



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0032642  
 (43) 공개일자 2018년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 31/7032* (2006.01) *A61K 31/407* (2006.01)  
*A61K 31/675* (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류  
*A61K 31/7032* (2013.01)  
*A61K 31/407* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7005943  
 (22) 출원일자(국제) 2016년06월03일  
 심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2018년02월28일  
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2016/053290  
 (87) 국제공개번호 WO 2017/021792  
 국제공개일자 2017년02월09일

(30) 우선권주장  
 62/201,912 2015년08월06일 미국(US)

(71) 출원인  
 글락소스미스클라인 인텔렉츄얼 프로퍼티 디벨로프먼트 리미티드  
 영국 미들섹스 브렌트포드 그레이트 웨스트 로드 980 (우: 티더블유8 9지에스)

(72) 발명자  
 클러프, 크리스토퍼 더블유.  
 미국 59840 몬타나주 해밀턴 에스. 쇠스쓰 스트리트 516  
 가오, 화신  
 미국 19426 웜실베니아주 칼리지빌 사우쓰 칼리지빌 로드 1250  
 (74) 대리인  
 양영준, 심미성

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 TLR4 효능제 및 그의 조성물 및 암 치료에서의 그의 용도

### (57) 요약

단독으로 또는 항암제와 조합된 TLR4 효능제 및 그의 제약 조성물, 그의 용도, 및 암에서의 사용을 포함한, 상기 조성물 또는 조합물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 개시되어 있다.

(52) CPC특허분류

*A61K 31/675* (2013.01)

*A61K 45/06* (2013.01)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61K 2300/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

암을 치료하기 위한, 임의로 항암제와 조합된 TLR4 효능제의 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, TLR4 효능제가 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 (AGP)인 조성물 또는 조합물.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, TLR4 효능제가 화학식 I의 화합물인 조성물 또는 조합물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, TLR4 효능제가 화학식 1a의 화합물인 조성물 또는 조합물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TLR4 효능제가 CRX-601, CRX-547 및 CRX-527로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물 또는 조합물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 TLR4 효능제 또는 조합물을 1종 이상의 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 조합물 키트.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 TLR4 효능제 또는 조합물을 제약상 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 8

치료 유효량의 항암제를 포함하는 제약 조성물 및 치료 유효량의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 TLR4 조정제를 포함하는 제2 제약 조성물.

#### 청구항 9

암 치료를 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 TLR4 효능제 조합물 또는 제약 조성물의 용도.

#### 청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에서 사용하기 위한 조합물 또는 제약 조성물.

#### 청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 암을 치료하는데 사용하기 위한 조합물 또는 제약 조성물.

#### 청구항 12

제1항 내지 제8항, 제10항 및 제11항 중 어느 한 항에 따른 조합물 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 인간에서 암을 치료하는 방법.

#### 청구항 13

치료 유효량의, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 항암제 및 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 TLR4 효능제를 투여하는 것을 포함하는, 암 치료를 필요로 하는 인간에서 암을 치료하는 방법.

**청구항 14**

제12항 또는 제13항에 있어서, 항암제 및 TLR4 효능체를 동시에 투여하는 것인 방법.

**청구항 15**

제12항 또는 제13항에 있어서, 항암제 및 TLR4 효능체를 임의의 순서로 순차적으로 투여하는 것인 방법.

**청구항 16**

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항암제 및 TLR4 효능체를 전신적으로, 예를 들어 정맥내로 투여하는 것인 방법.

**청구항 17**

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항암제를 전신적으로, 예를 들어 정맥내로 투여하고, TLR4 효능체를 종양내로 투여하는 것인 방법.

**청구항 18**

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항암제를 종양내로 투여하고, TLR4 효능체를 전신적으로, 예를 들어 정맥내로 투여하는 것인 방법.

**청구항 19**

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항암제 및 TLR4 효능체를 종양내로 투여하는 것인 방법.

**청구항 20**

제12항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 고형 종양인 방법.

**청구항 21**

제12항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, TLR4 효능체가 원격 효과를 제공하는 것인 방법.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 본 발명은 포유동물에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 특히 본 발명은 1종 이상의 TLR4 효능체를 단독으로 또는 다른 항암제와 조합하여 투여하는 것에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 암을 포함한 과증식성 장애의 효과적인 치료는 종양학 분야에서 지속적인 목표이다. 일반적으로, 암은 세포 분열, 분화 및 아폽토시스성 세포 사멸을 제어하는 정상적인 과정의 조절 이상으로부터 생기며 무제한 성장, 국소 확장 및 전신 전이에 대한 가능성이 있는 악성 세포의 증식을 특징으로 한다. 정상적인 과정의 조절 이상은 정상적인 세포에서 발견되는 것들과 상이한 인자에 대한 반응 및 신호전달 경로의 이상을 포함한다.

[0003] 면역요법은 과증식성 장애를 치료하는 한 접근법이다. 과학자 및 임상의가 다양한 유형의 암 면역요법의 개발에서 직면하여 온 주요 장애물은 종양 퇴행을 야기하는 강력한 항종양 반응을 시작하기 위해 자기 항원(암)에 대한 관용을 깨는 것이었다. 종양을 표적으로 하는 작은 분자 작용제 및 큰 분자 작용제의 전통적인 개발과 달리, 암 면역요법은 이펙터 세포의 기억 풀을 생성하여 더 내구성 있는 효과를 유도하고 재발을 최소화하는 가능성을 갖는 면역 체계의 세포를 표적으로 한다.

[0004] 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 (AGP)는 톤-유사 수용체 4 (TLR4)의 합성 리간드이다. 특정 AGP는 TLR4 효능체인 것으로 공지되어 있고 백신 아주반트로서 그리고 면역화된 동물에서 항체 생성을 증대시키고, 선천 면역 반응을 촉진하고, 대식세포를 활성화시키고, 시토카인 생성을 자극하는데 유용하다.

[0005] 암 치료에서 최근 많은 진전이 있었지만, 암의 영향으로 고통받고 있는 개체의 더 효과적이고/거나 향상된 치료에 대한 필요성이 여전히 존재한다. 항종양 면역을 증강시키기 위한 치료적 접근법을 조합하는 것과 관련된 본

원에서의 조성물, 조합물 및 방법은 이러한 필요성을 해결한다.

### 발명의 내용

- [0006] 따라서, 본 발명은 암 요법에서 사용하기 위한, 단독으로 또는 항암제와 조합된 그리고 임의로 다른 TLR4 효능제와 조합된, TLR4 효능제를 제공한다.
- [0007] 본 발명의 TLR4 효능제 조성물을 사용하여 인간에서 암을 치료하는 방법, 및 요법을 위한, 바람직하게는 암을 위한 요법을 위한 조합물에서의 TLR4 효능제의 용도가 또한 제공된다.
- [0008] 암 치료를 필요로 하는 대상체, 바람직하게는 인간에게 유효량의 TLR4 효능제를 단독으로 또는 조합물로, 예를 들어 1종 이상의 제약 조성물로 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체, 바람직하게는 인간에서 면역 반응을 조정하는 방법이 추가로 제공된다.

### 도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 미토마이신-C 및 CRX-527을 사용한 L1210 뮤린 백혈병-보유 BDF1 마우스의 처리를 제시하는 그래프이다.
- 도 2는 미토마이신-C를 사용한 MOT 종양-보유 CeH/FeJ 마우스의 처리를 제시하는 그래프이다.
- 도 3은 야생형 MOT 종양-보유 마우스에서 미토마이신-C 및 CRX-527을 제시하는 그래프이다.
- 도 4는 TLR4 돌연변이체 MOT 종양-보유 마우스에서 미토마이신-C 및 CRX-527을 제시하는 그래프이다.
- 도 5는 CRX-527의 수성, 비강내 및 서브마이크로미터 에멀젼 1 ug 10 ug 제제의 비교를 제시하는 그래프이다.
- 도 6은 CRX-527의 수성, IN 및 서브마이크로미터 에멀젼 제제의 비교를 제시하는 그래프이다.
- 도 7은 미토마이신-C 및 CRX-527의 단일 조합 치료를 제시하는 그래프이다.
- 도 8은 미토마이신-C를 사용한 단일 국소 치료에 뒤이어 CRX-527을 사용한 전신 치료의 결과를 제시하는 그래프이다.
- 도 9는 미토마이신-C를 사용한 2회의 국소 치료에 뒤이어 CRX-527을 사용한 전신 치료를 제시하는 그래프이다.
- 도 10은 마우스에서 B16 흑색종 폐 전이를 치료하는, IP 시클로포스파미드와 조합된 정맥내 CRX-527 IN을 제시하는 그래프이다.
- 도 11-14는 비히클, CRX-527 단독으로, 시클로포스파미드 단독으로 및 CRX-527과 시클로포스파미드로 처리한 마우스의 폐에서의 종양 사진이다.
- 도 15는 비히클, CRX-527 단독으로, 시클로포스파미드 단독으로 및 CRX-527과 시클로포스파미드로 처리 후 마우스의 폐에서의 종양 성장 (루시퍼라제 활성에 의해 측정된 바와 같은)을 제시하는 그래프이다.
- 도 16은 인간 등급 시톡산을 사용한 4T1-보유 BALB/c 마우스의 처리를 제시하는 그래프이다.
- 도 17은 CT-26 동계 마우스 모델에서 CRX-527 (TLR 4)이 종양 성장에 미치는 영향을 제시하는 그래프이다.
- 도 18은 결장암의 CT-26 동계 마우스 모델에서 4, 20, 또는 100 ug의 TLR-4 효능제 (CRX-601)의 용량 의존성 항종양 활성 (시간이 지남에 따른 종양 부피에 의해 측정된 바와 같은)을 제시하는 그래프이다.
- 도 19는 CT26 동계 마우스 모델에서 종양내로 투여된 CRX-601의 용량 의존성 항종양 활성을 제시하는 그래프이다.
- 도 20은 CT26 동계 마우스 모델에서 종양내로 투여된 CRX-601의 용량 의존성 생존 이익을 제시하는 그래프이다.
- 도 21은 CT26 동계 마우스 모델에서 정맥내로 투여된 CRX-601의 용량 의존성 항종양 활성을 제시하는 그래프이다.
- 도 22는 CT26 동계 마우스 모델에서 정맥내로 투여된 CRX-601의 생존 이익을 제시하는 그래프이다.
- 도 23은 CT26 동계 마우스 모델에서 정맥내로 투여된 CRX-601의 항종양 활성을 제시하는 그래프이다.
- 도 24는 CT26 동계 마우스 모델에서 종양내로 투여된 CRX-601의 항종양 활성을 제시하는 그래프이다.

도 25는 CT26 동계 마우스 모델에서 정맥내로 투여된 CRX-601의 생존 이익을 제시하는 그래프이다.

도 26은 CT26 동계 마우스 모델에서 종양내로 투여된 CRX-601의 생존 이익을 제시하는 그래프이다.

도 27은 CT26 동계 마우스 모델에서 정맥내로 또는 종양내로 투여된 CRX-601의 항종양 활성을 제시하는 그래프이다.

도 28은 종양내로 투여된 CRX-601의 리포솜 제제로 처리된 마우스에서의 항종양 활성의 그래프를 제시한다.

도 29는 총 3회 용량을 위한 정맥내 1x/주 투여된 TLR4 효능제 CRX-601의 25 ug/마우스의 항종양 활성 (시간이 지남에 따른 종양 성장 억제에 의해 측정된 바와 같은)을 제시하는 그래프이다 (\*p-값 = 0.041, \*\*p-값 <0.001).

도 30은 총 3회 용량을 위한 정맥내 1x/주 투여된 TLR4 효능제 CRX-601의 25 ug/마우스로 처리된 마우스의 생존 곡선을 제시하는 그래프이다 (\*p-값 = 0.03).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0010] 조성물 및 조합물

[0011] 1종 이상의 TLR4 효능제, 특히 AGP를 투여함으로써 항암 또는 항종양 효과를 유도하는 것은, 본 발명의 한 실시 양태의 목적이다. TLR4 효능제를 항암제와 조합하여 투여함으로써 항암제의 항종양 효과를 증강, 증대, 개선, 증가, 및 달리 변화시키는 것은 본 발명의 또 다른 실시양태의 추가적 목적이다. TLR4 효능제 조성물 및 TLR4 효능제와 항암제의 조합물이 본원에 기재되어 있다.

[0012] 따라서, 본원에 사용된 바와 같이 용어 "본 발명의 조합물"은 그 각각이 본원에 기재된 바와 같이 개별적으로 또는 동시에 투여될 수 있는, TLR4 효능제, 예컨대 AGP, 및 암 작용제를 포함하는 조합물을 지칭한다.

[0013] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "암," "신생물," 및 "종양,"은 서로 바꾸어 사용될 수 있으며 단수 또는 복수 형태로, 악성 형질전환을 겪거나 비정상 또는 비조절 성장 또는 과증식을 결과하는 세포 변화를 겪은 세포를 지칭한다. 이러한 변화 또는 악성 형질전환은 통상 이러한 세포를 숙주 유기체에 대해 병적으로 만들어서, 병적 이거나 병적으로 될 수 있거나 개입으로부터 이익을 필요로 하거나 이익을 얻을 수 있는 전암 또는 전암성 세포가 포함되도록 또한 의도된다. 원발성 암 세포 (즉, 악성 형질전환의 부위 가까이로부터 얻은 세포)는 널리 확립된 기술, 특히 조직학적 검사에 의해 비-암성 세포로부터 용이하게 구별될 수 있다. 암 세포의 정의는, 본원에 사용된 바와 같이, 원발성 암 세포뿐만 아니라, 암 세포 선조로부터 유래된 임의의 세포도 포함한다. 이는 전이된 암 세포, 및 암세포로부터 유래된 시험관내 배양물 및 세포주를 포함한다. 고형 종양으로서 보통 나타나는 암의 유형을 언급할 때, "임상적으로 검출가능한" 종양은 종양 매스를 기준으로 하여; 예를 들어, 절차 예컨대 CAT 스캔, MR 영상화, X-선, 초음파 또는 촉진에 의해 검출가능하고/거나, 환자로부터 수득가능한 샘플에서 하나 이상의 암-특이적 항원의 발현때문에 검출가능한 것이다. 확인하면, 본원에서의 상기 용어는 세포, 신생물, 암, 및 임의의 단계의 종양, 예를 들어 임상의가 전암, 종양, 계내 성장, 뿐만 아니라 후기 단계 전이성 성장으로서 언급한 것을 포함한다. 종양은 조혈성 종양, 예를 들어, 액성 종양을 의미하는, 혈액 세포 등의 종양일 수 있다. 이러한 종양을 기반으로 하는 임상적 병태의 구체적 예는 백혈병 예컨대 만성 골수구성 백혈병 또는 급성 골수구성 백혈병; 골수종 예컨대 다발성 골수종; 림프종 등을 포함한다.

[0014] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "작용제"는 조직, 계통, 동물, 포유동물, 인간 또는 다른 대상체에서 원하는 효과를 초래하는 물질을 의미하는 것으로 이해된다. 따라서, 용어 "항암제"는 조직, 계통, 동물, 포유동물, 인간 또는 다른 대상체에서 항암 효과를 초래하는 물질을 의미하는 것으로 이해되며, 마찬가지로 용어 동의어 "항신생물제"는 조직, 계통, 동물, 포유동물, 인간 또는 다른 대상체에서 항신생물 효과를 초래하는 물질을 의미하는 것으로 이해된다. "작용제"는 단일 화합물 또는 둘 이상의 화합물의 조합물 또는 조성물일 수 있음을 또한 이해하여야 한다.

[0015] 본원에 사용된 바와 같이 용어 "치료하는 것" 및 그의 유도체란, 치료적 요법을 의미한다. 특정 병태와 관련하여, 치료하는 것이란: (1) 병태 또는 병태의 하나 이상의 생물학적 징후를 개선하는 것, (2) (a) 병태를 야기하거나 그의 원인이 되는 생물학적 캐스케이드에서의 하나 이상의 지점 또는 (b) 병태의 하나 이상의 생물학적 징후를 상쇄시키는 것, (3) 병태와 연관된 하나 이상의 증상, 효과 또는 부작용, 병태 또는 그의 치료와 연관된 하나 이상의 증상, 효과 또는 부작용을 경감시키는 것, 또는 (4) 병태 또는 병태의 하나 이상의 생물학적 징후의 진행을 둔화시키는 것을 의미한다.

- [0016] 본원에 사용된 바와 같이, "예방"은 병태 또는 그의 생물학적 징후의 가능성 또는 중증도를 실질적으로 감소시키거나, 이러한 병태 또는 그의 생물학적 징후의 발병을 지연시키는 약물의 예방적 투여를 지칭하는 것으로 이해된다. 통상의 기술자는 "예방"이 절대적인 용어가 아님을 인식할 것이다. 예방적 요법은, 예를 들어, 대상체가 암에 걸린 가능성이 높다고 여겨지는 경우, 예컨대 대상체가 암의 강한 가족력을 갖고 있는 경우에 또는 대상체가 발암 물질에 노출된 경우에 적절하다.
- [0017] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량"은, 예를 들어, 연구원 또는 임상의가 모색하고 있는 조직, 계통, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 도출하는 약물 또는 약제의 양을 의미한다. 더욱이, 용어 "치료 유효량"은, 이러한 양을 받지 않은 상응하는 대상체와 비교하여, 질환 장애 또는 부작용의 개선된 치료, 치유, 예방, 또는 개선, 또는 질환 또는 장애의 진전 속도의 감소를 결과하는 임의의 양을 의미한다. 상기 용어는 그 범위 내에 정상적인 생리 기능을 증강시키는데 효과적인 양을 또한 포함한다.
- [0018] 한 실시양태에서 치료 유효량의 본 발명의 조합물 (또는 치료 유효량의, 조합물의 성분 각각)의 투여는 상기 조합물이 치료 유효량의 성분 화합물의 개개의 투여와 비교시 하기 개선된 특성 중 하나 이상을 제공한다는 점에서 개개의 성분 화합물에 비해 유리하다: i) 가장 활성인 단일 작용제보다 더 큰 항암 효과, ii) 상승작용적 또는 고도의 상승작용적 항암 활성, iii) 감소된 부작용 프로파일로 증강된 항암 활성을 제공하는 투여 프로토콜, iv) 독성 효과 프로파일의 감소, v) 치료 창의 증가, 또는 vi) 성분 화합물 중 하나 또는 둘 다의 생체 이용률의 증가.
- [0019] 본 발명은 본원에 언급된 TLR4 성분 중 1종 이상, 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 추가로 포함한다. 본 발명의 조합물은 항암제 및 TLR4 조정제를 포함할 수 있으며, 이 각각은 동일하거나 상이한 담체, 희석제 또는 부형제를 가질 수 있다. 담체(들), 희석제(들) 또는 부형제(들)는 제제의 다른 성분과 상용성이며, 제약 제제의 여지가 있으며, 그의 수령자에게 유해하지 않는다는 의미에서 허용되는 것이어야 한다.
- [0020] 본 발명의 조합물의 성분, 및 이러한 성분을 포함하는 제약 조성물은 임의의 순서로, 그리고 상이한 경로로 투여 될 수 있으며; 상기 성분 및 상기 성분을 포함하는 제약 조성물은 동시에 투여될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면 본 발명의 조합물의 성분과 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 혼합하는 것을 포함하는, 제약 조성물의 제조 방법이 또한 제공된다.
- [0022] 본 발명의 성분은 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 성분의 경우, 적합한 경로는 경구, 직장, 비내, 국소 (협측 및 설하 포함), 질, 및 비경구 (폐하, 근육내, 정맥내, 피부내, 척수강내, 및 경막외 포함)를 포함한다. 바람직한 경로는, 예를 들어, 상기 조합물의 수령자의 병태 및 치료되는 암에 따라 달라질 것임이 인식될 것이다. 투여되는 작용제 각각은 동일하거나 상이한 경로에 의해 투여될 것이며 성분은 함께 또는 개별 제약 조성물로 배합될 수 있음이 또한 인식할 것이다.
- [0023] 한 실시양태에서, 본 발명의 조합물의 1종 이상의 성분은 정맥내로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조합물의 1종 이상의 성분은 종양내로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조합물의 1종 이상의 성분은 전신적으로, 예를 들어 정맥내로 투여되고, 본 발명의 조합물의 1종 이상의 다른 성분은 종양내로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 조합물의 성분 모두는 전신적으로, 예를 들어 정맥내로 투여된다. 대안적인 실시양태에서, 본 발명의 조합물의 성분 모두는 종양내로 투여된다. 실시양태 중 임의의 것에서, 예를 들어 이 단락에서, 본 발명의 성분은 1종 이상의 제약 조성물로서 투여된다.
- [0024] **항원 결합 단백질 및 항체**
- [0025] "항원 결합 단백질 (ABP)"은 항체에 대해 유사한 방식으로 기능하는 항체 또는 조작된 분자를 포함한, 항원에 결합하는 단백질을 의미한다. 이러한 대안적인 항체 형태는 트리아바디, 테트라바디, 미니항체 및 미니바디를 포함한다. 또한, 대안적인 스캐폴드가 포함되며 여기서 본 개시내용에 따른 임의의 분자의 하나 이상의 CDR은 적합한 비-면역글로불린 단백질 스캐폴드 또는 골격, 예컨대 아피바디, SpA 스캐폴드, LDL 수용체 부류 A 도메인, 아비머 (예를 들어, 미국 특히 출원 공개 번호 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301을 참조) 또는 EGF 도메인상에 배열될 수 있다. ABP는 또한 이러한 항체 또는 다른 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 추가로, ABP는 적절한 경쇄와 쌍을 형성하는 경우, 전장 항체, (Fab')2 단편, Fab 단편, 이중-특이적 또는 이중파라토pic 분자 또는 그의 등가물 (예컨대 scFV, 비-, 트리- 또는 테트라-바디, Tandab 등)로 포맷화된 본 발명의 VH 영역을 포함할 수 있다. ABP는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4; 또는 IgM; IgA, IgE 또는 IgD인 항체 또는 그의 변형된 변이체를 포함할 수 있다. 항체 중쇄의 불변 도메인이 따라서 선택될 수 있다. 경쇄 불변 도메인은 카

파 또는 람다 불변 도메인일 수 있다. ABP는 또한, 항원 결합 영역 및 비-면역글로불린 영역을 포함하는 W086/01533에 기재된 유형의 키메라 항체일 수 있다.

[0026] 따라서, 본원에서 본 발명의 ABP는 수용체를 결합하는 것이며, 바람직한 실시양태에서 하기 중 하나 이상을 행하는 것이다: 수용체를 통해 신호전달을 조정하는 것, 수용체의 기능을 조정하는 것, 수용체 신호전달을 효능작용하는 것, 수용체 기능을 자극하는 것, 또는 수용체 신호전달을 공-자극하는 것. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 이러한 기능을 확립하기 위한 다양한 널리 공지된 검정을 쉽게 인식할 것이다.

[0027] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 항원 결합 도메인, 그리고 임의로 면역글로불린-유사 도메인 또는 그의 단편을 가진 분자를 지칭하며 모노클로날 (예를 들어 IgG, IgM, IgA, IgD 또는 IgE 및 그의 변형된 변이체), 재조합, 폴리클로날, 키메라, 인간화, 이중파라토픽, 이중 특이적 이종접합체 항체, 또는 폐쇄형 구조 다중 특이적 항체를 포함한다. "항체"는 이종발생성, 동종이형, 동계, 또는 그의 다른 변형된 형태를 포함하였다. 항체는 단리 또는 정제될 수 있다. 항체는 또한 재조합, 즉 재조합 수단에 의해 생성되는 재조합일 수 있으며; 예를 들어, 기준 항체와 90% 동일한 항체가 관련 기술분야에 공지된 재조합 분자 생물학 기술을 사용하여 특정 잔기의 돌연변이유발에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 적절한 경쇄와 쌍을 형성하는 경우, 전장 재조합 항체, (Fab')<sub>2</sub> 단편, Fab 단편, 이중-특이적 또는 이중파라토픽 분자 또는 그의 등가물 (예컨대 scFV, 비-, 트리- 또는 테트라-바디, Tandab 등)로 포맷화되거나 천연 항체의 구조로 포맷화될 수 있는 본 발명의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 또는 그의 변형된 변이체일 수 있다. 항체 중쇄의 불변 도메인이 따라서 선택될 수 있다. 경쇄 불변 도메인은 카파 또는 람다 불변 도메인일 수 있다. 항체는 또한, 항원 결합 영역 및 비-면역글로불린 영역을 포함하는 W086/01533에 기재된 유형의 키메라 항체일 수 있다.

[0028] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명의 ABP 및 항체가 관련 수용체의 에피토프에 결합한다는 것을 인식할 것이다. ABP의 에피토프는 ABP가 결합하는 그의 항원의 영역이다. 2종의 ABP는 각각이 항원에 대한 다른 하나의 결합을 경쟁적으로 억제 (차단)하는 경우에 동일한 또는 중첩 에피토프에 결합한다. 즉, 하나의 항체의 1x, 5x, 10x, 20x 또는 100x 초과는 경쟁 항체가 없는 대조군과 비교하여 경쟁적 결합 검정에서 측정된 카파 또는 그의 등가물 (예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990] 참조). 대안적으로, 2종의 항체는 본질적으로 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는, 항원 내의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 동일한 에피토프를 갖는다. 또한, 동일한 에피토프는 예를 들어 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 하나의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우에 "중첩 에피토프"를 포함할 수 있다.

[0029] 결합의 강도는 본 발명의 ABP 또는 항체의 투약 및 투여에서 중요할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 ABP 또는 항체는 고 친화도를 가진, 수용체 바람직하게는 인간 수용체에 결합한다. 예를 들어, 비아코어(Biacore)에 의해 측정시, 항체는 수용체에, 1-1000 nM 또는 500 nM 이하의 친화도 또는 200 nM 이하의 친화도 또는 100 nM 이하의 친화도 또는 50 nM 이하의 친화도 또는 500 pM 이하의 친화도 또는 400 pM 이하, 또는 300 pM 이하의 친화도로 결합한다. 추가 측면에서 항체는 수용체에, 비아코어에 의해 측정시 약 50 nM 내지 약 200 nM 또는 약 50 nM 내지 약 150 nM의 친화도로 결합한다. 본 발명의 한 측면에서 항체는 수용체에 100 nM 미만의 친화도로 결합한다.

[0030] 추가 실시양태에서, 결합은 비아코어에 의해 측정된다. 친화도는 한 분자, 예를 들어 본 발명의 항체의, 또 다른 것, 예를 들어 그의 표적 항원에 대한, 단일 결합 부위에서의 결합의 강도이다. 항체의 그의 표적에 대한 결합 친화도는 평형 방법 (예를 들어 효소-결합 면역흡수 검정 (ELISA) 또는 방사면역검정 (RIA)), 또는 동역학 (예를 들어 비아코어 분석)에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 비아코어 방법은 결합 친화도를 측정하는데 사용될 수 있다.

[0031] 결합활성은, 예를 들어 상호작용의 원자가를 고려를 고려하여, 다중 부위에서 2개의 분자가 서로 결합하는 결합의 강도의 총합이다.

[0032] 한 측면에서, ABP 또는 항체와 수용체의 평형 해리 상수 (KD), 상호작용은 100 nM 이하, 10 nM 이하, 2 nM 이하 또는 1 nM 이하이다. 대안적으로 KD는 5 내지 10 nM; 또는 1 내지 2 nM일 수 있다. KD는 1 pM 내지 500 pM; 또는 500 pM 내지 1 nM일 수 있다. 통상의 기술자는 KD 수치가 작을수록 더 강한 결합임을 인식할 것이다. KD의 역수 (즉, 1/KD)는 단위 M<sup>-1</sup>을 갖는 평형 연합 상수 (KA)이다. 통상의 기술자는 KA 수치가 클수록 더 강한 결합임을 인식할 것이다.

- [0033] 해리 속도 상수 ( $kd$ ) 또는 "오프-속도"는 한편으로는 수용체 상의 ABP 또는 항체의 복합체의 안정성, 다른 한편으로는, 즉 초당 붕괴하는 복합체의 분율을 나타낸다. 예를 들어,  $0.01\text{ s}^{-1}$ 의  $kd$ 는 초당 붕괴하는 복합체의 1%와 동일시한다. 한 실시양태에서, 해리 속도 상수 ( $kd$ )는  $1\times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$  이하,  $1\times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$  이하,  $1\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$  이하, 또는  $1\times 10^{-6}\text{ s}^{-1}$  이하이다.  $kd$ 는  $1\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$  내지  $1\times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ; 또는  $1\times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$  내지  $1\times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ 일 수 있다.
- [0034] 예를 들어, 수용체를 수용체의 에피토프 또는 단편에 결합하기 위한 본 발명의 ABP 또는 항체와 기준 항체 사이의 경쟁은, 경쟁 ELISA, FMAT 또는 비아코어에 의해 결정될 수 있다. 한 측면에서, 경쟁 검정은 비아코어에 의해 수행된다. 이 경쟁에는 여러 가능한 이유가 있다: 상기 2종의 단백질은 동일한 또는 중첩 에피토프에 결합할 수 있고, 결합의 입체적 억제가 있을 수 있거나, 제1 단백질의 결합이 제2 단백질의 결합을 저해 또는 감소시키는 항원에서의 형태적 변화를 유도할 수 있다.
- [0035] 본원에서 사용된 바와 같은 "결합 단편"은 항원-결합 부위를 포함하고 본원에 정의된 바와 같은 수용체에 결합할 수 있으며, 예를 들어 이에 제한되지는 않으나 모 또는 전장 항원의 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 본 발명의 ABP 또는 항체의 일부분 또는 단편을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 ABP 및 항체의 기능적 단편이 본원에 고려된다.
- [0037] 따라서, "결합 단편" 및 "기능적 단편"은 무손상 항체의 Fc 단편이 없고, 순환으로부터 보다 신속히 제거되고, 무손상 항체보다 덜한 비-특이적 조직 결합을 가질 수 있는 Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편일 수 있다 (Wahl et al., J. Nuc. Med. 24:316-325 (1983)). 또한, Fv 단편이 포함된다 (Hochman, J. et al. (1973) Biochemistry 12:1130-1135; Sharon, J. et al. (1976) Biochemistry 15:1591-1594). 이들 다양한 단편은 통상적인 기술 예컨대 프로테아제 절단 또는 화학적 절단을 사용하여 생성된다 (예를 들어, 문헌 [Rousseaux et al., Meth. Enzymol., 121:663-69 (1986)] 참조).
- [0038] 본원에 사용된 바와 같은 "기능적 단편"은 항원-결합 부위를 포함하고 모 ABP 또는 항체와 동일한 표적에 결합할 수 있으며, 예를 들어 이에 제한되지는 않으나 동일한 에피토프에 결합할 수 있으며, 관련 기술분야에 공지되거나 본원에 기재된 하나 이상의 조정 또는 다른 기능을 또한 보유하는 본 발명의 ABP 또는 항체의 일부분 또는 단편을 의미한다.
- [0039] 본 발명의 ABP 및 항체는 천연 항체의 구조로 포맷화될 수 있는 본 발명의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으므로, 기능적 단편은 본원에 기재된 바와 같은 전장 ABP 또는 항체의 하나 이상의 기능 또는 결합을 보유하는 것이다. 따라서 본 발명의 ABP 또는 항체의 결합 단편은 적절한 경쇄와 쌍을 형성하는 경우, VL 또는 VH 영역, (Fab')<sub>2</sub> 단편, Fab 단편, 이중-특이적 또는 이중파라토픽 분자의 단편 또는 그의 등가물 (예컨대 scFV, 비-, 트리- 또는 테트라-바디, Tandab 등)을 포함할 수 있다.
- [0040] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CDR"은 항원 결합 단백질의 상보성 결정 영역의 아미노산 서열을 지칭한다. 이들은 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 초기변 영역이다. 면역글로불린의 가변 부분에는 3개의 중쇄 및 3개의 경쇄 CDR (또는 CDR 영역)이 있다.
- [0041] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게는 CDR 서열에 대한 다양한 넘버링 규칙; 코티아(Chothia) (Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883), 카바트(Kabat) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath) 및 컨택트(Contact) (University College London)이 있다는 것이 명백할 것이다. 카바트, 코티아, AbM 및 컨택트 방법 중 적어도 2종을 사용하는 최소 중첩 영역은 "최소 결합 단위"를 제공하기 위해 결정될 수 있다. 최소 결합 단위는 CDR의 하위 부분일 수 있다. 항체의 구조 및 단백질 접힘은 다른 잔기가 CDR 서열의 부분으로서 여겨지며 통상의 기술자에 의해 그렇게 이해될 것이라는 것을 의미할 수 있다. CDR 정의의 일부는 사용된 개개의 간행물에 따라 달라질 수 있다는 점을 주목한다.
- [0042] 달리 명시되지 않는 한 및/또는 구체적으로 확인된 서열이 없는 경우, 본원에서 "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3"에 대한 언급은 공지된 규칙 중 어느 한 규칙에 따라 넘버링된 아미노산 서열을 지칭하며; 대안적으로, CDR은 가변 경쇄의 "CDR1," "CDR2," "CDR3" 그리고 가변 중쇄의 "CDR1," "CDR2," 및 "CDR3"으로서 언급된다. 특정 실시양태에서, 넘버링 규칙은 카바트 규칙이다.
- [0043] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CDR 변이체"는, 적어도 1개, 예를 들어 1, 2 또는 3개의, 아미노산 치환(들), 결실(들) 또는 부가(들)에 의해 변형된 CDR을 지칭하며, 여기서 CDR 변이체를 포함하는 변형된 항원 결합 단백

질은 항원 결합 단백질의 변형전의 생물학적 특징을 보유한다. 변형될 수 있는 각각의 CDR은 단독으로 또는 또 다른 CDR과 조합하여 변형될 수 있음이 인식될 것이다. 한 측면에서, 변형은 치환, 예를 들어 표 1에 제시된 바와 같이, 특히 보존적 치환이다.

표 1

측쇄	구성원
소수성	Met, Ala, Val, Leu, Ile
중성 친수성	Cys, Ser, Thr
산성	Asp, Glu
염기성	Asn, Gln, His, Lys, Arg
쐐 배향에 영향을 미치는 잔기	Gly, Pro
방향족	Trp, Tyr, Phe

[0045]

[0046] 예를 들어, 변이체 CDR에서, 최소 결합 단위의 아미노산 잔기는 동일하게 남아 있을 수 있으나 카바트 또는 코티아 정의(들)의 부분으로서 CDR을 포함하는 플랭킹 잔기는 보존적 아미노산 잔기로 치환될 수 있다.

[0047]

상기 기재된 바와 같은 변형된 CDR 또는 최소 결합 단위를 포함하는 이러한 항원 결합 단백질은 본원에서 "기능적 CDR 변이체" 또는 "기능적 결합 단위 변이체"로서 언급될 수 있다.

[0048]

항체는 임의의 종일 수 있거나, 이종간에 투여하기에 적합하도록 변형될 수 있다. 예를 들어 마우스 항체로부터의 CDR은 인간에게 투여하기 위해 인간화될 수 있다. 임의의 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 임의로 인간화 항체이다.

[0049]

"인간화 항체"는 비-인간 공여자 면역글로불린으로부터 유래된 그의 CDR을 갖는 조작된 항체의 유형을 지칭하며, 상기 분자의 잔류 면역글로불린-유래 부분은 하나의 (또는 그 초과의) 인간 면역글로불린(들)으로부터 유래된다. 게다가, 프레임워크 지지 잔기는 변경되어 결합 친화도를 보존할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)] 참조). 적합한 인간 수용자 항체는 통상적인 데이터베이스, 예를 들어, 카바트(KABAT)® 데이터베이스, 로스 아랄모스(Los Alamos) 데이터베이스, 및 스위스 프로테인(Swiss Protein) 데이터베이스로부터, 공여자 항체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대한 상동성에 의해 선택된 것일 수 있다. (아미노산 기준으로) 공여자 항체의 프레임워크 영역에 대한 상동성에 의해 특성화되는 인간 항체는 공여자 CDR의 삽입을 위한 중쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 가변 프레임워크 영역을 제공하는데 적합할 수 있다. 경쇄 불변 또는 가변 프레임워크 영역을 공여할 수 있는 적합한 수용자 항체는 유사한 방식으로 선택될 수 있다. 수용자 항체 중쇄 및 경쇄가 동일한 수용자 항체에서 비롯할 필요는 없다는 점을 주목하여야 한다. 선행 기술은 이러한 인간화 항체를 생성하는 여러 방법을 기재한다 - 예를 들어 EP-A-0239400 및 EP-A-054951을 참조.

[0050]

또 다른 실시양태에서, 인간화 항체는 IgG인 인간 항체 불변 영역을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, IgG는 상기 참고 문헌 또는 특히 공보 중 어느 하나에 개시된 바와 같은 서열이다.

[0051]

뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대해, 용어 "동일" 또는 "동일성"은 최적으로 정렬되고 적절한 삽입 또는 결실과 비교될 때 2개의 핵산 또는 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성의 정도를 나타낸다.

[0052]

두 개의 서열 간의 퍼센트 동일성은, 2개의 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는, 캡의 수, 및 각각의 캡의 길이를 고려하여, 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 합수 (즉, % 동일성 = 동일한 위치의 수/위치의 총 수에 100을 곱한 것)이다. 2개의 서열 간의 퍼센트 동일성의 결정 및 서열의 비교는 이하에 기재된 바와 같이, 수학적 알고리즘을 사용하여 완수될 수 있다.

[0053]

질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 쌍별 BLASTN 정렬을 수행한 후 대상 핵산 서열이 질의 핵산 서열을 가진 100% 질의 커버리지를 갖는 경우에 BLASTN 알고리즘에 의해 계산되는 백분율로서 표기되는 "동일성" 값이다. 질의 핵산 서열과 대상 핵산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTN 정렬은 복잡도가 낮은 영역에 대한 필터가 된 오프된 국립 생명공학 연구소(National Center for Biotechnology Institute)의 웹 사이트에서 이용 가능한 BLASTN 알고리즘의 디폴트 세팅을 사용함으로써 수행된다. 중요하게는, 질의 핵산 서열은 본원의 하나 이상의 청구항에서 확인된 핵산 서열에 의해 기재될 수 있다.

[0054]

질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 퍼센트 동일성은 쌍별 BLASTP 정렬을 수행한 후 대상 아미노산 서열이 질의 아미노산 서열을 가진 100% 질의 커버리지를 갖는 경우에 BLASTP 알고리즘에 의해 계산되는 백분율로서 표기되는 "동일성" 값이다. 질의 아미노산 서열과 대상 아미노산 서열 사이의 이러한 쌍별 BLASTP 정렬은 복잡도가 낮은 영역에 대한 필터가 된 오프된 국립 생명공학 연구소의 웹 사이트에서 이용 가능한 BLASTP

알고리즘의 디폴트 세팅을 사용함으로써 수행된다. 중요하게는, 질의 아미노산 서열은 본원의 하나 이상의 청구항에서 확인된 아미노산 서열에 의해 기재될 수 있다.

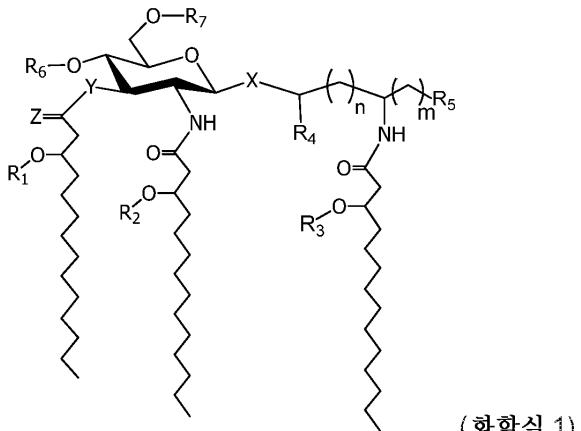
[0055] 본원에서의 본 발명의 임의의 실시양태에서, ABP 또는 항체는 임의의 하나 또는 모든 CDR, VH, VL을, 예를 들어 서열식별번호(SEQ ID NO)에 의해 정의된 바와 같은, 제시되거나 언급된 서열에 대한 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 또는 90 퍼센트 동일성으로 가질 수 있다.

#### TLR-4 효능제

[0057] 본 발명의 조합물은, 예를 들어 TLR4를 결속시킴으로써 결합하여 형태적 변화 또는 신호전달을 개시함으로써, TLR4를 활성화시키는 문자인 TLR-4 효능제를 포함한다.

[0058] 바람직한 TLR-4 효능제는 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 화합물 (AGP)이다. 톨-유사 수용체 4는 박테리아성 LPS (리포폴리사카라이드)를 인식하고 활성화되면 선천 면역 반응을 개시한다. AGP는 박테리아성 LPS의 지질 A 단백질의 모노사카라이드 모방체이며, 화합물의 "아실 쇄" 상에 에테르 및 에스테르 결합으로 발전되어 왔다. 이들 화합물을 제조하는 방법은 공지되어 있으며, 예를 들어, WO 2006/016997, 미국 특허 번호 7,288,640 및 6,113,918, 및 WO 01/90129에 개시되어 있으며, 이들 공보 및 특허는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 다른 AGP 및 관련 방법은 미국 특허 번호 7,129,219, 미국 특허 번호 6,525,028 및 미국 특허 번호 6,911,434에 개시되어 있다. 본 발명의 조성물에서 사용되는 아실 쇄 상의 에테르 결합을 가진 AGP는 공지되어 있고 WO 2006/016997에 개시되어 있으며, 이 공보는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 특히 관심은 WO 2006/016997의 단락 [0019] 내지 [0021]에서 화학식 (III)에 따라 제시되고 기재된 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 화합물이다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 아미노알킬 글루코사미니드 포스페이트 화합물은 하기와 같이 화학식 1로 제시되는 구조를 갖는다:



[0060]

[0061] 여기서

[0062] m은 0 내지 6이고

[0063] n은 0 내지 4이고;

[0064] X는 O 또는 S, 바람직하게는 O이고;

[0065] Y는 O 또는 NH이고;

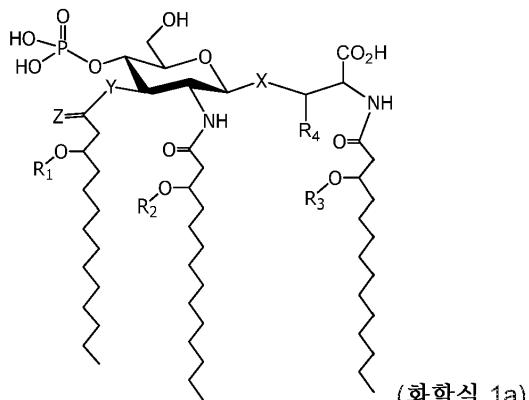
[0066] Z는 O 또는 H이고;

[0067] 각각의 R1, R2, R3은 독립적으로 C7-20 아실 및 C1-20 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0068] R4는 H 또는 Me이고;

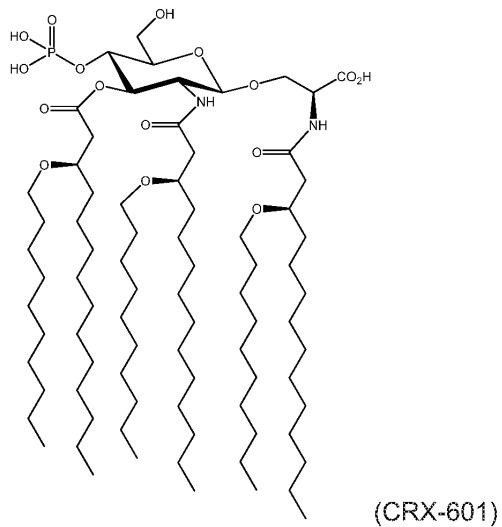
[0069] R5는 독립적으로 -H, -OH, -(C1-C4) 알콕시, -PO3R8R9, -OP03R8R9, -SO3R8, -OSO3R8, -NR8R9, -SR8, -CN, -NO2, -CHO, -CO2R8, 및 -CONR8R9로 이루어진 군으로부터 선택되며, 여기서 R8 및 R9는 각각 독립적으로 H 및 (C1-C4) 알킬로부터 선택되고;

- [0070] 각각의 R6 및 R7은 독립적으로 H 또는 PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>이다.
- [0071] 화학식 1에서 정상 지방 아실 잔기 (즉, 2급 아실옥시 또는 알콕시 잔기, 예를 들어, R10, R20 및 R30)가 부착된 3' 입체 중심의 배위는 R 또는 S, 바람직하게는 R이다 (칸-인골드-프렐로그 우선 규칙에 의해 지정된 바와 같이). R4 및 R5가 부착된 아글리콘 입체 중심의 배위는 R 또는 S일 수 있다. 모든 입체이성질체, 거울상 이성질체 및 부분 입체이성질체 둘 다, 및 그의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 여겨진다.
- [0072] 헤테로원자 X와 아글리콘 질소 원자 사이의 탄소 원자 수는 변수 "n"에 의해 결정되며, 이 변수는 0 내지 4의 정수, 바람직하게는 0 내지 2의 정수일 수 있다.
- [0073] 정상 지방산 R1, R2, 및 R3의 쇄 길이는 약 7 내지 약 16개의 탄소, 바람직하게는 약 9 내지 약 14개의 탄소일 수 있다. 쇄 길이는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 바람직한 실시양태는 R1, R2 및 R3이 10 또는 12 또는 14인 쇄 길이를 포함한다.
- [0074] 화학식 1은 L/D-세릴, -트레오릴, -시스테이닐 에테르 및 에스테르 지질 AGP, 효능제 및 그의 동족체 (n=1-4) 둘 다, 뿐만 아니라, 다양한 카르복실산 생동배체 (즉, R5는 염 형성 가능한 산성 기이며; 포스페이트는 글루코사민 단위의 4- 또는 6- 위치에 있을 수 있으나, 바람직하게는 4-위치에 있다)를 포함한다.
- [0075] 화학식 1의 AGP 화합물을 사용하는 본 발명의 바람직한 실시양태에서, n은 0이고, R5는 CO<sub>2</sub>H이고, R6은 PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>이고, R7은 H이다. 바람직한 AGP 화합물은 하기와 같이 화학식 1a의 구조로서 제시된다:

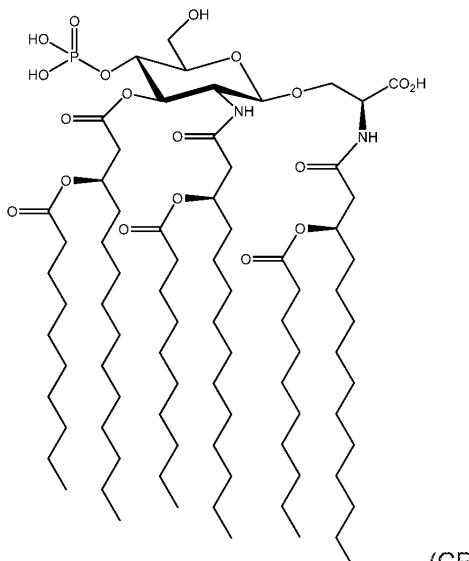


- [0076]
- [0077] 여기서, X는 O 또는 S이고; Y는 O 또는 NH이고; Z는 O 또는 H이고; 각각의 R1, R2, R3은 독립적으로 C7-20 아실 및 C7-20 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R4는 H 또는 메틸이다.
- [0078] 화학식 1a에서 정상 지방 아실 잔기 (즉, 2급 아실옥시 또는 알콕시 잔기, 예를 들어, R10, R20 및 R30)가 부착된 3' 입체 중심의 배위는 R 또는 S, 바람직하게는 R이다 (칸-인골드-프렐로그 우선 규칙에 의해 지정된 바와 같이). R4 및 CO<sub>2</sub>H가 부착된 아글리콘 입체 중심의 배위는 R 또는 S일 수 있다. 모든 입체이성질체, 거울상 이성질체 및 부분 입체이성질체 둘 다, 및 그의 혼합물은 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 여겨진다.
- [0079] 화학식 1a은 L/D-세릴, -트레오릴, -시스테이닐 에테르 또는 에스테르 지질 AGP 효능제를 포함한다.
- [0080] 화학식 1 및 화학식 1a 둘 다에서, Z는 단일 결합에 의해 각각 부착되는 2개의 수소 원자 또는 이중 결합에 의해 부착된 O이다. 즉, 화합물은 Z=Y=O인 경우에 에스테르-연결되고; Z=O이고 Y=NH인 경우에 아미드-연결되고; Z=H/H이고 Y=O인 경우에 에테르-연결된다.

[0081] 화학식 1의 특별히 바람직한 화합물은 CRX-601 및 CRX-527로서 언급된다. 그의 구조는 하기와 같이 제시된다:



(CRX-601)

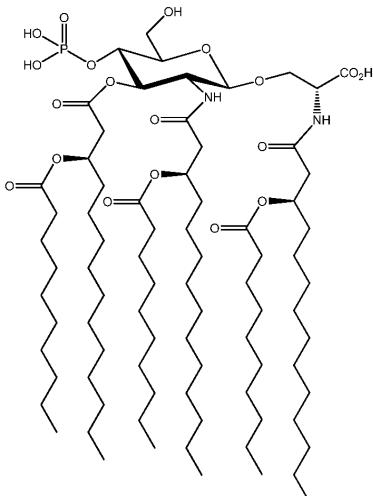


(CRX-527)

[0082]

[0083] 계다가, 또 다른 바람직한 실시양태는 제시된 구조를 갖는 CRX-547을 사용한다.

[0084]

CRX-547

[0085]

[0086] AGP 완충제

[0087]

본 발명의 한 실시양태에서, TLR4효능제, 바람직하게는 AGP를 포함하는 조성물은 쌍성이온성 완충제를 사용하여 완충된다. 적합하게는, 쌍성이온성 완충제는 아미노알칸슬픈산 또는 적합한 염이다. 아미노알칸슬픈산 완충제의 예는 HEPES, HEPPS/EPPS, MOPS, MOBS 및 PIPES를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 완충제는 인간에서 사용하기에, 예컨대 시판 주사제에서 사용하기에 적합한 제약상 허용되는 완충제이다. 가장 바람직하게는 완충제는 HEPES이다.

[0088] 치료 방법

[0089]

본 발명의 조성물 및 조합물은 TLR4의 결속이 유익한 장애에서 유용성을 갖는 것으로 여겨진다.

[0090]

따라서, 본 발명은 또한, 요법에서, 특히 TLR4의 결속이 유익한 장애, 특히 암의 치료에서 사용하기 위한, 본 발명의 조성물 또는 조합물을 제공한다.

[0091]

본 발명의 추가 측면은 본 발명의 조합물을 투여하는 것을 포함하는, TLR4의 결속이 유익한 장애의 치료 방법을 제공한다.

[0092]

본 발명의 추가 측면은 TLR4의 결속이 유익한 장애의 치료를 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 조합물의 용도를 제공한다. 바람직한 실시양태에서 장애는 암이다.

[0093]

본 발명의 조합물을 사용한 치료에 적합한 암의 예는 원발성 및 전이성 형태 둘 다의 두경부암, 유방암, 폐암, 결장암, 난소암 및 전립선암을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 적합하게는 암은 하기로부터 선택된다: 뇌(신경교종), 교모세포종, 성상세포종, 다형 교모세포종, 바나얀-조나나 증후군, 코우덴병, 레르미트-두클로스 병, 유방암, 염증성 유방암, 윌름스 종양, 유잉 육종, 횡문근육종, 뇌실막세포종, 수모세포종, 결장암, 두경부암, 신장암, 폐암, 간암, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 육종, 골육종, 골의 거대 세포 종양, 갑상선암, 림프모구성 T 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 모발 세포 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, AML, 만성 호중구성 백혈병, 급성 림프모구성 T 세포 백혈병, 형질세포종, 면역모세포 대세포 백혈병, 외투 세포 백혈병, 다발성 골수종 거핵모구성 백혈병, 다발성 골수종, 급성 거핵구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 적백혈병, 악성 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 림프모구성 T 세포 림프종, 베킷 림프종, 여포성 림프종, 신경모세포종, 방광암, 요로상피암, 폐암, 음문암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 중피종, 식도암, 타액선암, 간세포암, 위암, 비인두암, 구강암, 입의 암, GIST (위장관 기질 종양) 및 고환암.

[0094]

계다가, 치료되는 암의 예는 바렛 선암종; 담도 암종; 유방암; 자궁경부암; 담관암종; 원발성 CNS 종양 예컨대 교모세포종, 성상세포종 (예를 들어, 다형 교모세포종) 및 뇌실막세포종, 및 속발성 CNS 종양 (즉, 중추신경계 밖에서 비롯되는 종양의 중추신경계에 대한 전이)을 포함한 중추신경계 종양; 대장 결장 암종을 포함한 결장직장암; 위암; 두경부의 편평 세포 암종을 포함한 두경부의 암종; 혈액암, 예를 들어 백혈병 및 림프종 예컨대 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병 (AML), 골수형성이상 증후군, 만성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종,

비-호지킨 림프종, 거핵모구성 백혈병, 다발성 골수종 및 적백혈병; 간세포 암종; 소세포 폐암 및 비소세포 폐암을 포함한 폐암; 난소암; 자궁내막암; 췌장암; 뇌하수체 선종; 전립선암; 신장암; 육종; 흑색종을 포함한 피부암; 및 갑상선암을 포함한다.

[0095] 적합하게는, 본 발명은 하기로부터 선택된 암의 중증도를 치료 또는 완화시키는 방법에 관한 것이다: 뇌 (신경 교종), 교모세포종, 성상세포종, 다형 교모세포종, 바나얀-조나나 증후군, 코우텐병, 레르미트-두클로스 병, 유방암, 결장암, 두경부암, 신장암, 폐암, 간암, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 육종 및 갑상선암.

[0096] 적합하게는, 본 발명은 난소암, 유방암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택된 암의 중증도를 치료 또는 완화시키는 방법에 관한 것이다.

[0097] 적합하게는 본 발명은 인간을 포함한 포유동물에서 전암성 증후군의 중증도를 치료 또는 완화시키는 방법에 관한 것이며, 여기서 전암성 증후군은 자궁경부 상피내 신생물, 의미 불명의 모노클로날 감마글로불린병증 (MGUS), 골수형성이상 증후군, 재생불량 빈혈, 자궁경부 병변, 피부 모반 (전-흑색종), 전립선 상피내 (관내) 신생물 (PIN), 관 상피내 암종 (DCIS), 대장 용종 및 중증 간염 또는 간경변증으로부터 선택된다.

[0098] 본 발명의 조합물을 단독으로 또는 1종 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 추가 측면에서 본 발명의 조합물을 추가의 치료제 또는 치료제들과 함께 포함하는 추가의 조합물, 상기 조합물을 포함하는 조성물 및 의약, 및 요법에서 특히 TLR4의 결속에 감수성인 질환의 치료에서, 상기 추가의 조합물, 조성물 및 의약의 용도를 제공한다.

[0099] 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 암 치료의 다른 치료 방법과 함께 사용될 수 있다. 특히, 항신생물 요법에서, 상기에서 언급된 것들 이외에 다른 화학요법제, 호르몬제, 항체 작용제 뿐만 아니라 및 수술 및/또는 방사선 치료와의 조합 요법이 예상된다. 따라서 본 발명에 따른 조합 요법은 TLR4 효능제의 투여뿐만 아니라 다른 항신생물제를 포함한 다른 치료제의 임의적 사용도 포함한다. 이러한 작용제의 조합물을 함께 또는 개별적으로 투여할 수 있으며, 개별적으로 투여하는 경우에 이는 동시에 또는 순차적으로 임의의 순서로, 시간적으로 가깝고 시간적으로 멀게 둘 다로 실시할 수 있다. 한 실시양태에서, 제약 조합물은 TLR4 효능제, 그리고 적어도 1종의 추가적 항신생물제를 포함한다.

[0100] 한 실시양태에서, 추가 항암 요법은 수술 및/또는 방사선요법이다.

[0101] 한 실시양태에서, 추가 항암 요법은 적어도 1종의 추가적 항신생물제이다.

[0102] 치료 중인 감수성 종양에 대해 활성을 가진 임의의 항신생물제를 조합하여 이용할 수 있다. 유용한 전형적인 항신생물제는, 항미세소관제 예컨대 디테르페노이드 및 빙카 알칼로이드; 백금 배위 착물; 알킬화제 예컨대 질소 머스터드, 옥사자포스포린, 알킬술포네이트, 니트로소우레아, 및 트리아젠; 항생제 예컨대 안트라시클린, 악티노마이신 및 블레오마이신; 토포이소머라제 II 억제제 예컨대 에피포도필록톡신; 항대사물질 예컨대 푸린 및 피리미딘 유사체 및 항-폴레이트 화합물; 토포이소머라제 I 억제제 예컨대 캄프토테신; 호르몬 및 호르몬 유사체; 신호전달 경로 억제제; 비-수용체 티로신 혈관신생 억제제; 면역요법제; 아폽토시스유발제; 및 세포 주기 신호전달 억제제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0103] 항미세소관제 또는 항유사분열제: 항미세소관제 또는 항유사분열제는 세포 주기의 M 또는 유사분열기 동안에 종양 세포의 미세소관에 대항하여 활성인 단계 특이적 작용제이다. 항미세소관제의 예는 디테르페노이드 및 빙카 알칼로이드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0104] 천연 공급원에서 유래된 디테르페노이드는 세포 주기의 G<sub>2</sub>/M 단계에서 작동하는 단계 특이적 항암제이다. 디테르페노이드는 미세소관의 β-투불린 서브유닛을 이 단백질과 결합하여, 안정화시키는 것으로 여겨진다. 그 다음에 상기 단백질의 분해는 유사분열이 정지됨에 따라 억제되며 세포사가 뒤따르는 것으로 보인다. 디테르페노이드의 예는 파클리탁셀 및 그의 유사체 도세탁셀을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0105] 파클리탁셀, (2R,3S)-N-벤조일-3-페닐이소세린을 가진 5β,20-에폭시-1,2α,4,7β,10β,13α-헥사-하이드록시탁스-11-엔-9-온 4,10-디아세테이트 2-벤조에이트 13-에스테르는 태평양의 주목 탁수스 브래비풀리아(*Taxus brevifolia*)로부터 단리된 천연 디테르펜 생성물이고 주사액 탁솔(TAXOL)®로서 시판된다. 이것은 테르펜의 탁산 패밀리의 구성원이다. 파클리탁셀은 미국에서 난치성 난소암의 치료 (Markman et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intem. Med., 111:273, 1989) 및 유방암의 치료 (Holmes et al., J. Nat. Cancer Inst., 83:1797, 1991.)에서 임상적 이용이 승인되었다. 이것은 두경부 암종 (Forastire et al., Sem. Oncol., 20:56, 1990) 및 피부에서의 신생물 (Einzig et al., Proc. Am. Soc. Clin.

Oncol., 20:46)의 치료를 위한 잠재적 후보이다. 화합물은 또한 다낭성 신장 질환 (Woo et al., Nature, 368:750. 1994), 폐암 및 말라리아의 치료 가능성을 제시한다. 파클리탁셀에 의한 환자 치료는 역치 농도 (50 nM) 초과의 투여 지속기간 (Kearns, C.M. et al., Seminars in Oncology, 3(6) p.16-23, 1995)과 관련된 골수 억제를 결과한다 (multiple cell lineages, Ignoff, R.J. et al., Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998).

[0106] 도세탁셀,  $5\beta$ -20-에폭시-1,2 $\alpha$ ,4,7 $\beta$ ,10 $\beta$ ,13 $\alpha$ -헥사히드록시탁스-11-엔-9-온 4-아세테이트 2-벤조에이트를 가진 (2R,3S)-N-카르복시-3-페닐이소세린,N-tert-부틸 에스테르, 13-에스테르, 3수화물은 주사액 탁소테레 (TAXOTERE)®로서 시판된다. 도세탁셀은 유방암 치료를 위해 지시된다. 도세탁셀은 유럽의 주목의 침엽에서 추출된 천연 전구체, 10-데아세틸-바카틴 III을 사용하여 제조된 파클리탁셀 q.v.의 반합성 유도체이다.

[0107] 빈카 알칼로이드는 폐리윙클 식물로부터 유래된 단계 특이적 항신생물제이다. 빈카 알칼로이드는 투불린에 특이적으로 결합함에 의해 세포 주기의 M 단계 (유사분열)에서 작용한다. 결과적으로, 결합된 투불린 분자는 미세소관으로 중합될 수 없다. 유사분열이 중기에 정지되어 세포사가 뒤따르는 것으로 여겨진다. 빈카 알칼로이드의 예는 빈블라스틴, 빙크리스틴, 및 비노렐빈을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0108] 빈블라스틴, 빈카류코블라스틴 슬레이트는 주사액으로서 벨반(VELBAN)®으로서 시판된다. 비록 이것이 다양한 고형 종양의 제2선 요법으로서 지시 가능하긴 하지만, 이는 주로 고환암 및 다양한 림프종, 예를 들어 호지킨병; 및 림프구성 및 조직구성 림프종의 치료에서 지시된다. 골수억제는 빈블라스틴의 용량 제한적 부작용이다.

[0109] 빙크리스틴, 빈카류코블라스틴, 22-옥소-슬레이트는 주사액으로서 온코빈(ONCOVIN)®으로서 시판된다. 빙크리스틴은 급성 백혈병의 치료를 위해 지시되며 호지킨 및 비-호지킨 악성 림프종에 대한 치료 요법에도 사용되고 있다. 탈모 및 신경학적 효과가 빙크리스틴의 가장 흔한 부작용이고 골수억제 및 위장 점막염 부작용이 덜한 정도로 발생한다.

[0110] 비노렐빈 타르트레이트의 주사액 (나벨빈(NAVELBINE)®)으로서 시판되는 비노렐빈, 3',4'-디데히드로 -4'-데옥시-C'-노르빈카류코블라스틴 [R-(R\*,R\*)-2,3-디히드록시부탄디오에이트(1:2)(염)]는 반합성 빈카 알칼로이드이다. 비노렐빈은 다양한 고형 종양, 특히 비소세포 폐암, 진행성 유방암, 및 호르몬 난치성 전립선암의 치료에서, 단일 작용제로서 또는 시스플라틴과 같은 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 골수억제는 비노렐빈의 가장 흔한 용량 제한적 부작용이다.

[0111] 백금 배위 쥐물: 백금 배위 쥐물은 DNA와 상호작용성인 비-단계 특이적 항암제이다. 백금 쥐물은 종양 세포로 진입하여, 아크오화를 겪고, DNA와 가닥내 및 가닥간 가교를 형성하여 종양에 불리한 생물학적 효과를 유발한다. 백금 배위 쥐물의 예는 옥살플라틴, 시스플라틴 및 카르보플라틴을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0112] 시스플라틴, 시스-디암민디클로로백금은, 주사액으로서 플라티놀(PLATINOL)®으로서 시판된다. 시스플라틴은 주로 전이성 고환암 및 난소암 및 진행성 방광암의 치료에서 지시된다.

[0113] 카르보플라틴, 백금, 디암민 [1,1-시클로부탄-디카르복실레이트(2-)–0,0']는, 주사액으로서 파라플라틴 (PARAPLATIN)®으로서 시판된다. 카르보플라틴은 주로 진행성 난소 암종의 제1선 및 제2선 치료에서 지시된다.

[0114] 알킬화제: 알킬화제는 비-단계 항암 특이적 작용제이며 강력한 친전자체이다. 전형적으로, 알킬화제는 DNA 분자 예컨대 포스페이트, 아미노, 술프히드릴, 히드록실, 카르복실, 및 이미다졸의 친핵 모이어티를 통해, 알킬화에 의해, DNA에 대해 공유 결합을 형성한다. 이러한 알킬화는 핵산 기능을 파괴하여 세포사를 야기한다. 알킬화제의 예는 질소 머스터드 예컨대 시클로포스파미드, 멜팔란, 및 클로로암부실; 알킬 술포네이트 예컨대 부술판; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴; 및 트리아젠 예컨대 다카르바진을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0115] 시클로포스파미드, 2-[비스(2-클로로에틸)아미노]테트라히드로-2H-1,3,2-옥사자포스포린 2-옥시드 1수화물은, 시톡산(CYTOXAN)®으로서 주사액 또는 정제로서 시판된다. 시클로포스파미드는 악성 림프종, 다발성 골수종, 및 백혈병의 치료에서, 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다.

[0116] 멜팔란, 4-[비스(2-클로로에틸)아미노]-L-페닐알라닌은, 알케란(ALKERAN)®으로서 주사액 또는 정제로서 시판된다. 멜팔란은 다발성 골수종 및 난소의 절제불가능한 상피 암종의 완화적 치료를 위해 지시된다. 골수 억제는 멜팔란의 가장 흔한 용량 제한적 부작용이다.

[0117] 클로로암부실, 4-[비스(2-클로로에틸)아미노]벤젠부탄산은 류케란(LEUKERAN)® 정제로서 시판된다. 클로로암부실은 만성 림프성 백혈병, 및 악성 림프종, 예컨대 림프육종, 거대 여포성 림프종, 및 호지킨병의 완화적 치료

를 위해 지시된다.

- [0118] 부술관, 1,4-부탄디올 디메탄솔포네이트는 밀레란(MYLERAN)® 정제로서 시판된다. 부술관은 만성 골수구성 백혈병의 완화적 치료를 위해 지시된다.
- [0119] 카르무스틴, 1,3-[비스(2-클로로에틸)-1-니트로소우레이]는 비아이씨엔유(BiCNU)®로서 동결건조된 물질의 단일 바이알로서 시판된다. 카르무스틴은 완화적 치료를 위해 단일 작용제로서 또는 뇌 종양, 다발성 골수종, 호지킨병, 및 비-호지킨 림프종을 위한 다른 작용제와 조합되어 지시된다.
- [0120] 다카르바진, 5-(3,3-디메틸-1-트리아제노)-이미다졸-4-카르복스아미드는 DTIC-Dome®로서 물질의 단일 바이알로서 시판된다. 다카르바진은 전이성 악성 흑색종의 치료를 위해 그리고 호지킨병의 제2선 치료를 위한 다른 작용제와 조합되어 지시된다.
- [0121] 항생제 항신생물제: 항생제 항신생물제는 DNA와 결합하거나 삽입하는 비-단계 특이적 작용제이다. 전형적으로, 이러한 작용은 안정적인 DNA 복합체 또는 가닥 파손을 결과하여, 이는 핵산의 정상적인 기능을 파괴하여 세포사를 야기한다. 항생제 항신생물제의 예는 악티노마이신 예컨대 닉티노마이신, 안트로시클린 예컨대 다우노루비신 및 독소루비신; 및 블레오마이신을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0122] 악티노마이신 D로도 공지된 닉티노마이신은 코스메겐(COSMEGEN)®으로서 주사액으로 시판된다. 닉티노마이신은 월름스 종양 및 횡문근육종의 치료를 위해 지시된다.
- [0123] 다오노루비신, (8S-시스-)8-아세틸-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- $\alpha$ -L-락소-헥소피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라하이드로-6,8,11-트리히드록시-1-메톡시-5,12 나프타센디온 히드로클로라이드는 다우녹솜(DAUNOXOME)®으로서 리포솜 주사가능한 형태로서 또는 세루비딘(CERUBIDINE)®으로서 주사액으로서 시판된다. 다우노루비신은 급성 비림프구성 백혈병 및 진행성 HIV 연관 카포시 육종의 치료에서 관해 유도를 위해 지시된다.
- [0124] 독소루비신, (8S, 10S)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- $\alpha$ -L-락소-헥소피라노실)옥시]-8-글리콜로일, 7,8,9,10-테트라하이드로-6,8,11-트리히드록시-1-메톡시-5,12 나프타센디온 히드로클로라이드는 루벡스(RUBEX)® 또는 아드리아마이신(ADRIAMYCIN) RDF®로서 주사가능한 형태로서 시판된다. 독소루비신은 급성 림프모구성 백혈병 및 급성 골수모구성 백혈병의 치료를 위해 주로 지시되나, 또한 일부 고형 종양 및 림프종의 치료에서 유용한 성분이다.
- [0125] 블레오마이신, 스트렙토마이세스 베르티실루스(*Streptomyces verticillus*)의 균주로부터 단리된 세포독성 글리코펩티드 항생제의 혼합물은 블레녹산(BLENOXANE)®으로서 시판된다. 블레오마이신은 편평 세포 암종, 림프종, 및 고환 암종의 완화적 치료제로서, 단일 작용제로서 또는 다른 작용제와 조합되어 지시된다.
- [0126] 토포이소머라제 II 억제제: 토포이소머라제 II 억제제는 에피포도필록톡신을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0127] 에피포도필록톡신은 멘드레이트 식물로부터 유래되는 단계 특이적 항신생물제이다. 에피포도필록톡신은 토포이소머라제 II 및 DNA와 3원 복합체를 형성함으로써 세포 주기의 S 및 G<sub>2</sub> 단계의 세포에 전형적으로 영향을 미쳐 DNA 가닥 파손을 유발한다. 가닥 파손은 누적되고 세포사로 이어진다. 에피포도필록톡신의 예는 에토詈시드 및 테니포시드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0128] 에토포시드, 4'-데메틸-에피포도필로톡신 9[4,6-0-(R)-에틸리덴- $\beta$ -D-글루코파라노시드]는 베페시드(VePESID)®로서 주사액 또는 캡슐로서 시판되고, VP-16으로 일반적으로 공지되어 있다. 에토포시드는 고환암 및 비소세포 폐암의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다.
- [0129] 테니포시드, 4'-데메틸-에피포도필로톡신 9[4,6-0-(R)-테닐리딘- $\beta$ -D-글루코파라노시드]는 부몬(VUMON)®으로서 주사액으로서 시판되고, 일반적으로 VM-26으로 알려져 있다. 테니포시드는 소아의 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다.
- [0130] 항대사물질 신생물제: 항대사물질 신생물제는 DNA 합성을 억제하거나 푸린 또는 피리미딘 염기 합성을 억제함에 의해 세포 주기의 S 단계 (DNA 합성)에서 작용하여 DNA 합성을 제한하는 단계 특이적 항신생물제이다. 결과적으로, S 단계는 진행되지 않고 세포사로 이어진다. 항대사물질 항신생물제의 예는 플루오로우라실, 메토트렉세이트, 시타라빈, 메캡토푸린, 티오구아닌, 및 켐시타빈을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0131] 5-플루오로우라실, 5-플루오로-2,4- (1H,3H) 피리미딘디온은 플루오로우라실로서 시판된다. 5-플루오로우라실

의 투여는 티미딜레이트 합성의 억제를 야기하고 또한 RNA 및 DNA 둘 다에 또한 혼입된다. 그 결과는 전형적으로 세포사이다. 5-플루오로우라실은 유방, 결장, 직장, 위 및 췌장의 암종 치료에 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 다른 플루오로피리미딘 유사체는 5-플루오로 테옥시우리딘 (플록스우리딘) 및 5-플루오로데옥시우리딘 모노포스페이트를 포함한다.

[0132] 시타라빈, 4-아미노-1- $\beta$ -D-아라비노푸라노실-2(1H)-피리미디논은 시토사르(CYTOSAR)-U®로서 시판되고 Ara-C로서 일반적으로 공지되어 있다. 시타라빈은 성장하는 DNA 쇄에 시타라빈의 말단 혼입에 의해 DNA 쇄 연장을 억제함으로써 S-단계에서 세포 단계 특이성을 나타내는 것으로 여겨진다. 시타라빈은 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 다른 시티딘 유사체는 5-아자시티딘 및 2',2'-디플루오로데옥시시티딘 (겜시타빈)을 포함한다.

[0133] 메르캅토푸린, 1,7-디히드로-6H-푸린-6-티온 1수화물은 푸린에톨(PURINETHOL)®로서 시판된다. 메르캅토푸린은 아직 특정지지 않은 메커니즘에 의해 DNA 합성을 억제함으로써 S-단계에서 세포 단계 특이성을 나타낸다. 메르캅토푸린은 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 유용한 메르캅토푸린 유사체는 아자티오프린이다.

[0134] 티오구아닌, 2-아미노-1,7-디히드로-6H-푸린-6-티온은 타블로이드(TABLOID)®로서 시판된다. 티오구아닌은 아직 특정되지 않은 메커니즘에 의해 DNA 합성을 억제함으로써 S-단계에서 세포 단계 특이성을 나타낸다. 티오구아닌은 급성 백혈병의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화학요법제와 조합되어 지시된다. 다른 푸린 유사체는 펜토스타틴, 에리트로히드록시노닐아데닌, 플루다라빈 포스페이트, 및 클라드리빈을 포함한다.

[0135] 켐시타빈, 2'-데옥시-2',2'-디플루오로시티딘 모노히드로클로라이드 ( $\beta$ -이성질체)는 켐자르(GEMZAR)®로서 시판된다. 켐시타빈은 G1/S 경계를 통해 세포의 진행을 차단함으로써 S-단계에서 세포 단계 특이성을 나타낸다. 켐시타빈은 국소적 진행성 비소세포 폐암의 치료에서 시스플라틴과 조합되어 그리고 국소적 진행성 췌장암의 치료에서 단독으로 지시된다.

[0136] 메토트렉세이트, N-[4[((2,4-디아미노-6-프테리디닐) 메틸]메틸아미노] 벤조일]-L-글루탐산은 메토트렉세이트 소듐으로서 시판된다. 메토트렉세이트는 푸린 뉴클레오티드 및 티미딜레이트의 합성에 요구되는 디히드로폴산 리덕타제의 억제를 통해 DNA 합성, 복구 및/또는 복제를 억제함으로써 S-단계에서 특이적으로 세포 단계 효과를 나타낸다. 메토트렉세이트는 용모막암종, 수막성 백혈병, 비호지킨 림프종, 및 유방, 두부, 경부, 난소 및 방광의 암종의 치료에서 단일 작용제로서 또는 다른 화합요법제와 조합되어 지시된다.

[0137] 토포이소머라제 I 억제제: 캄프토테신 및 캄프토테신 유도체를 포함한 캄프토테신은 토포이소머라제 I 억제제로서 시판되거나 개발 중이다. 캄프토테신 세포독성 활성은 그의 토포이소머라제 I 억제 활성과 관련된 것으로 여겨진다. 캄프토테신의 예는 이리노테칸, 토포테칸, 및 이하에 기재된 7-(4-메틸피페라지노-메틸렌)-10,11-에틸렌디옥시-20-캄프토테신의 다양한 광학 형태를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0138] 이리토테칸 HCl, (4S)-4,11-디에틸-4-히드록시-9-[(4-피페리디노피페리디노) 카르보닐옥시]-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14(4H,12H)-디온 히드로클로라이드는 주사액 캄프토사르(CAMPTOSAR)®로서 시판된다. 이리노테칸은 그의 활성 대사물질 SN-38과 함께, 토포이소머라제 I - DNA 복합체에 결합하는 캄프토테신의 유도체이다. 세포독성은 토포이소머라제 I : DNA : 이리노테칸 또는 SN-38 삼원 복합체와 복제효소의 상호작용에 의해 유발되는 돌이킬 수 없는 이중 가닥 파손의 결과로서 발생한다고 여겨진다. 이리노테칸은 결장 또는 직장의 전이성 암의 치료를 위해 지시된다.

[0139] 토포테칸 HCl, (S)-10-[(디메틸아미노)메틸]-4-에틸-4,9-디히드록시-1H-피라노[3',4',6,7]인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-3,14-(4H,12H)-디온 모노히드로클로라이드는 주사액 히캄틴(HYCAMTIN)®으로서 시판된다. 토포테칸은 DNA 분자의 비틀림 변형에 반응하여 토포이소머라제 I에 의해 유발된 단일 가닥 파손의 재라이게이션을 방지하고 토포이소머라제 I - DNA 복합체에 결합하는 캄프토테신의 유도체이다. 토포테칸은 난소 및 소세포 폐암의 전이성 암종의 제2선 치료를 위해 지시된다.

[0140] 호르몬 및 호르몬 유사체: 호르몬 및 호르몬 유사체는 호르몬(들)과 암의 성장 및/또는 성장 부족 사이에 관련성이 있는 암을 치료하는데 유용한 화합물이다. 암 치료에 유용한 호르몬 및 호르몬 유사체의 예는 소아의 악성 림프종 및 급성 백혈병의 치료에서 유용한 아드레노코르티코스테로이드 예컨대 프레드니손 및 프레드니솔론; 에스트로겐 수용체를 함유하는 호르몬 의존성 유방 암종 및 부신피질 암종의 치료에서 유용한 아미노글루테티미드 및 다른 아로마타제 억제제 예컨대 아나스트로졸, 레트라졸, 보라졸, 및 엑세메스탄; 호르몬 의존성 유방암 및 자궁내막 암종의 치료에서 유용한 프로게스테린, 예컨대 메게스트롤 아세테이트; 전립선 암종 및 양성 전립

선 비대증의 치료에서 유용한, 에스트로겐, 안드로겐, 및 항-안드로겐 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 시프로테론 아세테이트 및 5 $\alpha$ -리덕타제, 예컨대 피나스테리드 및 두타스테리드; 호르몬 의존성 유방암종 및 다른 민감한 암의 치료에 유용한, 항에스트로겐, 예컨대 타목시펜, 토레미펜, 랄록시펜, 드롤록시펜, 아이오독시펜, 뿐만 아니라 미국 특허 번호 5,681,835, 5,877,219, 및 6,207,716에 기재된 것들과 같은 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERMS); 및 전립선 암종의 치료를 위해 황체형성 호르몬 (LH) 및/또는 난포 자극호르몬 (FSH)의 방출을 자극하는 성선자극호르몬-방출 호르몬 (GnRH) 및 그의 유사체, 예를 들어, LHRH 효능제 및 길항제, 예컨대 고세렐린 아세테이트 및 루프롤라이드를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0141] 신호전달 경로 억제제: 신호전달 경로 억제제는 세포내 변화를 일으키는 화학적 과정을 차단 또는 억제하는 그러한 억제제이다. 본원에 사용된 바와 같이 상기 변화는 세포 증식 또는 분화이다. 본 발명에서 유용한 신호전달 억제제는 수용체 티로신 키나제, 비-수용체 티로신 키나제, SH2/SN3 도메인 차단제, 세린/트레오닌 키나제, 포스포티딜 이노시톨-3 키나제, 미오-이노시톨 신호전달, 및 Ras 종양유전자의 억제제를 포함한다.

[0142] 여러 단백질 티로신 키나제는 세포 성장의 조절에 관여하는 다양한 단백질에서의 특이적 티로신 잔기의 인산화를 촉매화한다. 이러한 단백질 티로신 키나제는 크게 수용체 또는 비-수용체 키나제로서 분류될 수 있다.

[0143] 수용체 티로신 키나제는 세포외 리간드 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 티로신 키나제 도메인을 갖는 막관통 단백질이다. 수용체 티로신 키나제는 세포 성장의 조절에 관여하며, 일반적으로 성장 인자 수용체로 칭해진다. 이를 키나제 중 다수의 부적절하거나 비제어된 활성화, 즉, 예를 들어, 과다발현 또는 돌연변이에 의한 이상 키나제 성장 인자 수용체 활성은 비제어된 세포 성장을 결과하는 것으로 제시된 바 있다. 따라서, 이러한 키나제의 이상 활성은 악성 조직 성장과 관련되어 있다. 결과적으로, 이러한 키나제의 억제제는 암 치료 방법을 제공할 수 있었다. 성장 인자 수용체는, 예를 들어, 표피 성장 인자 수용체 (EGFr), 혈소판 유래 성장 수용체 (PDGFr), erbB2, erbB4, ret, 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFr), 면역글로불린-유사 및 표피 성장 인자 동일성 도메인 (TIE-2)을 가진 티로신 키나제, 인슐린 성장 인자 -I (IGFI) 수용체, 대식세포 집락 자극 인자 (cfms), BTK, ckit, cmet, 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 수용체, Trk 수용체 (TrkA, TrkB, 및 TrkC), 에프린 (eph) 수용체, 및 RET 원종양유전자를 포함한다. 성장 수용체의 여러 억제제가 개발 중에 있고 리간드 길항제, 항체, 티로신 키나제 억제제 및 안티-센스 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 성장 인자 수용체 및 성장 인자 수용체 기능을 억제하는 작용제가, 예를 들어, 문헌 [Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al. DDT Vol 2, No. 2 February 1997]; 및 [Lofts, F. J. et al., "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London]에 기재되어 있다.

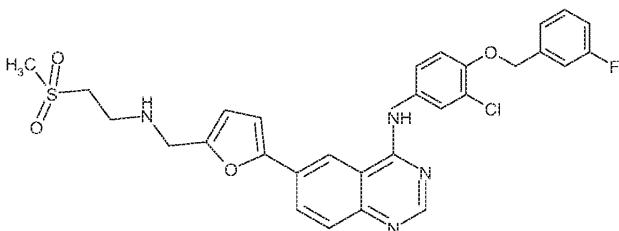
[0144] 성장 인자 수용체 키나제가 아닌 티로신 키나제는 비-수용체 티로신 키나제로 칭해진다. 항암 약물을 표적화하거나 잠재적으로 표적화하는 본 발명에 유용한 비-수용체 티로신 키나제는 cSrc, Lck, Fyn, Yes, Jak, cAb1, FAK (초점 부착 키나제), 브루톤 티로신 키나제, 및 Bcr-Ab1을 포함한다. 비-수용체 티로신 키나제 기능을 억제하는 이러한 비-수용체 키나제 및 작용제는 문헌 [Sinh, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematology and Stem Cell Research 8 (5): 465 - 80]; 및 [Bolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology. 15: 371-404]에 기재되어 있다.

[0145] SH2/SN3 도메인 차단제는 PI3-K p85 서브유닛, Src 패밀리 키나제, 어댑터 분자 (Shc, Crk, Nck, Grb2) 및 Ras-GAP을 포함한 다양한 효소 또는 어댑터 단백질에서 SH2 또는 SH3 도메인 결합을 봉괴시키는 작용제이다. 항암 약물에 대한 표적으로서 SH2/SN3 도메인은 문헌 [Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32]에 논의되어 있다.

[0146] Raf 키나제 (rakf), 미토겐 또는 세포외 조절된 키나제 (MEK), 및 세포외 조절된 키나제 (ERK)의 차단제를 포함한 MAP 키나제 캐스케이드 차단제; 및 PKC (알파, 베타, 감마, 엡실론, 뮤, 람다, 이오타, 제타)의 차단제를 포함한 단백질 키나제 C 패밀리 구성원 차단제를 포함한 세린/트레오닌 키나제의 억제제. IKK 키나제 패밀리 (IKKa, IKKb), PKB 패밀리 키나제, akt 키나제 패밀리 구성원, 및 TGF 베타 수용체 키나제. 이러한 세린/트레오닌 키나제 및 이의 억제제는 문헌 [Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803]; [Brodt, P, Samani, A., and Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107]; [Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64]; [Philip, P.A., and Harris, A.L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27], [Lackey, K. et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226]; 미국 특허 번호 6,268,391; 및 [Martinez-Iacaci, L., et al., Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52]에 기재되어 있다.

- [0147] PI3-키나제, ATM, DNA-PK, 및 Ku의 차단제를 포함한 포스포티딜 이노시톨-3 키나제 패밀리 구성원의 억제제가 또한 본 발명에서 유용하다. 이러한 키나제는 문헌 [Abraham, R.T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8]; [Canman, C.E., Lim, D.S. (1998), Oncogene 17 (25) 3301-3308]; [Jackson, S.P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29 (7):935-8]; 및 [Zhong, H. et al., Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545]에 논의되어 있다.
- [0148] 또한, 미오-이노시톨 신호전달 억제제 예컨대 포스포리파제 C 차단제 및 미오이노시톨 유사체가 본 발명에서 유용하다. 이러한 신호 억제제는 문헌 [Powis, G., and Kozikowski A., (1994) New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London]에 기재되어 있다.
- [0149] 신호전달 경로 억제제의 또 다른 군은 Ras 종양유전자의 억제제이다. 이러한 억제제는 파르네실트랜스퍼라제, 게라닐-게라닐 트랜스퍼라제, 및 CAAX 프로테아제의 억제제뿐만 아니라 안티-센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임 및 면역요법을 포함한다. 이러한 억제제는 암생형 돌연변이체 ras를 함유하는 세포에서 ras 활성화를 차단하여, 항증식제로서 작용하는 것으로 제시된 바 있다. Ras 종양유전자 억제는 문헌 [Scharovsky, O.G., Rozados, V.R., Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4) 292-8]; [Ashby, M.N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99 - 102]; 및 [BioChim. Biophys. Acta, (1989) 1423(3):19-30]에 논의되어 있다.
- [0150] 상기 언급한 바와 같이, 수용체 키나제 리간드 결합에 대한 항체 길항제가 신호전달 억제제로서 또한 작용할 수 있다. 이러한 군의 신호전달 경로 억제제는 수용체 티로신 키나제의 세포외 리간드 결합 도메인에 대한 인간화 항체의 사용을 포함한다. 예를 들어 임클론(Imclone) C225 EGFR 특이적 항체 (문헌 [Green, M.C. et al., Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4), 269-286] 참조); 헤르셉틴(Herceptin)® erbB2 항체 (문헌 [Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183] 참조); 및 2CB VEGFR2 특이적 항체 (문헌 [Brekken, R.A. et al., Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124] 참조).
- [0151] 항혈관신생제: 비-수용체 MEK 혈관신생 억제제를 포함한 항혈관신생제가 또한 유용할 수 있다. 항혈관신생제 예컨대 혈관 내피 성장 인자의 효과를 억제하는 것들 (예를 들어 항-혈관 내피 세포 성장 인자 항체 베마시주맙 [아베스틴(Avastin)™]), 및 다른 메커니즘에 의해 작동하는 화합물 (예를 들어, 리노미드, 인테그린  $\alpha v \beta 3$  기능의 억제제, 엔도스타틴 및 안지오스타틴);
- [0152] 면역요법제: 면역치료 요법에서 사용되는 작용제가 화학식(I)의 화합물과 조합하여 또한 유용할 수 있다. 예를 들어, 인터류킨 2, 인터류킨 4 또는 과립구-대식세포 접락 자극 인자와 같은 시토카인으로의 형질감염과 같이, 환자 종양 세포의 면역원성을 증가시키기 위한 생체외 및 생체내 접근법, T-세포 무반응을 감소시키기 위한 접근법, 시토카인-형질감염된 수지상 세포와 같은 형질감염된 면역 세포를 사용한 접근법, 시토카인-형질감염된 종양 세포주를 사용한 접근법 및 항-이디오타입 항체를 사용한 접근법을 포함한 면역요법 접근법
- [0153] 아폽토시스유발제: 아폽토시스유발 요법에 사용되는 작용제 (예를 들어, bcl-2 안티센스 올리고뉴클레오티드)가 본 발명의 조합물에서 또한 사용될 수 있다.
- [0154] 세포 주기 신호전달 억제제: 세포 주기 신호전달 억제제는 세포 주기의 제어에 관여하는 분자를 억제한다. 시클린 의존성 키나제 (CDK)로 칭해지는 단백질 키나제의 패밀리 및 시클린으로 칭해지는 단백질의 패밀리와 이들의 상호작용은 진핵생물 세포 주기를 통해 진행을 제어한다. 상이한 시클린/CDK 복합체의 동조 활성화 및 불활성화는 세포 주기를 통한 정상 진행에 필요하다. 세포 주기 신호전달의 여러 억제제는 개발 중에 있다. 예를 들어, CDK2, CDK4, 및 CDK6를 포함한 시클린 의존성 키나제 및 그에 대한 억제제의 예는, 예를 들어, 문헌 [Rosania et al., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(2):215-230]에 기재되어 있다.
- [0155] 한 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 TLR4 효능제, 및 항미세소관제, 백금 배위 쟈물, 알킬화제, 항생제, 토포이소머라제 II 억제제, 항대사물질, 토포이소머라제 I 억제제, 호르몬 및 호르몬 유사체, 신호전달 경로 억제제, 비-수용체 티로신 MEK 혈관신생 억제제, 면역요법제, 아폽토시스유발제, 및 세포 주기 신호전달 억제제로부터 선택된 적어도 1종의 항신생물제를 포함한다.
- [0156] 한 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 TLR4 효능제, 및 디테르페노이드 및 빈카 알칼로이드로부터 선택된 항미세소관제인 적어도 1종의 항신생물제를 포함한다.

- [0157] 추가 실시양태에서, 적어도 1종의 항신생물체는 디테르페노이드이다.
- [0158] 추가 실시양태에서, 적어도 1종의 항신생물체는 빈카 알칼로이드이다.
- [0159] 한 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 TLR4 효능제 및 백금 배위착물인 적어도 1종의 항신생물체를 포함한다.
- [0160] 추가 실시양태에서, 적어도 1종의 항신생물체는 파클리탁셀, 카르보플라틴, 또는 비노렐빈이다.
- [0161] 추가 실시양태에서, 적어도 1종의 항신생물체는 카르보플라틴이다.
- [0162] 추가 실시양태에서, 적어도 1종의 항신생물체는 비노렐빈이다.
- [0163] 추가 실시양태에서, 적어도 1종의 항신생물체는 파클리탁셀이다.
- [0164] 한 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 TLR4 효능제 및 신호전달 경로 억제제인 적어도 1종의 항신생물체를 포함한다.
- [0165] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 성장 인자 수용체 키나제 VEGFR2, TIE2, PDGFR, BTK, erbB2, EGFr, IGFR-1, TrkA, TrkB, TrkC, 또는 c-fms의 억제제이다.
- [0166] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 세린/트레오닌 키나제 rafk, akt, 또는 PKC-제타의 억제제이다.
- [0167] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 키나제의 src 패밀리로부터 선택된 비-수용체 티로신 키나제의 억제제이다.
- [0168] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 c-src의 억제제이다.
- [0169] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 파르네실 트랜스퍼라제 및 게라닐게라닐 트랜스퍼라제의 억제제로부터 선택된 Ras 종양유전자의 억제제이다.
- [0170] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 PI3K로 이루어진 군으로부터 선택된 세린/트레오닌 키나제의 억제제이다.
- [0171] 추가 실시양태에서 신호전달 경로 억제제는 이중 EGFr/erbB2 억제제, 예를 들어 N-(3-클로로-4-[((3-플루오로벤질) 옥시]페닐)-6-[5-([2-(메탄솔포닐)에틸]아미노}메틸)-2-푸릴]-4-퀴나졸린아민 (하기 구조)이다:



- [0172]
- [0173] 한 실시양태에서, 본 발명의 조합물은 화학식 I의 화합물 또는 그의 염 또는 용매화물 및 세포 주기 신호전달 억제제인 적어도 1종의 항신생물체를 포함한다.
- [0174] 추가 실시양태에서, 세포 주기 신호전달 억제제는 CDK2, CDK4 또는 CDK6의 억제제이다.
- [0175] 한 실시양태에서 본 발명의 방법 및 사용에서의 포유동물은 인간이다.
- [0176] 명시된 바와 같이, 치료 유효량의 본 발명의 조합물 (항암제 및 TLR4 효능제)은 인간에게 투여된다. 전형적으로, 본 발명의 투여된 작용제의 치료 유효량은, 예를 들어, 대상체의 연령 및 체중, 치료를 필요로 하는 정확한 병태, 병태의 중증도, 제제의 성질, 및 투여 경로를 포함한 다수의 인자에 따라 달라질 것이다. 궁극적으로, 치료 유효량은 담당 의사의 재량에 달려 있을 것이다.
- [0177] 하기 실시예는 단지 예시하고자 하는 것이며 본 발명의 범위를 어떤 식으로든 제한하려는 것은 아니다.
- [0178] **실시예**
- [0179] 비제한적 실시예 화학요법과 AGP 치료의 조합은 뮤린 암 모델의 생존을 상당히 향상시킨다 (화학요법 또는 AGP 단독과 비교하여). CRX-527과 화학요법 간의 상승작용에 대한 증거는 하기 계통에서 보인다: 뮤린 백혈병 모델 (L1210), 뮤린 난소 기형종 모델 (MOT), 뮤린 흑색종 모델 (B16), 유방암 (4T1).

- [0180] **실시예 1** L120 뮤린 백혈병 모델: 화학요법과 면역조정의 조합은 항암 반응을 개선시킨다
- [0181] 화학요법 미토마이신 C와 AGP CRX-527로 이루어진 조합 치료가 둘 중 어느 하나의 단독 치료보다 암-보유 마우스의 생존을 연장시키는지의 여부를 조사하기 위해, 제0일에 L1210 뮤린 백혈병 세포 (복강내 (IP) 경로를 통해  $10^4$  개 종양 세포)가 시딩된 BDF1 마우스 (군당 10마리)를 1) 무처리 (미처리 대조군), 2) 제6일에 미토마이신 C (40 ug)의 복강내 주사, 3) 제7일에 CRX-527-AF (수성 제제 (AF) 중의 100 ug CRX-527, 이는 물 중 0.02% 디팔미토일 포스파티딜 콜린이다)의 IP 주사, 또는 4) 제6일에 미토마이신 C의 IP 주사에 뒤이어 7일째 CRX-527-AF의 IP 주사로 처리하였다. 제54일까지의 생존 곡선을 도 1에 각각의 군에 대해 제시하였다. 미토마이신 C 및 CRX-527 둘 다를 투여한 마우스는 2종의 성분 중 어느 하나를 단독으로 투여한 마우스와 비교하여 상당히 연장된 생존을 가졌다.
- [0182] **실시예 2: 마우스 난소 종양 (MOT) 모델**
- [0183] **화학요법과 면역조정제의 투여의 시기 선택**
- [0184] 미토마이신 C와 CRX-527 둘 다를 투여한 마우스는 또한 마우스 난소 종양 (MOT) 모델에서 2종의 성분 중 어느 하나를 단독으로 투여한 마우스와 비교하여 상당히 연장된 생존을 나타냈다. 화학요법제 및 TLR4 리간드의 투여의 시기 선택이 항암 반응에 중요한 지의 여부를 결정하기 위해, 제0일에 마우스 난소 종양 (MOT) 세포 (복강내 (IP) 경로를 통해  $10^4$  개 종양 세포)가 시딩된 C3H/FeJ 마우스 (군당 10마리)를, 1) 무처리 (미처리 대조군), 2) 제6일에 미토마이신 C (40 ug), 3) 제4일에 CRX-527-SE (2% 스쿠알렌 함유 안정적인 에멀젼 수중유 제제 중 10 ug)에 뒤이어 제6일에 미토마이신 C, 4) 제5일에 CRX-527-SE에 뒤이어 제6일에 미토마이신 C, 5) 제6일에 CRX-527-SE 및 미토마이신 C 둘 다, 6) 제6일에 미토마이신 C에 뒤이어 제7일에 CRX-527-SE, 7) 제6일에 미토마이신 C에 뒤이어 제10일에 CRX-527-SE, 및 8) 제6일에 미토마이신 C에 뒤이어 제11일에 CRX-527-SE로 처리하였다. 미토마이신 C 및 CRX-527-SE 투여에 대한 용량/경로는 항상 각각 40 ug IP 및 10 ug IP이었다. 미토마이신 C와 동시에 또는 최대 5일 후 CRX-527이 투여된 군들은 무처리 (미처리 대조군), 미토마이신 단독으로 또는 CRX527-SE에 뒤이어 미토마이신 C를 받은 군들과 비교하여 상당히 연장된 생존 시간을 가졌는데 (도 2), 이는 효과적인 TLR4 리간드 예컨대 CRX-527을 화학요법제 예컨대 미토마이신 C와 동시에 또는 그 후에 투여하는 경우에 이러한 암 모델에서 조합 요법의 이익이 관찰됨을 나타내는 것이다.
- [0185] **실시예 3 TLR4 의존성**
- [0186] C3H/HeJ 마우스는 톨-유사 수용체 4 (TLR4)를 코딩하는 유전자에서 돌연변이를 가지며, 그 결과, TLR4 리간드 예컨대 리포폴리사카라이드 (LPS) 또는 AGP 예컨대 CRX-527에 반응하지 않는다. 본 발명자들은 이를 TLR4 비-응답자 마우스 (군당 10마리)를 이용하여 암생형 마우스에서 CRX-527에 의해 도출되는 항암 활성이 기능적 TLR4의 존재에 의존하는 것을 제시하였다. 예상대로, CRX-527은 단독으로 또는 미토마이신 C와 조합하여 투여되는 경우에 C3H/HeOuJ 암생형 마우스에서 생존을 촉진시켰으나 (도 3), MOT-보유 C3H/HeJ 마우스에서는 생존을 촉진시키지 않았다 (도 4).
- [0187] **실시예 4 제제**
- [0188] CRX-527을 사용하여 관찰된 항암 활성이 대한 제제의 효과를 MOT 종양 모델에서 평가하였다. 도 5에 제시된 실험에서, C3H/HeN 마우스 (암생형 TLR4, 군당 10마리)에 MOT 종양 ( $10^4$  개 종양 세포 IP)을 제0일에 시딩하였다. 미토마이신 C (40 ug IP)를 제6일에 투여하고, AF (수성 제제 = 물 중 0.02% 디팔미토일 포스파티딜 콜린), IN (비강내 제제 = 물 중 2% 글리세롤) 또는 SE (안정적인 에멀젼 = 2% 스쿠알렌 수중유)에서 제제화된 1 또는 10 ug CRX-527을 제7일에 IP 경로를 통해 투여하였다. 다시 한번, 미토마이신 C 단독으로 처리한 결과 비처리 대조군과 비교하여 생존이 약간 증가하였다. 미토마이신 C 처리 후 1일에 CRX-527을 투여하면 생존이 길어졌으며, SE 및 IN 제제는 AF 제제와 비교하여 효능이 증강되었다. SE 및 IN 제제에 대한 증강된 효능은 도 5 및 도 6에 나타냈으며, 여기서 높은 수준의 보호를 유도하기 위해 AF 제제 중 10 ug 용량의 CRX-527을 필요로 하였으며, 한편 SE 및 IN 제제 둘 다는 1 및 10 ug 용량 둘 다에서 매우 효과적임을 알 수 있다. 이 실험의 결과는 이 모델에서 CRX-527의 효능이 제제를 통해 증강될 수 있음을 나타낸다.
- [0189] **실시예 5 적응 면역의 유도**
- [0190] 도 7에 제시된 데이터는 미토마이신 C 및 CRX-527을 사용한 조합 치료에 의해 MOT 종양을 치유한 마우스가 동일한 종양을 사용한 재-시험감염에 대해 내성이 있음 (과거 데이터를 기준으로 하여 정상적인 속도로 사망한, 나

이브 대조군 마우스와 비교하여)을 입증한다. 이 결과는 재-시험감염시 생존을 연장시키고 종양의 성장을 둔화 시킬 수 있는 치료/치유된 마우스에서 종양-특이적 적응 면역 반응이 생성됨을 나타내는 것이다. 이 실험에서 군 크기는 10이었다.

#### [0191] 실시예 6 다중 치료 효과 및 면역조정제의 국소 투여 대 전신 투여의 효과

도 8 및 도 9에 제시된 데이터는 조합 요법의 성분이 상이한 경로에 의해 성공적으로 투여될 수 있음을 입증한다. 이 실험에서, 미토마이신 C는 IP 경로를 통해 MOT-보유 마우스에 투여하였고, CRX-527-IN은 IP 또는 IV 경로에 의해 투여하였다. 생존의 연장은 IP 경로를 통해 성분 둘 다를 받은 군에서 더 두드러졌지만, IP 경로를 통해 미토마이신 C를 받고 IV 경로를 통해 CRX-527-IN을 받은 군은 또한, 특별히 조합 요법의 2종의 투여 후 보호되었다. 도 8 및 도 9에 제시된 데이터는 조합 요법을 사용한 2종의 치료가 MOT 종양 모델에서 생존을 연장시키기 위한 1종의 치료보다 더 효과적이라는 것을 또한 입증한다. 이 결과는 치료의 수가 이러한 치료제의 결과에 영향을 미칠 수 있음을 나타내는 것이다.

#### [0193] 실시예 7 B16 흑색종 계통

화학요법제와 AGP를 사용한 조합 요법의 효능은 B16-F10이라 칭해지는 비-면역원성 종양을 사용하여 뮤린 흑색종 모델에서 또한 시험하였다. 이를 실험에서, BDF1 마우스에 B16-F10 흑색종 세포 ( $1.5 \times 10^3$  개 IV)를 제0일에 시딩하였다. 그 후 다양한 시간에서, 암-보유 마우스를 시클로포스파미드 (시톡산으로도 공지됨) 단독으로 (3 mg IP), CRX-527-IN (10 ug) 단독으로 또는 상기 2종의 작용제의 조합으로 처리하였다. 도 10에 제시된 바와 같이, 제5일에 CRX-527-IN 단독 처리는 생존을 향상시키지 않았으며, 한편 제5일에 시클로포스파미드 단독 처리는 보통 정도로 연장시켰다. 그러나, CRX-527-IN과 시클로포스파미드를 함께 투여한 군은 다른 군들과 비교하여 생존의 향상을 제시하였다.

추가 실험에서, 녹색 형광 단백질로 형질감염된 B16-F10 흑색종 세포를 마우스의 폐에 대한 종양의 전이를 정량하는데 사용하였다. 녹색 형광 단백질은 B16-F10-보유 마우스의 폐에서 종양의 양을 정량화할 수 있기 때문에, 폐 종양 부담을 판독으로서 사용하여 다양한 치료 요법의 효능을 평가하는 것이 가능하였다. BDF1 마우스에 B16-F10 흑색종 세포 ( $1.5 \times 10^3$  개 IV)를 제0일에 시딩하였다. 종양-보유 마우스 (군당 5마리)에 제1일에 비히클 (500 ul 식염수 IP 및 100 ul SE 비히클 IV), CRX-527-SE (100 ul 중 10 ug IV), 시클로포스파미드 (500 ul 물 중 4 mg IP) 또는 CRX-527-SE (100 ul 중 10 ug IV) 및 시클로포스파미드 (500 ul 물 중 4 mg IP) 둘 다를 주사하였다. 제26일에, 마우스를 희생시키고 그의 폐를 수집하였다. 각각의 마우스로부터의 폐를 사진 촬영한 다음에 균질화하여 루시퍼라제 활성을 정량화하여 B16-F10 종양이 얼마나 존재하는지를 결정할 수 있도록 하였다. 육안 검사 (도 11-14)에 의해, 시클로포스파미드 / CRX-527 조합 (도 14)으로 처리한 마우스는 임의의 다른 군보다 폐 종양 부담이 더 낮았다는 것이 명백하다. 이 관찰은 폐를 균질화하고 루시퍼라제 활성을 평가할 때 확인되었다. 도 15에 나타낸 데이터는 시클로포스파미드와 CRX-527로 처리한 마우스로부터의 폐가 비히클 또는 2종의 작용제 중 어느 하나를 단독으로 처리한 마우스보다 그의 폐에서의 루시퍼라제 활성이 상당히 덜하여, 종양이 더 적음을 제시하는데, 이는 계통에서의 조합 요법의 이점을 확인해 주는 것이다.

#### [0196] 실시예 8 유방암 모델에서의 조합 요법

화학요법제와 TLR4 리간드 예컨대 AGP를 조합하는 이익이 4T1 뮤린 유방암 모델에서 또한 확인되었다. 이 전이성 암 모델을 사용하여 수행한 실험의 경우, 제0일에 각각의 마우스의 하부 유선에 4T1 종양 세포 (50 uL 중  $7 \times 10^3$  개)를 주사하였다. 원발성 종양을 제14일에 외과적으로 제거하였으며, 마우스 (군당 10마리)는 제15일에 비히클, 시클로포스파미드 (3 mg IP) 또는 시클로포스파미드 (3 mg IP)와 CRX-527 (다양한 용량 IV)로 처리하였다. 도 16에 제시된 결과는 조합 요법을 받은 군이 비히클 또는 시클로포스파미드를 단독으로 받은 군보다 생존 시간이 더 길었다는 것을 입증한다. L1210, MOT 또는 B16-F10 계통에서 수집된 데이터만큼 결정적인 것은 아니지만, 이를 결과는 화학요법제 및 면역조정제 예컨대 CRX-527을 사용한 조합 요법이 둘 중 어느 하나의 단독 치료보다 우수하다는 주장을 뒷받침하는 것이다.

#### [0198] 실시예 9: TLR-4 (CRX-527)로 처리한 CT-26 연구의 결과

CT26 마우스 결장 암종 (CT26.WT; ATCC #CRL-2638) 세포주는 ATCC로부터 입수하였다. 이는 관련 기술분야에 공지된 N-니트로소-N-메틸우레탄-(NNMU) 유도된, 미분화 결장 암종 세포주이다. 예를 들어, 이는 문헌 [Wang M, et al. Active immunotherapy of cancer with a nonreplicating recombinant fowlpox virus encoding a model tumor-associated antigen. J. Immunol. 154: 4685-4692, 1995 (PubMed: 7722321)]에 기재되어 있으며,

이 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 종양 세포의 제조를 위해, ATCC (카탈로그# CRL-2638, 로트# 59227052)로부터의 CT-26 (마우스 결장 암종 세포)의 동결 (-140°C) 바이알을 해동시키고 기본 RPMI (10% FBS 함유) 배지에서 그 다음 주에 걸쳐 배양하였다.

[0200] CT-26 세포 (계대배양 12)를 완전 배지에서 플라스크로부터 수확하였다. 세포를 원심분리하고 RPMI (FBS 없이)에 재현탁시키고, 이 단계를 3회 반복하였다. 세포 밀도 및 생존력을 트립판 블루 배제를 통해 점검하였다. 그 다음에 세포를 원하는 밀도 ( $\text{mL}$ 당  $5 \times 10^5$  개 세포)로 희석하고 얼음에 보관하였다.

[0201] CRX-527의 상승 용량을 종양 성장을 감소시키는데 있어 그의 효능에 대해 평가하였다. 동물을 체중을 재고 제0일에 마우스당  $0.5 \times 10^5$  개 CT26 종양 세포로 우측 뒷다리와 엉덩이 사이에 접종하였다. 총 130마리의 마우스에 종양 세포를 접종하였으며 - 30% 실패율 (연구의 시작시 너무 크거나 너무 작은 것)을 가정하여, 목표는 각각의 군에 대해  $n=10$ 을 갖는 것이었다. 종양 세포 접종 후, 종양 성장 및 총 체중을 연구 기간 동안 1주 3회 측정하였다. 무작위화는 평균 종양 부피가 대략  $100 \text{ mm}^3$ 인 경우에 제10일 또는 제11일에 실시하였다. 무작위화 일에 시작하여, 동물에게 CRX-527 또는 비히클 복강내 주2회로, 총 6회 용량을 위해 투여하였다. 종양이 2회 연속 측정 동안  $>2000 \text{ cu mm}$ 에 도달할 때까지 마우스에 대한 연구를 계속하였으며, 이들은 다른 이유 (즉 체중 감량 >20%, 종양 케양화 등)로 또는 연구의 종료 때까지 연구에서 제외되었다. 안락사 후에 종양은 제거하고 IHC 분석을 위해 FFPE 및/또는 유동 분석을 위해 해리시킬 수 있었다.

	처리	용량 (마우스당)	마우스의 수
--	----	-----------	--------

[0203] 군 0:  $0.5 \times 10^5$  개 세포/ 비히클 10-13

[0204] 군 a:  $0.5 \times 10^5$  개 세포/ CRX-527; 4 ug 10-13

[0205] 군 b:  $0.5 \times 10^5$  개 세포/ CRX-527; 20 ug 10-13

[0206] 군 c:  $0.5 \times 10^5$  개 세포/ CRX-527; 100 ug 10-13

[0207] 제0일: 종양 세포로 sc 접종

[0208] 제1일, 제4일, 제6일, 제8일: 동물을 체중을 재고 종양을 검사하여 측정하였다.

[0209] 무작위화 일 (대략 제10일): 동물을 무작위화하여 적절한 군을 나타내는 케이지에 넣었다.

[0210] 연구 종료까지 주2회로 투여: 동물은 (마우스당) 상기에 제시된 양으로, TLR 화합물 CRX-527, 또는 비히클로 ip 투여되었다.

[0211] 연구 종료까지 주3회 측정: 동물을 체중을 재고 종양을 측정하였다.

[0212] 상기 프로토콜을 사용하여 명시된 투여량에서 도 17에서의 결과를 생성하였다. 거의 모든 경우에, 우측 뒷다리와 엉덩이 사이에  $0.5 \times 10^5$  개 CT-26 결장직장 종양 세포를 접종한 Balb/c 마우스는 종양을 발달시켰는데, 이는 비히클 (2% 글리세롤)만으로 복강내 처리할 경우이며, 예상대로 진행되었다. TLR 4 효능제 CRX-527은 비히클 처리 동물과 비교시 용량 의존성 방식으로 종양 성장을 억제하였다. 도 17. 용량 의존성은 또한 상기 모델의 생존 가능성에서 나타났다. 유사한 실험에서, TLR4 효능제 CRX-601은 종양 성장을 억제하였다. 표 2 및 도 18 참조.

[0213]

표 2

여제	일 / 연구일					
	투여					
	9/16	9/19	9/23	9/26	9/30	10/3
균	14	17	21	24	28	31
비히클						
CRX-601 4ug	- 59.63%	4.57%	-1.55%	21.73%	7.65%	-34.14%
CRX-601 20ug	42.34%	69.46%	50.75%	66.96%	50.75%	-18.27%
CRX-601 100ug	68.20%	92.51%	98.50%	93.21%	94.68%	80.15%

[0214]

**실시예 10:** 항암제 및 화학식 I의 TLR-4 표적 분자를 사용한 단독요법 및 조합 치료

물질 및 방법

생체내 항종양 효능 연구

TLR4 효능제 (CRX-601)의 생체내 항종양 효능은 뮤린 CT-26 결장 암종 동계 고형 종양 모델에서 단독요법으로서 그리고 일정 비율의 치료 항체와 조합하여 (조합 데이터는 제시되지 않음) 평가하였다. 7 내지 8주령의 암컷 Balb/c 마우스 (BALB/cAnNCrl, 찰스 리버(Charles River))를 이들 연구에서 사용하였다. 뮤린 CT-26 결장 암종 세포 (ATCC 카탈로그 번호 CRL-2638 로트# 59227052)를 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 가습된 37°C 인큐베이터에서 10% 소태아 혈청 (FBS)이 보충된 RPMI 성장 배지에서 배양하였다. 대수 성장으로 배양된 CT-26 세포를 조직 배양 플라스크에서 수확하고, 5분 동안 4°C에서 450xg에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 상청액을 폐기하고, 세포를 칼슘과 마그네슘이 없는 빙냉 포스페이트 완충 식염수 (PBS)로 세척하고 5분 동안 4°C에서 450xg에서 10분 동안 다시 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 세포를 FBS 없이 멸균 RPMI 배지에서 재현탁시키고, 500,000개 세포/ml의 세포 농도로 조정하였다. 100 μl의 세포 스톡을 각각의 Balb/c 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사를 통해 이식하였다. 평균 종양 크기가 대략 100 mm<sup>3</sup>에 도달한 10일 또는 11일 후에, 마우스를 종양 크기에 따라 연구 코호트로 무작위화하고 최초 치료 용량을 제공하였다. TLR4 효능제 (CRX-601) 또는 비히클은 전신성 정맥내 또는 직접 종양내 주사를 통해 명시된 바와 같이 투여하였다. 정맥내 및 종양내 투여에 사용된 CRX-601 비히클은 명시된 경우에 0.5%였다. CRX-601 리포솜 종양내 투여의 경우, GSK 로트 #1783-157-B에 의해 준비된 DOPC/CHOL 리포솜을 사용하였다. 치료 항체를 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 제공된 복강내 주사를 통해 투여하였다. 종양 성장을 평가하기 위해 1주당 3회 캘리퍼 측정하고, 종양이 <2,000 mm<sup>3</sup>인 마우스는 30일에서 최대 대략 115일까지 연구를 유지하였다. 2회 연속 측정 동안 종양이 >2,000 mm<sup>3</sup>인 마우스 또는 개방 궤양을 형성한 마우스는 연구로부터 배제하였다. 종양 부피는 화학식  $(0.52) \times (\text{길이}) \times (\text{폭})^2$ 을 사용하여 계산하였다. 연구 3에서, 종양이 없는 마우스를 원래의 접종 부위와 반대편 옆구리 상에, 상기 기재된 바와 같이 CT-26 종양 세포로 재-시험감염시키고, 종양 성장을 상기 기재된 바와 같이 모니터링하였다. 모든 연구는 실험실 동물의 관리, 복지 및 치료(Care, Welfare and Treatment of Laboratory Animals)에 관한 GSK 정책에 따라 수행되었으며 GSK에서 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 검토를 받았다.

[0219]

면역표현형 분석법 및 시토카인 분석

[0220]

최초 CRX-601 투여 후 제0일, 제1일 및 제8일에 CT-26 마우스로부터 종양, 혈액 및 조직을 수확하였다. 마우스 백혈구 및 해리된 종양 단일 세포를 면역표현형 분석법을 위한 다색 유동 세포계측 분석을 위해 표면 또는 세포 내 염색 항체로 새롭게 염색하였다. 다중 시토카인 분석을 동일한 연구로부터의 마우스 혈장 샘플을 사용하여 수행하였다.

[0221]

통계 분석

[0222]

연구 1 및 연구 2의 경우, 종양 성장 억제의 유의성을 결정하기 위해, 최초 투여로부터 11일 후 (연구 1) 또는

15일 후 (연구 2)의 종양 부피를 상이한 처리군 간에 비교하였다. 분석 이전에, 종양 부피를 상이한 처리군에 서의 분산의 격차로 인해 자연 로그로 변환시켰다. 그 다음에 ANOVA에 뒤이어 쌍별 비교를 로그 변환 데이터 상에서 수행하였다. SAS 9.3 및 R 3.0.2 분석 소프트웨어를 사용하였다. 카플란-메이어(Kaplan-Meier) (KM) 방법을 수행하여 주어진 시간에 상이한 처리군의 생존 확률을 평가하였다. 생존 분석을 위한 사건은 2000 mm<sup>3</sup>의 종양 부피 또는 종양 궤양화 중 어느 것이든 먼저 발생하는 것이었다. 컷-오프(cut-off) 부피에 대한 정확한 시간은 2회의 관찰, 즉 컷-오프 부피를 초과하는 최초 관찰과 컷-오프 부피 직전에 하나의 관찰의 일과 로그 종양 부피 사이의 선형 라인을 피팅함으로써 추정하였다. 종점까지의 중앙 시간과 그에 상응하는 95% 신뢰 구간을 계산하였다. 그 다음에 KM 생존 곡선이 임의의 2개 군 간에 통계적으로 상이한 지의 여부는 로그-순위 검정에 의해 시험하였다. 생존 분석에 의한 사건에 대한 일의 비교 및 치료군 간에 명시된 일에서 로그 변환된 종양 부피의 비교로부터, 원시 p-값, 뿐만 아니라 오류 발견률(FDR) 조정된 p-값을 결정하였다. FDR 조정된 p-값 ≤ 0.05을 가진 것들은 통계적으로 유의한 것으로 밝혀졌다.

[0223] 연구 3의 경우, 종양 성장 억제의 유의성을 결정하기 위해, 최초 투여로부터 12일 후의 종양 부피를 상이한 처리군 간에 비교하였다. ANOVA 방법에 뒤이어 다중성을 위한 FDR 조정에 의해 처리를 비교하였다. 응답은 등분산성(등분산) 이유 때문에 부피의 제곱근이다. 카플란-메이어(KM) 방법을 수행하여 주어진 시간에 상이한 처리군의 생존 확률을 평가하였다. 이들 생존 분석에서 "죽음"은 종양 부피 컷오프(2000mm<sup>3</sup>)의 크로싱을 의미한다. "생존"은 "죽지 않은" 마우스의 비율을 의미하고 "생존 시간"은 "죽음"까지의 일을 의미한다. 두 측정일 사이에 마우스가 부피 컷오프를 크로스한 경우, "죽음"의 날은 선형 보간법에 의해 추정하였다. 마우스가 1회 초과로 부피 컷오프를 크로스한 경우, 최초 크로싱을 사용하였다. 2회 처리에 대한 표준 로그-순위 검정에 의해 처리를 비교하였다. 로그-순위 p-값은 FDR(오류 발견률) 방법을 사용하여 다중성을 위해 조정하였다. 유의성은 FDR <= 0.05로서 정의하였다. 모든 계산 및 그래프는 R 소프트웨어, 버전 3.2.3을 사용하여 행하였다.

## 결과

[0225] 연구 1-3을 수행하여 CRX-601 및 치료 항체로 둘 다 단독 및 서로 조합하여 처리한 마우스의 종양 크기 및 생존 시간을 평가하였다.

[0226] 연구 1

[0227] 종양내 투여로 CRX-601 단독요법 활성을 결정하기 위해, 마우스에  $5 \times 10^4$  개 CT-26 세포를 접종하고 물질 및 방법에 기재한 바와 같이 종양 크기가 대략 100 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 이하에 열거된 10개의 군으로 무작위화하였다.

[0228] 군 1: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 종양내로 비히클 투여됨

[0229] 군 2: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 종양내로 CRX-601 0.1 ug/마우스 투여됨

[0230] 군 3: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 종양내로 CRX-601 1 ug/마우스 투여됨

[0231] 군 4: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 종양내로 CRX-601 10 ug/마우스 투여됨

[0232] 군 5: CRX-601 50 ug/마우스 단일 용량

[0233] 종양내 투여로, 용량-의존성 항종양 활성을 (시간이 지남에 따른 종양 성장 억제에 의해 측정된 바와 같은)을 CT-26 동계 마우스 종양 모델에서 TLR4 효능제 CRX-601에 대해 관찰하였다. 10 μg 및 50 μg 투여된 마우스는 비히클과 비교하여 초기 투여 11일 후에 통계적으로 유의한 (\*p-값 ≤ 0.05) 종양 성장 억제를 제시하였다. 결과는 도 19에 제시된다.

[0234] 이 연구에서 TLR4 효능제 CRX-601로 처리한 마우스는 또한 생존 시간에 통계적으로 유의한 증가를 제시하였다. 50 μg 투여된 마우스는 연구 종료시 CT26 종양 세포 접종 후 42일까지 비히클과 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 (\*p-값 ≤ 0.05) 증가를 제시하였다. 당일에, 50 ug 및 10 ug CRX-601 군으로부터의 마우스에 대해서만 연구를 계속하였다. 50 μg 군의 4마리 마우스 중 3마리는 종양이 없었으며, 상기 4마리는 854.19 mm<sup>3</sup>의 종양 부피를 제시하였다. 10 μg 군에 남아 있는 유일한 마우스가 종양이 없었다. (도 20 참조).

[0235] 연구 2

[0236] 정맥내 투여로 CRX-601 단독요법 활성을 결정하기 위해, 마우스에  $5 \times 10^4$  개 CT-26 세포를 접종하고 물질 및 방법

에 기재한 바와 같이 종양 크기가 대략 100 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 이하의 10개의 군으로 무작위화하였다.

[0237] 군 1: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 정맥내로 비히클 투여됨

[0238] 군 2: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 정맥내로 CRX-601 1 ug/마우스 투여됨

[0239] 군 3: 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 정맥내로 CRX-601 10 ug/마우스 투여됨

[0240] 군 4: CRX-601 100 ug/마우스 단일 용량

[0241] 정맥내 투여로, 용량-의존성 항종양 활성 (시간이 지남에 따른 종양 성장 억제에 의해 측정된 바와 같은)을 본 CT-26 동계 마우스 종양 모델에서 TLR4 효능제 CRX-601에 대해 관찰하였다. 10 µg 및 100 µg 투여된 마우스는 비히클과 비교하여 초기 투여 15일 후에 통계적으로 유의한 (\*p-값 ≤ 0.05) 종양 성장 억제를 제시하였다 (도 21 참조).

[0242] 본 CT-26 동계 마우스 종양 모델에서 TLR4 효능제 CRX-601로 처리한 마우스는 또한 비히클과 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 증가를 제시하였다. 100 µg 투여된 마우스는 CT-26 종양 세포 접종 후 제32일에 연구 종료 시 비히클과 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 증가 (\*p-값 ≤ 0.05)를 제시하였다. 이 군에 남아 있는 3마리 중 1마리는 종양이 없었으며, 한편 나머지 마우스는 1500.49 및 962.61 mm<sup>3</sup>의 종양 부피를 제시하였다. 10 µg 용량 군에 남아 있는 유일한 마우스가 188.0 mm<sup>3</sup>의 종양 부피를 가졌다. (도 22 참조).

[0243] 연구 3

[0244] 단독으로 그리고 치료 항체와 조합하여 (조합 데이터는 제시되지 않음) CRX-601 활성을 비교한 조합 연구의 패트로서 CRX-601을 0.5% 글리세롤/4% 텍스트로스 비히클을 사용하여 정맥내 (IV) 또는 DOPC/CHOL 리포솜 제제를 사용하여 종양내 (IT)로 투여하고, 마우스에 5x10<sup>4</sup> 개 CT-26 세포를 접종하고 물질 및 방법에 기재한 바와 같이 종양 크기가 대략 100 mm<sup>3</sup>에 도달하였을 때 이하의 10개의 군으로 무작위화하였다.

[0245] 군 1 및 군 5는 각각 정맥내/복강내 및 종양내/복강내에 대한 대조군이었다. 군 2 및 군 7에 CRX-601이 투여되었다. 군 3, 군 4, 군 6, 군 8에 CRX-601과 치료 항체의 조합물 (조합 데이터는 제시되지 않음)을 투여하였다.

[0246] 군 1: 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 정맥내로 비히클 (0.5% 글리세롤/4% 텍스트로스) 투여됨 + 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 복강내로 래트 IgG1 25 ug/마우스 투여됨

[0247] 군 2: 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 정맥내로 CRX-601 25 ug/마우스 (0.5% 글리세롤/4% 텍스트로스 중) 투여됨 + 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 복강내로 래트 IgG1 25 ug/마우스 투여됨

[0248] 군 5: 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 종양내로 비히클 (DOPC/CHOL 리포솜) 투여됨 + 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 복강내로 래트 IgG1 25 ug/마우스 투여됨

[0249] 군 7: 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 종양내로 CRX-601 25 ug/마우스 (DOPC/CHOL 리포솜 중) 투여됨 + 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 복강내로 래트 IgG1 25 ug/마우스 투여됨

[0250] 처리군에 대한 항종양 활성 (시간이 지남에 따른 종양 성장 억제에 의해 측정된 바와 같은)을 초기 투여 12일 후에 평가하였다. 25 ug/마우스의 차선의 단독요법 CRX-601 용량은 정맥내 (군 2 도 23) 또는 종양내 (군 7, 리포솜 제제 도 24) 투여시 상응하는 대조군 (군 1 및 군 5 각각)과 비교하여 통계적으로 유의한 (\*p-값 ≤ 0.05) 종양 성장 억제를 제시하였다.

[0251] 본 CT-26 동계 마우스 모델 연구에서, 생존 이점은 또한 최초 투여로부터 80일 후에 결정되었다. 단독요법 IV (군 2)로서 투여된 CRX-601은 대조군 1과 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 (\*p-값 ≤ 0.05) 증가를 제시하였다. (도 25) 군 2는 전체 종양 퇴행을 제시하는 10마리 마우스 중 5마리를 가졌다. DOPC/CHOL 리포솜 제제 (군 7)로 단독요법으로서 종양내 투여된 CRX-601은 대조군 5와 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 (\*p-값 ≤ 0.05) 증가를 제시하였다. (도 26). 나이브 대조군 마우스 및 완전 퇴행 종양이 없는 마우스는 제80일에 CT26 종양 세포로 재-시험감염시켰다. CT26 종양은 나이브 대조군 마우스에서 예상대로 성장하였으나, 처리군 마우스에서 어떠한 종양 성장도 없이 거부되었다. 이 결과는 CRX-601으로 인한 지속적인 항종양 기억을 나타내는 것이다. (도 27) 종양 성장의 이러한 결여는 CRX-601으로 인한 지속적인 항종양 기억을 나타내는 것이다.

[0252] 실시예 11 CRX-601의 원격 효과

[0253]

연구 4

[0254]

원격 효과는 국소 종양 치료 후 면거리 종양 퇴행으로서 기재된다. 원격 효과를 평가하기 위해, 마우스에 단일 종양 접종에 대해 물질 및 방법에 기재한 바와 같이  $5 \times 10^4$  개 CT-26 세포를 좌측 옆구리에, 그리고  $5 \times 10^4$  개 CT-26 세포를 우측 옆구리에 접종하였다. 따라서, 본 연구에서, 각각의 마우스는 2개의 종양, 우측 옆구리에 하나, 좌측 옆구리 다른 하나를 보유하였다. 종양 크기가 우측 옆구리에 대해 대략  $100 \text{ mm}^3$ 에 도달하고, 좌측 옆구리 종양 크기가 유사할 때 이하에 제시된 바와 같이 마우스를 10개의 군으로 무작위화였다. 단독으로 그리고 치료 항체와 조합된 CRX-601 활성의 원격 효과를 결정하기 위해 고안된 연구에서, (조합 데이터는 제시되지 않음) CRX-601을 단지 DOPC/CHOL 리포솜 제제를 사용하여 좌측 옆구리 종양에 종양내 (IT) 투여하였다. 우측 및 좌측 옆구리 종양 둘 다에 대한 종양 크기를 모니터링하였다. 연구의 결과는 암 치료에 CRX-601을 단독으로 투여하는 것의 효능을 뒷받침하는 증거를 제공하는 것이다.

[0255]

군 1: 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 종양내로 비히클 (DOPC/CHOL 리포솜) 투여됨 + 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 복강내로 래트 IgG1 25 ug/마우스 투여됨

[0256]

군 2: 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 종양내로 CRX-601 25 ug/마우스 (DOPC/CHOL 리포솜 중) 투여됨 + 총 6회 용량을 위해 1주당 2회 복강내로 래트 IgG1 25 ug/마우스 투여됨

[0257]

처리군에 대한 항종양 활성 (시간이 지남에 따른 종양 성장 억제에 의해 측정된 바와 같은)을 평가하였다. 둘 중 어느 한쪽 종양 또는 종양 둘 다가  $2,000 \text{ mm}^3$ 에 도달하면 마우스를 연구로부터 배제하였다. 최초 투여 후 연구 60일까지, 계속 연구 중인 모든 마우스는 완전히 종양이 없어졌고, 원격 효과 및 생존 이점을 결정하였다. 국소 좌측 옆구리 종양 IT 주사가 먼 거리 우측 옆구리 종양 퇴행을 결과한 CRX-601의 원격 효과가 관찰되었다. 도 28은 군 2에서, 10마리의 마우스가 리포솜 CRX-601 종양내 주사를 받았고, 10마리 마우스 중 2마리 마우스 (마우스 #4 및 마우스 #6)는 처리된 종양 부위 (진한 회색 선) 상에서 완전한 종양 퇴행을 제시하였으며, 마우스 #4 및 마우스 #6 둘 다 또한 다른 한쪽의 옆구리 상에 처리되지 않은 먼 거리 종양 (밝은 회색 선)에서도 완전한 종양 퇴행을 가졌다는 것을 제시하였으며, 이는 CRX-601의 IT 주사가 원격 효과를 결과했다는 것을 나타낸 것이었다 (도 28). CRX-601 (리포솜) IT 주사는 대조군과 비교하여 유의한 생존 이익을 결과하였다 (블랭크 리포솜 + 래트 IgG1 IT, 군 2, p = 0.011, 그레프는 제시되지 않음)

[0258]

### 실시예 12 EMT6 동계 종양 모델

[0259]

TLR4 효능제 (CRX-601)의 생체내 항종양 효능은 뮤린 EMT6 유방 상피 동계 고형 종양 모델에서 단독요법 대 대조군 및 항-PD-1 처리로서 평가하였다. 7 내지 8주령의 암컷 Balb/c 마우스 (BALB/cAnNHsd, 엔비고(Envigo))를 이들 연구에서 사용하였다. 뮤린 EMT6 유방 상피 세포 (ATCC 카탈로그 번호 로트 # CRL-2755)를 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 가습된 37°C 인큐베이터에서 10% 소 태아 혈청 (FBS)이 보충된 RPMI 성장 배지에서 배양하였다. 대수 성장으로 배양된 EMT6 세포를 조직 배양 플라스크에서 수확하고, 5분 동안 4°C에서 450xg에서 10분 동안 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 상청액을 폐기하고, 세포를 칼슘과 마그네슘이 없는 빙냉 포스페이트 완충 식염수 (PBS)로 세척하고 5분 동안 4°C에서 450xg에서 10분 동안 다시 원심분리하여 세포를 펠렛화하였다. 세포를 FBS 없이 멀균 RPMI 배지에서 재현탁시키고,  $1 \times 10^6$  개 세포/ml의 세포 농도로 조정하였다. 100 μl의 세포 스톡을 각각의 Balb/c 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사를 통해 이식하였다. 평균 종양 크기가 대략  $100 \text{ mm}^3$ 에 도달한 7일 또는 9일 후에, 마우스를 종양 크기에 따라 연구 코호트로 무작위화하고 최초 치료 용량을 제공하였다. TLR4 효능제 (CRX-601) 또는 비히클은 전신성 정맥내 투여를 통해 총 3회 용량을 위해 1주당 1회 투여하였다. CRX-601 비히클은 0.5% 글리세롤/4% 엑스트로스, eE 810115-V이었다. 래트 항-마우스 PD-1 수용체 항체 (클론 RMP1-14, 바이오엑스셀(BioXCell) 카탈로그 # BE0146, 로트 # 5792-599016J1) 또는 래트 IgG2a 이소형 대조군 항체 (바이오엑스셀 카탈로그 # BE0089, 로트 # 601416M1B)를 총 3회 용량을 위해 주어진 격일로 복강내 주사를 통해 투여하였으며, 최초 용량은 최초 CRX-601 용량과 공동으로 제공되었다. 종양 성장을 평가하기 위해 1주당 3회 캘리퍼 측정하고, 2회 연속 측정 동안 종양이  $>2,000 \text{ mm}^3$ 인 마우스 또는 개방 궤양을 형성한 종양을 가진 마우스를 연구로부터 배제하였다. 종양 부피는 화학식 ( $0.52 \times (\text{길이}) \times (\폭)^2$ )을 사용하여 계산하였다. 모든 연구는 실험실 동물의 관리, 복지 및 치료에 관한 GSK 정책에 따라 수행되었으며 GSK에서 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 검토를 받았다. 종양 성장 억제의 유의성을 결정하기 위해, 최초 투여로부터 19일 후의 종양 부피를 상이한 처리군 간에 비교하였다. ANOVA 방법에 뒤이어 다중성을 위한 FDR 조정에 의해 처리를 비교하였다. 응답은 등분산성 (등분산) 이유 때문에 부피의 제곱근이다. 카플란-메이어 (KM) 방법을 수행

하여 주어진 시간에 상이한 처리군의 생존 확률을 평가하였다. 이들 생존 분석에서 "죽음"은 종양 부피 컷오프 ( $2000\text{mm}^3$ )의 크로싱을 의미한다. "생존"은 "죽지 않은" 마우스의 비율을 의미하고 "생존 시간"은 "죽음"까지의 일을 의미한다. 두 측정일 사이에 마우스가 부피 컷오프를 크로스한 경우, "죽음"의 날은 선형 보간법에 의해 추정하였다. 마우스가 1회 초과로 부피 컷오프를 크로스한 경우, 최초 크로싱을 사용하였다. 2회 처리에 대한 표준 로그-순위 검정에 의해 처리를 비교하였다. 로그-순위  $p$ -값은 FDR (오류 발견률) 방법을 사용하여 다중성을 위해 조정하였다. 유의성은  $FDR \leq 0.05$ 로서 정의하였다. 모든 계산 및 그래프는 R 소프트웨어, 버전 3.2.3을 사용하여 행하였다.

[0260] 마우스 코호트는 하기와 같았다:

[0261] 군 1: 비히클 + 200 ug 래트 IgG2a

[0262] 군 2: 25 ug CRX-601 + 200 ug 래트 IgG2a

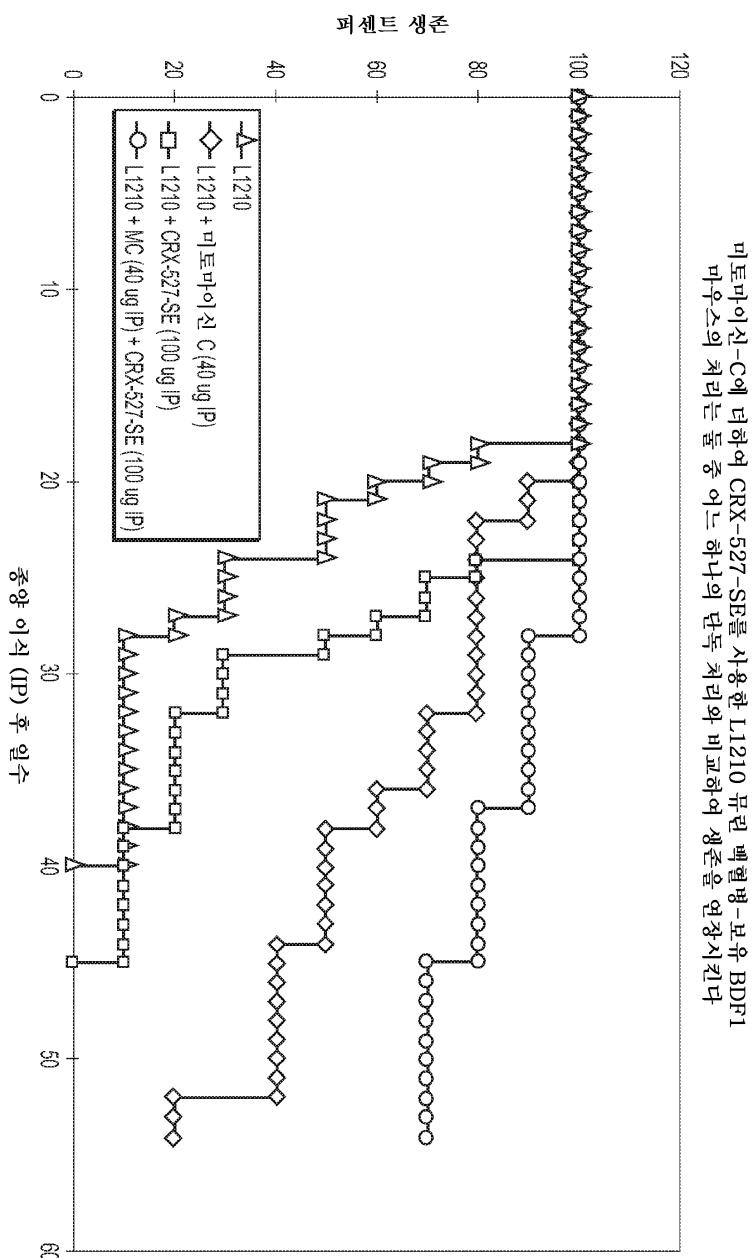
[0263] 군 3: 비히클 + 200 ug 항-PD-1

[0264] 정맥내 투여로, 항종양 활성 (시간이 지남에 따른 종양 성장 억제에 의해 측정된 바와 같은)을 EMT6 동계 마우스 종양 모델에서 TLR4 효능제 CRX-601에 대해 관찰하였다. 25  $\mu\text{g}$  CRX-601 투여된 마우스는 비히클 군 1 ( $**p$ -값  $<0.001$ )과 비교하여, 그리고 항-PD-1 처리군 3 ( $*p$ -값 = 0.041)과 비교하여 초기 투여 후 19일에 통계적으로 유의한 종양 성장 억제를 제시하였다. 결과는 도 29에 제시된다. 항-PD-1 처리는 비히클 군 1 ( $*p$ -값 = 0.03)과 비교하여 초기 투여 후 19일에 통계적으로 유의한 종양 성장 억제를 제시하였다.

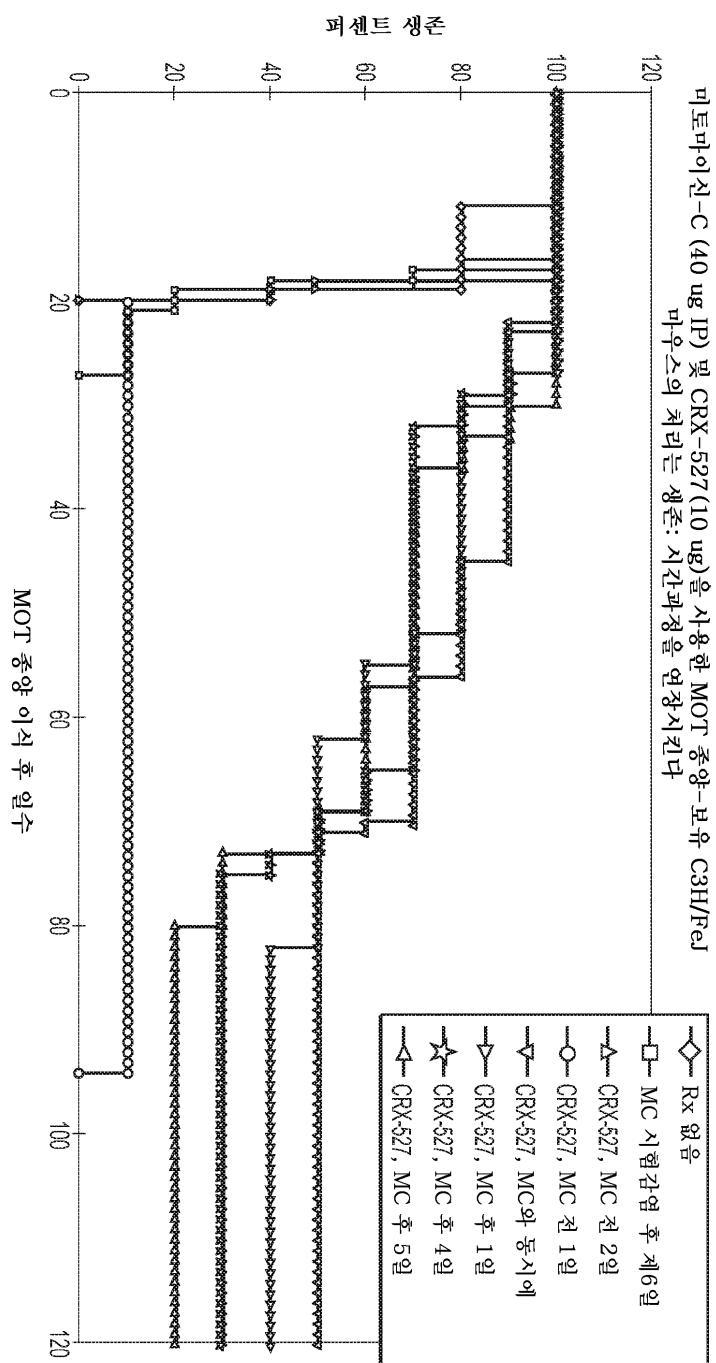
[0265] 본 연구에서 TLR4 효능제 CRX-601로 처리한 마우스는 또한 생존 시간에 통계적으로 유의한 증가를 제시하였다. 25  $\mu\text{g}$  CRX-601 투여된 마우스는 EMT6 종양 세포 접종 후 제33일까지 비히클 군 1과 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 증가 ( $*p$ -값 = 0.03)를 제시하였다. 당일에, 25 ug CRX-601 군으로부터의 6마리 마우스에 대한 연구를 계속하였다. 4마리 마우스는 종양이 없었으며, 한편 2마리 마우스는 649 및  $382\text{ mm}^3$ 의 종양 부피를 보유하였다. 200 ug 항-PD-1 투여된 마우스는 EMT6 종양 세포 접종 후 제33일까지 비히클 군 1과 비교하여 생존에 통계적으로 유의한 ( $p$ -값 = 0.199) 증가를 제시하지 않았다. 당일에, 항-PD-1 군으로부터의 5마리의 마우스에 대한 연구를 계속하였다. 3마리의 마우스는 종양이 없었으며, 한편 2마리의 마우스는 1517 및  $917\text{ mm}^3$ 의 종양 부피를 보유하였다. 결과를 도 30에 제시하였다.

## 도면

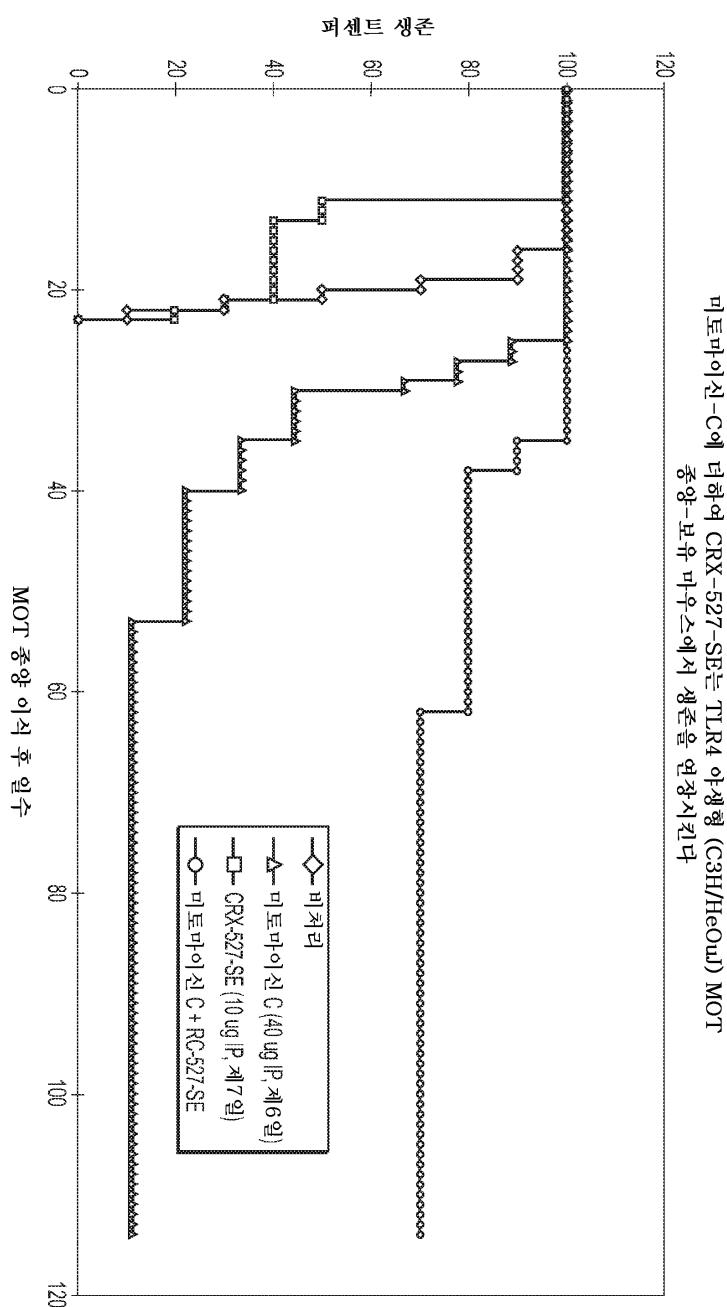
## 도면1



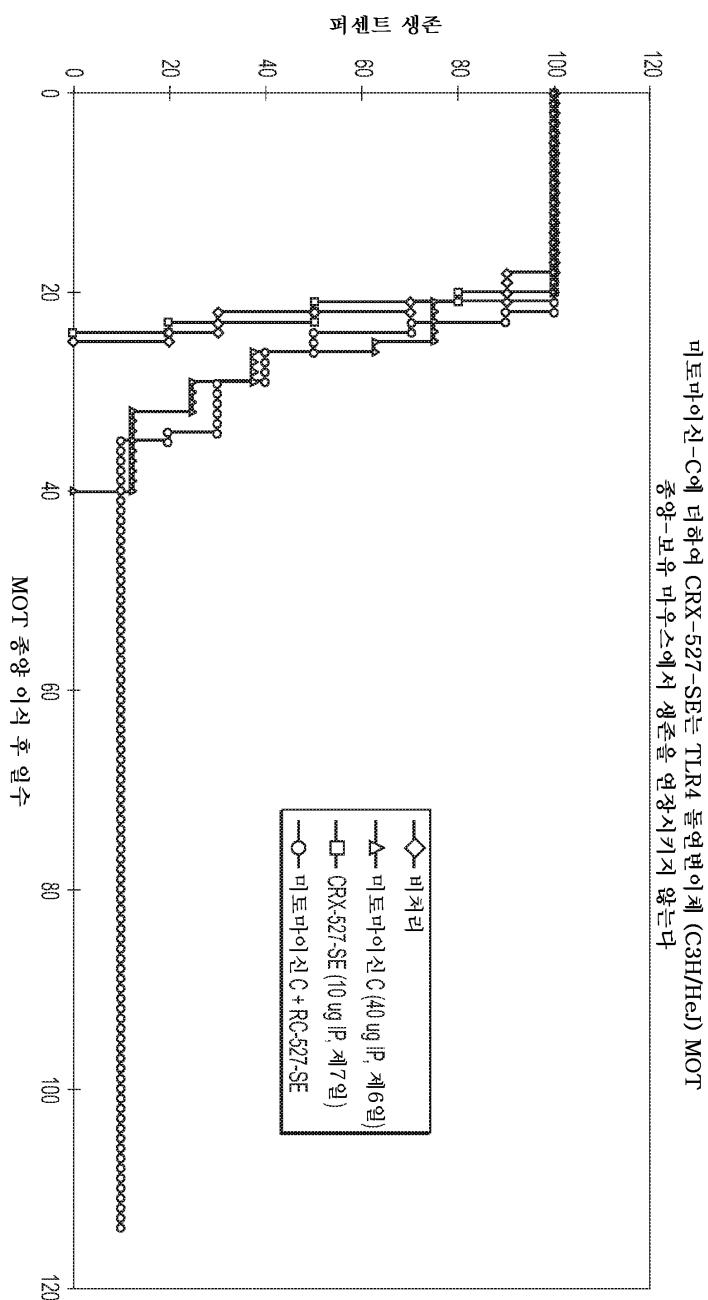
도면2



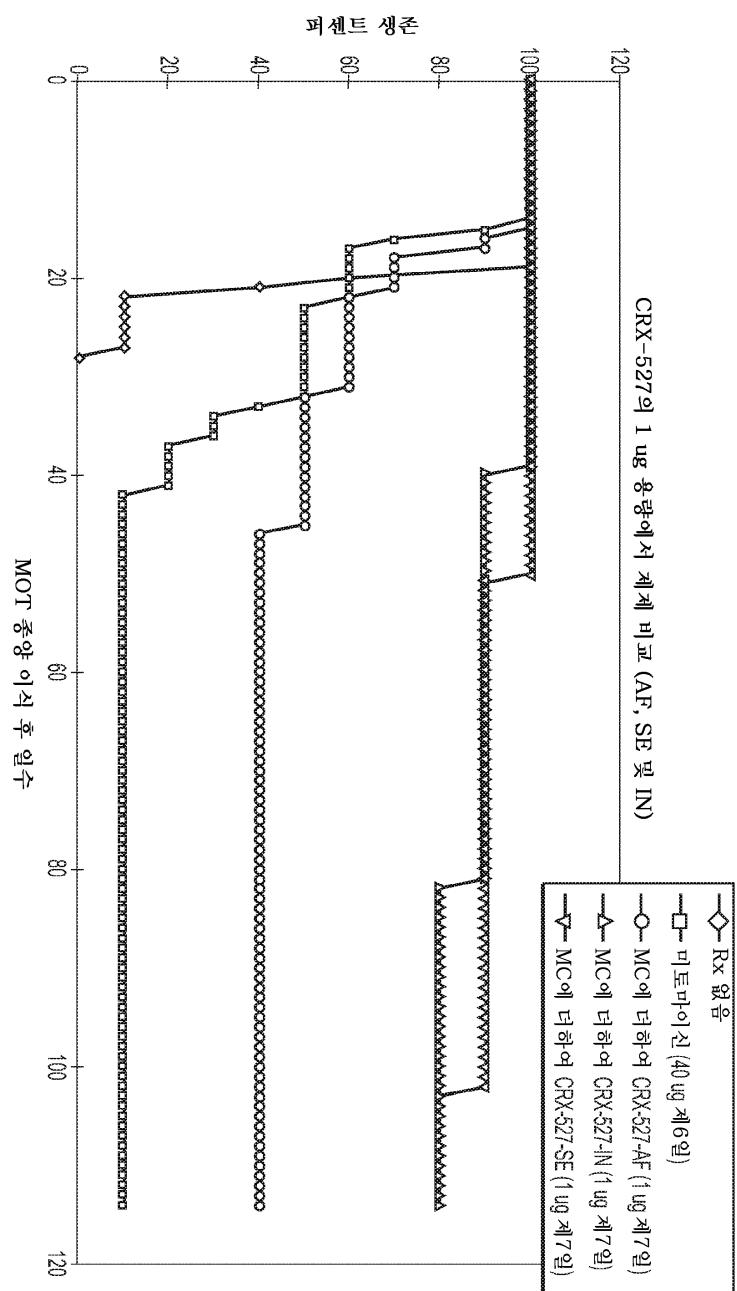
## 도면3



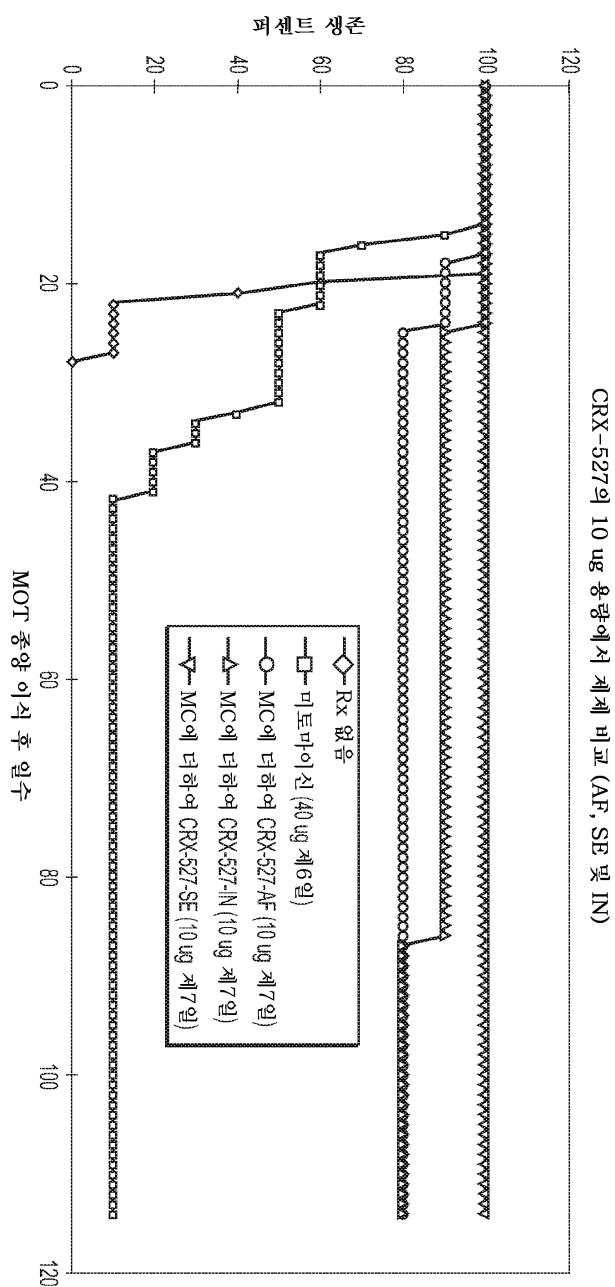
## 도면4



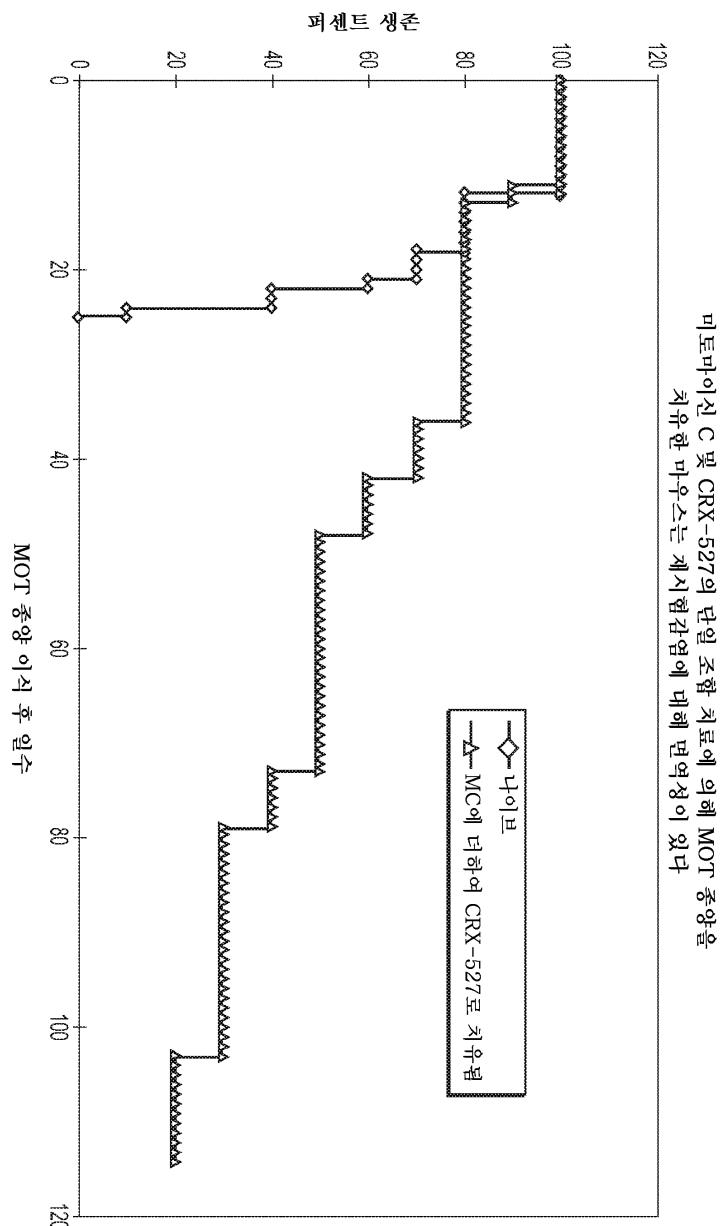
## 도면5



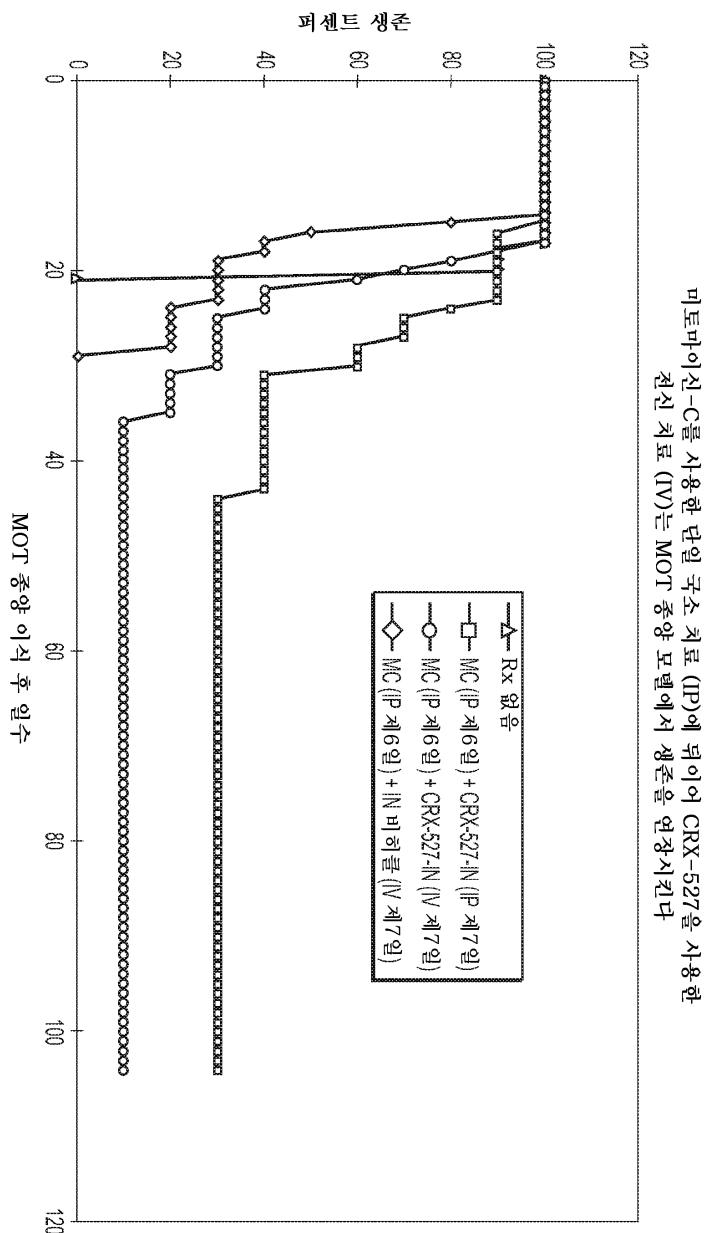
## 도면6



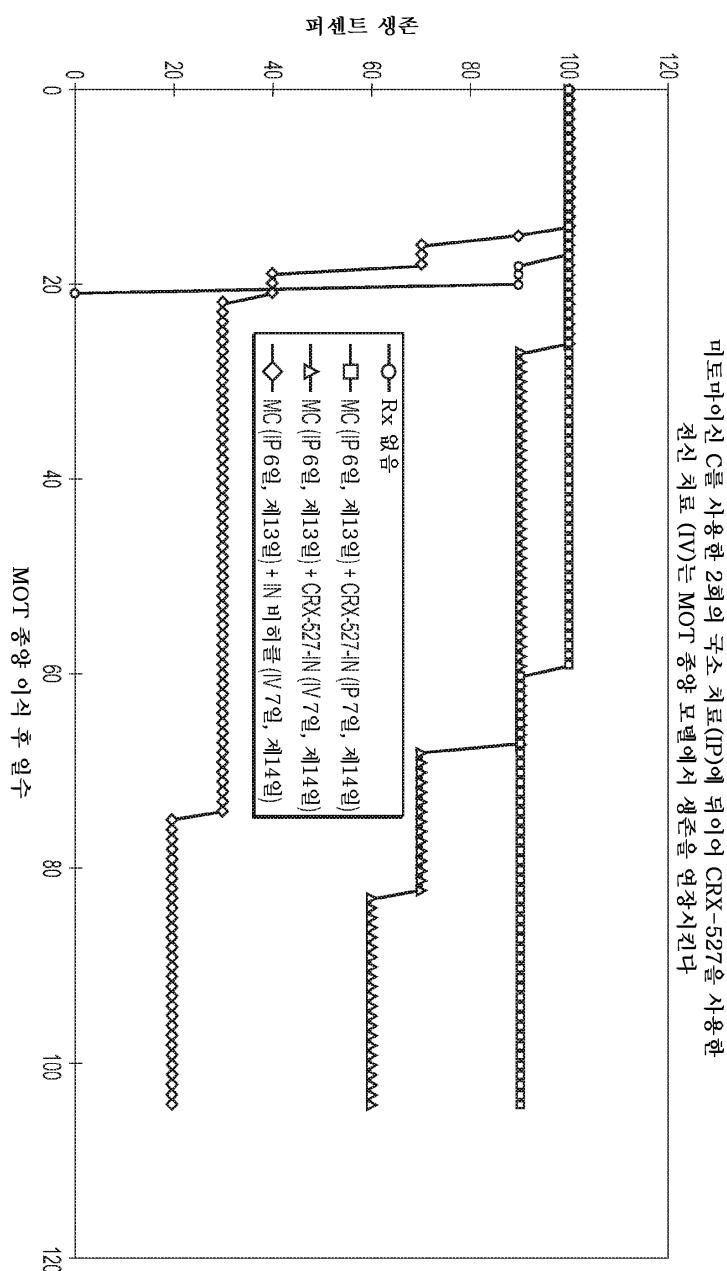
도면7



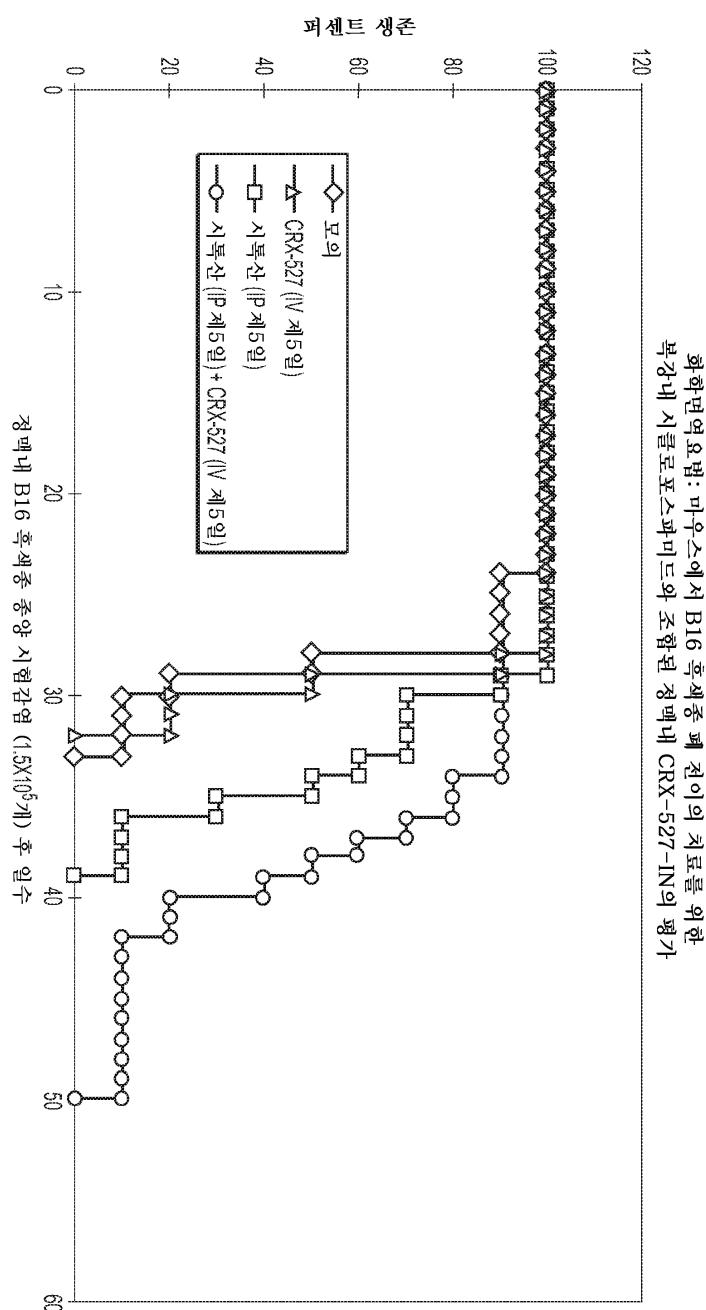
## 도면8



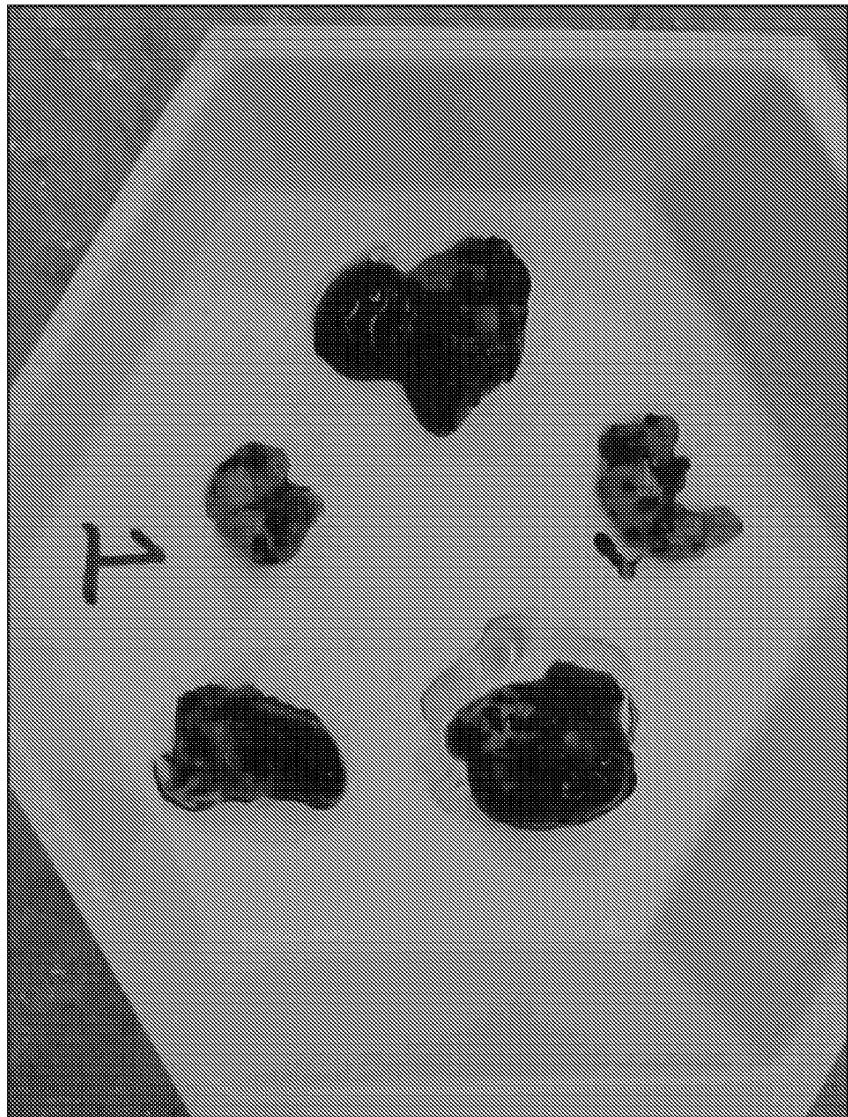
## 도면9



## 도면10

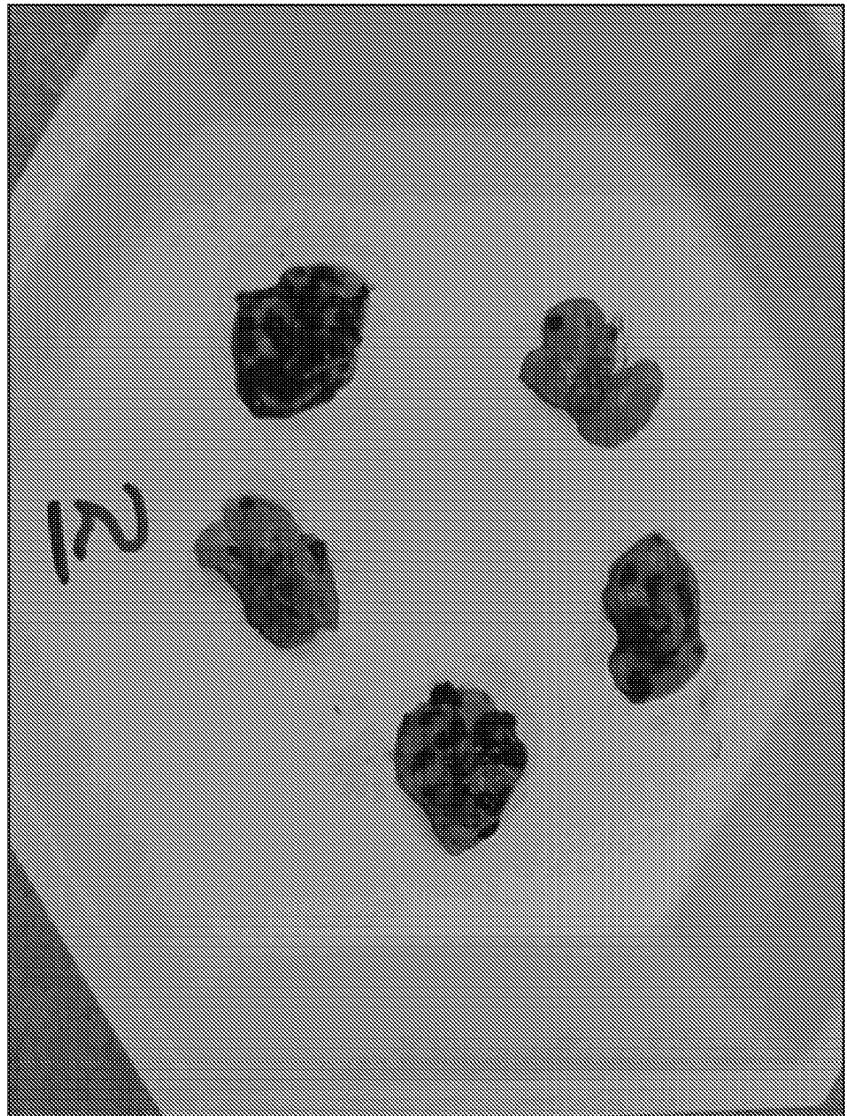


도면11



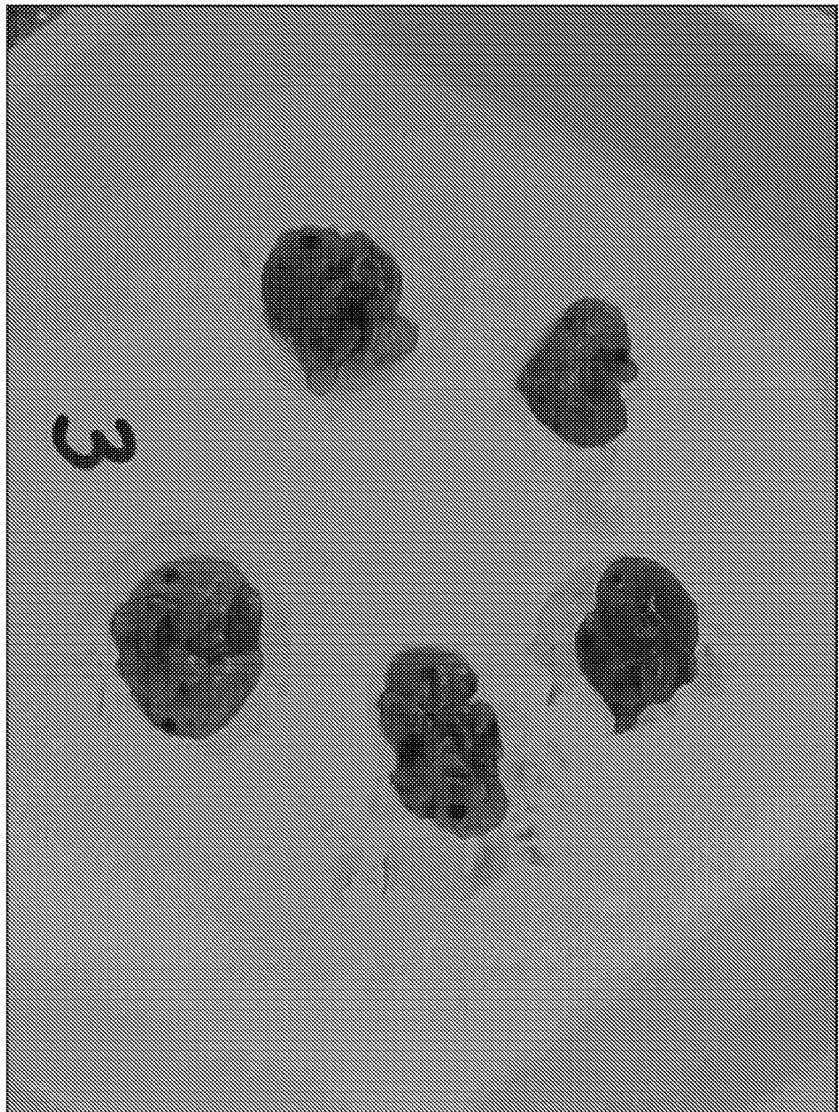
단지 비하이클만

도면12



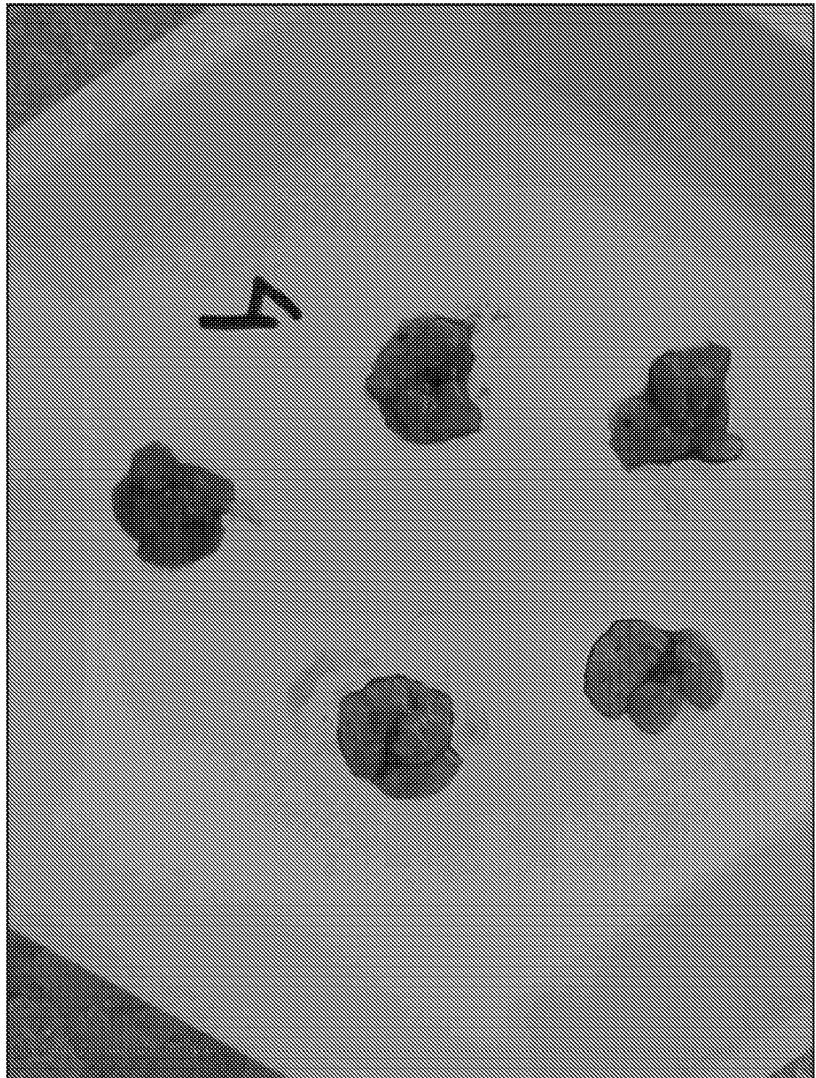
CRX527 단독

도면13



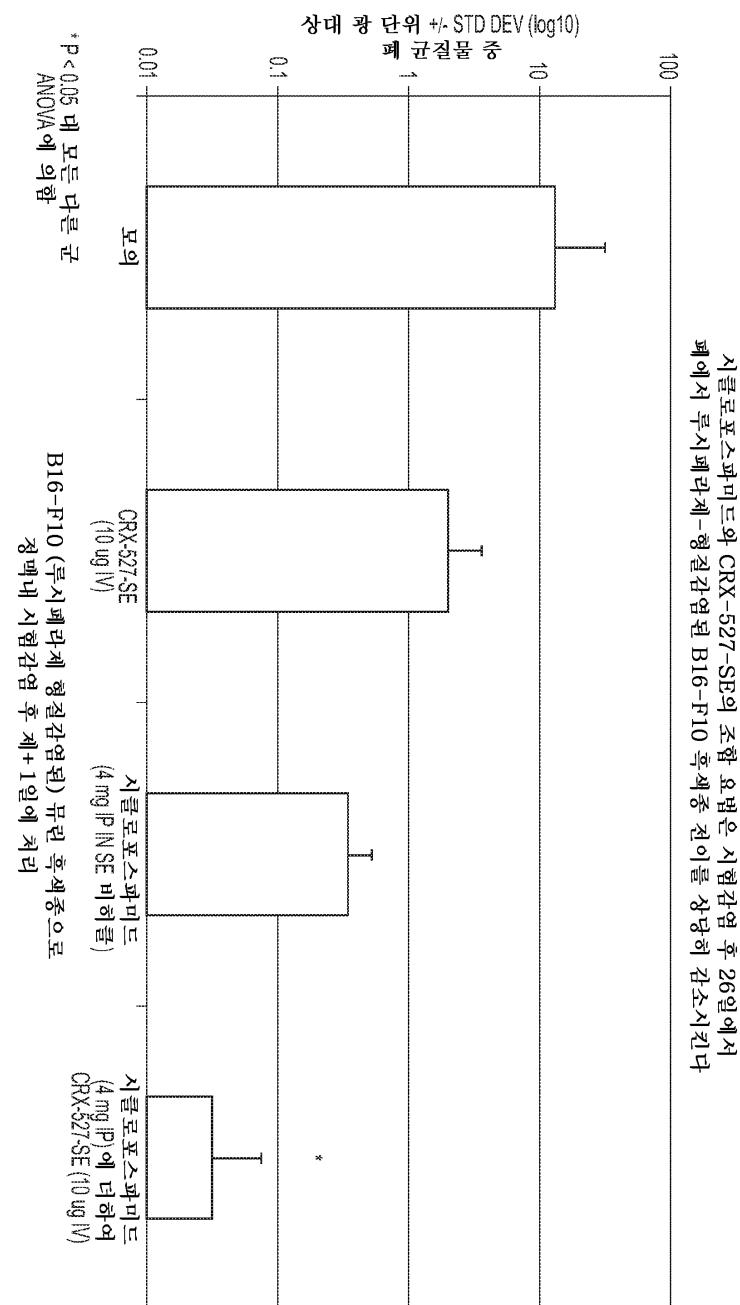
시클로포스파미드 단독

도면14



CRX527와 조합된 시클로포스파미드

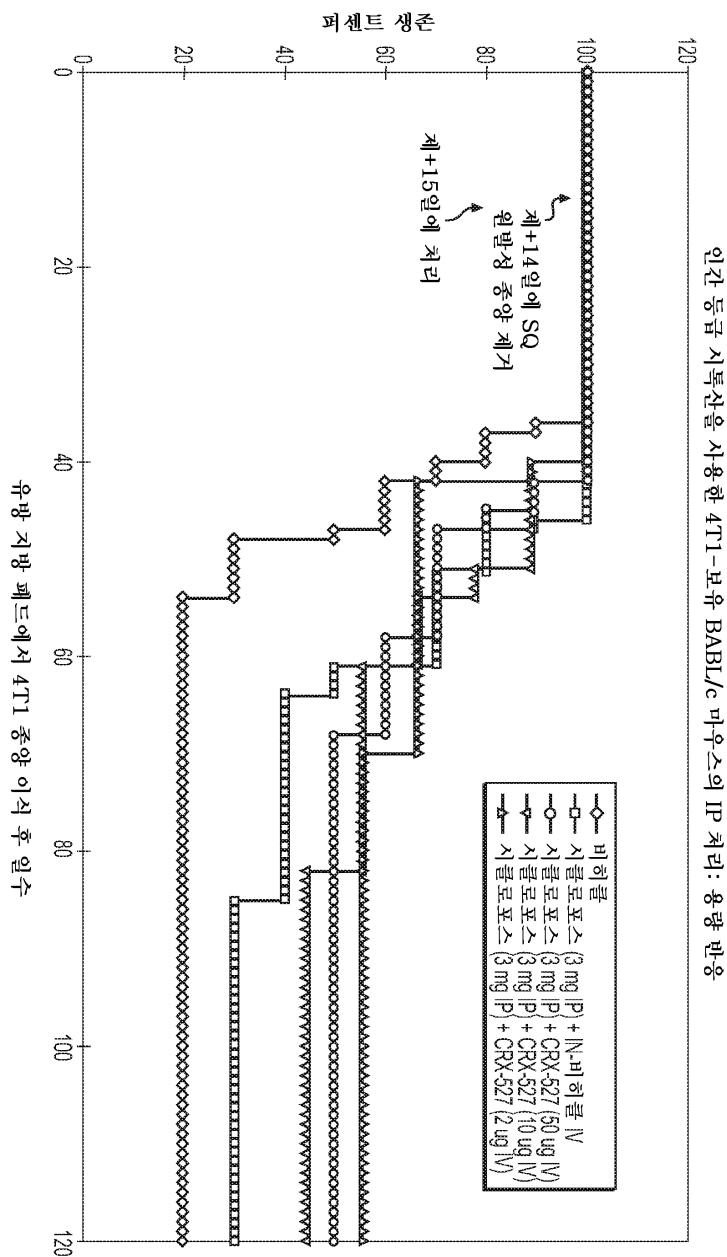
## 도면15



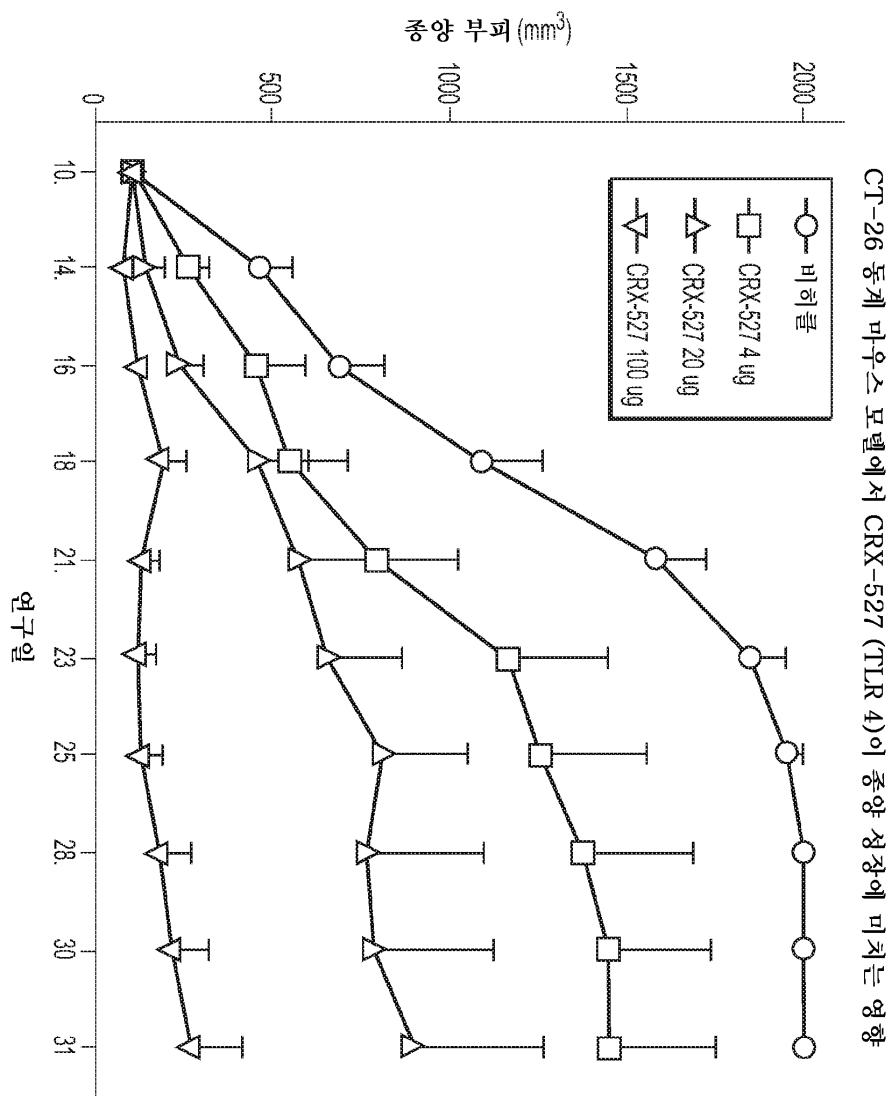
\* P<0.05 대 모든 다른 군  
ANOVA에 의함

B16-F10 (루시페라제 형질감염된) 뮤린 혼세종으로  
정맥내 시험감염 후 2주+1일에 채취

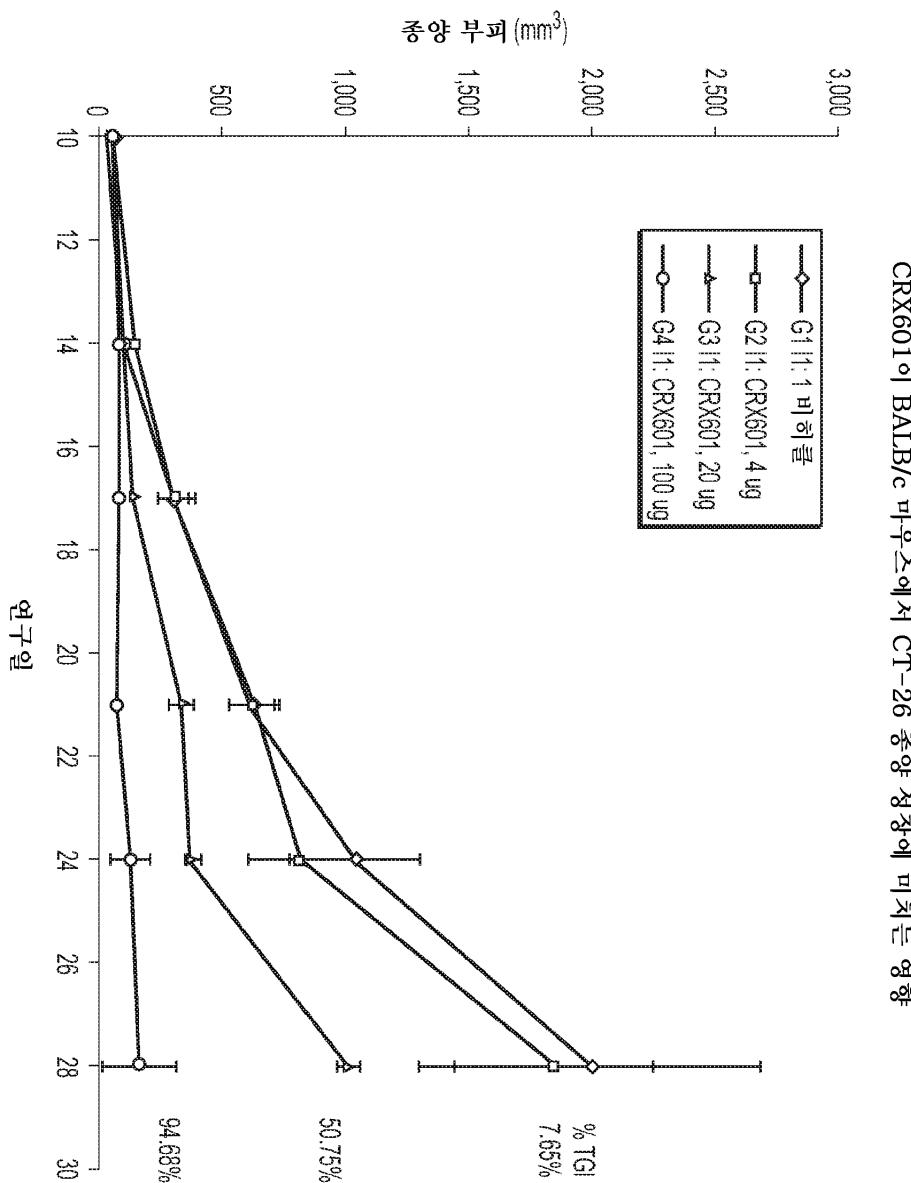
## 도면16



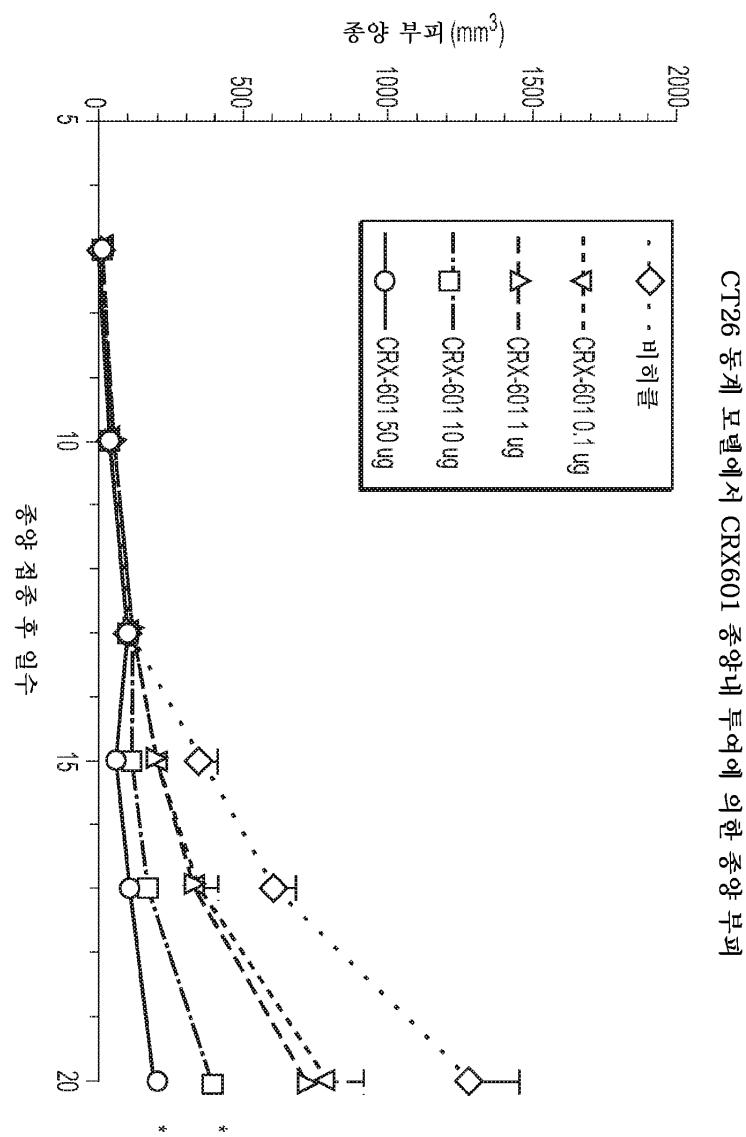
## 도면17



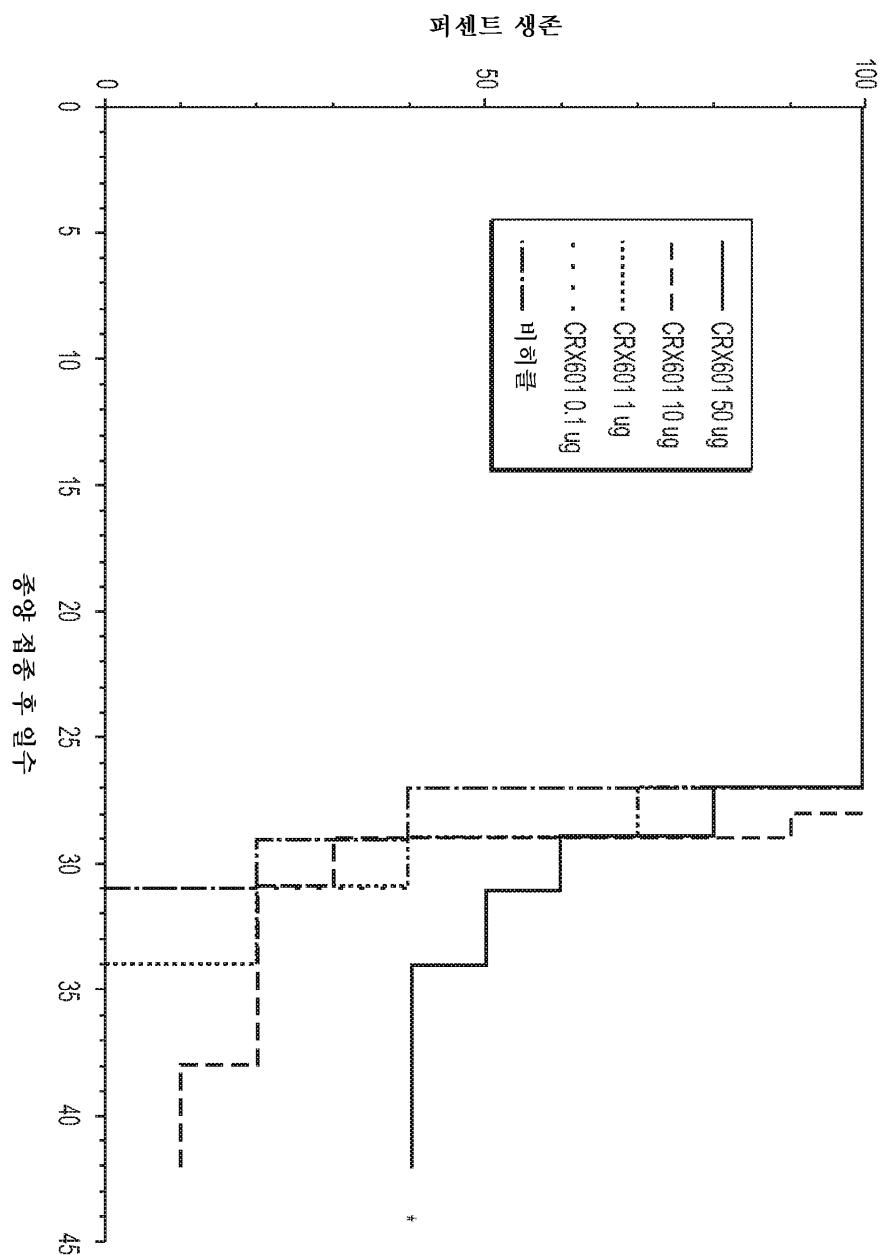
## 도면18



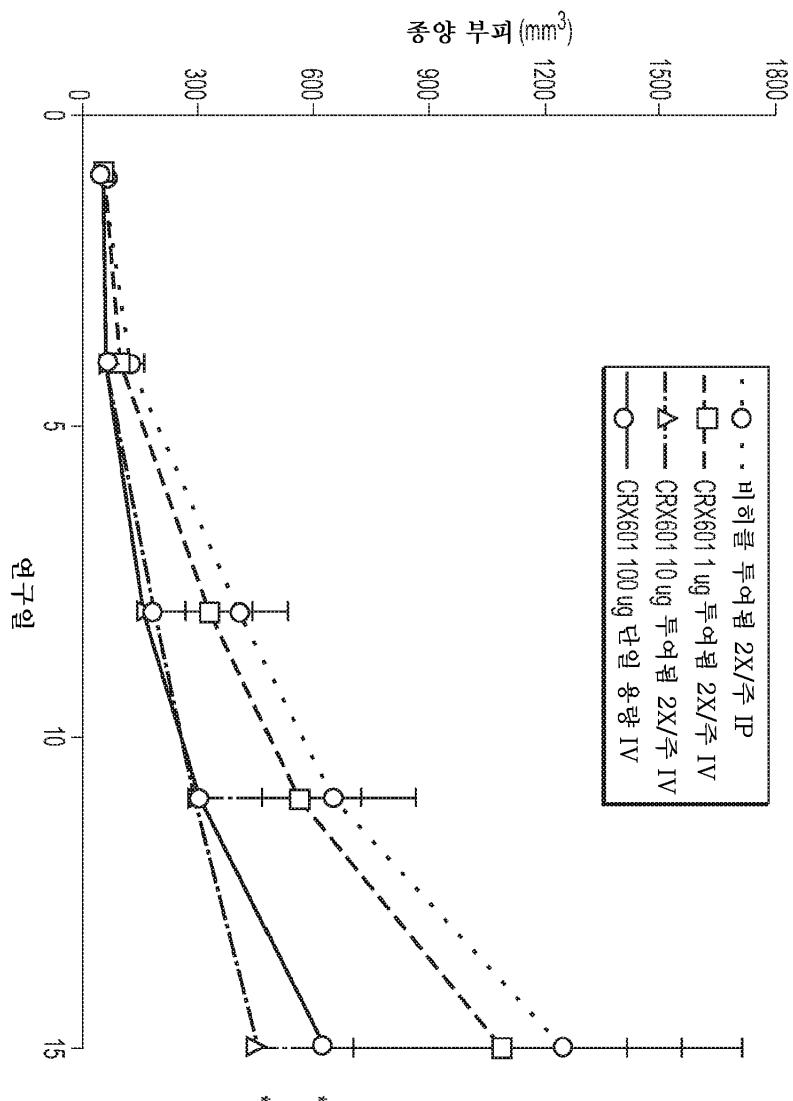
도면19



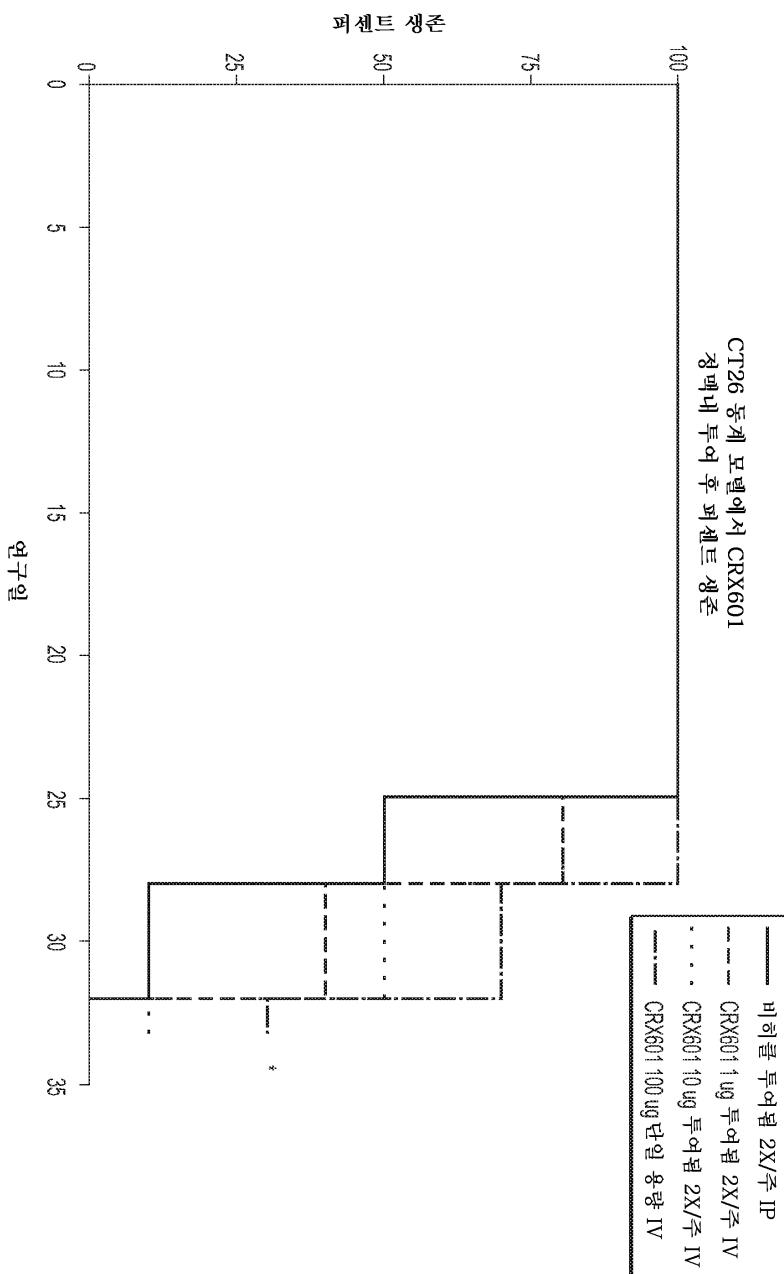
도면20



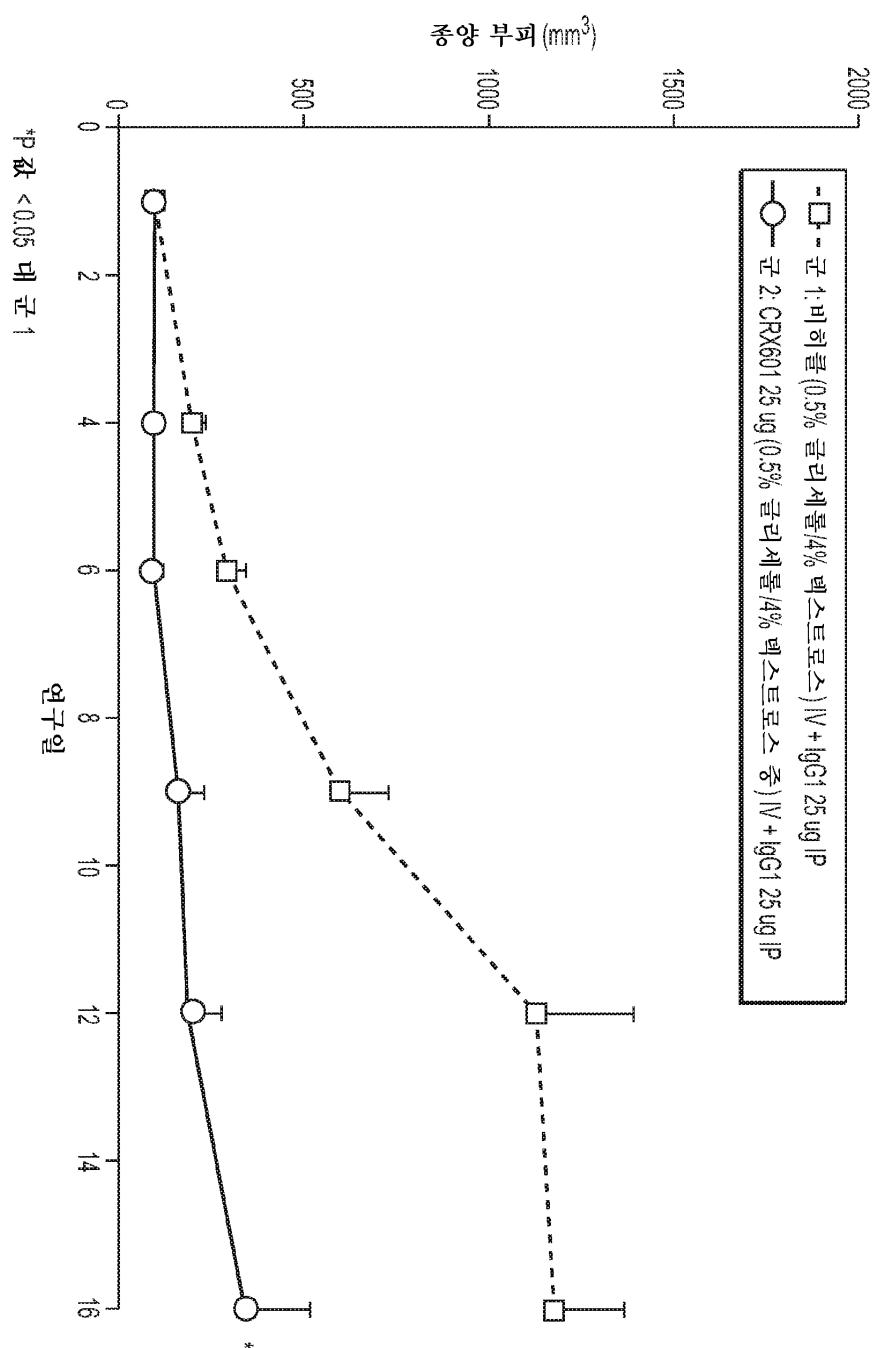
도면21



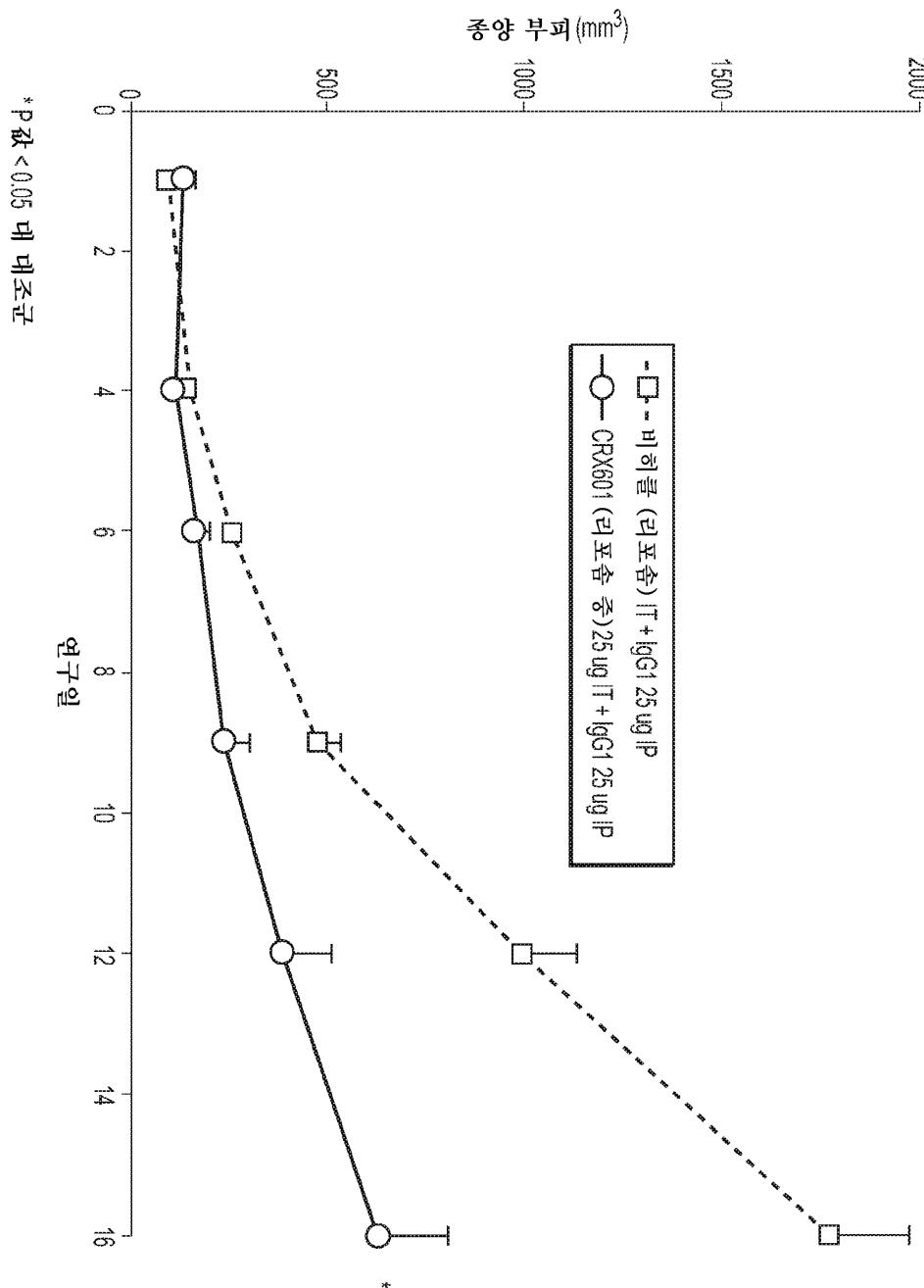
## 도면22



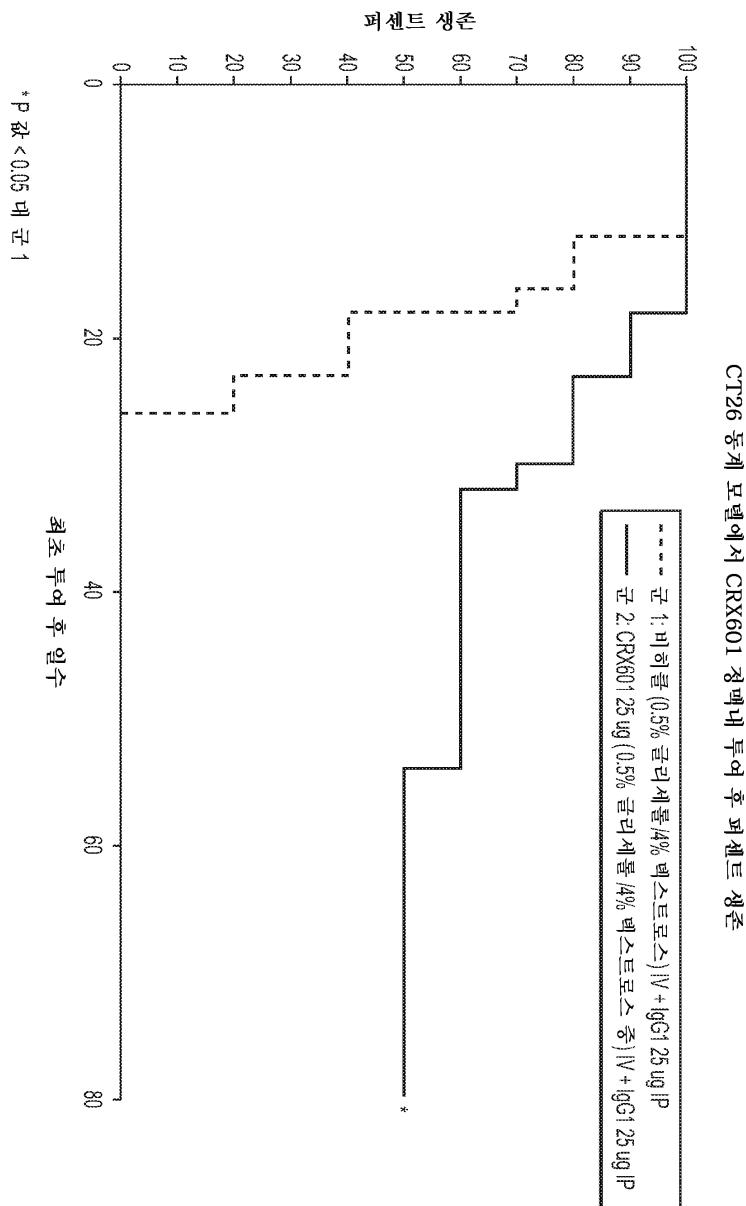
## 도면23



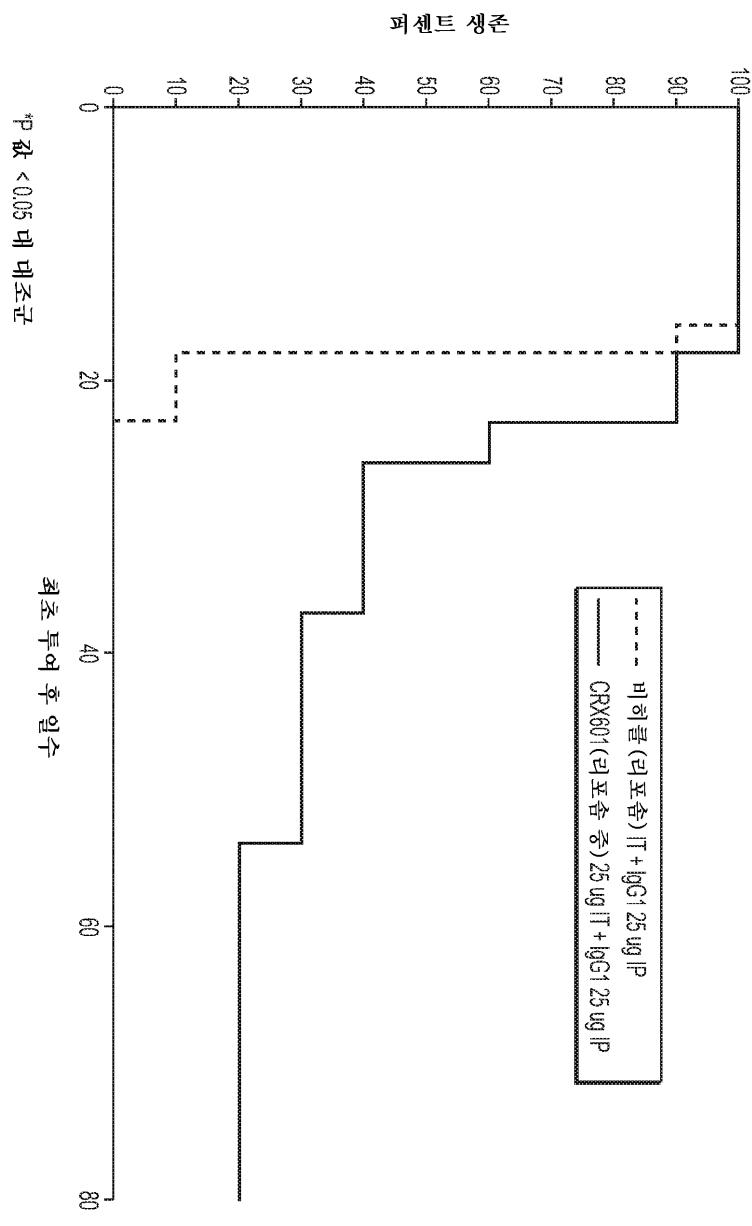
도면24



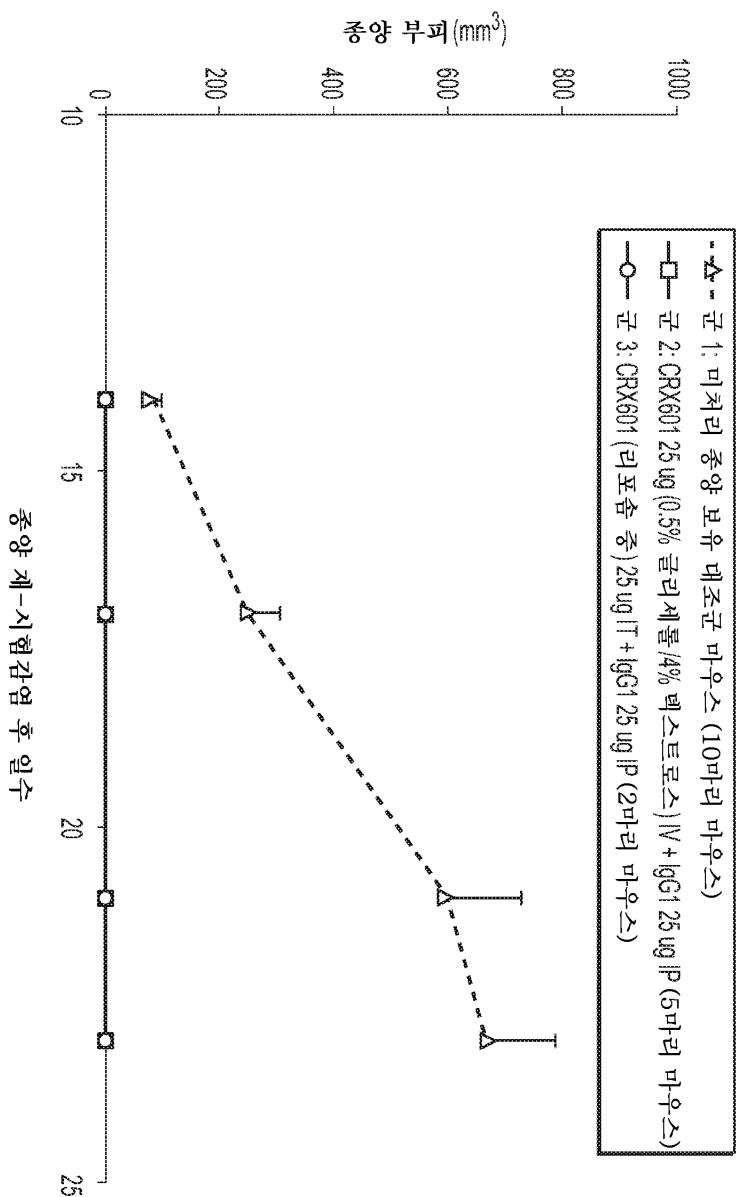
## 도면25



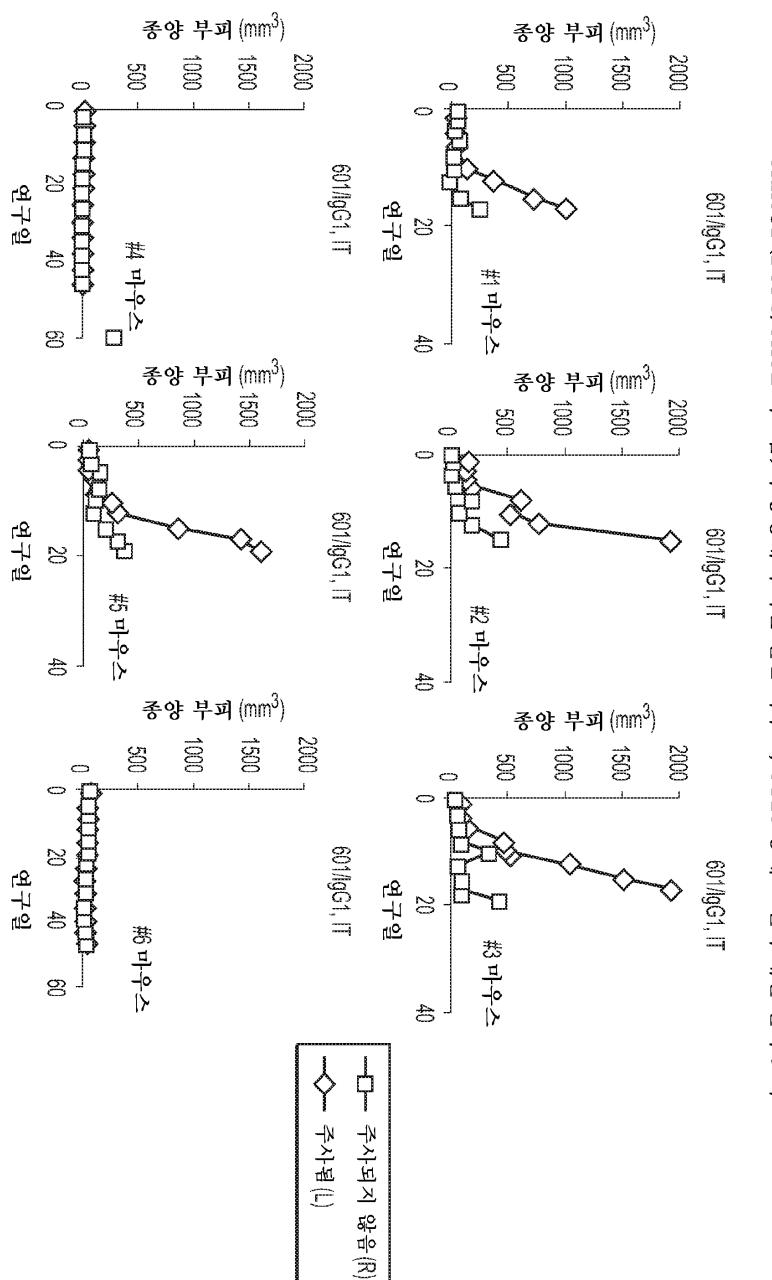
도면26



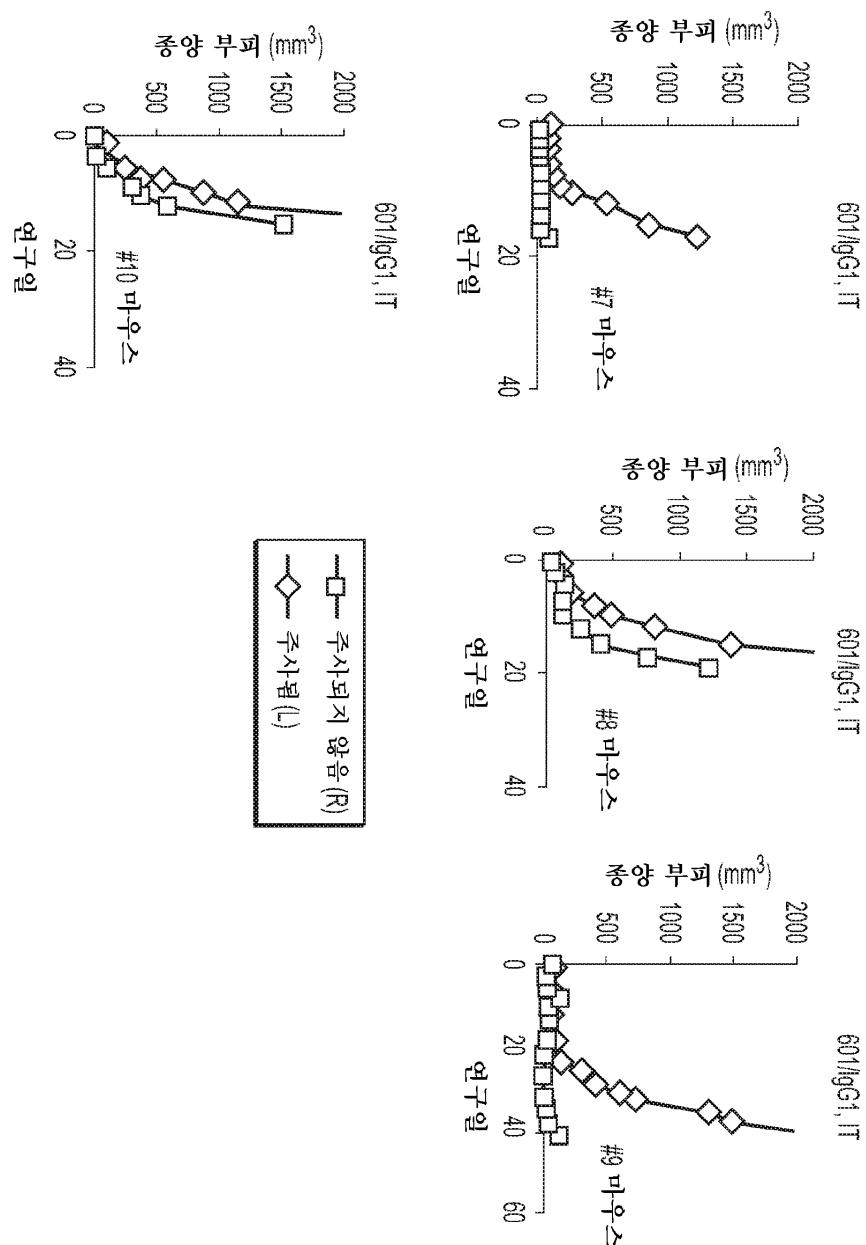
## 도면27



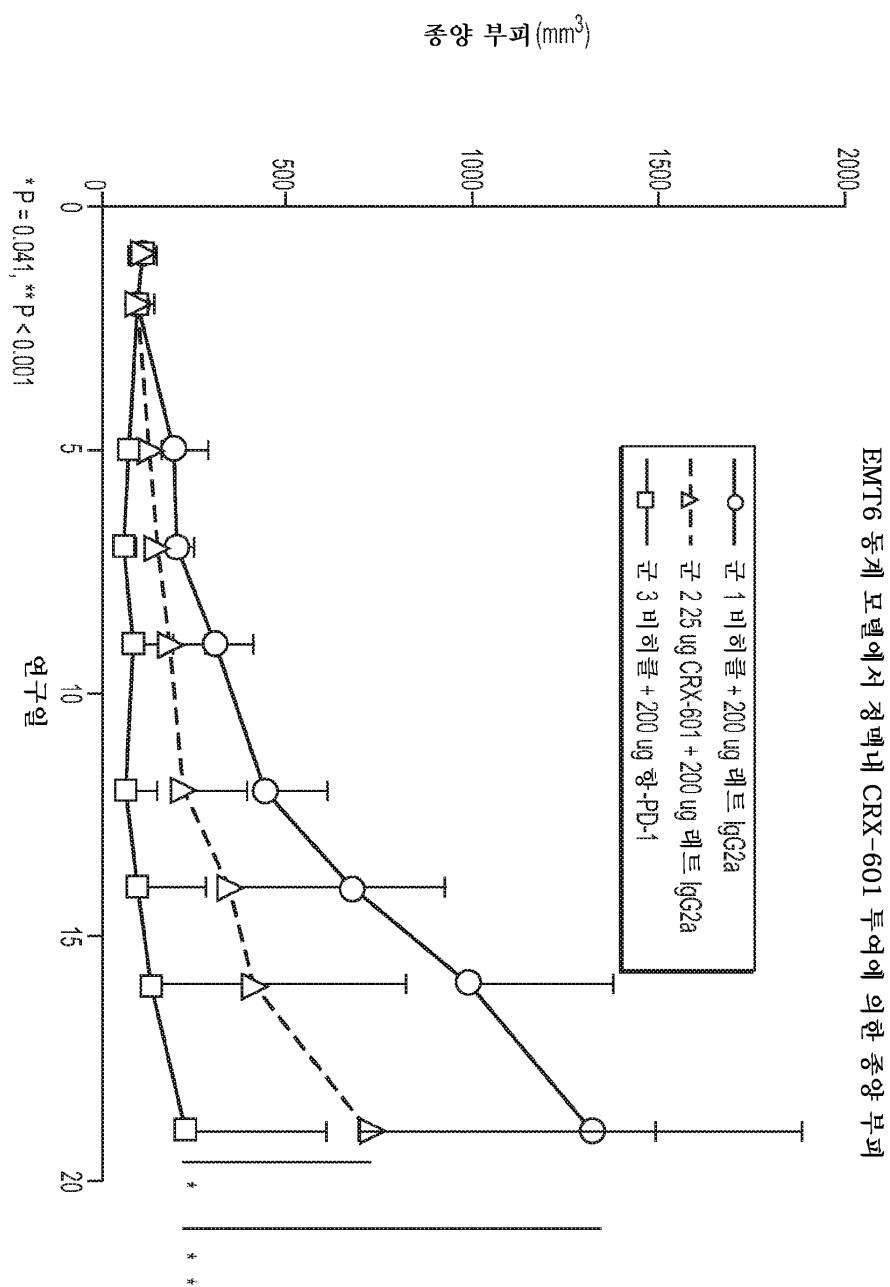
## 도면28i



## 도면28ii



## 도면29



도면30

