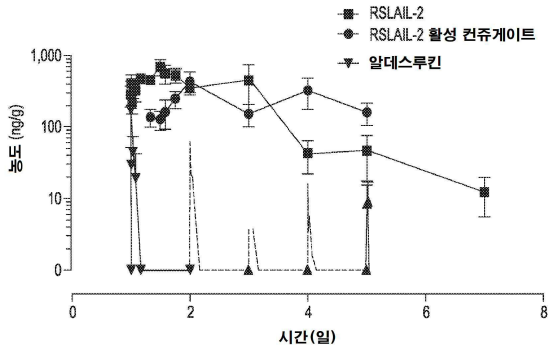
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **입양 세포 이식 요법과 조합된 인터루킨-2 수용체 알파, 베타 선택성 효현제를 이용한 면역요법적 종양 치료 방법**

(57) 요 약

입양 세포 이식 요법을 제공하고, 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향 효현제를 개인에게 투여함에 의한, 암 환자의 치료에 관한 방법 및 조성물이 제공된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/04 (2018.01)
C07K 14/55 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

암이 발병한 대상체의 치료 방법으로서,

(i) 대상체로부터 수집되고, 생체 외 배양 및 확장된 종양 특이적 숙주 T 세포를 그 대상체에게 투여하는 단계, 및

(ii) IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 대상체에게 투여하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii)는 순차적으로, 임의의 순서로, 또는 실질적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 단계 (i)은 단계 (ii) 전에 수행되는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 단계 (ii)는 단계 (i) 전에 수행되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii) 모두는 실질적으로 동시에 수행되는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 단계 (i) 및 단계 (ii) 모두는 치료 1일차에 수행되는 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 단계 (ii)는 치료 1일차 내지 7일차 중 어느 한 날에 수행되는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 과정에 걸쳐 수집, 배양 및 확장된 종양 특이적 숙주 T 세포의 대상체로의 단일 투여를 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 과정에 걸쳐 IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 대상체로의 다중 투여를 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 수집, 배양 및 확장된 종양 특이적 숙주 T 세포가 주입에 의해 투여되는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 특이적 숙주 T 세포는 종양 침윤성 림프구(TIL)인 방법.

청구항 12

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

청구항 13

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

청구항 14

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

청구항 15

제13항에 있어서, 암은 전이성인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 4 내지 7개의 폴리에틸렌글리콜 모이어티에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 4 내지 6개의 폴리에틸렌글리콜 모이어티에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함하는 방법.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 분지형인 방법.

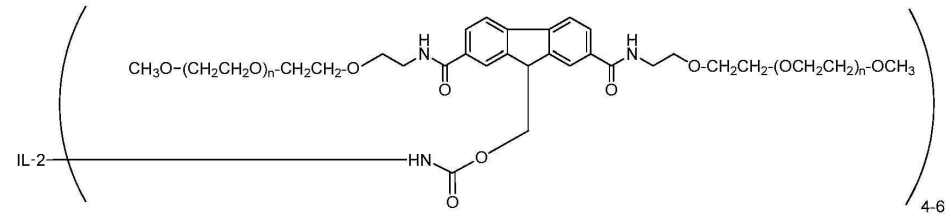
청구항 19

제18항에 있어서, 분지형 폴리에틸렌글리콜 모이어티는 중앙 플루오렌 고리의 2- 및 7- 위치로부터 연장된 폴리에틸렌글리콜 사슬을 포함하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 화학식 I에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 방법:

[화학식 I]



(식에서, IL-2는 인터루킨-2이고, 각각의 "n"은 독립적으로 약 3 내지 약 4000의 정수임).

청구항 21

제20항에 있어서, 각각의 "n"은 약 40 내지 약 550의 정수인 방법.

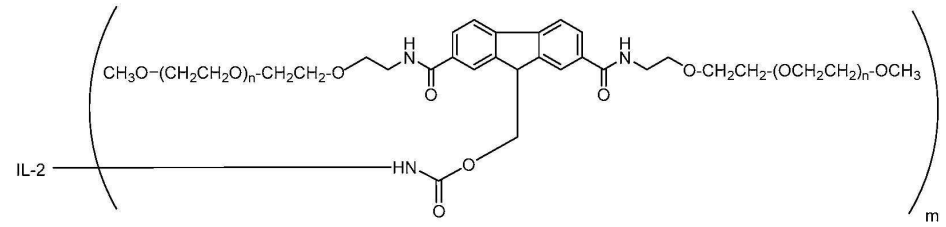
청구항 22

제21항에 있어서, 각각의 "n"은 약 227인 방법.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 약 10%(몰 양) 이하의 화학식 II에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 방법:

[화학식 II]



(식에서, IL-2는 인터루킨-2이고, "m"은 1, 2, 3, 7 및 >7로 이루어진 군으로부터 선택된 정수임).

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 I에 따른 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 IL-2에 방출 가능하게 부착된 평균 약 6개의 분지형 폴리에틸렌글리콜 모이어티를 갖는 방법.

청구항 25

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는, 대상체에게 수집, 배양 및 확장된 종양 특이적 숙주 T 세포를 투여한지 4일 내에 초기에 투여되는 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 주사에 의해 투여되는 방법.

청구항 27

제1항 내지 제13항 및 제15항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 본 방법은, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 초기 투여 후 적어도 10일차의 시점에 측정한 경우, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여 없이 단계 (i) 단독으로 대상체의 치료시 대상체의 종양 부위에 보유된 종양 특이적 이펙터 T 세포의 수와 비교하여, 또는 거의 동일한 정도의 IL-2 당량을 달성하기 위해 투여된 인터루킨-2의 투여와 조합된 단계 (i)로부터 수집, 배양 및 확장된 종양 특이적 T 세포로 대상체의 치료시 대상체의 종양 부위에 보유된 종양 특이적 이펙터 T 세포의 수와 비교하여, 대상체의 종양 부위에 보유된, 더 많은 수의 종양 특이적 이펙터 T 세포를 생성하는 데 유효한 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 시점은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 초기 투여 후 10, 11, 12, 13, 14 또는 15일차인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 단계 (i) 단독 또는 단계 (ii) 단독에 따라 수행되는 경우 관찰된 치료에 대한 반응보다 증진된 유리한 반응 치료를 제공하는 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 치료에 대한 유리한 반응은 적합한 동물 모델을 기준으로 하는 방법.

청구항 31

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 방법이, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여없이 단계 (i) 단독으로 대상체의 치료시, 또는 거의 동일한 정도의 IL-2 당량을 달성하기 위해 투여된 인터루킨-2의 투여와 조합된 단계 (i)로부터 수집, 배양 및 확장된 종양 특이적 T 세포로 대상체의 치료시에 관찰되는 것보다 증진된 양으로, 대상체의 종양 내 CD4+ Treg, CD25+ Treg, 및 FoxP3+ Treg로 이루어진 군으로부터 선택되는 조절 T 세포의 축적을 억제하는 데 유효한 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 조절 T 세포의 축적의 억제는 생체 내 암 모델에서 평가되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원들에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. §119(e) 하에, 2017년 3월 1일에 출원된 미국 가출원 62/465,506, 그리고 2017년 4월 3일에 출원된 미국 가출원 62/480,971에 대해 우선권의 이익을 주장하며, 이들의 개시 내용은 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **기술분야**

[0004] 본 출원은 (특히) 암 면역 요법 분야에 관한 것으로, 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향(즉, IL-2Rαβ 선택성) 효현제를 개인에게 투여하는 단계를 수반하는, 입양 세포 이식 요법(adoptive cell transfer therapy)을 제공함으로써 암이 발병한 개인의 치료를 포함한다.

배 경 기 술

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

[0006] 초기(1세대) 입양 세포 이식은 진행성 암이 발병한 환자의 치료를 위해 고용량의 IL-2를 갖는 림포카인-활성화 킬러(LAK) 세포를 이용하였지만, IL-2 단독 치료보다 우수하지 않은 것으로 나타났다(Rosenberg, S.A., *et al., Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 85 (8), 622-632 (1993)). 분석 결과, 확장된 LAK 세포는 어떠한 항종양 활성도 나타내지 않았다(Dudley, M.E., et al., *Seminars in Oncology*, Vol 34 (6), 524-531 (2007)).

[0007] 2세대 입양 세포 이식은 LAK 세포 대신 종양 침윤성 림프구(TIL)를 사용하였다. TIL은 종양 항원을 특이적으로 인식하여 악성 세포를 제거하는 능력을 증진시킬 수 있는 환자의 종양 내에 존재하는 T 세포이다. 그러나, 대부분의 암 환자에서, 자연 발생적 TIL은 통상적으로 수적으로 우세하거나 완전히 활성화되지 않거나 억제되기 때문에, 종양을 파괴하지 못한다. 대안적으로, 종양은 TIL에 의한 인식을 포함하여, 면역계에 의한 인식을 회피했을 수 있다. 결과적으로, TIL-입양 세포 이식의 주요 목적은 환자로부터 TIL을 분리한 후, 생체 외 자극 및 증식을 수행하여 다수의 활성화된 종양 특이적 T 세포를 생성하는 것이다. 이어서, 확장된 TIL은 환자에게 다시 주입된다. 전이성 흑색종에 대한 초기 TIL-ACT 시험에서, 환자는 TIL에 대한 자극 성장 인자로서 고용량의 정맥내 IL-2를 수반하는 자가 TIL로 치료 받았다. IL-2의 다면발현(pleiotropic) 성질 및 짧은 반감기는 제한된 생체 내 지속성(persistence)의 조절 및 이펙터 T 세포 모두의 성장을 허용한다. 반응 속도는 낮았으며, 순환에서 TIL의 지속성은 투여한지 1주일 후 겨우 0.1퍼센트였다(Rosenberg, S. A., *et al., New England Journal of Medicine,* Vol. 323 (9), 570-578 (1990)). 이펙터 T 세포의 좋지 않은 지속성 및 조절 TIL의 자극은 반응 결여에 기여했을 수 있다.

[0008] 상기 기술된 시험은 항종양 반응을 개선할 필요성을 나타내었다. 차세대 입양 세포 이식 연구에는 내인성 조절 T 세포를 억제하고 주입된 TIL에 대한 최적의 환경을 제공하기 위한 목적으로 환자의 림프구제거 전처리의 추가를 포함하였다. 그러나, 이들 이후의 연구는 저혈압, 폐울혈, 혈관 누출 증후군, 및 골수 억제를 포함한 관련된 환자 독성을 입증하였다(Dudley, M.E., *et al., Journal of Clinical Oncology,* Vol. 23 (10), 2346-2357 (2005)). 상기에 추가하여, 이러한 접근 방식의 또 다른 단점은 환자의 극히 높은 중도 탈락자 비율인데, 이는 주로 앞서 언급된 독성 및 반응 결여로 인한 것이었다. 또한, 확장된 T 세포의 개체군은, 조절 세포 및 이펙터 세포 모두가 무차별적으로 확장될 수 있기 때문에 논의 대상으로 남아 있다. 결국, 체내에서 이식된 세포의 지

속성 결여는 주요 문제로 남아 있다.

[0009] 특히 상기 진술된 과제들에도 불구하고, 암 치료를 위한 입양 세포 이식 임상 시험은 환자 등록이 계속되는데, 진행성 전이성 암에서는 관문 억제제(checkpoint inhibitor) 항체를 포함하는 유효한 치료법이 거의 없기 때문이다. 진행중인 입양 세포 이식 시험은 다양한 유형의 세포 확장제, 이식된 세포, 환자 컨디셔닝, 종양세포붕괴제(oncolytic agent)를 포함하고; 입양 세포 이식을 개선하기 위한 한 가지 접근법은 TIL 대신 유전자 변형된 말초 T 세포의 이식을 포함한다. TIL 프로토콜은 통상적으로 TIL 분리를 위한 종양 조직 절제를 위해, 환자를 수술하는 것을 필요로 하며; 대조적으로, T 세포 입양 세포 요법은 통상적으로 환자가 수술을 회피하는 것을 가능하게 하고, 유전자 변형을 위해 말초 T 세포를 수득하기 위하여 환자의 백혈구 성분 채집술만을 필요로 한다. 이러한 접근법은 어떤 종양 항원이 존재할 수 있는지에 대한 사전 지식을 필요로 한다. 또한, 오늘날까지 유전자조작된 T 세포 요법(CAR-T 또는 TCR)은 액체 종양에 대해서만 효과적이고, 고체 종양에 대해서는 효과적이지 않으며, T 세포 서브세트 개체군의 문제는 남아 있다. 고체 종양은 TIL 및 인터루킨-2에 대해서만 반응하였다. 이들 접근법에도, 확장된 세포 개체군은 조절, 헬퍼 및 이펙터 T 세포를 포함할 수 있기 때문에, 인터루킨-2에 의해 확장된 세포들의 개체군은 불명확하다. 이는 자연발생적인 인터루킨-2의 다면발현 성질로 인한 것이며, 이는 조절 및 이펙터 T 세포를 균등하게 확장할 수 있다.

[0010] 오늘날까지 다양한 플랫폼을 포함하는 유효한 입양 세포 이식 치료를 개발하는 데 있어서 상당한 노력이 있어 왔지만, 이러한 면역세포 치료 기반 접근법의 잠재성을 활용하기 위해 현재의 치료법의 하나 이상의 단점들을 극복하는, 새롭고 더욱 유효한 면역 요법적 입양 세포 이식 전략 및 관련 치료 요법을 제공할 필요가 남아 있다. 따라서, 본 발명의 개시 내용은 확장된 T 세포 개체군을 더욱 큰 지속성을 갖는 종양-사멸 표현형으로 편향시킬 수 있는 입양 세포 이식을 이용하는 새롭고 유효한 암 면역 요법을 제공함으로써, 이러한 요구와 기타 요구를 해결하고자 하는 것이다.

발명의 내용

[0011] 제1 양태에서, IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여와 조합된, 암이 발병한 대상체로의 입양 세포 이식을 포함하는 방법이 본 명세서에서 제공되며, 이는 아래에서 더욱 상세히 기술된다. 하나 이상의 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 우선적으로 이펙터 T 세포를 확장시키는 데 유효하다. 본 개시 내용은, 순차적으로, 임의의 순서로, 또는 실질적으로 동시에 투여되는, 입양 세포 요법 및 이펙터 T 세포의 지속 작용성 편향 IL-2Rβ 활성화 효현제의 하나 이상의 사이클 및/또는 도스를 포함하는 병용 치료 요법이 일부 대상체에서 암 치료에 특히 효과적일 수 있고/있거나, 면역 세포의 활성화 및/또는 수를 개시하거나, 가능하게 하거나, 증가시키거나, 증진시키거나 연장할 수 있거나, 또는 어느 하나의 단일 면역 요법적 접근 단독에 비해 증진된 정도로, 액체 및 고형암을 포함한 암 세포에 대해 유리한 반응(예를 들어, 해당될 경우, 안정화, 퇴화, 축소, 괴사 등)을 유도할 수 있다는 인식으로부터, 적어도 부분적으로 유래한다.

[0012] 제2 양태에서, 입양 세포 요법 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 포함하는, 암의 치료를 위한 병용 요법이 본 명세서에서 제공된다.

[0013] 제3 양태에서, 입양 세포 요법의 치료 효과의 증진 방법이 제공되며, 상기 방법은 암이 발병한 대상체에게 입양 세포 요법을 제공하는 단계, 및 대상체에게 IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 입양 세포 요법에 대한 대상체의 반응을 개선시키는 데 유효하다.

[0014] 또한 제4 양태에서, 암 치료를 받고 있는 대상체에서 조절 T 세포(Treg)의 축적을 억제하는 방법이 제공되며, 이는 대상체 세포 내로 (예를 들어, 대상체의 혈액 또는 종양으로부터 수집되고, 시험관 내에서 확장된) T 세포를 주입하는 단계, 및 대상체에게 IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 투여하는 단계를 포함한다. 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 암 종양을 치료하는 데 유효한 양으로 투여되며, 여기서 이 치료는, 예를 들어 마우스 또는 기타 적합한 생체 내 암 모델에서 평가되는 경우, 입양 세포 이식과 조합된 IL-2R 효현제의 비-지속 작용성 버전의 투여시 관찰되는 것에 비해 또는 어느 하나의 단일 면역-종양 치료 단독으로 치료(즉, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제 또는 입양 세포 이식의 단독 투여)시 관찰되는 것에 비해 증진된 양으로, 종양 내 CD4+ Treg, CD25+ Treg, 및 FoxP3+ Treg로 이루어진 군으로부터 선택된 조절 T 세포의 축적을 억제하는 데 유효하다.

[0015] 명확성을 위해, 투여 순서와 관련하여, 용어 "투여"는 이 경우, 입양 세포 또는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 전달을 지칭하는 데 사용되며, 입양 세포 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 동시에 또는 순차적으로

그리고 임의의 순서로 투여될 수 있다. 나아가, 치료는 단일 사이클의 요법을 포함할 수 있거나, 다중 사이클을 포함할 수 있다. 입양 세포 이식 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여를 포함하는 요법의 초기 사이클 후, 추가 라운드(round)의 치료는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여와 조합된 입양 세포 이식, 또는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여가 수반되지 않은 입양 세포 요법, 또는 입양 세포 이식이 수반되지 않은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여를 포함할 수 있다.

[0016] 하기 구현예들은 상기 기술된 각각의 양태들에 균등하게 적용되고, 달리 표시되지 않는 한, 적용가능한 경우 단독으로 및 조합으로 고려되어야 함을 의미하고자 한다.

[0017] 하나 이상의 구현예들에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0018] 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 암은 고형암이다. 예를 들어 하나 이상의 구현예들에서, 암은 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 골암, 결장직장암, 위암, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 갑상샘암, 신장암, 담관의 암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암 및 부신피질암으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0019] 또한 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 암은 흑색종, 신장암, 비소세포 폐암, 유방암, 방광암, 두경부암, 및 결장암으로부터 선택된다.

[0020] 하나 이상의 특정 구현예들에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다.

[0021] 하나 이상의 구현예들에서, 고형 암성 종양 치료시 본 방법은 단일 사이클의 치료 이후에 평가되었을 때 고형 종양 크기의 적어도 약 25% 감소를 달성하는 데 유효하다.

[0022] 일부 추가의 구현예들에서, 암은 전이성이다.

[0023] 일부 추가의 구현예들에서, 암은 혈액 암과 같은 액체 암이다. 일부 구현예들에서, 암은 림프종 또는 백혈병이다. 하나 이상의 관련 구현예들에서, 암은 호지킨 및 비호지킨 림프종으로부터 선택된 백혈병이다.

[0024] 하나 이상의 구현예들에서, 입양 세포 요법은 입양 T 세포 또는 NK 세포의 주입을 포함한다.

[0025] 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 입양 세포 요법은 종양 침윤성 림프구(TIL)의 주입을 포함한다.

[0026] 하나 이상의 구현예들에서, 세포는 자가 세포이다.

[0027] 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 세포는 동종이계 세포이다. 일부 구현예들에서, 동종이계 세포는 종양 항원에 대해 표적화된다.

[0028] 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 세포는 유전자 조작된다.

[0029] 일부 구현예들에서, 입양 세포 요법은 IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여 전에 제공된다.

[0030] 몇몇 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 폴리에틸렌글리콜에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함한다. 또 다른 몇몇 추가의 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 4, 5 및 6개, 또는 4, 5, 6 및 7개의 폴리에틸렌글리콜 중합체에 방출가능하도록 공유 부착된 인터루킨-2, 예컨대 알데스루킨을 포함한다. 또 다른 몇몇 추가의 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 평균 약 6개의 폴리에틸렌글리콜 중합체에 방출가능하도록 공유 부착된 알데스루킨을 포함한다. 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 알데스루킨에 방출가능하도록 공유 부착된 폴리에틸렌글리콜 중합체는 분지형 중합체이다.

[0031] 일부 구현예들에서, 입양 세포 요법은, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여와 함께, 1회 투여되고(단일 라운드의 치료), 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여의 추가의 라운드가 뒤따른다.

[0032] 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제에 관한 하나 이상의 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 약학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 포함하는 조성물 내에 포함된다.

[0033] 추가의 양태들 및 구현예들은 하기 상세한 설명 및 청구범위에 기재되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] **도 1a 내지 도 1h.** 이들 도면은, 실시예 2에 상세히 기술된 바와 같이, 예시적인 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제, RSLAIL-2(하기에 기재됨, 여기서 "RSLAIL-2"는 방출가능하게 페길화된 인터루킨-2 분자를 지칭함)를 1회

투여하거나 또는 알데스루킨을 매일 투여하여 5회 투여하는 처리를 받은 B16F10 마우스 흑색종 모델에서의 면역 세포 변경을 도시한 것이다. 표시된 시점에 종양 침윤성 림프구(TIL)가 동물로부터 분리되었으며, 면역 세포 집단은 유세포 분석에 의해 평가되었다. 각각의 데이터 점은 개별 마우스 종양을 나타내고, 선은 평균을 나타낸다. 데이터는 2회 내지 4회의 독립된 연구 결과와 각 시점에서의 3회 내지 4회의 중복 실험 결과를 합한 것이다. **도 1a**는 비히클(○), 알데스루킨(■) 및 RSLAIL-2(▲) 각각을 처리한 후 다양한 시점(5, 7 및 10일)에서 종양 중 CD8 T 세포의 총 백분율을 나타내는 것이고; **도 1b**는 비히클(○), 알데스루킨(■) 및 RSLAIL-2(▲) 각각을 처리한 후 다양한 시점에서 종양 중 기억 CD8 T 세포의 백분율을 나타내는 것이며; **도 1c**는 비히클(○), 알데스루킨(■) 및 RSLAIL-2(▲) 각각을 처리한 후 다양한 시점(5, 7 및 10일)에서 종양 중 활성화된 NK 세포의 백분율을 나타내는 것이고; **도 1d** 및 **1e**는 처리 후 다양한 시점(5, 7 및 10일)에서 종양 중 CD4 T 세포의 백분율을 나타내는 것이며; **도 1f**는 처리 후 다양한 시점(5, 7 및 10일)에서 종양 중 CD4 Treg 세포의 백분율을 나타내는 것이고; **도 1g**는 처리 후 총 CD4 세포 중 Treg 세포의 백분율을 나타내는 것이며; **도 1h**는 처리 후 총 CD8 세포 대 Treg 세포의 비를 제공한다.

도 2는 실시예 3에 기술된 바와 같이, 비변형 IL-1(알데스루킨, ▼)의 종양 약동학에 비한, RSLAIL-2(■)(및 이의 방출된 활성 컨쥬게이션된 IL-2 형태(●))의 종양 약동학을 나타내는 그래프이다.

도 3은 실시예 5에 사용된 투약 전략을 기술한 개략도로서, pmel-1 입양 세포 이식와 조합된 RSLAIL-2 또는 IL-2의 항-종양 활성이 공격적인 뮤린 흑색종 모델에서 연구되었다.

도 4는 실시예 5에 기술된 연구에 대해, SEM에 의해 결정된 평균 종양 부피(㎣) 대 시간의 플롯을 제공한다. 투약법 개략도가 수평 축 아래에 화살표로 제공된다. 범례: ●: ACT + 비히클; ■: ACT + IL-2; ▲: ACT + RSLAIL-2. **도 4**에 나타낸 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 입양 세포 이식과 조합하여 투여된 경우, RSLAIL-2는 입양 세포 이식과 조합된 IL-2와 비교하여, 덜 빈번한 투여로(IL-2와 조합된 ACT와 비교하여, $p<0.0001$); (# 비히클과 비교하여, $p<0.0001$, (본페로니(Bonferroni) 검정을 이용하여 쌍별 비교)) 현저한 종양 성장 지연을 제공하였다.

도 5는 실시예 5에 기재된 연구에 대해 N=12/군을 이용하여, 1000 ㎣의 종양 부피를 달성하는 시간을 보간(interpolating)함으로써 각각의 종양 성장 곡선에 대해 평가된 종양 성장 지연을 도시한 것이다(* ACT + IL-2에 비교하여, $p<0.0001$; # 비히클과 비교하여, $p<0.0001$ (로그 순위(Log-Rank) 멘텔-콕스(Mantel-Cox) 검정)).

도 6a 및 도 6b는, 생체 내 생물발광 이미징 실험을 위해, 실시예 5에 기재된 바와 같은 루시퍼라제를 발현하는 pmel-1 T 세포의 입양 세포 이식 후, 19일차까지 비장(도 6a) 및 종양(도 6b)의 관심 영역(ROI)에서 일련의 이미지들의 정량화를 제공한다(픽셀 당 수). 도면의 범례는 **도 6a 및 도 6b** 모두에 대해 동일하다. 맨 위의 플롯, ▲: ACT + RSLAIL-2로 나타낸 바와 같음; 중간 플롯, ■: ACT + IL-2; 맨 아래 플롯, ●: ACT + 비히클. 이들 이미지는 인터루킨-2인 알데스루킨보다는, RSLAIL-2과 같은 제제의 투여와 조합된 입양 세포 이식 요법의 효과를 입증하는데, IL-2(알데스루킨)의 다중 처리에도 반응이 약화되는 ACT/IL-2 요법과 달리, 지속적인 반응이 ACT/RSLAIL-2 병용 요법으로 관찰되었기 때문이다.

도 7a 내지 도 7c는 실시예 5에 기술된 바와 같은 다양한 처리군에 대한 종양에서의 면역 세포의 수의 플롯이며, 여기서 종양 내 조절 T 세포 및 CD8+ T 세포에 대한 입양 세포 이식 병용 요법(즉, IL-2 또는 RSLAIL-2, 또는 대조구 비히클과의 병용 요법)의 효과를 유세포 분석에 의해 평가하였다. 구체적으로, **도 7a**는 처리군의 각각에 대해 종양에서 Thy 1.1 CD8 세포의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 7b**는 처리군 각각에 대해 종양에서 CD4 Treg의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 7c**는 상기 기술된 바와 같이, 처리군 각각에 대해 종양에서 CD8 세포 대 Treg의 수의 비를 제공한다. 이들 데이터는 ACT + RSLAIL-2 조합의 경우 비장에서 관찰된 것보다 더욱 큰, 종양에서의 CD8/Treg 세포 비를 도시한 것이며, 이는 정상 조직이 현저한 영향을 받지 않았음을 시사한다. 나아가, ACT + RSLAIL-2 조합의 경우, CD8/Treg 비는 RSLAIL-2를 더 적게 투여하면서, ACT + IL-2 조합에서 달성된 것보다 실질적으로 더 높다.

도 8a 내지 도 8c는 실시예 5에 상술된 바와 같이, 유세포 분석에 의해 평가됨에 따라, 비장에서 조절 T 세포 및 CD8+ T 세포에 대한 ACT 병용 요법(즉, IL-2 또는 RSLAIL-2, 또는 대조구 비히클과의 병용 요법)의 효과를 도시한 것이다. 구체적으로, **도 8a**는 처리군 각각에 대해 비장에서 Thy 1.1 CD8 세포의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 8b**는 처리군 각각에 대해 비장에서 CD4 Treg의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT +

IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 8c**는 상기 기술된 바와 같은 각각의 처리군에 대해 비장에서 CD8 세포 대 Treg의 수의 비를 제공한다.

도 9는 실시예 5에 기술된 바와 같은 각각의 처리군에 대한 처리 후 5일차에 비장 세포의 회복을 나타내는 그래프이다.

도 10은 실시예 5에 기술된 바와 같은 입양 세포 이식 후 IL-2 또는 RSLAIL-2의 투여 후 12일차에 종양의 IHC (면역조직화학)이다. 면역조직화학적 염색은 뮤린 항-CD8 항체를 이용하여 포르말린-고정된/파라핀 매립된 조직 상에서 수행되었다; HALO 이미지 분석 소프트웨어(Indica Labs, New Mexico)를 이용하여 분석을 수행하였다. 도면은 그룹 당 3 마리의 상이한 마우스의 종양에서 CD8 침투를 보여준다. 제1 컬럼("pos")는 CD8 염색을 보여주며, 제2 컬럼("pos halo")은 HALO 소프트웨어에 의해 분석된 슬라이드이며, 여기서 컬러 버전의 경우, 푸른색 점은 음성 세포이고, 황색 내지 적색 점은 CD8 양성 세포이고(황색은 CD8 발현이 낮고, 적색은 높음), 제3 컬럼은 CD8 T 세포에 대해 양성인 영역의 5X 배율이다. 컬럼 4 및 컬럼 5는 각각 항체 항-CD8의 음성 염색, 정상 염색 및 HALO 분석이다. 컬럼 6은 H&E 염색이다. 컬럼 1에서 어두운 영역은, ACT + RSLAIL-2 병용 요법에 대한 컬러 버전에서 컬럼 2에서 황색 및 적색 점에 상응한다. 이 도면은 두 개의 군 사이에서 CD8 발현에서 상당한 차이를 입증하며, CD8 발현 수준은 ACT + RSLAIL-2 병용 요법의 경우 현저히 더욱 높았다. IHC는, 비-중합체 변형된 IL-2, 알데스루킨을 이용한 처리와 비교하여, 지속 작용성 편향 IL-2Rβ-인터루킨-2(RSLAIL-2)를 이용한 처리의 경우에서의 종양 내 CD8 T 세포의 지속성을 도시한 것이다.

도 11은 실시예 5에 기술된 바와 같은 입양 세포 이식 후, IL-2(알데스루킨) 또는 RSLAIL-2의 1회 도스 후 9일차에 조직-손상 CD8 T 세포의 결여를 보여주는 정상의 비종양 조직(신장 및 간)의 IHC이다. 면역조직화학적 염색은 뮤린 항-CD8 항체를 이용하여 포르말린-고정/파라핀 매립된 조직 상에서 수행되었으며; 분석은 HALO 이미지 분석 소프트웨어(Indica Labs, New Mexico)를 이용하여 수행되었다.

도 12는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 제조에서 사용되는 예시적인 인터루킨-2 서열을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 문맥에서 달리 명확하게 지시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0036] 본 개시 내용의 특정의 특성을 기술하고 청구함에 있어서, 다음의 용어는 달리 지정되지 않는 한 이하에 기술된 정의에 따라 사용될 것이다.

[0037] "수용성, 비-펩타이드 중합체"는 실온에서 수 중에 적어도 35%(중량 기준) 가용성인 중합체를 지칭한다. 그러나, 바람직한 수용성 비-펩타이드 중합체는, 바람직하게 70%(중량 기준)를 초과하고, 더 바람직하게는 95%(중량 기준)를 초과하여 수 중에서 가용성이다. 통상적으로 여과되지 않은 "수용성" 중합체의 수성 제조물은 여과 후 동일 용액이 투과시키는 광선 양의 적어도 75%를 투과시킨다. 바람직하게 이처럼 여과되지 않은 수성 제조물은 여과 후 동일 용액이 투과시키는 광선 양의 적어도 95%를 투과시킨다. 수 중에서 적어도 95%(중량 기준) 가용성이거나 또는 수 중에서 완전히 가용성인 수용성 중합체가 가장 바람직하다. "비펩타이드성"인 것에 대하여, 중합체는 그것이 아미노산 잔기의 35%(중량 기준) 미만을 함유할 때 비펩타이드성이다.

[0038] 용어 "단량체", "단량체 서브유닛" 및 "단량체 단위"는 본 명세서에서 상호호환적으로 사용되며, 중합체의 기본 구조 반복 단위 중 하나를 지칭한다. 동종중합체의 경우에, 단일 반복 구조 단위는 중합체를 형성한다. 공중합체의 경우에, 2개 이상의 구조적 단위가 (패턴으로 또는 무작위로) 반복되어 중합체를 형성한다. 본 개시 내용과 관련하여 사용된 바람직한 중합체는 동종중합체이다. 수용성, 비펩타이드성 중합체는 연속으로 부착된 하나 이상의 단량체를 포함하여 단량체의 사슬을 형성한다.

[0039] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "PEG" 또는 "폴리에틸렌글리콜"은 임의의 수용성 폴리(에틸렌옥사이드)를 포함하는 것으로 의미된다. 달리 나타내지 않는 한, "PEG 중합체" 또는 폴리에틸렌글리콜은, 중합체가, 예를 들어 컨쥬게이션을 위해 별개의 말단 캡핑 모이어티 또는 작용기를 함유할 수도 있지만, 실질적으로 모든(바람직하게는 모든) 단량체 서브유닛이 에틸렌옥사이드 서브유닛인 것이다. 본 개시 내용에서 사용하기 위한 PEG 중합체는 2가지의 구조, 즉 말단의 산소(들)가, 예를 들어 합성 전환 동안 대체되었는지 여부에 따라서 "$-(CH_2CH_2O)_n-$" 또는 "$-(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2-$" 중 하나를 포함할 것이다. 상기 진술한 바와 같이, PEG 중합체에 대해, 변수(n)는 통상적으로 약 3 내지 4000의 범위에 있고, 말단기 및 전반적인 PEG의 구조는 다를 수 있다.

[0040] 중합체의 기하학적 구조 또는 전체 구조와 관련하여 "분지형"은 중합체가, 분지점 또는 중심의 구조적 특성으로부터 연장되는 중합체 "팔(arm)" 또는 "사슬"을 2개 이상 가지는 상태를 지칭한다.

[0041] "생리학적으로 분열가능한" 또는 "가수분해가능한" 또는 "분해가능한" 결합은 생리학적 조건에서, 그리고 임의의 적합한 가수분해 방법으로 물과 통상적으로 반응하는(즉, 가수분해됨) 상대적으로 불안정한 결합이다. 결합이 수 중에서 가수분해하는 경향은 소정의 분자 내에서 두 개의 원자를 연결하는 연결기의 일반적인 유형뿐만 아니라, 이들 원자에 부착된 치환기 및 분자의 전체 구조에 따라서도 달라질 수 있다. 적절한, 가수분해에 불안정적인 또는 약한 결합은 통상적으로 카복실산에스테르, 인산에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩타이드, 올리고뉴클레오타이드, 티오에스테르 및 탄산염을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0042] "효소로 분해가능한 결합"은 하나 이상의 효소에 의해 분해되는 결합을 의미한다.

[0043] "안정적인" 연결 또는 결합은 수 중에서 실질적으로 안정적이며, 즉 장기간의 시간에 걸쳐 임의의 주목할 만한 정도로 생리적 조건 하에서 가수분해를 겪지 않는 화학적 결합을 지칭한다. 가수분해에 안정적인 연결의 예는 일반적으로 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 사슬에서), 에테르, 아미드, 아민 등을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 일반적으로, 안정적인 연결은 생리적 조건 하에서 1일당 약 1 내지 2% 미만의 가수분해율을 나타내는 것이다. 대표적인 화학적 결합의 가수분해율은 대부분의 표준 화학 교재에서 찾을 수 있다.

[0044] 예를 들어, 인터루킨-2와 같은 활성 모이어티에 공유적으로 방출가능하게 부착된 폴리에틸렌글리콜 모이어티와 관련하여, 공유 "방출가능한" 연결기는, 임의의 적절한 메커니즘에 의해 활성 모이어티로부터 폴리에틸렌글리콜 모이어티를 방출 또는 분리하는 것(즉, 탈페길화)이다.

[0045] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "암 치료"는 절대적인 용어로 의도되지 않으며, 예를 들어 종양의 크기 또는 암 세포의 수를 감소시키는 것, 암이 완화되는 것, 또는 암 세포의 크기 또는 세포 수의 성장을 방지하는 것 등을 포함할 수 있다. 일부 상황에서, 본 개시 내용에 따른 치료는 개선된 예후로 이어진다.

[0046] 본 명세서에 사용된 바와 같은 어구 "치료를 필요로 하는 대상체"는 암으로 진단된 개인 또는 대상체를 지칭한다.

[0047] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "증진"은 예를 들어, 증진된 반응과 관련하여, 주어진 기준선과 비교하여, 예를 들어 본 명세서에 개시된 바와 같은 치료에 반응하는 대상체 또는 종양 세포의 개선된 능력을 지칭한다. 예를 들어, 증진된 반응은, 치료에 대한 반응성의 임의의 하나 이상의 지시자를 기준으로, 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 이상의 반응성에서의 증가를 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이 "증진"은 또한 예를 들어, 그러한 비교에 대한 주어진 기준과 비교하여, 치료에 유리하게 반응하는 대상체의 수를 증진시키는 것을 지칭할 수 있다.

[0048] 어구 "치료적으로 유효한", "치료적 유효량", "유효량" 또는 "유효한 양"은, 원하는 생리학적 반응을 촉진시키기에 충분한 양 또는 투여량을 지칭하며, 예컨대 이에 제한되지는 않지만 T 세포 반응을 촉진시키기에 충분한 양 또는 투여량을 지칭한다.

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

[0050] "약학적으로 허용가능한 부형제" 또는 "약학적으로 허용가능한 담체"는 대상체에게 유의적으로 독성학적 부작용을 전혀 야기하지 않고 본원에 기술된 조성물에 포함될 수 있는 성분을 지칭한다.

[0051] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "환자" 또는 "대상체"란, 본원에 제공된 바와 같은 화합물, 조성물 또는 이것들의 조합의 투여에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 병태, 예컨대 암을 앓고 있거나 그러한 병태에 걸리기 쉬운, 살아있는 유기체를 지칭하며, 인간과 동물을 둘 다 포함한다. 대상체로서는 포유동물(예컨대, 마우스, 원숭이, 말, 소, 돼지, 개, 고양이 등)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 인간이다.

[0052] 개관

[0053] 유효한 항종양 반응을 유도하는 데 유망한 요법이기는 하지만, 입양 세포 요법 후에, 암 종양은 종종 초기 반응 후 재발한다. 또한, 그러한 자극제는 이펙터 및 조절 T 세포를 모두 자극할 수 있지만, 입양 T 세포 이식에 대한 현재의 프로토콜은 T 세포 증식을 자극하고 유지하기 위하여 일반적으로 시토카인 또는 기타 제제와 같은 면역 자극제를 필요로 한다. 현재의 입양 세포 이식 전략과 관련된 단점들 중 적어도 일부를 해결하려는 노력으로, 본 명세서에서는 암이 발병한 대상체에게 생체 외 확장된 종양 반응성 T 세포 및 IL-2Rβ 활성화량만

큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 고용량의 IL-2와 같은 시토카인이 오랫동안 입양 세포 이식과 조합되어 사용되어 왔지만, 그러한 치료는 모세혈관 누출 증후군, 주입된 세포의 지속성 부족, 및 낮은 반응 속도와 같은 보고된 환자 독성을 초래했다. 또한, 임상적으로 승인된 IL-2는, IL-2Rβγ 및 IL-2Rαβγ 복합체 각각의 결합을 통해, 종양-사멸 CD8+ 이펙터 T 세포(CD8T) 및 조절 T 세포(Treg) 모두를 확장시켜, 종양에서의 Treg가 원하는 항-종양 반응을 방해하는 면역 억제를 유도하도록 한다. 따라서, 이들 및 기타 단점에 비추어, 개선된 항종양 특이성을 갖는 내구성이 있고, 재현가능하며 유효한 입양 세포 이식-기반 암 치료법을 제공하기 위해 추가의 증진이 필요하다. 따라서, 본 개시 내용은 세포-기반 요법, 및 지속 작용성 IL-2R 효현제, 더욱 구체적으로 예시적인 시험관 내 동물 모델에서 예시된 바와 같은 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여를 포함하는 특히 유리한 치료적 조합의 발견에 적어도 부분적으로 기초한다.

[0054] Il-2는 알파 사슬 수용체(IL2Rα, CD25), 베타 사슬 수용체(IL2Rβ, CD122) 및 공통의 감마 사슬 수용체(γc, CD132)를 함유하는 수용체-신호전달 복합체를 통해 면역 세포 증식과 활성화를 자극한다. IL-2가 고용량일 경우, 이는 이종이량체 IL2Rβγ 수용체와 결합하여, 종양 사멸 CD8+ 기억 효과기 T(CD8 T) 세포의 요망되는 증식을 유도한다. 그러나, IL2는 또한 자체의 이종이량체 수용체인 IL2Rαβγ와 더 큰 친화성으로 결합하여, 면역억제성 CD4+, CD25+ 조절 T 세포(Treg)를 증식시킴으로써, 암 면역 요법에 바람직하지 않는 효과를 유도할 수 있다. 따라서, IL-2-증진된 면역-종양학 전략과 연관된 하나 이상의 단점을 극복하기 위한 노력으로, 입양 세포 이식과 IL-2Rαβ 편향 효현제, 구체적으로 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향 효현제의 투여를 조합한 치료 방법이 본 명세서에서 제공된다. 이론에 의해 구속되지는 않지만, 출원인은 면역억제 Treg를 활성화하는 데 원인이 되는 IL-2Rα 서브유닛과 상호작용하는 영역이 마스킹된(즉, 그의 활성이 억제되거나 약화된) 지속 작용성 인터루킨-2 분자, 즉 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향 효현제를 이용함으로써, 특히 입양 세포 이식-유도된 T 세포 반응을 선택적으로 확장시켜서 우월한 치료 효능을 달성할 수 있음을 발견하였으며, 이는 본 개시 내용 및 이를 뒷받침하는 실시예로부터 명백하게 될 것이다.

[0055] **입양 세포 이식 요법**

[0056] 본 명세서에 제공된 치료 방법은, 암 특이적 면역 반응을 자극하기 위하여, 생체 외 확장된 종양 반응성 T 세포를 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법은 특히 임상적 응용 및 연구를 위한 응용에 사용된다. 다양한 입양 세포 이식 요법은 본 명세서에 기재된 방법에 따라 투여될 수 있고, 본 개시 내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다. 이론에 의해 구속되지 않지만, 입양 세포 이식, 예를 들어 T 세포 이식, 및 본 명세서에 제공된 바와 같은 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향 효현제의 면역 활성화의 상보적 메커니즘으로 인해, 원하는 T 세포 반응의 자극하기 위해 IL-2 경로를 통해(즉, 입양 세포 이식과 함께, 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향 효현제의 투여를 통해) 증진된 항종양 결과를 달성할 수 있는 것으로 생각된다.

[0057] 임의의 적합한 입양 세포 이식 요법이 본 명세서에 제공된 방법에서 사용될 수 있으며, 본 개시 내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Rosenberg, S., *et al., Adoptive Cell Transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer.* 2008 Apr; 8(4): 299-308]을 참조한다. 예를 들어, 입양 T 세포 또는 NK 세포 요법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 선택 후, 종양 특이적 숙주 T 세포는 종양 항원 또는 세포와 생체 외 조합, 확장되고, 대상체 내로 재주입될 수 있다. 예를 들어, 림프구제거 골수비소멸성(nonmyeloablative) 화학요법(NMC)을 이용하여 내인성 조절 T 세포를 억제하고, 주입된 T 세포에 대해 최적화된 환경을 제공하기 위하여, 주입 전에, 환자 예비 컨디셔닝이 또한 실시될 수 있으며; 대안적으로, 시클로포스파미드 또는 임의의 기타 적합한 컨디셔닝제가 사용될 수 있다. 그러한 예비 컨디셔닝은 Treg(조절 T 세포) 및 림프구의 수를 제거하거나 실질적으로 감소시키기 위한 것으로, 이는 항상성 시토카인에 대해 이식된 세포와 경쟁한다. 숙주 세포는 림프절, 예를 들어 서혜부, 장간막, 표재성 원위 보조(superficial distal auxiliary) 등; 골수; 비장; 또는 말초혈액과 같은 다양한 공급원뿐만 아니라, 종양, 예를 들어 종양 침윤성 림프구로부터 분리될 수 있다. 세포는 동종이계 또는 바람직하게는 자가일 수 있다. 생체 외 자극을 위해, 숙주 세포는 무균적으로 제거되고, 본 기술분야에 알려진 바와 같은, 임의의 적합한 배지에 현탁된다. 세포는 임의의 다양한 프로토콜, 특히 항-CD3, B7, 항-CD28 등의 조합을 이용하여 자극 및 확장된다. 숙주 T 세포의 생체 외 확장에 적합한 프로토콜은 문헌["*Focus on Adoptive T Cell Transfer Trials in Melanoma" Clinical and Developmental Immunology*, Vol 2010, Art. ID 260267]에 기재되어 있다.

[0058] 예를 들어, 입양 세포 이식은 (i) 포유 동물 대상체, 예컨대 인간으로부터 자가 림프구를 수득하는 단계, (ii) 자가 림프구를 배양하여 확장된 림프구를 생성하는 단계, 및 (ii) 확장된 림프구를 대상체(즉, 환자)에게 투여하는 단계에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는, 림프구는 종양-유래이며, 예를 들어 이들은 TIL이고, 치료될

대상체로부터 분리된다(즉, 자가 이식). 또한, 자가 입양 세포 요법은 (i) 자가 림프구를 배양하여 확장된 림프구를 생성하는 단계; (ii) 골수비소멸성 림프구제거 화학요법(NMC)을 대상체에게 투여하는 단계; 및 (iii) NMC 투여 후, 확장된 림프구를 투여하는 단계에 의해 수행될 수 있다. 자가 TIL은 예를 들어, 종양을 기계적으로 분할함으로써 또는 효소적으로(예를 들어, 콜라게나제 또는 DNA분해효소를 사용하여), 예를 들어 절제된 종양의 기질로부터 수득될 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 세포가 혼합된 림프구 종양 세포 배양물로 풍부화되거나, 자가 항원 제시 세포 및 종양 유래 펩티드를 이용하여 클로닝된 항종양 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라성 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 유전자 조작된 경우, 세포는 혈액으로부터 유래될 수 있다.

[0059] T 세포와 같은 종양 침윤성 림프구를 포함하는, 림프구의 확장은 본 기술 분야에 알려진 바와 같은 임의의 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 공급자 림프구 및 인터루킨-2(IL-2), IL-7, IL-15, IL-21, 또는 이들의 조합의 존재 하에서 비특이적 T 세포 수용체 자극을 이용하여 확장될 수 있다. 비특이적 T 세포 수용체 자극은, 예를 들어, 자극량만큼의 마우스 단일클론성 항-CD3 항체(예를 들어, 미국 워싱턴주 시애틀 소재의 LS Bio에서 입수할 수 있음)를 포함할 수 있다. 대안적으로, T 세포는, 인터루킨-2 또는 인터루킨-15, 바람직하게는 인터루킨-2와 같은 T 세포 성장 인자 존재 하에서, 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2) 결합 펩티드와 같은 벡터로부터 선택적으로 발현될 수 있는, 하나 이상의 항원(이의 항원 부분, 예컨대 에피토프를 포함함)을 이용하여 시험관 내 말초혈액 단핵세포(PBMC)의 자극에 의해 급속히 확장될 수 있다. 시험관 내 유도된 T 세포는 HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상에서 펄싱된(pulsed) 암의 동일한 항원(들)을 이용한 재자극에 의해 급속히 확장된다. 대안적으로, T 세포는 방사선조사된 자가 림프구 또는 방사선조사된 HLA-A2+ 동종이계 림프구 및 인터루킨-2으로 재자극될 수 있다.

[0060] 확장된 TIL의 특이적 종양 반응성은, 본 기술 분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어 종양 세포와 함께 공동배양 후 시토카인 방출(예를 들어, 인터페론-감마)을 측정함으로써 시험될 수 있다. 예를 들어, 입양 세포 이식은 세포의 급속한 확장 전에, 배양된 TIL을 CD8+ T 세포에 대해 풍부화하는 단계를 포함할 수 있다. 인터루킨-2를 함유하는 배지에서 TIL의 배양 후, T 세포는 CD4+ 세포가 고갈되고, 예를 들어 CD8 마이크로비드 분리를 이용하여 CD8+ 세포에 대해 풍부해진다. 일부 구현예들에서, 자가 T 세포의 성장 및 활성화를 촉진하는 T 세포 성장 인자는 자가 T 세포와 함께 또는 자가 T 세포에 후속으로 대상체에게 투여된다. T 세포 성장 인자는 자가 T 세포의 성장 및 활성화를 촉진하는 임의의 적합한 성장 인자일 수 있다. T 세포 성장 인자의 적합한 예는 인터루킨(IL)-2, IL-7, IL-15, IL-12 및 IL-21을 포함하며, 이들은 단독으로, 또는 IL-2와 IL-7, IL-2와 IL-15, IL-7과 IL-15, IL-2, IL-7과 IL-15, IL-12와 IL-7, IL-12와 IL-15, 또는 IL-12와 IL2와 같은 다양한 조합으로 사용될 수 있다.

[0061] 입양 세포 요법은 또한 유전자 변형된 말초 T 세포, 즉, 통상적으로 MHC-제한된 T 세포 수용체(TCR) 또는 비-MHC-제한된 합성 키메라성 항원 수용체로 이루어진 항원-특이적 수용체의 유전자 이식에 의해 형성된 종양-표적화된 T 세포를 이용하여 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sadelain, M., *et al, Current Opinion in Immunology*, Vol 21 (2), 215-223 (2009)] 참조; 또한 문헌[Kalos, M., et al., *Sci Transl Med* 2011; **3**: 95ra73]; 및 문헌[Grupp SA, et al, *N Engl J Med* 2013; 368: 1509-1518] 참조). 이러한 접근법을 이용하여, 매우 열렬한 항종양 T 세포가 확인되며, 이들의 T 세포 수용체(TCR)를 암호화하는 유전자가 클로닝되고 레트로바이러스 내로 삽입된다. 이어서 레트로바이러스 상등액이 생성되어, T 세포 수용체를 정상 림프구 내로 삽입하는 데 사용된다. 이어서 T 세포 수용체의 발현은 형광-활성화된 세포 분류 분석에 의해 그리고 $HLA\text{-}A2^-$ 888 흑색종 계열이 아닌, $HLA\text{-}A2^+$ 526 흑색종 계열의 시험관 내 인식에 의해 비형질도입된(UnTd) 세포 및 형질도입된(Td) 세포에서 비교된다(Rosenberg, S., *et al., Nat Rev. Cancer*, 2008 Apr; 84(4):299-308). 범용 유형의 T 세포 또한 문헌[*Qasim, W., et al., Sci. Transl. Med.* 9, eaaj2013 (2017)]에 기술된 것과 같이 사용될 수 있다. 예를 들어, 범용 CAR19 T 세포는 렌티바이러스성 형질도입과 조합되어 TALEN-매개 세포 엔지니어링을 이용하여 생성되고, 입양 세포 요법에 사용될 수 있다. 세포는 비인간 백혈구 항원-매치된 공여자 세포의 렌티바이러스성 형질도입, 및 T 세포 수용체 α 사슬 및 CD52 유전자좌의 동시 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)-매개된 유전자 편집에 의해 생성된다.

[0062] 이어서 확장된 세포는 주입, 예를 들어 정맥 내 또는 동맥 내 주입 또는 기타 적합한 형태의 전달에 의해 숙주에게 투여되며, 이는 더 짧거나 긴 기간이 요구될 수도 있지만 통상적으로 약 30 분 내지 약 60 분 동안 지속된다. 예를 들어, 약 1×10^{10} 개 내지 약 15×10^{10} 개의 림프구가 통상적으로 투여된다. 기타 투여 경로는 복강내, 척추강내 및 림프관내 경로를 포함한다. 확장된 세포는 임의의 다양한 약학적으로 허용가능한 첨가제, 결합제, 충전제, 담체, 보존제, 안정화제, 유화제, 버퍼 등을 선택적으로 포함할 수 있는 적합한 배지에 제공된다.

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

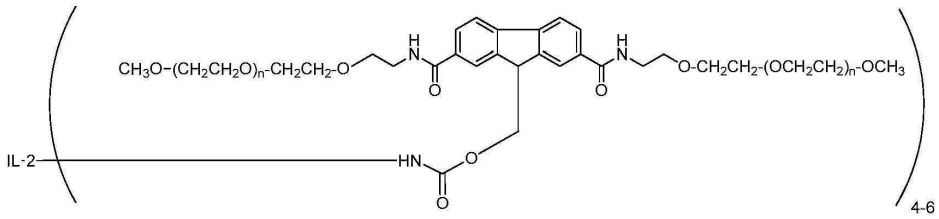
[0063] 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제

[0064] 본원에 기술된 방법은, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여를 수반한다. 이와 관련하여, 효현제가, 동일 시험관 내 모델 내 IL-2Rαβ에 대한 결합 친화성보다 적어도 5배(더 바람직하게는 적어도 10배) 더 큰, IL-2Rβ에 대한 시험관 내 결합 친화성을 나타내고, 비 변형 IL-2보다 10배 더 긴 생체 내 반감기(다만 반감기는 IL-2의 생체 내 소멸을 기반으로 함) 동안 적어도 유효한 한, 본 개시 내용은 임의의 특정 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제에 제한되지 않는다. 예를 들어 IL-2에 대한 결합 친화성을 표준으로 하여 측정하는 것이 가능하다. 이와 관련하여, 실시예 1에서 참조되고 하기에 기술되어 있는 RSLAIL-2 분자는, IL-2에 비해 IL-2Rαβ에 대한 친화도에서 약 60배 감소를 나타내지만, IL-2에 비해 IL-2Rβ에 대한 친화도에서는 단지 약 5배의 감소만을 나타낸다. 따라서, 예시적인 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 RSLAIL-2이다.

[0065] 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 비제한적인 예가 국제 특허 공보 번호 WO 2012/065086 및 WO 2015/125159에 기재되어 있다. 예시적인 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 본 출원의 실시예 1에서 참조된 RSLAIL-2이고, 여기서 방출가능한 PEG는, 아래에 나타낸 바와 같은, 중심 플루오렌 고리의 2-위치 및 7-위치로부터 아미드 연결기(플루오렌-C(O)-NH~)를 통해 연장되어 있는 폴리(에틸렌글리콜) 사슬을 가져, 분지형 PEG를 제공하는 2,7,9-치환된 플루오렌을 기재로 한다. 플루오레닐계의 분지형 PEG 모이어티는 인터루킨-2 모이어티의 아미노기에 방출가능하게 공유 부착된다. IL-2 모이어티 아미노기와 플루오레닐계의 분지형 PEG 모이어티 사이의 연결은 메틸렌 기($-CH_2-$)를 통해 플루오렌 고리의 9-위치에 부착된 카바메이트 연결이다. 이러한 일반적인 구조를 갖는 방출가능한 PEG는 통상적으로 생리학적 조건 하에서 β-제거 반응되어 IL-2에 공유 부착된 PEG 모이어티를 느리게 방출시킨다. PEG 모이어티는 투여 후 순차적으로 방출되는 것으로 생각된다.

[0066] 이와 관련하여, 일부 바람직한 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 하기 화학식인 **화학식 I**에 포함되는 화합물을 포함한다:

[0067] [화학식 I]

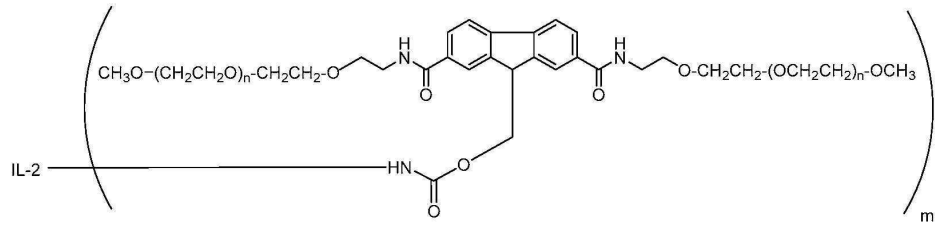


[0068]

[0069] (식에서, IL-2는 인터루킨-2이고, 각각의 "n"은 약 3 내지 약 4000의 정수, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다). 각각의 "n"(즉, 각각의 PEG "아암")에 대한 대표적인 범위는, 예를 들어 약 40 내지 약 550의 정수, 또는 약 60 내지 약 500의 정수, 또는 약 113 내지 약 400의 정수를 포함한다. 바람직한 구현예들에서, 대략 나타낸 각각의 선형 PEG 아암에서 "n"은 약 227이다.

[0070] 하나 이상의 구현예들에서, 앞의 문단에 기술된 바와 같은 화학식을 갖는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는, 하기 화학식인 **화학식 II**에 의해 포함되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 (몰량을 기준으로) 10% 이하, 바람직하게는 (몰량을 기준으로) 5% 이하 함유하는 조성물을 포함하는 조성물에 포함된다:

[0071] [화학식 II]



[0072]

[0073] (식에서, IL-2는 인터루킨-2이고, "m"(IL-2에 부착된 폴리에틸렌글리콜 모이어티의 수를 지칭함)은 1, 2, 3, 7 및 7 초과로 이루어진 군으로부터 선택된 정수임).

[0074] 일부 구현예들에서, 예를 들어 화학식 I을 참조하면, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 IL-2에 방출가능하게 부착된 평균 약 6개의 분지형 폴리에틸렌글리콜 모이어티를 갖는다. 일부 추가의 구현예들에서, 예를 들어 화학식 I을 참조하면, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 일반적으로 비활성 전구약물, 즉 투여시 비활성인 것으로 간주되며, 생체 내에서의 폴리에틸렌글리콜 모이어티의 서방성으로 인해, 초기 투여된 컨쥬게이트에서보다 더 적은 PEG 모이어티가 부착된 인터루킨-2의 활성 컨쥬게이트 형태를 제공하며, 종양 부위에서 지속적인 농도를 달성하는 데 유효하다.

[0075] RSLAIL-2의 추가의 예시적 조성물은 상기 화학식에 따른 화합물로서, 분자의 전체 중합체 부분의 중량 평균 분자량이 약 250 달톤 내지 약 90,000 달톤의 범위인 화합물을 포함한다. 추가의 적합한 범위는 약 1,000 달톤 내지 약 60,000 달톤에서 선택되는 범위, 약 5,000 달톤 내지 약 60,000 달톤 범위, 약 10,000 달톤 내지 약 55,000 달톤 범위, 약 15,000 달톤 내지 약 50,000 달톤 범위, 및 약 20,000 달톤 내지 약 50,000 달톤 범위의 중량 평균 분자량을 포함한다.

[0076] 폴리에틸렌글리콜 중합체 부분에 대한 추가의 예시적 중량 평균 분자량은 약 200 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤, 약 600 달톤, 약 700 달톤, 약 750 달톤, 약 800 달톤, 약 900 달톤, 약 1,000 달톤, 약 1,500 달톤, 약 2,000 달톤, 약 2,200 달톤, 약 2,500 달톤, 약 3,000 달톤, 약 4,000 달톤, 약 4,400 달톤, 약 4,500 달톤, 약 5,000 달톤, 약 5,500 달톤, 약 6,000 달톤, 약 7,000 달톤, 약 7,500 달톤, 약 8,000 달톤, 약 9,000 달톤, 약 10,000 달톤, 약 11,000 달톤, 약 12,000 달톤, 약 13,000 달톤, 약 14,000 달톤, 약 15,000 달톤, 약 20,000 달톤, 약 22,500 달톤, 약 25,000 달톤, 약 30,000 달톤, 약 35,000 달톤, 약 40,000 달톤, 약 45,000 달톤, 약 50,000 달톤, 약 55,000 달톤, 약 60,000 달톤, 약 65,000 달톤, 약 70,000 달톤 및 약 75,000 달톤을 포함한다. 몇몇 구현예들에서, 폴리에틸렌글리콜 중합체의 중량 평균 분자량은 약 20,000 달톤이다.

[0077] 상기 기술된 바와 같이, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 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 무독성인, 무기 및 유기 산 부가 염을 지칭할 것이다. 이러한 염은 비히클 투여 또는 투여 형태 제조 절차 중 현장에서 제조될 수 있거나, 또는 본원에 기술된 바와 같은 지속 작용성 인터루킨-2와 적합한 유기 또는 무기 산을 별도로 반응시켜, 이에 따라 형성된 염을 분리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염들은 브롬화수소산염, 염화수소산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 질산염, 아세트산염, 발레르산염, 올레산염, 팔미트산염, 스테아르산염, 라우르산염, 벤조산염, 젖산염, 인산염, 토실산염, 시트르산염, 말레산염, 푸마르산염, 숙신산염, 주석산염, 나프틸산염, 옥실산염, 메실산염, 글루코헵토산염, 락토비오산염 및 라우릴설폰산염 등을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Berge et al. (1977) *"Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci.* 66:1-19] 참조). 그러므로 기술된 바와 같은 염은 무기산, 예컨대 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 설팜산, 인산 및 질산 등으로부터 유래할 수 있거나; 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 젖산, 말산, 주석산, 시트르산, 아스코르브산, 팔미트산, 말레산, 하이드록시말레산, 페닐아세트산, 글루탐산, 벤조산, 살리실산, 설파닐산, 2-아세톡시벤조산, 푸마르산, 톨루엔설폰산, 메탄설폰산, 에탄 디설폰산, 옥살산 및 이소티온산 등으로부터 제조될 수 있다.

[0078] 상기 IL-2Rβ 편향 효현제를 참고할 경우, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "IL-2"는 인간 IL-2 활성을 가지는 모이어티를 지칭한다. IL-2의 잔기의 맥락에서, 용어 '잔기'는, 상기 화학식에 나타낸 바와 같이, 중합체, 예컨대 폴리에틸렌글리콜과 하나 이상의 공유 부착 위치에서 공유 부착이 이루어진 후 남아 있는 IL-2 분자의 부분을 지칭한다. 비 변형 IL-2가 중합체, 예컨대 폴리에틸렌글리콜에 공유 부착될 경우, 이 IL-2는, 중합체(들)와의

결합과 연관된 공유 결합이 하나 이상 존재함으로 말미암아 약간 변경됨이 이해될 것이다. 폴리에틸렌글리콜 모이어티와 같은 다른 분자에 부착된 IL-2의 이러한 약간 변경된 형태는, IL-2의 폴리에틸렌글리콜 컨쥬게이트를 참조하여, 그러한 컨쥬게이트에서 IL-2에 대한 참조가, 예를 들어 IL-2 분자(예를 들어, 리신) 내 아미노 기가 하나 이상의 PEG 모이어티에 공유 부착된 IL-2의 그러한 약간 변경된 형태를 포함한다는 것이 이해되어야 하지만, 일부 경우에 IL-2의 "잔기"로서 본 명세서에서 지칭될 수 있다.

[0079] 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 번호 2012/065086호에 기술된 서열 번호 1 내지 4 중 어느 하나에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 단백질은, 그에 실질적으로 동종성인 임의의 단백질 또는 폴리펩티드인 것과 같이, 예시적인 IL-2 단백질인 것으로 간주된다. 이들 예시적인 인터루킨-2 서열이 본 명세서에도 제공되며, 다음을 포함한다: 신호 펩티드 서열을 포함하는 인간 인터루킨-2, 인간 인터루킨-2, 알데스루킨, 및 인터루킨-2 특이적 효현제(BAY 50-4798로도 지칭됨). 용어 "실질적으로 상동성"은, 특정 대상 서열, 예를 들어 돌연변이 서열이 하나 이상의 치환, 결실 또는 부가에 의해 참조 서열과 다르며, 자체의 순수 효과는 기준 서열과 대상 서열 간 부정적인 기능상의 차이를 초래하지 않는 것을 의미한다. 본원의 목적을 위해, 95%보다 큰 상동성, 동등한 생물 활성(그러나 생물 활성의 세기가 반드시 동등할 필요는 없음), 및 동등한 발현 특징을 갖는 서열은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 상동성을 결정하기 위하여 성숙한 서열의 절단은 무시되어야 한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "IL-2"는, 예를 들어 위치 배향 돌연변이 유발에 의하여 정교하게 변형되거나, 돌연변이를 통하여 우발적으로 변형된 단백질을 포함한다. 이러한 용어들은 또한 1 내지 6개의 추가 글리코실화 위치를 가지는 유사체, 적어도 하나의 추가 아미노산(여기서 추가 아미노산(들)은 적어도 하나의 글리코실화 위치를 포함함)을 단백질의 카르복시 말단에 가지는 유사체, 그리고 적어도 하나의 글리코실화 위치를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 유사체를 포함한다. 본 용어는 천연 모이어티 및 재조합 생산된 모이어티 둘 다를 포함한다. 또한, IL-2는 인간 기원, 동물 기원 및 식물 기원으로부터 유래할 수 있다. 하나의 예시적이고 바람직한 인터루킨-2는 알데스루킨으로 지칭되는 재조합 IL-2이다. 알데스루킨(서열 번호 3)은 대장균으로부터 유래되기 때문에 글리코실화되지 않고, N-말단 알라닌이 없고, 아미노산 위치 125에서 시스테인에 대해 치환된 세린을 갖는다는 점에서 천연 IL-2와 상이하다.

[0080] 종래의 접근법들, 예컨대 화합물을 방사능 표지화한 후, 이를 생체 내 투여하고, 이의 제거(clearance)를 판별하는 단계를 포함하는 접근법은, 지속 작용성인 것으로 제안된 화합물인 IL-2Rβ 편향 효현제가 "지속 작용성"인지 여부를 판별하는 데 사용될 수 있다. 본원의 목적을 위해, IL-2Rβ 편향 효현제의 지속 작용성은, 통상적으로 마우스 내에서 평가될 효현제를 투여한 후 다양한 시점에서 림프구 내 STAT5 인산화를 측정하기 위해 유세포 분석을 이용하여 결정된다. 참고로, IL-2에 대한 신호는 약 24시간 경과할 때까지 소멸되지만, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제에 대한 신호는 그보다 더 긴 기간 동안 지속된다. 예시로서, RSLAIL-2 조성물에 대한 신호는 수 일에 걸쳐 지속된다.

[0081] 지금부터 본원에 기술된 바와 같이 지속 작용성 효현제의 IL-2Rβ 편향성을 고려하여, 실시예 2는 RSLAIL-2의 예시적 조성물에 대한 수용체 편향성과 관련된 시험관 내 및 생체 내 데이터 둘 다를 제공한다. 실시예 2에 기술된 바와 같이, 마우스 흑색종 종양 모델에 있어서, RSLAIL-2에 대한 CD8/조절 T 세포의 비는 IL-2에 대한 경우와 비교하였을 때 IL2 수용체 알파보다 IL2 수용체 베타가 우선적으로 활성화됨을 뒷받침해준다. 예시적 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제, 예컨대 RSLAIL-2는, 예를 들어 Treg보다 효과기 CD8+ T- 및 NK 세포를 우선적으로 활성화하여 증식시키는 데 유효하다.

[0082] 게다가 대표적인 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제, 예컨대 RSLAIL-2는 IL-2에 비하여 증가한 종양 노출(tumor exposure), 바람직하게는 유의미하게 증진된 종양 노출, 예컨대 IL-2의 당량에 대해 정규화되었을 때 적어도 50배 증가한 노출, 또는 적어도 100배 증가한 노출, 또는 적어도 200배 증가한 노출, 또는 적어도 300배 증가한 노출, 또는 적어도 400배 증가한 노출, 또는 적어도 500배 증가한 노출을 제공한다. 예시와 같이 마우스 흑색종 종양 모델에 있어서 RSLAIL-2의 항종양 활성은 실시예 3에 기술되어 있다. 이 실시예 3에 기술된 바에 의하면, RSLAIL-2는 (IL-2 당량을 기준으로 정규화되었을 때) IL-2에 비하여 상당히 증진된, 예컨대 500배 증진된 종양 노출을 제공하는 것으로 파악되었다.

[0083] **방법**

[0084] 본 명세서에 기재된 바와 같은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 적어도 하나 또는 그 이상의 특징에 기초하여, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여 전에, 자가 또는 동종이계 항-종양 T 세포, 또는 생체 외에서 배양 및 확장된 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 세포를 투여한 후, 면역억제 Treg를 활성화하는 원인이 되는 IL2Rα 서브유닛과 상호작용하는 영역이 마스킹된 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 투여하여, 우수한 치료적

효능을 달성하는, 암 환자에게 면역 반응을 유도하는 데 유효한 방법이 본 명세서에서 제공된다.

[0085] 본원에 기술된 방법에 따라, 본 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 IL-2Rβ 활성화량으로 제공된다. 당업자는 얼마나 많은 양의 소정의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제가 IL-2Rβ에서 임상학적으로 적절한 효현 활성을 제공하기에 충분한지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 당업자는 문헌을 참조하고/참조하거나, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 점차적으로 증량하여 투여하여, IL-2Rβ의 임상학적으로 유효한 효현 활성을 제공하는 양 또는 양들을 결정할 수 있다. 대안적으로, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 활성화량은 상기 기술된 생체 내 STAT5 인산화 분석을 이용하여 결정될 수 있고(생체 내 투여 후 결정됨), 여기서 STAT5 인산화를 10% 초과의 NK 세포에서 최고로 유도하기에 충분한 양이 활성화량인 것으로 간주된다.

[0086] 그러나, 하나 이상의 경우에 있어서, IL-2Rβ 활성화량은 단백질 양으로 표현되는 하기 범위들, 즉 약 0.01 mg/kg 내지 100 mg/kg; 약 0.01 mg/kg 내지 약 75 mg/kg; 약 0.02 mg/kg 내지 약 60 mg/kg; 약 0.03 mg/kg 내지 약 50 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 40 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 30 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 25 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 15 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 10 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 5 mg/kg; 약 0.05 mg/kg 내지 약 1 mg/kg 중 하나 이상에 의해 포함되는 양이다. 몇몇 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 0.7 mg/kg 이하의 용량으로 투여된다. 특정의 예시적 투여량 범위는, 예를 들어 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.2 mg/kg 내지 약 7 mg/kg, 또는 약 0.2 mg/kg 내지 약 0.7 mg/kg 미만을 포함한다.

[0087] 확인을 위해, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제와 관련하여, 활성화량 및 정도는 매우 광범위할 수 있고, 입양 세포 이식 요법과 조합된 경우에도 효과적일 수 있다. 즉, 충분히 연장된 기간 동안 IL-2Rβ에서 단지 최소의 효현제 활성을 나타내는 일정량의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는, 입양 세포 요법과 조합되어 투여되는 경우, 본 명세서에 기술된 방법이 임상적으로 의미있는 반응을 가능하게 하는 한, 여전히 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제일 수 있다. 일부 경우에서, (예를 들어) 상승적인 상호작용 및 반응으로 인해, 입양 세포 이식 요법이 수반되는 경우 단지 최소 효현제 활성의 IL-2Rβ가 요구될 수 있다.

[0088] 하나 이상의 구현예들에서, 입양 세포 이식은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여 전에 수행된다. 예를 들어, 입양 세포 이식-기반 세포 주입은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여 전에, 즉시, 1시간 내, 2시간 내, 3시간 내, 4시간 내, 5시간 내, 6시간 내, 7시간 내, 8시간 내, 9시간 내, 10시간 내, 11시간 내, 12시간 내, 1일 내, 2일 내, 3일 내, 4일 내, 5일 내, 6일 내, 7일 내, 8일 내, 9일 내, 10일 내, 11일 내, 12일 내, 13일 내, 14일 내, 15일 내, 16일 내, 17일 내, 18일 내, 19일 내, 20일 내, 21일 내, 22일 내, 23일 내, 24일 내, 25일 내, 26일 내, 27일 내, 28일 내, 29일 내, 1 개월 내, 3 개월 내, 6 개월 내 또는 이들의 임의의 조합으로 일어날 수 있다.

[0089] 본원에 기술된 치료 방법은 환자 케어를 관리하는 임상의가 해당 치료 방법이 유효하다고 여기는 동안 지속될 수 있다. 해당 치료 방법이 유효한지를 나타내는 비제한적 매개변수는, 하기의 것들, 즉 (무게 및/또는 부피의 관점에서의) 종양 수축; 개별 종양 콜로니 수의 감소; 종양 제거; 및 비 진행 생존 중 임의의 것 한 가지 이상을 포함한다. 종양 크기 변화는 임의의 적합한 방법, 예컨대 영상화에 의해 측정될 수 있다. 다양한 진단 영상화 방식, 예컨대 컴퓨터 단층촬영(CT 스캔), 이중 에너지 CDT, 양전자 방사 단층촬영 및 MRI가 사용될 수 있다.

[0090] 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 실질적인 도스 및 본 명세서에 기재된 방법과 관련된 투약법은 대상체의 연령, 체중, 및 전반적인 건강 상태, 및 치료될 암의 유형 및 진행, 보건 전문가의 판단, 및 사용된 특정 입양 세포 이식 요법 및 투여될 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제에 따라 달라질 것이다.

[0091] 입양 세포 이식의 빈도 및 일정, 그리고 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여와 관련하여, 당업자는 적절한 빈도를 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 치료 사이클에서, 임상의는, 입양 세포 이식과 동시에, 또는 바람직하게는 입양 세포 이식 이후에 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 투여하는 것과 조합하여, 입양 세포 이식을 수행할 것이다. 예를 들어, 일부 치료 방식에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 입양 세포 이식 후 7일 내(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일차 중 어느 한 날에)에 투여된다. 일부 경우에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 입양 세포 이식 후 4일 내, 예를 들어 1, 2, 3 또는 4일차 중 어느 한 날에 투여된다. IL-2Rβ 기반 효현제의 지속 작용성을 바탕으로 하였을 때, 이러한 화합물은 통상적으로 비교적 빈번치 않게(예컨대 3주에 한 번, 2주에 한 번, 8일 내지 10일에 한 번, 매주 한 번 등) 투여된다.

[0092] 요법의 진행과정과 연관된 예시적 시간 길이는 약 1주; 약 2주; 약 3주; 약 4주; 약 5주; 약 6주; 약 7주; 약 8주; 약 9주; 약 10주; 약 11주; 약 12주; 약 13주; 약 14주; 약 15주; 약 16주; 약 17주; 약 18주; 약 19주;

약 20주; 약 21주; 약 22주; 약 23주; 약 24주; 약 7개월; 약 8개월; 약 9개월; 약 10개월; 약 11개월; 약 12개월; 약 13개월; 약 14개월; 약 15개월; 약 16개월; 약 17개월; 약 18개월; 약 19개월; 약 20개월; 약 21개월; 약 22개월; 약 23개월; 약 24개월; 약 30개월; 약 3년; 약 4년 및 약 5년을 포함한다. 통상적으로, 1회차 입양 세포 이식이 환자에게 제공된 후, 하나 이상의 도스의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제가 제공되지만, 일부 경우에서 입양 세포 이식의 하나 이상의 추가의 사이클이 일어날 수 있다.

[0093] 본원에 기술된 치료 방법은, 통상적으로 환자의 케어를 관리하는 임상의가 해당 치료 방법이 유효하다고 여기는 동안(즉, 환자가 해당 치료에 반응하는 동안) 지속된다. 치료 방법이 유효한지를 나타내는 비제한적 매개변수는 하기의 것들, 즉 (무게 및/또는 부피 및/또는 시각적 외관의 관점에서의) 종양의 수축; 개별 종양 콜로니 수의 감소; 종양 제거; 비 진행 생존; (적용 가능하다면) 적합한 종양 마커에 의한 적당한 반응, 증가한 NK(자연 살해) 세포 수, 증가한 T 세포 수, 증가한 기억 T 세포 수, 증가한 중앙 기억 T 세포(central memory T cell) 수, 감소한 조절 T 세포(예컨대, CD4+ Treg, CD25+ Treg 및 FoxP3+ Treg) 수 중 한 가지 이상을 포함할 수 있다.

[0094] 본 명세서에 제공된 방법은 (특히) 암으로 고통받는 환자의 치료에 유용하다. 예를 들어, 환자는 입양 세포 이식 단독, 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제와의 조합에 반응성일 수 있지만, 조합에 대해 더욱 반응성이다. 추가의 예로서, 환자는 입양 세포 이식 또는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제에 대해 비반응성일 수 있지만, 조합에 대해 반응성이다. 또한 추가의 예로서, 환자는 입양 세포 이식 또는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제 단독에 대해 비반응성일 수 있지만, 조합에 대해 반응성이다.

[0095] 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여는, 통상적으로 주사에 의한다. 기타 다른 투여 방식, 예컨대 폐, 비강, 협측, 직장, 설하 및 경피가 또한 상정된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "비경구"는 피하, 정맥내, 동맥내, 종양내, 림프내, 복강내, 심장내, 척추강내 및 근육내 주사뿐만 아니라 인퓨전 주사를 포함한다. 앞서 기술된 바와 같이, 입양 세포 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 별도로 투여될 수 있다. 대안적으로, 입양 세포 이식의 준비 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여가, 초기 투여로서 또는 치료 과정에 걸쳐, 또는 투약법의 다양한 단계에서, 동시인 것이 바람직한 경우, (그리고 세포와 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제가 함께 소정의 제형 형태 내에서 서로 양립성이면) 그 동시 투여는 단일 투여 형태/제형의 주입(예를 들어, 면역 성분을 둘 다 함유하는 정맥투여 제형의 정맥 내 투여)을 통해 달성될 수 있다.

[0096] IL-2Rβ 편향 효현제를 환자에게 투여하는 것은 예를 들어, IL-2Rβ 편향 효현제(예를 들어, RSLAIL-2) 및 희석제를 포함하는 조성물의 주사를 통해 달성될 수 있다. 가능한 희석제와 관련하여, 희석제는 주사용 정균수, 물 중 5% 덱스트로스, 인산염 완충 식염수, 링거액, 링거 젖산 용액, 식염수, 멸균수, 탈이온수, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0097] 또한 본 명세서에 기재된 치료적 조합은 입양 세포 이식과 조합하여 이용하기 위한 지시사항이 수반된 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 포함하는 키트 형태로 제공될 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는, 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 부형제를 수반하는 단일 도스 조성물 내에 포함될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 부형제로서 적합한 것은, 예를 들어 문헌[Handbook of Pharmaceutical Excipients, 7th ed., Rowe, R.C., Ed., Pharmaceutical Press, 2012]에 기술된 것들을 포함한다. 키트내 성분은 액체 형태 또는 고체 형태 중 어느 하나로 존재할 수 있다. 바람직한 특정 구현예들에서, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제는 고체 형태로 존재한다. 바람직한 고체 형태는, 예컨대 물 5 중량% 미만, 바람직하게는 물 2 중량% 미만을 함유하는 건조 고체 형태이다. 고체 형태는 일반적으로 키트에 제공될 수도 있는 수성 희석제 중에서의 재구성에 적합하다.

[0098] 본원에 기술된 방법, 키트 및 관련 조성물은 본원에 제공된 방법에 의해 치유 또는 예방될 수 있는 임의의 병태, 예컨대 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 데 사용될 수 있다. 암은 액체 암 또는 고형암일 수 있다. 예시적인 병태는 암이며, 예컨대 흑색종, 신장암, 비소세포 폐암 유방암(예를 들어, 삼중 음성 유방암), 방광암, 두경부암, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척색종, 혈관육종, 내피육종, 림프혈관육종, 림프관내피육종, 활막종, 악성중피종, 유윙종(Ewing's tumor), 평활근육종, 횡문근육종, 결장암종, 췌장암, 뇌암, 유방암, 난소암, 전립선암, 편평세포암, 기저세포암, 선암, 땀샘암, 피지선암, 유두암, 유두상 선암, 낭선암, 수질암(medullary cancer), 기관지암, 신장세포암, 간세포암, 담도암, 융모암, 정상피종, 배아암, 빌름스 종양(Wilms' tumor), 자궁경부암, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 고환암, 폐암, 소세포 폐암, 뇌암, 방광암, 상피암, 신경교종, 별아교세포종, 수모세포종, 두개인두종, 뇌실막세포종, 송과체부종양(pinealoma), 혈관모세포종, 청신경종, 희돌기신경교종(oligodendroglioma), 수막종, 흑색종, 다발성 골수종, 신경모세포종, 망막모세포

종 및 백혈병이다.

[0099] 일부 특정 구현예들에서, 치료될 암은 고형암이다.

[0100] 또한 일부 추가의 구현예들에서, 치료될 암은 예를 들어 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 뼈암, 대장암, 위암, 림프종, 악성 흑색종, 간암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 갑상선암, 신장암, 담도암, 뇌암, 자궁경부암, 상악동암, 방광암, 식도암, 및 부신피질암으로부터 선택된다.

[0101] 하나 이상의 추가의 구현예들에서, 암은 흑색종, 신장암, 비소세포 폐암, 유방암, 방광암, 두경부암, 및 결장암으로부터 선택된다.

[0102] 하나 이상의 특정 구현예들에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다. 삼중 음성 유방암은 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 및 ERBB2(HER2) 유전자 증폭을 결여한 매우 공격적인 종양이다.

[0103] 본 발명의 방법, 키트 및 조성물은 예를 들어, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여에 의해, 대상체의 반응을 개선시킴으로써, 입양 세포 이식의 치료적 효과 증진에 유용하다. 증진된 반응은 치료중 임의의 적합한 시점, 즉 치료 1회차 후, 치료 2 내지 3회차 후 등에 임의의 수의 적합한 방법에 의해 평가될 수 있으며, 상기 방법은 종양 수축(부분 반응)(즉 종양 크기 또는 부피의 평가), 종양 소멸, 질환 진행 감소(암이 진행되지 않는 것), 그리고 적당하다면 하나 이상의 종양 시험 마커 분석을 포함한다. 일부 경우에서, 치료 효능의 적응증은, 입양 세포 이식 및 RSLAIL-2와 같은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 이용한 치료를, 입양 세포 이식 단독, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제 단독을 이용한 치료, 또는 입양 세포 이식 및 상응하는 비-지속 작용성 버전의 IL-2의 조합을 이용한 치료(예를 들어, 거의 동일한 정도의 IL-2 당량을 달성하기 위해 투여됨)와 비교하여, 시간 지연 면에서, 50% 최대 종양 성장 사이에서 측정될 수 있다. 비교는 인간 환자, 또는 적합한 동물 모델, 예컨대 적합한 뮤린 암 모델에서 수행될 수 있다.

[0104] 본 명세서에서 제공된 방법, 키트, 조성물 및 조합은 또한 치료를 받는 대상체에서 종양 성장 또는 크기(또는 부피)를 감소시키는 데 유용하다. 확립된 종양이 발병한 대상체로의, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 치료적 유효량의 투여와 조합된 입양 세포 이식을 사용하는 치료는, 하나 이상의 구현예들에서, 대상체에서 종양 성장 또는 크기를 감소시키는 데 유효하다. 예를 들어 몇몇 구현예들에서, 종양 크기를 치료전 종양 크기와 비교하였을 때 약 25% 또는 약 30% 또는 약 40% 또는 약 50% 또는 심지어 약 60% 또는 약 70% 또는 이 이상까지 줄이는 데에는 1차 이상의 치료 회차가 유효하다.

[0105] 또 다른 몇몇 추가의 구현예들에서, 본원에 제공된 방법, 키트, 조성물 및 조합은 암 치료 진행중인 대상체 내에서 조절 T 세포(Treg)의 축적을 억제하는 데 유효하다. 일부 구현예들에서, 예를 들어, 상응하는 암의 암 마우스 모델에서 평가된 경우, 본 방법은 ACT 단독 또는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제 단독의 투여, 또는 ACT 및 상응하는 비-지속 작용성 버전의 IL-2의 조합을 이용한 치료(예를 들어, 거의 동일한 정도의 IL-2 당량을 달성하기 위해 투여됨)시 관찰되는 것보다 증진되는 양으로, 종양에서 CD4+ Treg, CD25+ Treg 및 FoxP3+ Treg로 이루어진 군으로부터 선택된 조절 T 세포(즉, 상기 세포 유형들 중 임의의 하나 이상의 것)의 축적을 억제하는 데 유효하다.

[0106] 또 다른 몇몇 추가의 구현예들에서, 본원에 제공된 방법, 키트, 조성물 및 조합은 대상체 내에서 T 세포 및/또는 NK 세포 활성 및/또는 증식을 자극하는 데 유효하다. 몇몇 구현예들에서, 본 방법은, 예를 들어 상응하는 암의 암 마우스 모델을 대상으로 대상체 내 CD8+ T 세포 수의 증가에 대해 평가되었을 때 유효하다. 또 다른 몇몇 기타 구현예들에서, 본 방법은, 예를 들어 상응하는 암의 암 마우스 모델을 대상으로 평가되었을 때, 대상체 내 NK 세포 수를 증가시키는 데 유효하다.

[0107] 실시예에 따르면, 실시예 4 및 실시예 5는 공격적인 뮤린 흑색종 모델에서 입양 세포 이식과 조합된 RSLAIL-2의 항-종양 활성의 평가를 기술한다. 이러한 실시예들에서 상술된 바와 같이, 입양 세포 이식과 조합된 예시적인 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제, RSLAIL-2를 이용한 치료는, (특히) T 세포를 종양 내로 강하게 이동시키며, 종양 내에서 T 세포는 오래 지속되는 것으로 발견되었다. 나아가, 입양 세포 이식/비-지속 작용성 IL-2 조합으로 유사하게 치료된 군에 비해 효과가 현저한 것으로 나타났다. ACT/RSLAIL-2 병용 요법 군의 경우 (대조군 및 ACT/IL-2 조합에 비해) 현저히 증진된 종양 성장 지연뿐만 아니라, RSLAIL-2 처리군의 경우에도 종양 호밍(homing)이 관찰된, 비장에서의 증가된 T 세포 확장이 있었다. 이들 결과가 제안하는 바와 같이, 입양 세포 요법 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제, RSLAIL-2의 조합은 이펙터 세포에 대해 편향되며, 이는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 단일 도스 후뿐만 아니라 다중 도스 후에도 지속된다. 또한, 이러한 이펙터 세포 편향은, 정상 조직과 비교하여, 종양에서 특이적으로 관찰되며, 이미징, 유세포 분석 및 IHC를 포함하는 독립적

인 분석 방법에 의해 뒷받침되는 바에 따라, 인터루킨-2 치료와 조합된 입양 세포 이식에 비해 현저하다. 또한, 이펙터 세포의 지속성은 도스 후 시점의 길이, 및 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 다중-도스 후 유지되는 (후속 도스들에 반응이 떨어지는 IL-2의 투여에 비해) 강력한 반응에 의해 나타난다. 많은 ACT 기반 요법과 대조적으로, 본 명세서에 기술된 병용 면역 요법은 종양 부위에서 외생적으로 전달된 이펙터 세포의 범위 및 지속성(즉, 보유)을 증가시키는 데 효과적이어서, 증가된 항종양 효능을 제공한다.

[0108] 따라서, 또한 추가의 양태에서, 대상체에서 외생적으로 도입된 이펙터 T 세포의 보유를 증가시키는 방법이 본 명세서에서 제공되며, 이는 (i) 암성 종양이 발병한 대상체에게, 대상체의 암성 종양으로부터 수득되고, 배양 및 생체 외에서 확장된 림프구를 도입하는 단계, 및 (ii) IL-2Rβ 활성화량만큼의 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제를 대상체에게 투여하는 단계로서, 이에 의해 단계 (i) 단독으로부터의 림프구를 이용한 대상체의 치료(즉 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여가 없음)시에 종양 부위에 보유되는 도입된 림프구의 수와 비교하여, 또는 비-지속 작용성 버전의 인터루킨-2의 투여(예를 들어, 거의 동일한 정도의 IL-2 당량을 달성하기 위해 투여됨)와 조합된 단계 (i)로부터의 림프구를 사용한 대상체의 치료시 종양 부위에서 보유되는 도입된 림프구의 수와 비교하여, 종양 부위에 보유되는 도입된 림프구의 수가 더 많게 된다.

[0109] 종양 부위에 보유된 도입된 림프구의 수는 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 투여 후 임의의 적당한 시점, 예를 들어, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 첫 번째 투여 후 1일차, 2일차, 3일차, 4일차, 5일차, 6일차, 7일차, 8일차, 9일차, 10일차, 11일차, 12일차, 13일차, 14일차, 15일차, 16일차, 17일차, 18일차, 19일차, 20일차 등에 측정될 수 있다. 일부 바람직한 구현예들에서, 도입된 림프구의 수는, 세포의 수를 평가하기 위한 임의의 적합한 방법을 이용하여, 지속 작용성 IL-2Rβ 편향 효현제의 첫 번째 투여 후 10, 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16일차 중 어느 한 날에 측정된다. 적합한 방법은 이미지 분석, 유세포 분석, 및 IHC를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0110] 본 명세서에 언급된 모든 논문, 서적, 특허, 특허 공개 및 기타 다른 간행물은 전체가 참고로 포함된다. 본 명세서의 교시와 참고로 포함된 기술 사이에 불일치가 있는 경우에는, (특히 본 명세서에 첨부된 청구범위에서 사용된 용어에 대해) 본 명세서의 교시 및 정의의 의미가 우선할 것이다. 예를 들어, 참고로 포함된 출원 및 간행물이 동일한 용어를 상이하게 정의하는 경우, 해당 용어의 정의는 정의가 있는 문헌의 교시 내에서 보존될 것이다.

[0111] **실시예**

[0112] 다음의 실시예는 본 개시 내용의 범주를 설명하는 것으로 의도되며 제한하지 않는 것으로 의도된다는 것이 이해되어야 한다. 본 발명(들)의 범주 내의 다른 양태, 이점 및 변형은 본 개시 내용이 속하는 기술분야의 당업자에게 명확할 것이다.

[0113] **재료 및 방법**

[0114] 알데스루킨의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 가지는 재조합 인간 IL-2를 클로닝 및 발현시키고, 예시적 지속 작용성 IL-2Rαβ 편향 효현제(본원에서 RSLAIL-2라 지칭됨)를 제조하는 데 사용하였다.

[0115] "RSLAIL-2"란, PCT 국제특허출원공보 WO 2015/125159의 실시예 1의 절차에 따라 수득 가능한 조성물을 지칭하는 것으로, 총괄적으로는 IL-2의 다중 페길화된 형태를 포함하는 조성물을 지칭하며, 여기서 컨쥬게이트의 형성에 사용된 PEG 시약의 부착은 대상체에의 투여 후 탈락 가능하다. 또한 하기 실시예 1을 참조한다.

[0116] **실시예 1**

[0117] **MPEG2-C2-FMOC-20KD-NHS에 의한 RIL-2의 페길화**

[0118] 1.44 mg/ml로 정제된 rIL-2(106.4 mL)를 첫 번째 용기에 채우고 나서, 53.6 mL의 제형 완충제(10 mM 아세트산나트륨, pH 4.5, 5% 트레할로스)를 첨가하였다. pH가 4.62로 측정되고, 온도가 21.2℃로 측정되었다. PEG 시약인 C2-PEG2-FMOC-NHS-20K(WO 2006/138572에서 기술한 바와 같이 이용가능)(13.1 g)를 제2 용기 내에 채우고 나서, 73.3 mL의 2 mM HCl을 첨가하였다. 생성된 용액을 손으로 25분 동안 교반시켰다. 붕산나트륨(0.5 M, pH 9.8)을 제1 용기에 첨가하여 pH를 약 9.1로 상승시키고, 이어서 PEG 시약을 함유하는 제2 용기의 내용물을 1분 내지 2분의 기간에 걸쳐 제1 용기에 첨가하였다. 이어서 8.1 mL의 2 mM HCl을 제2 용기에 채움으로써 헹굼 단계를 수행하고, 제1 용기에 상기 내용물을 첨가하였다. 컨쥬게이션 반응에 있어서, 최종 rIL-2 농도는 0.6 mg/mL이고, 붕산나트륨 농도는 120 mM이며, pH는 9.1 +/-0.2이고, 온도는 20℃ 내지 22℃이며, 시약의 활성에 대한 조절 후 PEG 시약 대 rIL-2의 몰 비(치환 수준)는 35:1이었다. 컨쥬게이션 반응을 30분 동안 진행시킨 후, 여기

에 2 N 아세트산 75 mL를 첨가하여 (pH를 대략 4까지 강하시켜) 산성화함으로써 퀜칭(quenching)하였다. 생성물을 앞서 기술한 바와 같은 이온 교환 크로마토그래피로 정제하여, 주로 4량체, 5량체 및 6량체(이 4, 5 및 6은 r-IL-2에 방출가능하도록 공유 부착된 PEG 시약의 수를 지칭하는 것으로서, 8량체 및 이 이상의 정도로 페길화가 일어난 다량체는 크로마토그래피와 연관된 세정 단계 동안에 제거됨)로 이루어진 조성물을 제공하였다. 이 조성물을 본원에서는 "RSLAIL-2"라 칭한다.

[0119] **실시예 2**

[0120] **RSLAIL-2의 수용체 편향성 및 면역 요법상의 관련 특성**

[0121] IL-2 수용체에 대한 결합 친화성 및 면역자극 프로필과 관련된 수용체 편향성: RSLAIL-2의, IL-2Rα 및 IL-2Rβ에 대한 친화성을 표면플라스몬 공명법(Biacore T-100)으로 직접 측정하여, 이를 임상적으로 이용 가능한 IL-2(알데스루킨)의 IL-2Rα 및 IL-2Rβ에 대한 친화성과 비교하였다. EDC/NHS 화학을 이용하여 항인간 항체(Invitrogen)를 CM-5 센서 칩 표면에 커플링(coupling)하였다. 그 다음, 인간 IL-2Rα-Fc 또는 IL-2Rβ-Fc 융합 단백질 어느 하나를 이 표면에 대하여 포착된 리간드로서 사용하였다. RSLAIL-2 및 이의 활성 IL-2 컨쥬게이트 대사체(1-PEG-IL-2 및 2-PEG-IL-2)의 일련의 희석액을 아세트산염 완충제(pH 4.5) 중에 제조하였다(5 mM에서 출발). 이 희석액들을 5분 동안 리간드와 결합하도록 허용하고, 결합된 반응 단위(RU)를, 농도에 대해 플롯화하여 EC50 값을 결정하였다. 각각의 이소폼의, 각각의 IL-2 수용체 서브타입에 대한 친화성을 IL-2의, IL-2 수용체 서브타입에 대한 친화성을 기준으로 하는 배수 변화로서 산정하였다.

[0122] RSLAIL-2의 시험관 내 결합 및 활성화 프로필은, 페길화가, 알데스루킨에 비해 IL2 및 IL2Rα 간 상호작용을 방해함을 암시하였으며; 이러한 효과가 생체 내 면역 세포 서브타입의 프로필을 편향시키는지를 확인하기 위한 연구를 수행하였다. RSLAIL-2 또는 IL2 중 어느 하나를 투여한 후 종양 내 CD8 T 세포 및 Treg 세포의 수는, (RSLAIL-2에서처럼) IL2/IL2Rα 계면에서의 IL2와 폴리(에틸렌글리콜)의 컨쥬게이션으로 말미암아 IL2의 다면발현효과가 변동되었는지에 관한 중요한 척도이다. 의문을 해결하기 위해, 피하 B16F10 마우스 흑색종 종양을 보유하는 마우스를 RSLAIL-2 단일 용량 또는 알데스루킨 5회분 용량으로 처리한 다음, 종양 미세환경 내 면역 세포를 유세포분석으로 정량하였다. 결과들을 **도 1a 내지 1g**에 나타내었다.

[0123] 알데스루킨 처리된 마우스의 종양에 있어서, 총 CD8 세포 및 기억 CD8 세포는 증가하였지만(종양 침습 림프구의 백분율로 파악); 이러한 효과는 일시적이었으며, 5일에는 비히클 투여시에 비하여 유의미한 정도에 이르게 되었다. 반대로, RSLAIL-2만이 단독 투여된 후에는 유의미하고($P < 0.05$) 지속적인 총 CD8 T 세포 자극 및 기억 CD8 T 세포 자극이 달성되었는데, 이 경우 알데스루킨 처리시에 비하여 (7일에서의) 기억 CD8 T 세포 백분율 및 (7일 및 10일에서의) 총 CD8 T 세포 백분율은 월등히 컸다. RSLAIL-2 처리 및 알데스루킨 처리는 둘 다 처리 개시 후 5일 및 7일 경과시에 활성화된 자연 살해(NK) 세포의 증가를 초래하였지만, 이 효과는 10일에 이르기까지 사라졌다. 5일에, 종양 침습 림프구 중 CD4 세포 백분율은 비히클 처리시에 비해 RSLAIL-2 처리시 감소하였다. 10일에, RSLAIL-2는 비히클 및 알데스루킨에 비하여 더 낮은 CD4 세포 백분율을 초래하였다. CD4 세포 집단을, Treg 집단을 정의하는 $FoxP3^+$ 서브세트에 대해 더 분석하였다. RSLAIL-2 투여는 매 시점마다 Treg의 백분율을 감소시켰는데, 이는 PEG 사슬로부터 유래하는 IL2Rα 서브유닛에 대한 접근경로가 감소한 것과 일치하였다. 반대로, 알데스루킨에 의한 Treg 감소는 5일에 유의성을 달성하면서도 보통의 수준이었다. CD8 T 세포의 증가와 Treg의 감소는, 7일이 될 때까지 종양 내 CD8/Treg 비의 상당한 증가를 유도하였다. RSLAIL-2, 알데스루킨 및 비히클 투여시의 CD8/Treg 비는 각각 449, 18 및 4였는데, 이 점은 RSLAIL-2에 대해서 IL2 수용체 알파보다는 IL2 수용체 베타가 우선적으로 활성화됨을 뒷받침해준다.

[0124] 면역조직화학적 염색을 수행한 결과, CD8 T 세포는 그 수가 증가하였을 뿐만 아니라, 종양 세포 속에 존재하였음을 확인하였다. 이러한 결과는, RSLAIL-2가, 종양 내 Treg의 상응하는 자극을 일으키지 않고도 시험관 내 IL2Rβ 편향 결합 프로필과 일관되게, 비변형 IL-2(알데스루킨)에 의해 보이는 것보다 더 강력한 생체 내 기억 효과기 CD8 T 세포 반응 유도하는 데 유효함을 나타낸다. 다시 말해서, RSLAIL-2는 Treg보다 효과기 CD8+ T 세포 및 NK 세포를 우선적으로 활성화하고 증식시키는 데 유효하다.

[0125] **실시예 3**

[0126] **RSLAIL-2의 종양 노출**

[0127] 본 연구의 목적은, B16F10 흑색종 세포가 이식된 C57BL/6 마우스에서 RSLAIL-2의 항종양 활성을 알데스루킨의 항종양 활성과 비교하여 평가하는 것이었다.

[0128] C57BL/6 마우스의 오른쪽 옆구리에 B16F10 흑색종 세포(동물당 1 × 10^6개)를 피하 이식하였다. 이식 후 7일에, 종양이 200 mm^3으로 측정되면, 동물에 RSLAIL-2(2 mg/kg × 1) 또는 알데스루킨(매일 3 mg/kg × 5)을 투여하였다. 종양을 수집하고(관찰 시간당 n = 4), 프로테아제 억제제(Roche) 및 0.25% 아세트산을 함유하는 얼음 냉각 PBS에서 균질화한 다음, 원심분리하여, 상청액을 수득하였다. 종양 조직 내 RSLAIL-2 수준을 정량하기 위해, 상청액을 37℃에서 밤새 pH 9의 완충제 중에 항온처리하여, IL2로부터 PEG를 방출시켰다. 인간 IL2에 특이적인 샌드위치 ELISA에 의해 IL2를 측정하였다. AUC를 산정하기 위해, 비구획 모델을 사용하여 데이터를 Pheonix WinNonLin에 피팅하였다. 1일에서의 AUC에 5를 곱하여 알데스루킨 처리 후의 AUC를 추산하였다.

[0129] **도 2**에 나타낸 바와 같이, 종양 알데스루킨 수준은 급속하게 C_{max}에 도달하였으며, 이후에는 급속하게 감소하여, 매 투여 후 24시간에서의 농도는 4 ng/g 미만이었고, 매일의 AUC는 0.09 ± 0.02 μg/시간/g이 되었다. 반대로, RSLAIL-2는 1회 투여 후 8일까지 종양 내에서 검출될 수 있었는데, 이때 AUC는 30 ± 6.9 μg/시간/g에 이르게 되었다. AUC를 기반으로 하였을 때, RSLAIL-2의 1회 투여는 알데스루킨이 매일 5회 투여되었을 때에 비하여, 심지어 RSLAIL-2가 사용되었을 때에는 7.5배 더 작은 당량의 IL2가 투여되었을 때에 비하여, 67배 더 많은 노출을 유도하였다(매일 3 mg/kg × 5 = 15 mg/kg vs. 2 mg/kg). 그러므로, IL2 당량을 기반으로 노출을 정규화하였을 때, RSLAIL-2는 알데스루킨 처리시보다 500배 증가한 노출을 달성하였다. RSLAIL-2의 컨쥬게이션된 활성 IL-2 형태(2-PEG-IL2 및 1-PEG-IL2 모두)도 또한 정량한 결과, 5일까지는 종양 내에서 검출 가능한 상태였으며, 이때 AUC는 23 ± 4.4 μg/g에 달하였다. 그러므로 컨쥬게이션된 활성 IL2에 대한 노출은 알데스루킨의 경우에 비하여 50배 더 많았는데, 이는 곧 동일 용량의 알데스루킨이 투여되었을 때에 비하여 노출이 380배 증가한 것으로 해석된다. 따라서, 마우스 내 RSLAIL-2의 종양 노출은, 5일 주기 2회차 동안 매일 2회 투여되었던 알데스루킨의 경우와는 비교되게, 9일마다 1회 투여를 허용하였다.

[0130] **실시예 4**

[0131] **공격적인 뮤린 흑색종 모델에서 ACT와 조합된 RSLAIL-2의 항종양 활성의 평가**

[0132] pmel-1 ACT/BL6 흑색종 종양 모델을 사용하여 RSLAIL-2의 항종양 활성을 시험하고, 종양 특이적 TCR 유전자이식 T 세포에 대한 이의 효과를 평가하였다. D6(6일차)에, 이온화 방사선의 500 cGy 도스를 이용하여 림프구제거 후, 0일차(D0)에, C57/BL6 마우스에 B16-F10 마우스 흑색종 세포를 이식하였다. D7일에, 마우스들을 ACT(1 μg/ml 항원 gp100를 이용하여 시험관 내에서 활성화된 T 림프구)와 RSLAIL-2(0.8 mg/kg, q9dx3, i.v.)의 조합, 또는 C57/BL6 T 세포와 PBS(비히클 대조구)의 조합을 이용하여 처리하였다. 비히클 대조구 마우스(n=12)의 종양은 처리후 12일 내에 1500 mm^3 종점으로 급속히 성장한 한편, RSLAIL-2/ACT 조합 군(n=12)의 경우 35일차에 12마리 중 단지 1마리만 종점에 도달하였다. 생물발광 이미징을 사용하여 항원-특이적 T 세포의 생체 내 분포 및 종양 호밍을 시각화하였다. 흥미롭게도, RSLAIL-2/ACT 투여 후, 리포터 T 세포는 D7까지 비장 내에 보유되었으며, D9에 종양으로 이동하여, D12에 피크 생물발광에 도달하는 것을 볼 수 있었는데, 이는 통상의 IL-2로 처리된 마우스에서 일반적으로 관찰되는 5일차와 비교하여 지연된 시점이다. 신호는 비히클-대조구 동물에서 D7까지에 비해 D20까지 지속되었다. 이들 데이터는 ACT와 조합된 RSLAIL-2가 공격적인 B16F10 뮤린 흑색종 모델에서 내성이 우수하고, 강력한 항-종양 반응을 제공함을 시사한다. RSLAIL-2 및 ACT 요법을 이용한 처리는 T 세포를 종양 내로 강력히 이동시키며, T 세포는 종양 내에서 오래 지속된다. RSLAIL-2의 강력하고 오래 지속되는 효과는, 세포-기반 치료제와 조합된 이용을 뒷받침한다.

[0133] 키메라 뮤린/인간 MHC 분자를 발현하도록 조작된 B16-A2/K 뮤린 흑색종 또는 EL-4-A2/K 뮤린 림프종 종양을 이용하여 유사한 연구가 수행된다.

[0134] **실시예 5**

[0135] **뮤린 흑색종 모델에서 ACT와 조합된 RSLAIL-2 또는 IL-2의 항종양 활성의 평가**

[0136] C57/BL6 마우스는, D-7(-7일차)에 B16F10(동물 당 0.5X10^6) 동계(syngeneic) 뮤린 흑색종 세포주로 피하 이식되었으며, D-1(-1일차)에 이온화 방사선의 500 cGy 도스로 림프구제거되었다. D0(0일차)에, 마우스들은 ACT(1 μg/ml gp100으로 시험관 내 활성화된 pmel-1 gp100 TCR 유전자이식 T 림프구) 및 RSLAIL-2(0.8 mg/kg, q9dx3, i.v.)의 조합으로 또는 IL-2(알데스루킨, 0.4 mg/kg, 3 사이클 동안 qdX3 매 9일차, i.p.), 또는 비히클로 처리되었다. 제2 및 제3 처리 사이클은 ACT를 포함하지 않았다. 비히클 대조구는 실시예 4에서와 동일하였다. **도 3**은 사용된 투약 전략을 설명하는 개략도를 제공한다.

[0137] **도 4**에서 나타낸 결과들로부터 알 수 있는 바와 같이(SEM 대 시간에 의해 결정된 바와 같은 평균 종양 부피(㎣)의 플롯), RSLAIL-2는 ACT와 조합하여 투여된 경우, 덜 빈번한 투여로 ACT와 조합된 IL-2와 비교하여, 현저한 종양 성장 지연을 제공하였다(IL-2와 조합된 ACT와 비교하여, $p<0.0001$); (# 비히클과 조합된 ACT와 비교하여, $p<0.0001$, (본페로니 검정을 이용하여 쌍별 비교). 플롯 고려시, ●은 ACT + 비히클(맨 위의 플롯)을 나타내고; ■은 ACT + IL-2(중간 플롯)를 나타내고; ▲은 ACT + RSLAIL-2(약 25일 후까지 현저한 종양 성장은 본질적으로 없는, 맨 아래 플롯)를 나타낸다.

[0138] 종양 성장 지연은 **도 5**에 예시된 바와 같이 추가로 평가되었으며, 여기서 종양 성장 지연은 종양 부피 1000 ㎣를 달성하는 시간을 보간함으로써 각각의 종양 성장 곡선에 대해 평가하였다(* ACT + IL-2와 비교하여, $p<0.0001$; # 비히클과 비교하여, $p<0.0001$, (로그 순위 멘텔-콕스 검정); N=12/군. 가장 좌측에 있는 플롯은 비히클과 조합하여 ACT 투여된 처리군을 나타내고; 가운데 플롯은 IL-2와 조합된 ACT를 수령하는 처리군을 나타내고; 가장 우측에 있는 플롯은 RSLAIL-2와 조합하여 ACT 투여된 처리군을 나타내며, 이는 기타 두 개의 처리군과 비교하여 가장 현저한 종양 성장 지연을 입증한다. 나타낸 바와 같이, 가장 현저한 종양 성장 지연이 RSLAIL-2 및 ACT의 조합에 대해 관찰되었다.

[0139] 생체 내 생물발광 이미징: 입양 이식된 림프구의 생체 내 생물발광 이미징(BLI)을 수행하였다. Pmel-1 유전자이식 T 세포를 레트로바이러스-반딧불이 루시퍼라제를 이용하여 형질도입하고, 시각화를 가능하게 하도록 ACT에 사용하였다. ACT/비히클 또는 ACT/IL-2 군과 대조적으로, ACT/RLSAIL-2 조합의 경우, 군 당 5 마리의 복제 마우스들에서 5일차 및 14일차에서의 대표 도면은, 비장에서의 T 세포 확장 및 종양으로의 이동 및 종양에서의 지속성을 입증하였다.

[0140] **도 6a 및 도 6b**는 루시퍼라제를 발현하는 pmel-1 T 세포의 ACT 후, 19일에 걸쳐서 비장(**도 6a**) 및 종양(**도 6b**)(픽셀 당 수)의 관심 대상의 영역(ROI)에서 일련의 이미지들의 정량화를 제공한다. **도 6a**: 맨 위의 플롯, ▲: 나타낸 바와 같이, ACT + RSLAIL-2; 중간 플롯, ■: ACT + IL-2; 맨 아래 플롯, ●: ACT + 비히클; **도 6b:** 맨 위의 플롯, ▲: 나타낸 바와 같이, ACT + RSLAIL-2; 중간 플롯, ■: ACT + IL-2; 아래 플롯, ●: ACT + 비히클).

[0141] 단일 ACT + RSLAIL-2 처리는, IL-2+ACT 또는 비히클의 매일 투여로 3회의 도스와 비교하여, 5일차 내지 9일차까지 비장에서의 T 세포 확장에서 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다(**도 6a**). 시간 경과에 따른 루시퍼라제 신호는, 5일차 내지 7일차의 ACT + IL-2 또는 ACT + 비히클 처리군과 비교하여, ACT + RSLAIL-2 처리군에서 종양 침윤성 이펙터 T 세포의 더욱 강한 피크를 나타냈다. 9일차에 투여된 RSLAIL-2의 제2 도스는 12일차 내지 17일차에 비장에서(**도 6a**) 및 종양에서(**도 6b**) 이펙터 T 세포의 제2 확장을 촉발하였다. 대조적으로, 제2 IL-2 처리 후 비장 또는 종양에서 확장은 없었다. (** IL-2 + ACT과 비교하여, $p<0.0001$, # ACT + 비히클과 비교하여, $p<0.0001$, 터키 검정을 이용하여 쌍별 비교, n =5, 평균 ± SE).

[0142] 종양 및 비장의 면역학적 분석: 종양 및 비장은 처리(단일 도스 RSLAIL-2 및 IL-2의 qdx3) 후 5일차에 수집하였다. 조절 T 세포 및 CD8+ T 세포에 대한 RSLAIL-2의 효과는 유세포 분석에 의해 평가되었다. **도 7a 및 도 7b**는 종양에서 특정 유형의 면역 세포의 수를 도시하는 플롯이다; **도 7c**는 처리군 각각에 대한 CD8/Treg 비(종양)를 제공한다. 유사하게, **도 8a 및 도8b**는 비장에서 면역 세포의 수를 나타내는 플롯인 한편, **도 8c**는 처리군 각각에 대해 CD8/Treg 비(비장)을 제공한다.

[0143] 더욱 구체적으로, **도 7a**는 처리군 각각에 대해 종양에서 Thy 1.1 CD8 세포의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 7b**는 처리군 각각에 대해 종양에서 CD4 Treg의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 7c**는 상기 기술된 바와 같이, 처리군 각각에 대해 종양에서 CD8 세포 대 Treg의 수의 비를 제공한다.

[0144] 이제 비장에 관해서, **도 8a**는 처리군 각각에 대해 비장에서 Thy 1.1 CD8 세포의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). 도 **8b**는 처리군 각각에 대해 비장에서 CD4 Treg의 수를 도시한 것이다(각각의 바에 대해, 왼쪽에서 오른쪽으로, ACT + 비히클; ACT + IL-2 및 ACT + RSLAIL-2). **도 8c**는 상기 기술된 바와 같이 처리군 각각에 대해 비장에서 CD8 세포 대 Treg의 수의 비를 제공한다.

[0145] 종양에서, 면역 세포의 절대 수는 종양 중량(그램)에 대해 정규화하고 그래프화되었다. 결과에 기초하여, ACT + IL-2 또는 ACT + 비히클 처리군과 비교하여, ACT +RSLAIL-2 처리가 pmel-1 CD8 T 세포를 증가시켰으며,

CD8/Treg 비를 증폭시켰음이 발견되었다. CD8/Treg 비는 RSLAIL-2 처리군의 경우 비장에서보다 종양에서 더 컸다. 비쌍체(unpaired) t 검정(**, $p<0.05$, 막대들은 비교를 나타냄, n=3).

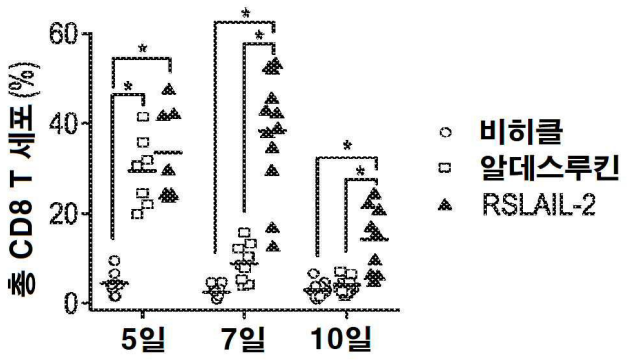
[0146] 또한, 방사선 조사 후, 비장 세포 회복은, 처리 후 5일차에 비장세포 수의 측정시 ACT + IL-2 처리군과 비교하여, ACT + RSLAIL-2 처리군의 경우 급속한 것으로 관찰되었다. 즉, RSLAIL-2는 방사선 조사 후, 급속한 비장 세포 재증식을 유도하였다. 비쌍체 t 검정(**, $p<0.0001$, 막대들은 비교를 나타냄). **도 9 참조**.

[0147] 면역조직화학 염색은 뮤린 항-CD8 항체를 이용하여 포르말린 고정된/파라핀 매립된 조직 상에서 수행되었고; 분석은 HALO 이미지 분석 소프트웨어(Indica Labs, New Mexico)를 이용하여 수행되었다. **도 10**은 12일차에서의 종양의 IHC(면역조직화학)이다. 이 도면은 군 당 3 마리의 상이한 마우스들의 종양에서의 CD8 침윤을 나타낸다. 제1 열("pos")은 CD8 염색을 나타내고, 제2 열("pos halo")은 HALO 소프트웨어에 의해 분석된 슬라이드로, 컬러 버전의 경우, 푸른색 점은 음성 세포이고, 황색 내지 적색 점은 CD8 양성 세포이고(황색은 CD8 발현이 낮고, 적색은 높음), 제3 열은 CD8 T 세포에 대해 양성인 영역의 5X 배율이다. 제4 열 및 제5 열은 각각 항체 항-CD8의 음성 염색, 정상 염색 및 HALO 분석이다. 제6 열은 H&E 염색이다. 제 1열에서 어두운 영역은 ACT + RSLAIL-2 병용 요법의 컬러 버전에서 제2 열에서 황색 및 적색 점에 상응한다. 이 도면은 두 개의 군 사이에서 CD8 발현에서 상당한 차이를 입증하며, CD8 발현 수준은 ACT + RSLAIL-2 병용 요법의 경우 현저히 더 높았다. IHC는, 비-중합체 변형된 IL-2인, 알데스루킨을 이용한 처리에 비해, 지속 작용성 편향된 IL-2Rβ-인터루킨-2(RSLAIL-2)를 이용한 처리의 경우, 종양 내 CD8 T 세포의 지속성을 도시한 것이다.

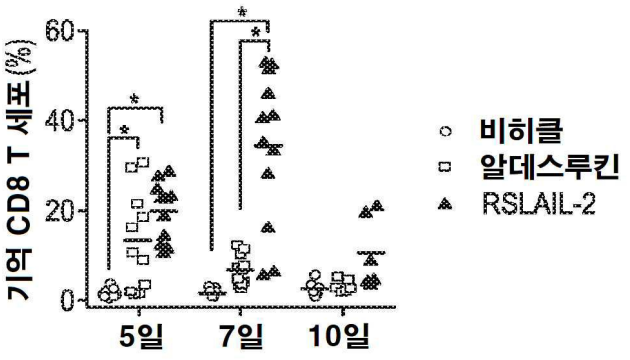
[0148] **도 11**은 정상, 비종양 조직(신장 및 간) 의 IHC이며, 실시예 5에 기재된 바와 같은 입양 세포 이식 후 IL-2(알데스루킨) 또는 RSLAIL-2의 1회 도스 후, 9일차에 조직-손상 CD8 T 세포의 결여를 나타낸다.

도면

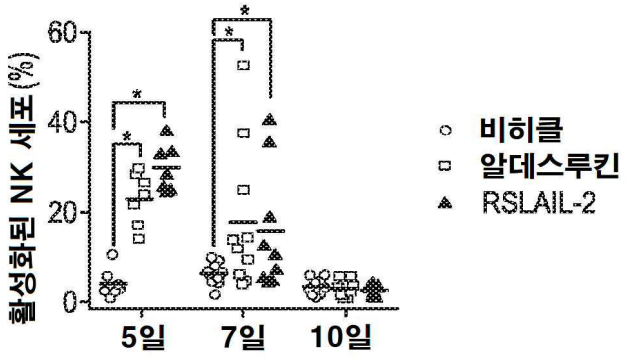
도면1a



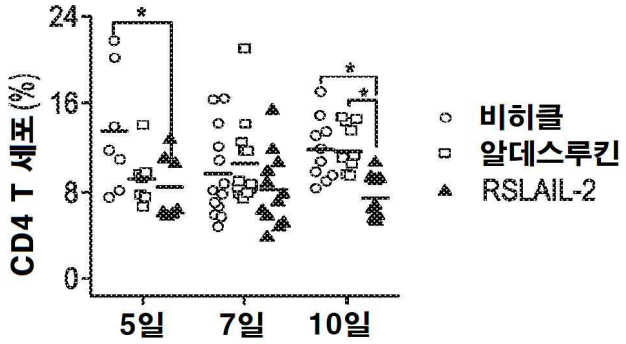
도면1b



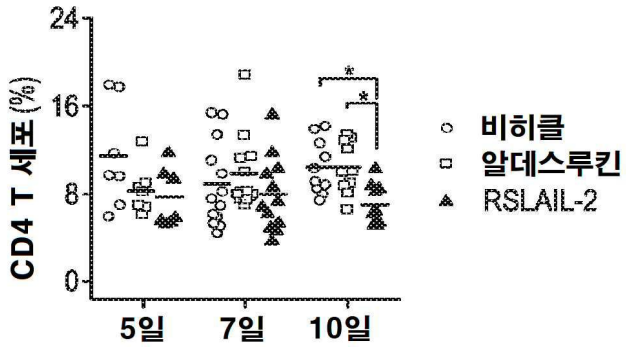
도면1c



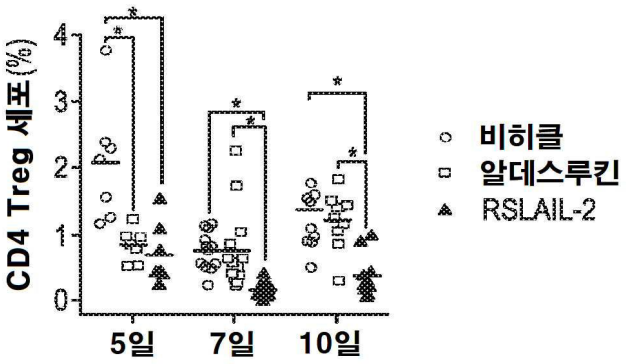
도면1d



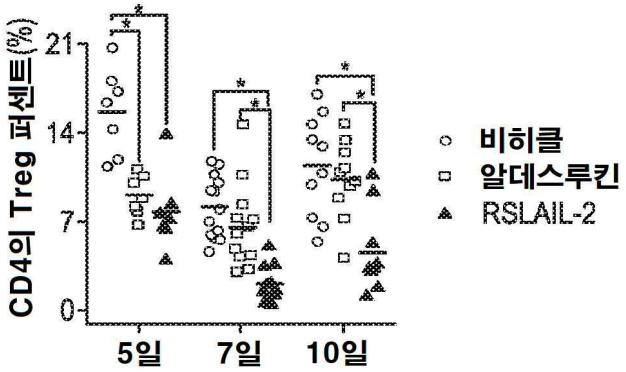
도면1e



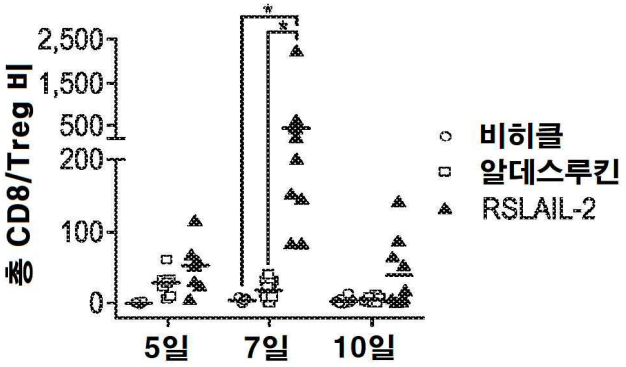
도면1f



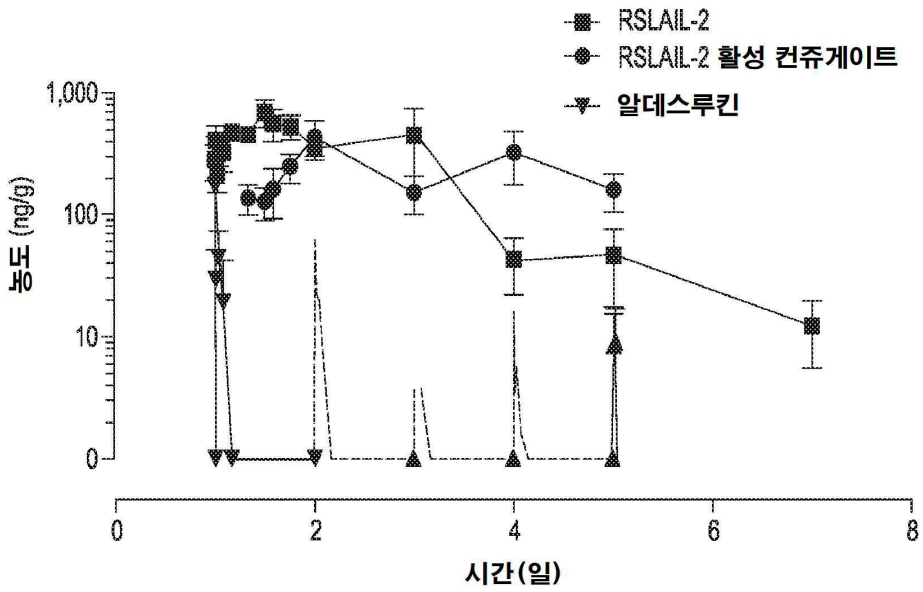
도면1g



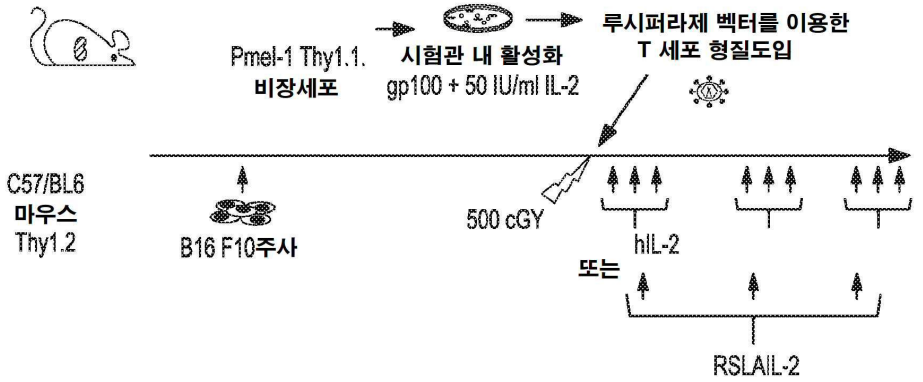
도면1h



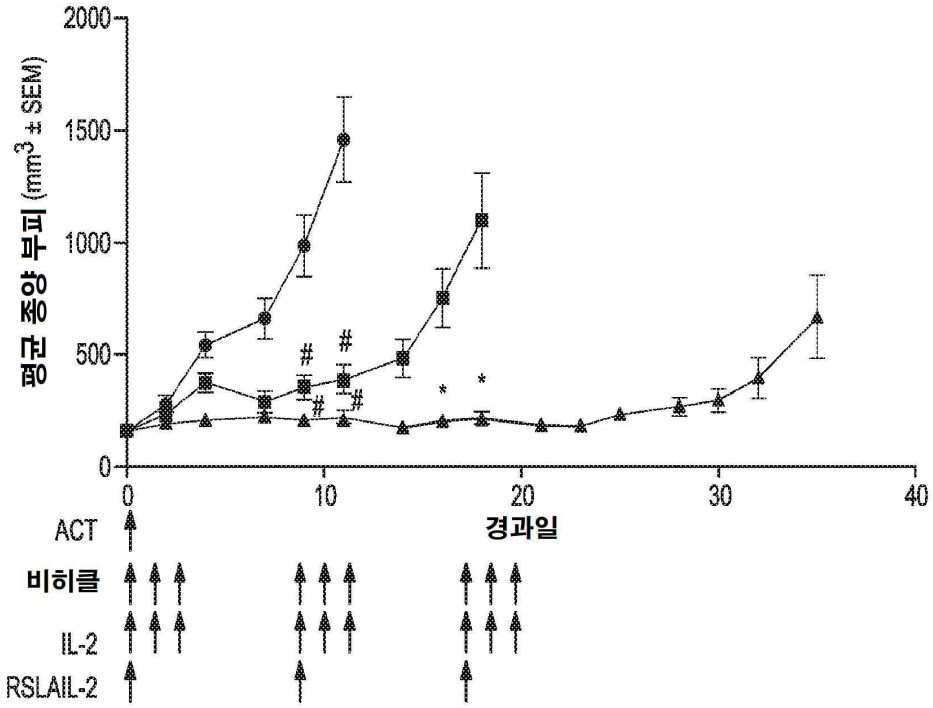
도면2


RSLAIL-2
RSLAIL-2 활성 컨쥬게이트
알데스루킨
1,000
100
10
0
혈청 (ng/g)
0
2
4
6
8
시간(일)

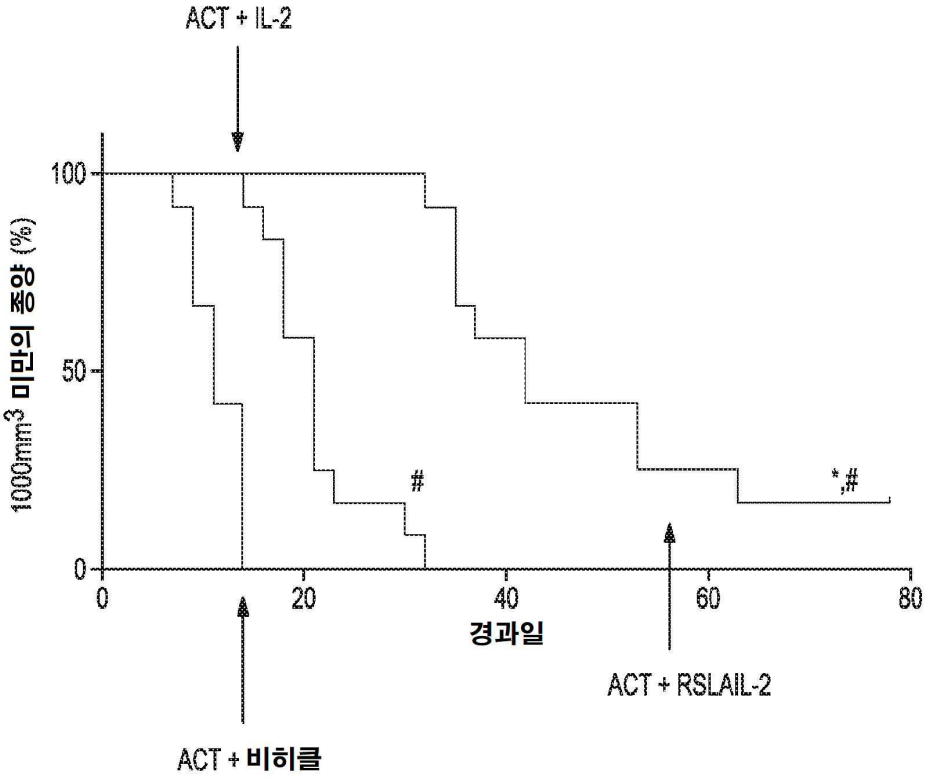
도면3


Pmel-1 Thy1.1.
비장세포
시험관 내 활성화
gp100 + 50 IU/ml IL-2
루시퍼라제 벡터를 이용한
T 세포 형질도입
C57/BL6
마우스
Thy1.2
B16 F10주사
500 cGY
hIL-2
또는
RSLAIL-2

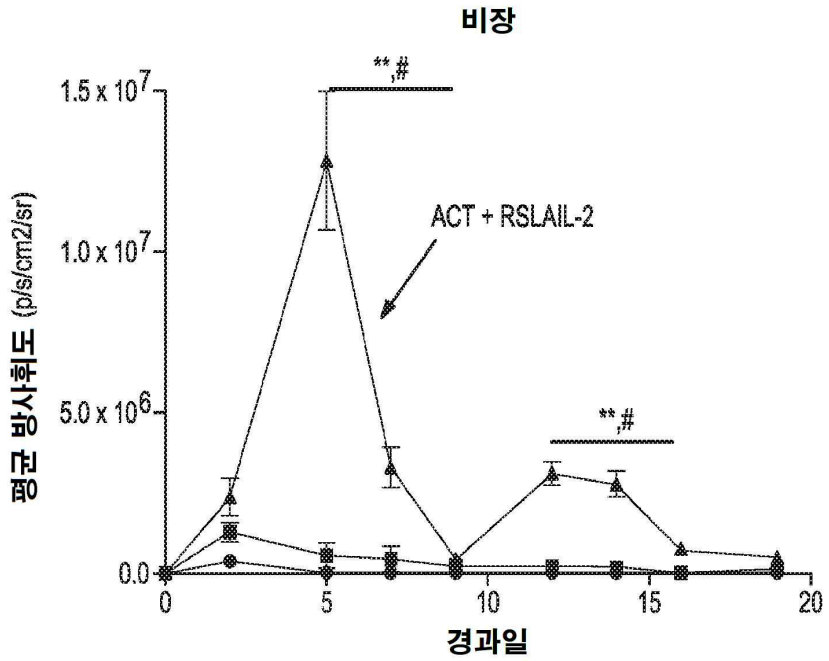
도면4


2000
1500
1000
500
0
평균 종양 부피 (mm3 ± SEM)
0
10
20
30
40
경과일
ACT
비히클
IL-2
RSLAIL-2
#
*

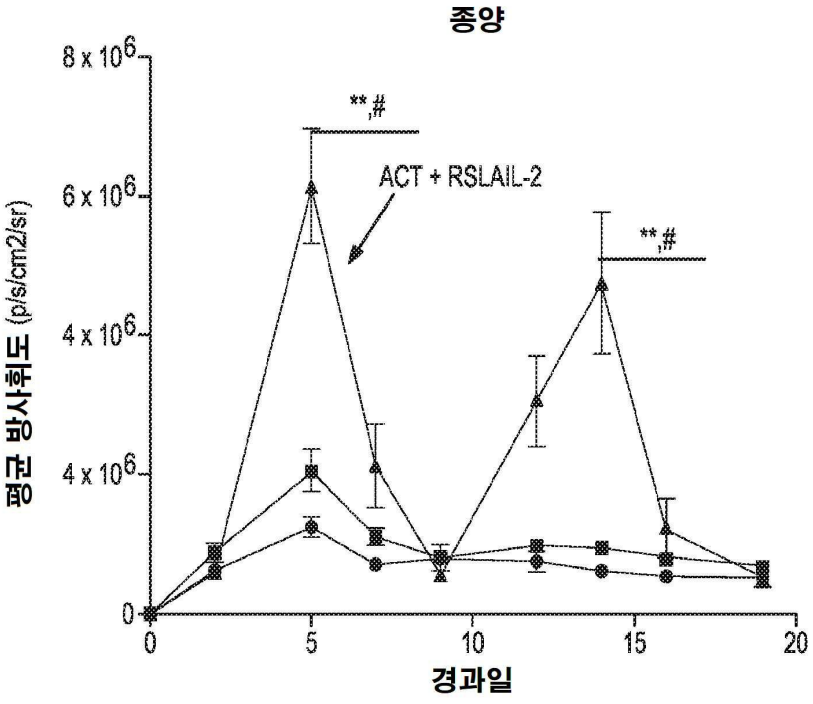
도면5


ACT + IL-2
100
50
0
1000mm3 미만의 종양 (%)
0
20
40
60
80
경과일
#
*,#
ACT + RSLAIL-2
ACT + 비히클

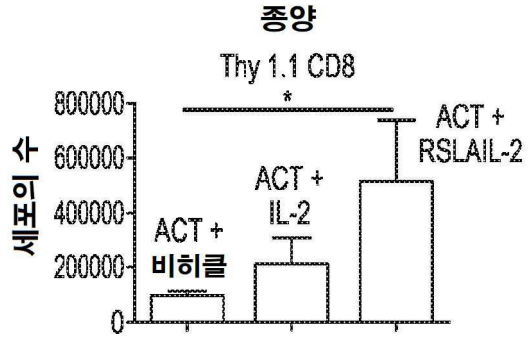
도면6a


비장
**,#
1.5 x 10^7
1.0 x 10^7
5.0 x 10^6
0.0
ACT + RSLAIL-2
**,#
평균 방사휘도 (p/s/cm2/sr)
0
5
10
15
20
경과일

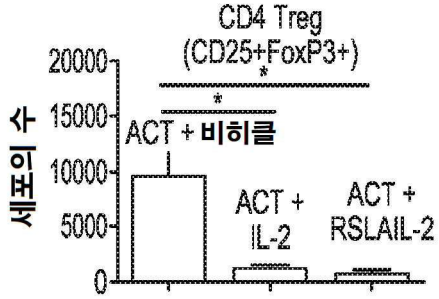
도면6b


종양
8 x 10^6
6 x 10^6
4 x 10^6
4 x 10^6
0
**,#
ACT + RSLAIL-2
**,#
평균 방사휘도 (p/s/cm2/sr)
0
5
10
15
20
경과일

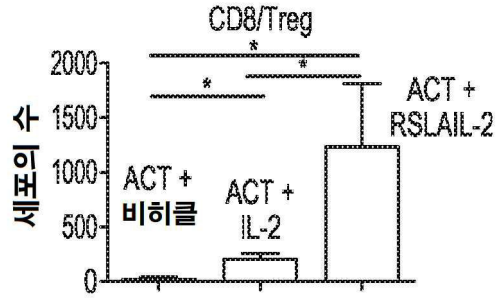
도면7a



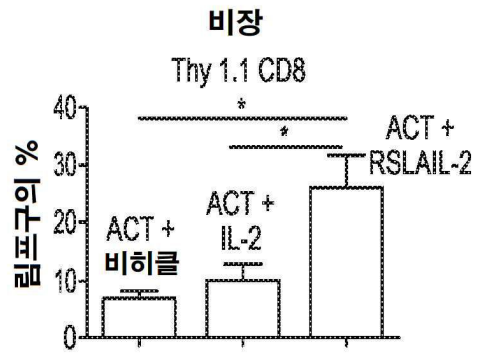
도면7b



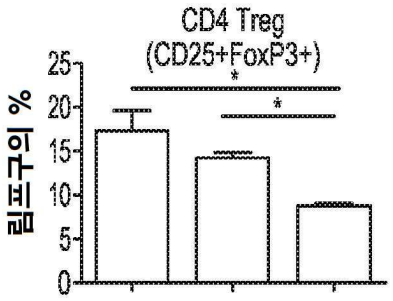
도면7c



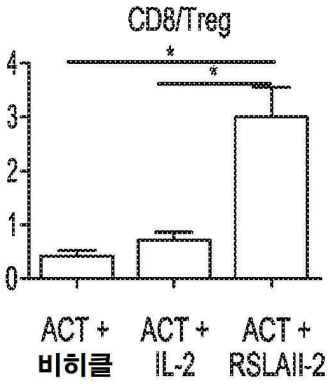
도면8a



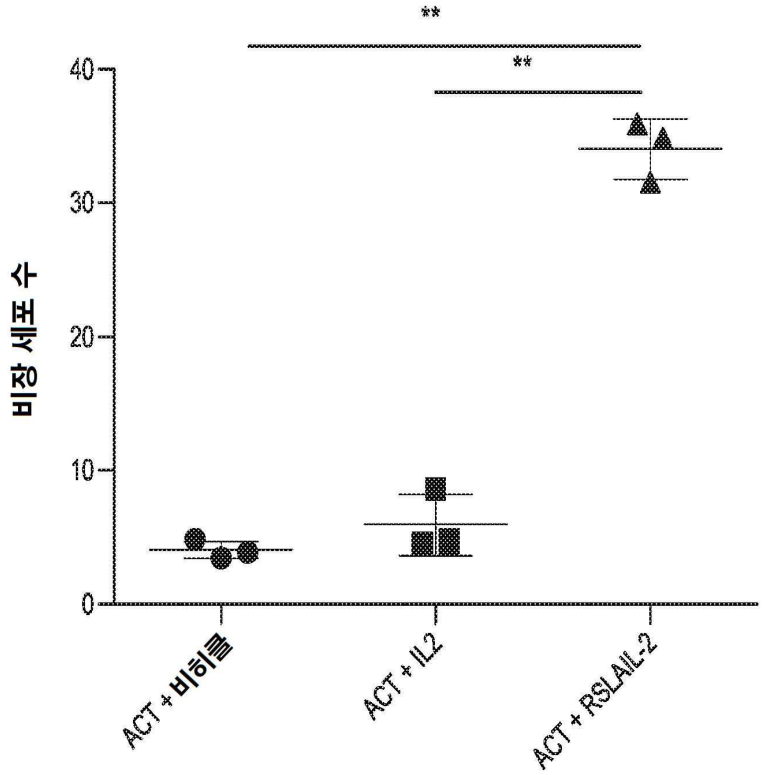
도면8b



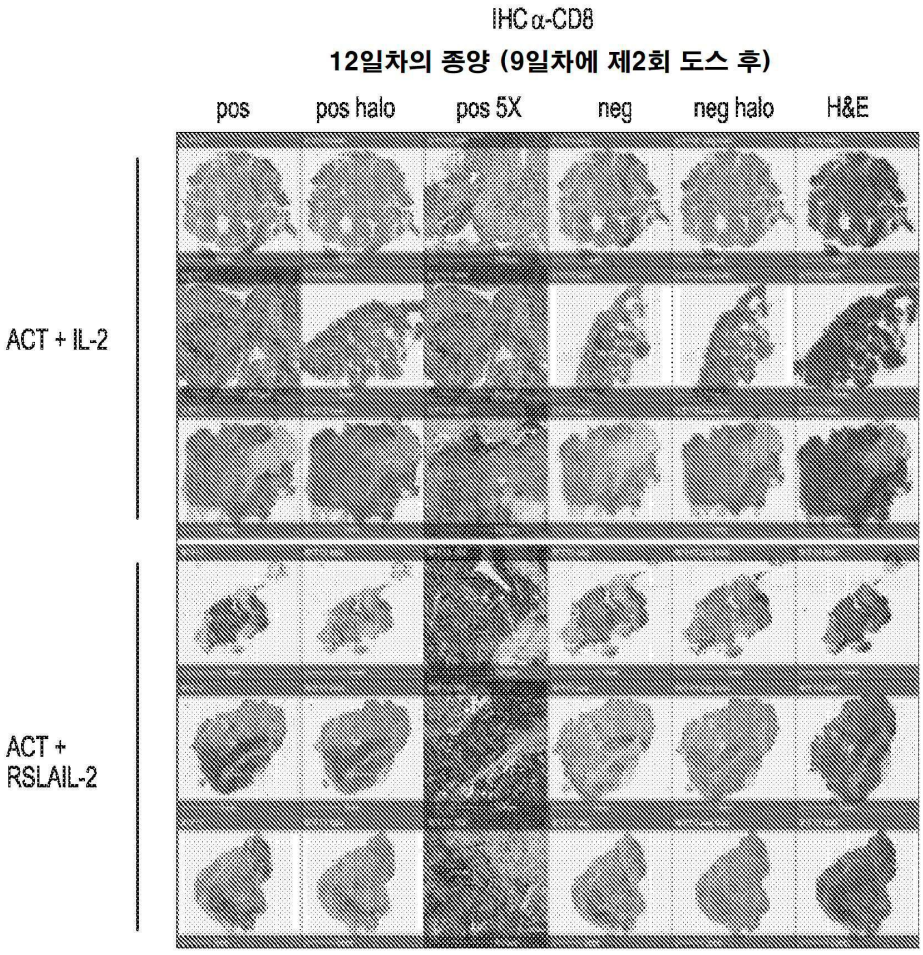
도면8c



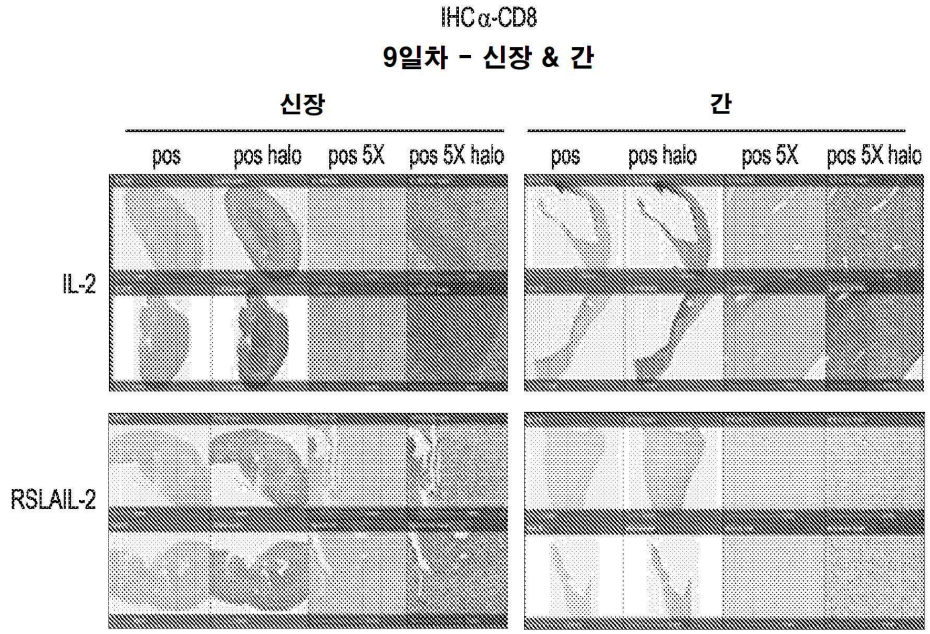
도면9



도면10


IHC α-CD8
12일차의 종양 (9일차에 제2회 도스 후)
pos
pos halo
pos 5X
neg
neg halo
H&E
ACT + IL-2
ACT + RSLAIL-2

도면11


IHC α-CD8
9일차 - 신장 & 간
신장
간
pos
pos halo
pos 5X
pos 5X halo
pos
pos halo
pos 5X
pos 5X halo
IL-2
RSLAIL-2

도면12

서열 번호 1

```
MYRMQLLSCI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN
-20        -10         1          11         21

YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL
31         41          51         61         71

RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS
81         91          101        111        121

TLT
```

서열 번호 2

```
                     APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN

YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL

RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT
```

서열 번호 3

```
                     PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN

YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL

RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT
```

서열 번호 4

```
                     APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN

YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL

RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS

TLT
```

서 열 목 록

<110> NEKTAR THERAPEUTICS

<120> IMMUNOTHERAPEUTIC TUMOR TREATMENT METHOD USING AN INTERLEUKIN-2 RECEPTOR ALPHA, BETA-SELECTIVE AGONIST IN COMBINATION WITH ADOPTIVE CELL TRANSFER THERAPY

<130> SHE0508.PCT

<140> PCT/US2018/020514

<141> 2018-03-01

<150> 62/480,971

<151> 2017-04-03

<150> 62/465,506

<151> 2017-03-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu

20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile

35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe

50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu

65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys

85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile

100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala

115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe

130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

145 150

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 3

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu

1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys

35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr

100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile

115 120 125

Ser Thr Leu Thr

130

<210> 4

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130