



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0063722
 (43) 공개일자 2017년06월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7010186
- (22) 출원일자(국제) 2015년10월02일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년04월14일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/053828
- (87) 국제공개번호 WO 2016/054574
 국제공개일자 2016년04월07일
- (30) 우선권주장
 62/059,669 2014년10월03일 미국(US)

- (71) 출원인
 더 보드 어브 트러스티스 어브 더 리랜드 스텐포드 주니어 유니버시티
 미국 94305-2038 캘리포니아주 스텐포드 피오 박스 20386 메인 퀸드 빌딩 170 3층 오피스 오브 더 제너럴 카운셀
- (72) 발명자
 브란켄버그, 프란시스 제라드
 미국 94028 캘리포니아주 포틀라 밸리 베어 굴치 드라이브 15
- (74) 대리인
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 16 항

- (54) 발명의 명칭 선천적 면역 반응의 종양 유도된 면역억제를 차단하기 위한 방법으로서의 아넥신 V의 사용

(57) 요 약

대상체에 대한 치료 용량의 아넥신 V를 사용한 암을 가진 대상체를 치료하기 위한 방법이 제공된다.

(52) CPC특허분류
A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

사람에게의 종양에 대한 면역 반응을 증가시키는 방법으로서, 유효 용량의 아넥신 V 제제의 경구적 투여에 의해 일정 과정의 요법을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아넥신 V 제제는 아넥신 V 단백질인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단백질은 야생형인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 단백질은 야생형 단백질에 대해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 종양은 암종인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 유효 용량은 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 5 mg/kg 인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 투여 단계는 적어도 약 1시간의 순환 반감기 동안 제공되는 경로에 의해 수행되는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 투여는 복강내로의 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 투여는 적어도 4시간의 기간에 걸쳐 정맥내 투여에 의해 수행되는 방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 유효 용량은 적어도 2회 투여되는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 유효 용량은 제2 항암제와의 병용 요법으로 투여되는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 병용 요법은 상승작용 효과를 위해 제공되는 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 상기 제2 항암제는 면역 체크포인트 저해제인 방법.

청구항 14

제11항 또는 제13항에 있어서, 제2 항암제는 방사선 요법인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 종양은 표면 포스파티딜세린의 발현에 대해 양성인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 포스파티딜세린의 표면 발현에 대해 양성인 종양의 존재는 아넥신 V 제제로의 영상화에 의해 결정되는 방법.

발명의 설명

배경기술

[0001]

악성 신생물로서도 공지된 암은 비조절된 세포 분열, 인접한 조직의 침습 및 파괴, 및 경우에 따른 신체에서의 다른 위치로의 전이를 나타내는 세포의 비정상적 성장으로 특정된다. 유방암, 폐암, 결장암, 전립선암, 및 림프종을 비롯한 100개 초과의 유형의 암이 존재한다. 암은 미국에서의 사망의 두 번째 주요 원인이고, 이는 전체 사망의 약 13%를 야기한다. 암은 모든 나이의 사람, 심지어 태아에게도 영향을 줄 수 있으나, 대부분 유형의 암에 대한 위험은 나이와 함께 증가한다.

[0002]

종양 면역회피는 암 면역감시의 진전된 단계이고, 이에서 종양 세포는 숙주 면역 시스템을 회피하는 능력을 얻고, 친종양형성 염증을 이용한다. 종양 세포 및 숙주 면역 세포 사이의 상호작용은 종양형성의 복수 단계에서 중요한 역할을 하고, 증거는 숙주 면역 반응은 암 환자의 임상 결과에서의 인자임을 제시한다. 내인성 면역계의 조작은 진행된 암을 갖는 환자에서의 효과적인 항암 요법으로서 부각되었다. 문헌 [(Mellman 등 (2011) Nature 480:480-489; Rosenberg (2012) Sci Transl Med 4:127ps8).]

[0003]

종양 미세환경은 숙주 반응을 촉진하거나 또는 종양 성장을 길항하는 여부를 조절하는 면역조절 구성성분의 기능적 특성에 중요한 영향을 준다. 종양 세포 및 종양-침투 림프구는 항종양 과정을 회피하는 전략이 적용되고, 만성적 염증 신호의 활성화를 통해 전이성 포텐셜을 향상시킬 수 있다. 선천적 및 적응성 면역계는 다중 세트의 골수 세포 및 림프구를 활성화시킴으로써 형질전환된 세포를 감지하거나 제거하는데 중요한 역할을 한다. 또한, 종양-침윤 면역 세포는 종양 혈관신생 및 면역 억제를 유발함으로써 종양 진행에 기여한다.

[0004]

종양 면역회피는 종양 세포에 대한 관용성 반응을 유발하고, 친-종양 염증을 이용함으로써 종양형성에 다중적인 영향을 미친다. 포스파티딜세린 (PS)은 세포사멸 세포 또는 스트레스 받은 세포의 표면에 선택적으로 노출된 구조적 음이온성 원형질막 인지질이다. 이의 존재는 "잇 미 신호(eat me signal)"인 것으로 널리 인식되어 있고, 이를 통해 NK 세포, T-세포 및 단핵구/대식세포를 포함하는 선천적 면역계는 표적 세포를 인식하고 제거한다. 그러나, 또한, PS 발현 종양 세포와의 접촉은 면역억제성 조절 T-세포를 강하게 활성화시키고, 이에 따라 종양 세포가 면역계에 의한 인식을 회피하는 기전을 제공할 수 있는 것이 관찰되었다.

[0005]

생물학적 요법은 암의 치료에 대한 막대한 포텐셜을 유지하고, 내인성 생물학적 시스템을 통해 종양 세포의 효과적인 사멸을 위해 제공되는 요법에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 이러한 필요성을 다룬다.

[0006]

발명의 요약

[0007]

종양 세포에 대한 포스파티딜세린 (PS)의 결합 부위를 차단하는 유효량의 제제의 투여함으로써 암의 치료를 위한 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 차단제는 PS에 대해 결합하고, 이에 의해 이용가능한 결합 부위를 경쟁적으로 차단하는 단백질이다. 관심대상의 폴리펩타이드는 비제한적으로 아넥신 V 단백질 및 이로부터 유도된 PS 결합 결편을 포함하고, 이는 야생형 및 돌연변이 (예를 들면, 아넥신 V-128) 서열을 포함한다. 아넥신 V 단백질이 특정 관심대상이다.

[0008]

본 발명의 일부 구현예에서, 유효량의 아넥신 V 단백질은 예를 들면 국소적으로 또는 전신적으로 암을 가진 사람에게의 비경구 투여에 의해 투여되고, 여기서 암은 비제한적으로 암종, 육종, 림프종, 백혈병, 신경교종, 흑색종 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여는 연속적인 전신 주입에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 이러한 연속적인 전신 주입은 복강내 주입을 포함한다. 일부 구현예에서, 삼투 펌프가 활용된다. 일부 구현예에서, 암은 고형암이고, 이는 비제한적으로 암종을 포함한다.

[0009]

임의의 이론에 구속됨 없이, 본 방법은 외인성으로 투여된 아넥신 V가 종양 세포 상에서의 PS의 결합을 통한 항-종양 효과를 가지고, 이에 의해 면역계의 T-reg 면역억제를 차단한다는 것을 나타낸다. PS 발현을 통한 국부 면역억제는 공격성 형태의 유방암 (삼중 음성), 신경교세포종, 및 두경부 암을 포함하는 다수의 종양의 특징이

다. 본 발명의 방법은 종양에 대한 숙주 면역 반응을 향상시키는 PS의 잘 용인되는 차단을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일부 구현예에서, 효과적인 용량의 아넥신 V 단백질은 암을 진단받은 사람에게의 비경구적으로 투여되고, 투여는 종양내, i.v., i.P. 등, 특히 복강내 연속적인 주입일 수 있다. 인간에서의 유효량은 최대 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 1 mg/kg , 최대 약 1.5 mg/kg , 최대 약 2 mg/kg , 최대 약 5 mg/kg , 최대 약 7.5 mg/kg , 최대 약 10 mg/kg , 최대 약 20 mg/kg 일 수 있다.

[0011] 유효 용량의 아넥신 V는 다른 치료 방식과 조합될 수 있고, 이는 비제한적으로 화학치료 약물, 방사선 요법, 항암 생물 제제 예컨대 종양 항원에 유도된 단클론성 항체, VEGF 등 및 기타 다른 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상승작용 효과는 아넥신 V 요법이 항암 생물학적 제제와 조합되는 경우에 관찰된다. 일부 구현예에서, 생물학적 제제는 "체크포인트 저해제"에 특별하게 결합하는 항체이다. 다른 구현예에서, 처리 방법은 방사선이고, 이는 국소적으로 투여될 수 있다.

[0012] 일부 구현예에서, 아넥신 V 단백질은 단백질의 장기적인 혈액 청소능을 제공하는 방식으로 투여되고, 예를 들면, 여기서 순환시 단백질의 반감기는 적어도 약 30분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 1.5시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 2.5 시간, 적어도 약 3 시간 이상이다. 일부 구현예에서, 투여의 방식은 복막내 주사, 또는 삼투펌프이다. 다른 구현예에서, 투여 경로는 연장된 기간에 걸친 정맥내 주사이고, 예를 들면, 여기서 본원에 기재된 일일 투여는 최대 30분, 최대 1시간, 최대 2시간, 최대 4시간, 최대 6시간, 최대 8시간, 최대 12시간, 최대 16시간, 최대 24시간의 기간에 걸쳐 전달된다.

[0013] 본 발명의 일부 구현예에서, 암 세포 상의 과량의 PS의 존재는 아넥신 V 시약으로 이미지화되고, 여기서 표면 PS의 발현에 대해 양성인 종양을 갖는 사람은 이후 본 발명의 방법을 사용한 치료를 위해 선택된다. 본 발명의 일부 구현예에서, 표면 PS를 발현하는 암 줄기세포의 존재는 치료 이전에 결정된다. 또한, 본 발명의 방법은 암 줄기세포에 의해 유도된 면역억제를 차단하는데 있어서의 용도를 발견한다. 줄기 세포는 또한 면역-인식을 회피하기 위한 PS 수준을 발현하고, 이에 따라 아넥신 V로도 치료될 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 양태는 암 줄기세포의 성장을 감소시키는 방법을 포함하여 종양 성장을 안정화시키고, 방지하거나 또는 감소시키는 의약의 제조에서의 아넥신 V 제제의 사용과 관련된다. 의약은 PS 양성 암 세포를 갖는 것으로 진단된 사람에게 투여될 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태는 종양 성장을 안정화시키고, 방지하거나 또는 감소시키는 키트를 제공한다. 키트는 치료적 아넥신 V 제제를 포함하고, 이는 질병을 안정화시키고, 방지하거나 또는 감소시키는데 충분한 양으로 암 줄기 세포를 포함하는 암 세포의 표면 상의 PS를 차단한다. 또한, 키트는 PS의 세포 표면 발현에 대해 암을 표현형검사하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 사용에 대한 지시, 암을 모니터링하기 위한 시약 등을 포함할 수 있다.

0016] 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 대조군에 대한 아넥신 V로 치료된 동물에서의 종양 크기에서의 변화를 예시한다.

[0018] 도 2. Tc99m-아넥신의 혈액 청소능.ip 주입 이후 V-128 (0.5 cc 일반 생리 식염수에서의 마우스당 1 mg/kg 단백질). 동물이 안정화시키는 동안 모세관 튜브를 통해 수프라-인프라-오비탈 출혈(supra-infra-orbital bleeding)을 통해 혈액을 수득하였다. 그룹당 5개의 종양 함유 마우스로부터 얻은 데이터 (좌측 유방 지방체로의 50,000 4T1 세포의 이식 이후의 19일). 마우스의 동일한 군으로부터의 종양을 이후 마우스를 안락사시킨 후 동시에 절개하고, 청량하고, 계수하였다.

[0019] 도 3. 동소이식 4T1 액와 지방체 종양의 아넥신 V 면역요법.좌측 액와 지방체로의 50,000 4T1 세포의 직접 이식 이후 9 내지 11일에 어린 암컷 BALB/c 마우스는 8일 동안 ip 주입된 아넥신 V의 2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$ 또는 2 mg/kg 비드(bid)를 받았다.

[0020] 도 4. 4T1 액와 지방체 종양의 독소루비신 및 일일 i.P. 아넥신 V-면역요법.4T1 종양을 갖는 것은 8일 동안, ip 주입된 야생형 아넥신 V (Theseus CorP.)의 2 $\text{mg}/\text{kg}/\text{일}$, 0 및 5일에의 독소루비신 5 mg/kg , 또는 둘 모두를 받았다.

[0021] 도 5. i.P. 아넥신 V-128의 혈액 청소능.생체분포 검정 및 청소능 연구의 100 uCi의 Tc99m-아넥신 V-128 (1 - 2 ug 단백질)를 4T1 종양 함유 마우스 (크기에서의 400 내지 600 mm^3)에 ip 주입하였다. 혈액 샘플을 청량 인출

하여 트레이서의 ip 주입 이후 30분, 1시간, 6시간, 12 및 24시간에서 생체분포에 대해 안락사시 계수하였다.

[0022] 도 6. i.P. 아넥신 V-128의 종양 $t_{1/2}$. 생체분포 검정 및 청소능 연구의 100 uCi의 Tc99m-아넥신 V-128 (1 - 2 ug 단백질)를 4T1 종양 함유 마우스 (크기에서의 400 내지 600 mm³)에 ip 주입하였다. 종양을 트레이서의 ip 주입 이후 30분, 1시간, 6시간, 12 및 24시간에서 생체분포에 대해 안락사시 청량하고 계수하였다.

[0023] 도 7a-7b. 아넥신 V와 체크포인트 저해제에 대한 항체와의 생체내 조합의 상승작용 효과, 생존 (도 7a) 및 종양 성장 (도 7b)에 나타난 효과.

[0024] 상세한 설명

[0025] 본 발명은 암의 치료 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 질환의 개시, 진행, 또는 진행을 억제하고 예방하기 위해 아넥신 V 결합 활성을 제공하는 유효량의 제제를 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명에서, 본 조성물을 투여하는 단계는 본 기술분야의 당업자에게 공지된 임의의 다양한 방법 및 전달 시스템을 사용하여 실시되거나 수행될 수 있다. 투여는 예를 들면 정맥내로, 임플란트를 통해, 경첨막으로, 경피로, 근육내로, 척추강내로, 및 피하로 수행될 수 있다. 다수의 일반적으로 사용되는 약제학적 캐리어를 이용하는 하기 기재된 전달 시스템은 아넥신 V 조성물을 투여하기 위해 가시화된 다수의 구현예만을 나타낸다.

[0026] 본 방법 및 조성물을 기술하기 이전에, 본 발명은 기술되는 특정 방법 또는 조성물로 제한되지 않고, 예컨대, 이는 물론 변화될 수 있는 것으로 이해된다. 또한, 본원에 사용되는 전문 용어는 특정 구현예만을 기술하기 위한 목적을 위한 것이고, 제한적인 것이 아니며, 이는 본 발명의 범위는 첨부된 청구항에 의해서만 제한될 것이기 때문이다.

[0027] 값의 범위가 제공되는 경우, 맥락에서 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 이 범위의 상한값 내지 하한값 사이의 하한값의 단위의 10분의 1로의 각각의 개입되는 값이 또한 구체적으로 개시되어 있다. 언급된 범위 내의 임의의 언급된 값 또는 개입되는 값 내지 언급된 범위 내의 다른 언급되거나 또는 개입되는 값 사이의 각각의 더 작은 범위가 본 발명 내에 포함된다. 이러한 더 작은 범위의 상한값 및 하한값은 독립적으로 상기 범위, 및 더 작은 범위 내에 상기 두 값 중 하나, 둘 모두가 본 발명 내에 포함되거나 포함되지 않고, 언급된 범위 내의 임의의 구체적으로 배제된 값의 대상이 되는 각각의 범위 내에 포함되거나 배제될 수 있다. 언급된 범위가 상기 값 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 이러한 포함되는 값 중 하나 또는 둘 모두를 배제하는 범위가 본 발명에 포함된다.

[0028] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 일부 잠재적이고 바람직한 방법 및 재료가 이하 기술된다. 본원에 언급된 모든 개시물은 개시를 위해 참조로 본원에 포함되어 있고, 개시물이 인용되는 것과 연관된 방법 및/또는 재료를 기술하고 있다. 본 개시물은 모순되는 범위에 포함된 개시물의 임의의 개시내용을 대체하는 것으로 이해된다.

[0029] 본 개시물을 읽는 경우 본 기술분야의 당업자에게 자명한 바와 같이, 본원에 기술되고 예시된 각각의 구현예 각각은 본 발명의 범위 또는 사상을 벗어남 없이 임의의 다른 다수의 구현예의 특징과 용이하게 분리되거나 이와 조합될 수 있는 별개의 구성요소 및 특징을 가진다. 임의의 인용된 방법은 인용된 경우의 순서로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 실시될 수 있다.

[0030] 본원 및 첨부된 청구항에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태("a", "an", 및 "the")는 맥락에서 달리 분명하게 언급되지 않는 한 다수의 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들면, "세포"에 대한 참조는 복수개의 이러한 세포를 포함하고, "펩타이드"에 대한 참조는 하나 이상의 펩타이드 및 이의 등가물, 예를 들면, 본 기술분야의 당업자에게 공지된 폴리펩타이드 등에 대한 참조를 포함한다.

[0031] 본원의 논의된 개시물은 본 출원의 출원일 이전에 이를 개시내용에 대해서만 제공된다. 본원에서, 본 발명은 선행 발명에 의해 이러한 개시물이 선행하는 것으로 인정하는 것으로 해석되지 않는다. 게다가, 제공되는 개시물의 날짜는 실제 공개 날짜와 상이할 수 있고, 이는 독립적으로 확인할 필요가 있다.

[0032] 정의

[0033] 용어 "치료", "치료함", "치료하다" 등은 일반적으로 원하는 생리학적 및/또는 생리적 효과를 얻는 것을 지칭하는 것으로 사용된다. 그 효과는 질환 또는 증상(들)을 완전하거나 부분적으로 예상하는 것과 관련하여 예방적일

수 있고 및/또는 질환에 대한 치료의 부분적이거나 완전한 안정화 및/또는 질환에 기여하는 부작용과 관련하여 치료적일 수 있다. 용어 "치료"는 포유동물, 특히 인간에서의 질환의 임의의 치료를 포함하고, 하기를 포함한다:(a) 질환 및/또는 증상(들)이 아직 질환을 갖는 것으로 진단되지 않았지만 질환 또는 증상에 걸릴 수 있는 환자에서 발생되는 것을 예방하는 것; (b) 질환 및/또는 증상(들)을 억제하는 것, 즉, 이의 발달을 차단하는 것; 또는 (c) 질환 증상(들)을 완화하는 것, 즉, 질환 및/또는 증상(들)의 퇴행을 야기하는 것. 치료가 필요한 대상은 이미 병에 걸린 것 (예를 들면, 암에 걸린 것, 감염된 것 등)뿐만 아니라 예방이 요구되는 것 (예를 들면, 암에 대해 증가된 민감성을 가지는 것, 감염의 증가된 가능성을 가지는 것, 암을 갖는 것으로 의심되는 것, 감염을 가진 것으로 의심되는 것 등)을 포함한다.

[0034] 치유적 치료는 대상체가 투여 이전에 병을 앓고 있는 것이고, 예방적 치료는 대상체가 투여 이전에 병을 앓고 있지 않는 것이다. 일부 구현예에서, 대상체는 병을 앓게 될 증가된 가능성을 가지거나, 또는 치료 이전에 병에 걸린 것으로 의심된다. 일부 구현예에서, 대상체는 병을 앓게 될 증가된 가능성을 가진 것으로 의심된다.

[0035] "비슷한 세포"는 비교되는 이 세포의 유형이 다른 세포의 것과 동일한 것을 의미한다. 비슷한 세포의 예는 동일한 세포주로부터의 세포이다.

[0036] 단백질의 발현을 "특별하게 억제한다"는 (a) 임의의 다른 단백질의 발현보다 초과로, 또는 (b) 모든 그러나 10개 이하의 다른 단백질의 발현보다 더 많이 단백질의 발현을 억제하는 것을 의미할 것이다.

[0037] "적절한 조건"은 이 용어가 사용되는 문맥에 좌우되는 의미를 가질 것이다. 즉, 항체와 연관하여 사용되는 경우, 상기 용어는 항체가 이의 대응되는 항원에 결합되게 하는 조건을 의미할 것이다. 이 용어가 핵산 혼성화와 연결하여 사용되는 경우, 상기 용어는 길이에 있어서 적어도 15개의 뉴클레오티드의 핵산이 이와 상호보완적인 서열을 갖는 핵산으로 혼성화되게 하는 조건을 의미한다. 세포에 대해 제제를 접촉시키는 것과 연관하여 사용되는 경우, 이 용어는 세포가 유입되게 하여, 이의 의도된 기능을 수행하게 하는 제제를 허용하는 조건을 의미한다. 일부 구현예에서, 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "적합한 조건"은 생리적 조건을 의미한다.

[0038] 용어 "수령체", "사람", "대상체", "숙주", 및 "환자"는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 진단, 치료, 또는 치료가 요구되는 포유동물 대상체, 특히 인간과 관련된다. 치료의 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소, 양, 염소, 돼지 등을 비롯한 포유동물로 분류되는 임의의 동물과 관련된다. 바람직하게는, 동물은 인간이다.

[0039] "치료적 유효 용량" 또는 "치료적 용량"은 원하는 임상적 결과에 영향(즉, 치료적 효능을 달성함)을 주기에 충분한 양이다. 치료적 유효 용량이 하나 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 치료적으로 유효한 용량의 아넥신 V는 선천적 면역 반응을 증가시킴으로써 질환 상태 (예를 들면, 암)의 진전을 증상을 줄이고, 완화시키고, 안정화시키고, 역전시키고, 예방하고, 느리게 하거나 지연시키기에 충분한 양이다. 따라서, 치료적 유효 용량의 아넥신 V 제제는 암 세포의 직접적 사멸 또는 식세포 사멸을 증가시키기 위해 유효한 용량으로 면역 세포, 예를 들면, 조절 T 세포, 식균 세포, NK 세포 등에의 암 세포 상의 포스파티딜세린의 결합을 감소시킨다.

[0040] 용어 "특정 결합", "특이적으로 결합하다" 등은 용액 또는 반응 혼합물에서의 다른 문자 또는 모이어티에 대한 문자에의 비공유적 또는 공유적 우선 결합과 관련된다 (예를 들면, 아넥신 V는 특이적으로 포스파티딜세린에 결합한다). 일부 구현예에서, 특이적으로 결합하는 다른 문자에 대한 하나의 문자의 친화도는 10^{-5} M 이하 (예를 들면, 10^{-6} M 이하, 10^{-7} M 이하, 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 10^{-10} M 이하, 10^{-11} M 이하, 10^{-12} M 이하, 10^{-13} M 이하, 10^{-14} M 이하, 10^{-15} M 이하, 또는 10^{-16} M 이하)의 K_D (해리 상수)로 특정된다. "친화도"는 결합의 강도와 관련되고, 증가된 결합 친화도는 낮은 K_D 와 상호관련된다.

[0041] 본원에 사용되는 용어 "특이적 결합 성분"은 특이적 결합 쌍의 성분 (즉, 2개의 문자, 보통 2개의 상이한 문자, 여기서 이 문자 중 하나, 예를 들면 비공유적인 제1 특이적 결합 성분은 다른 문자, 예를 들면 제2 특이적 결합 성분에 특이적으로 결합됨)과 관련된다.

[0042] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 또한, 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기는 상응하는 자연 발생된 아미노산의 인공적인 화학적 유사체인 아미노산 중합체뿐만 아니라 자연 발생된 아미노산 중합체 및 비-자연 발생된 아미노산 중합체에 적용된다.

- [0043] 환자와 관련된 용어 "샘플"은 혈액 및 생물학적 유래의 다른 액체 샘플, 고형 조직 샘플 예컨대 생검 시편 또는 조직 배양액 또는 이로부터 유도되거나 단리된 세포 및 이의 후대의 것을 포함한다. 또한, 상기 정의는 이의 입수 이후의 임의의 방식으로, 예컨대 시약으로의 처리에 의해, 세정된; 또는 특정 세포 집단, 예컨대 암 세포에 대한 농축으로 조작된 샘플을 포함한다. 상기 정의는 또한 특정 유형의 문자, 예를 들면, 핵산, 폴리펩타이드, 등에 대해 농축된 샘플을 포함한다.
- [0044] 용어 "생물학적 샘플"은 임상적 샘플을 포함하고, 또한 외과적 절제로 얻은 조직, 생검에 의해 얻은 조직, 배양액 중의 세포, 세포 상청액, 세포 용해물, 조직 샘플, 기관, 골수, 혈액, 플라즈마, 혈청, 등을 포함한다. "생물학적 샘플"은 표적 세포 또는 일반 대조군 세포를 포함하거나 또는 이러한 세포 또는 이로부터 유도된 생물학적 유체를 포함하는 것으로 의심되는 샘플 (예를 들면, 암성 세포, 감염된 세포 등), 예를 들면, 이러한 세포로부터 수득된 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드를 포함하는 샘플을 포함한다 (예를 들면, 폴리뉴클레오타이드 및/또는 폴리펩타이드를 포함하는 세포 용해물 또는 다른 세포 추출물). 환자로부터의 병을 앓고 있는 세포를 포함하는 생물학적 샘플은 또한 병을 앓지 않는 세포를 포함할 수 있다.
- [0045] 아넥신-V (PAP-I, 피로코르틴 -V)은 높은 친화성, 예를 들면 10^{-9} 내지 10^{-10} M 범위의 Kd를 갖는 음전하로 하전된 인지질에 결합함으로써 강력한 항응고제로서 작용한다. 아넥신 V는 음전하로-하전된 인지질 분자 주변에 실드를 형성한다. 응고 (응고) 반응으로의 인지질의 유입의 차단 형성은 면역 조절 세포와의 인지질의 상호작용을 방해한다. 인간 아넥신 V의 유전적 서열은 유전자은행, NM_001154로 구할 수 있다. 결정 및 문자 구조는 문헌 [Romisch 및 Paques (1992) J. Mol.Biol.223 (3), 683-704]에 기술되어 있다. 아넥신 V 폴리펩타이드 또는 이의 생물학적 활성 절편 및 변이체 등은 암의 치료에 사용된다. 일부 구현예에서, 아넥신 V는 야생형 또는 천연 서열을 가진다. 다른 구현예에서, 아넥신 V는 아넥신 V-128 돌연변이체 단백질이다.
- [0046] 아넥신 V의 활성 절편은 전장의 아넥신 V와 기능적 또는 결합 특성을 공유한다. 아넥신 V의 에피토프 절편은 전장의 아넥신 V에 결합하는 단일클론성 항체에 결합된다. 아넥신 V의 "활성"은 이러한 단백질에 의해 수행되는 임의의 결합 기능을 의미할 것이다.
- [0047] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 아넥신 V 폴리펩타이드는 적어도 약 50개의 인접 아미노산, 보통 적어도 약 100 개의 인접 아미노산, 적어도 약 150 개의 인접 아미노산, 적어도 약 200 개의 인접 아미노산, 적어도 약 250 개의 인접 아미노산을 포함하고, 이는 비제한적으로 인간 아넥신 V 단백질, 또는 이의 변이체를 포함하는 아넥신 V의 최대 320개의 인접 아미노산을 포함할 수 있고, 이는 추가로 제공된 서열 이외 본 기술분야에 공지된 융합 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 아넥신 V 서열은 포유동물 또는 조류 종 예를 들면 영장류 sp., 특히 인간; 마우스, 랙트 및 햄스터를 포함하는 설치류; 토끼; 말, 소, 개, 고양이, 등으로부터의 것일 수 있다. 인간 단백질이 특히 관심대상이다.
- [0048] 본 발명의 일부 구현예에서, 아넥신 V 단백질, 또는 이의 기능성 절편은 환자에게 투여된다. 본 발명에 유용한 아넥신 V 폴리펩타이드가 또한 자연 발생 아넥신 V 폴리펩타이드의 유도체, 변이체, 및 생물학적 활성 절편 등을 포함한다. "변이체" 폴리펩타이드는 천연 서열 폴리펩타이드와 100% 미만의 서열 동일성을 갖는 아래에 정의된 생물학적 활성 폴리펩타이드를 의미한다. 이러한 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기는 천연 서열의 N- 또는 C-말단에서, 또는 이내에 부가되고; 약 1 내지 40개의 아미노산 잔기가 결실되고, 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 임의로 치환되는 폴리펩타이드; 및 아미노산 잔기가 생성된 생성물이 비-자연 발생된 아미노산을 갖도록 공유적으로 개질된 상기 폴리펩타이드의 유도체를 포함한다. 보통, 생물학적 활성 변이체는 천연 서열 폴리펩타이드와의 적어도 약 90%, 바람직하게는 적어도 약 95%, 더 바람직하게는 적어도 약 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이다.
- [0049] 상기 기재된 바와 같은 아넥신 V 펩타이드의 서열은 서열에서의 표적화된 변화를 생성하도록 본 기술분야에 공지된 다양한 방식으로 변경될 수 있다. 서열 변화는 치환, 삽입 또는 결실일 수 있다. 이러한 변경은 안정성, 특이성, 등에 영향을 줌으로써 단백질의 특성을 변경하기 위해 사용될 수 있다. 클론화된 유전자의 시험관내 돌연변이유발에 관한 기술은 공지되어 있다. 돌연변이를 스캐닝하기 위한 프로토콜의 예는 문헌 [Gustin 등, Biotechniques 14:22 (1993); Barany, Gene 37:111-23 (1985); Colicelli 등, Mol Gen Genet 199:537-9 (1985); 및 Prentki 등, Gene 29:303-13 (1984)]에서 찾을 수 있다. 부위 특이적 돌연변이유발에 대한 방법은 문헌 [Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press 1989, pP. 15.3-15.108; Weiner 등, Gene 126:35-41 (1993); Sayers 등, Biotechniques 13:592-6 (1992); Jones 및 Winistorfer, Biotechniques 12:528-30 (1992); Barton 등, Nucleic Acids Res 18:7349-55 (1990); Marotti 및 Tomich, Gene Anal Tech 6:67-70 (1989); 및 Zhu Anal Biochem 177:120-4 (1989)]에서 찾을 수 있다.

- [0050] 단백질은 다양한 목적을 위해 광범위한 다른 올리고펩타이드 또는 단백질과 결합될 수 있다. 본 펩타이드의 발현을 위해 제공함으로써, 다양한 후발현 개질이 달성될 수 있다. 예를 들면, 적절한 코딩된 서열을 이용함으로써, 당업자는 파르네실화 또는 프레닐화를 제공할 수 있다. 펩타이드는 폐길화될 수 있고, 여기서 폴리에틸렌옥시기는 혈류에서의 향상된 수명을 위해 제공된다. 또한, 펩타이드는 융합 단백질에서의 다른 단백질과 조합될 수 있고, 통상적으로 여기서 IgG 아이소타입의 Fc과 같은 2개의 단백질은 일반적으로 결합되지 않고, 이는 독소, 예컨대 리신, 아브린, 디프테리아 독소, 등, 또는 표적 세포 상의 특정 모이어티를 표적화할 수 있는 특정 결합제와 보체 결합할 수 있다.
- [0051] 아넥신 V는 부가된 작용성을 위해 제공하기 위해, 예를 들면 생체내 안정성을 증가시키기 위해 다른 폴리펩타이드에 융합될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 파트너는 안정한 혈장 단백질이고, 이는 예를 들면 융합으로 존재하는 경우, 특히 이러한 안정한 혈장 단백질이 면역글로불린 불변 도메인인 경우 아넥신 V의 생체내 혈장 반감기를 연장할 수 있다.
- [0052] 본 방법에서 사용하기 위한 아넥신 V는 진핵 또는 원핵 세포로부터 생성될 수 있고, 또는 시험관내에서 합성될 수 있다. 단백질이 원핵 세포에 의해 생산되는 경우, 이는 추가로 언폴딩(unfolding), 예를 들면 열 변성, DTT 환원, 등에 의해 가공될 수 있고, 이는 본 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 추가로 재폴딩될 수 있다. 합성기를 사용함으로써, 자연 발생된 아미노산은 비천연 아미노산으로 치환될 수 있다. 제조의 특정 순서 및 방식은 편의, 경제성, 요구되는 순도 등으로 결정될 것이다.
- [0053] 주요 순서를 변경하지 않는 관심대상의 변형은 폴리펩타이드의 화학적 유도체화, 예를 들면, 아실화, 아세틸화, 카복실화, 아미드화, 등을 포함한다. 또한, 당화의 변형, 예를 들면 이의 합성 및 처리 또는 추가의 처리 단계 과정에서의 폴리펩타이드의 당화 패턴을 개질하는 것에 의해; 예를 들면 당화, 예컨대 포유동물 글리코실화 또는 탈글리코실화 효소에 영향을 주는 효소에 대해 폴리펩타이드를 노출시킴으로써 제조되는 것을 포함한다. 또한, 인산화된 아미노산 잔기, 예를 들면 포스포티로신, 포스포세린, 또는 포스포트레오닌을 갖는 서열이 포함된다.
- [0054] 또한, 본 발명에서, 단백 분해에 대한 이의 저항성을 개선하거나 또는 이들의 치료제로서 더 적합하게 하기 위해 통상적인 분자 생물학적 기술 및 합성 화합물을 사용하여 개질되는 폴리펩타이드가 포함된다. 이러한 폴리펩타이드의 유사체는 천연 발생 L-아미노산, 예를 들면 D-아미노산 또는 비-천연 발생 합성 아미노산 이외 잔기를 함유하는 것을 포함한다. D-아미노산은 일부 또는 모든 아미노산 잔기로 치환될 수 있다.
- [0055] 원하는 경우, 다양한 기가 합성 과정에서 또는 발현 과정에서 펩타이드로 도입될 수 있고, 이는 다른 분자 또는 표면에 연결을 가능하게 한다. 따라서, 시스테인은 금속 이온 복합체, 아미드 또는 에스테르를 형성하기 위한 카복실기, 아미드를 형성하기 위한 아미노기 등에 연결되기 위한 티오에테르, 히스티딘을 제조하기 위해 사용될 수 있다.
- [0056] 또한, 폴리펩타이드는 재조합 합성의 종래의 방법에 따라 단리되고 정제될 수 있다. 용해물은 HPLC, 배제 크로마토그래피, 젤 전기영동, 친화성 크로마토그래피, 또는 다른 정제 기술을 사용하여 정제된 발현 숙주 및 용해물로 제조될 수 있다. 대부분, 생성물의 제조 방법 및 이의 정제와 관련한 오염물과 관련하여 적어도 20 중량%의 원하는 생성물, 보다 일반적으로 적어도 약 75 중량%, 바람직하게는 적어도 약 95 중량%, 및 치료적 목적을 위해 보통 적어도 약 99.5 중량%를 포함하는 조성물이 사용된다. 보통, 백분율은 총 단백질에 기초할 것이다.
- [0057] 본 발명의 일 구현예에서, 아넥신 V 폴리펩타이드는 상기 기재된 바와 같은 아넥신 V 펩타이드의 서열을 갖는 본질적으로 길이에 있어서 대략 약 320개의 아미노산의 폴리펩타이드 서열로 이루어진다. 본원에 기술된 폴리펩타이드의 문맥에서의 "본질적으로 이루어짐"에 의해, 폴리펩타이드는 아넥신 V 서열로 구성되는 것을 의미하고, 이 서열은 임의로 하나 이상의 아미노산 및 폴리펩타이드의 기본 특성(들)에 물질적으로 영향을 주지 않는 다른 잔기에 의해 측정된다.
- [0058] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "면역 체크포인트 저해제"는 하나 이상의 체크포인트 단백질을 전체적으로 또는 부분적으로 감소되고, 억제시키고, 방해하거나 또는 조절되는 분자와 관련된다. 체크포인트 단백질은 T-세포 활성화 또는 기능을 조정한다. 수많은 체크포인트 단백질, 예컨대 CTLA-4 및 그것의 리간드 CD 80 및 CD86; 및 그것의 리간드 PDL1 및 PDL2를 갖는 PDI가 공지되어 있다 (문헌 [Pardoll, Nature Reviews Cancer 12:252-264, 2012]). 이러한 단백질은 T-세포 반응의 공통-자극 또는 억제적 상호작용과 관련된다. 면역 체크포인트 단백질은 자기-내성 및 생리적 면역 반응의 지속시간 및 진폭을 조절하고 유지한다. 면역 체크포인트 저해제는 항체를 포함하거나 또는 항체로부터 유도된다.

[0059]

본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 임의의 아이소타입 또는 하위부류의 당화되고 그리고 비당화된 면역글로불린 또는 특정 결합에 대한 온전한 항체와 경쟁하는 이의 항원-결합 부위에 대한 참조를 포함하고, 이는 달리 언급되지 않는 한, 각각 단클론성 항체, 이중특이적 항체, 미니바디, 도메인 항체, 합성 항체, 항체 모방체, 키메라성 항체, 인간화된 항체, 인간 항체, 항체 융합, 항체 콘주게이트, 단일 사슬 항체, 항체 유도체, 항체 유사체 및 그것의 절편을 포함한다. 또한, 이러한 항체가 시험관내 합성 수단에 의한 제조합 기술을 통한, 면역화를 통해 전체적으로 또는 부분적으로 제조되거나 또는 그렇지 않던 간에 항체 (예를 들면, Fab, Fab', F(ab')₂, 또는 a scFv)의 면역학적 절편을 포함한다. 따라서, 용어 "항체"는 제조합 수단에 의해 제조되고, 발현되고, 생성되거나 또는 단리된 것, 예컨대 (a) 인간 면역글로불린 유전자 또는 이로부터 제조된 하이브리도마에 대해 유전자삽입된 동물 (예를 들면, 마우스)로부터 분리된 항체, (b) 항체로부터 발현하기 위한 형질감염된 숙주세포, 예를 들면 트랜스펙토마로부터 단리된 항체, (c) 제조합, 조합 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 다른 DNA 서열로 면역글로불린 유전자 서열을 분리하는 것을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되고, 발현되고, 생성되거나 단리된 항체를 포함한다. 이러한 항체는 동물의 2개의 상이한 종의 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유도된 가변 및 불변 영역을 가진다. 그러나, 특정 구현예에서, 이러한 항체는 시험관내 돌연변이유발 (또는, 인간 면역글로불린 서열에 대한 동물 유전자삽입이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이 유발)에 가해질 수 있고, 따라서 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열이 특정 종 (예를 들면, 인간)의 생식계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유도되고 이와 관련되는 경우, 생체내 종의 항체 생식계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재할 수 없는 서열이다. 달리 나타내지 않는 한, 용어 "항체"는 2개의 전장의 중쇄 및 2개의 전장의 경쇄를 포함하는 항체 이외, 이의 유도체, 변이체, 절편, 및 이의 무테인을 포함한다. 일부 경우에서, "항체"는 단지 무거운 사슬을 포함할 수 있는 낙타과에서 자연 발생된 항체와 같은 소수의 사슬을 포함할 수 있다.

[0060]

본원에 사용되는 바와 같은, 용어 "투여"는 대상체 또는 시스템으로의 조성물의 투여와 관련된다. 동물 대상체 (예를 들면, 인간)에의 투여는 임의의 적절한 경로에 의한 것일 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 투여는 기관지 (기관지 점적주입에 의한 것을 포함함), 구강, 장관, 진피간, 동맥내, 진피내, 위내, 수질내, 근육내, 비강내, 복강내, 척추강내, 정맥내, 심실내, 특정 장기 (예를 들면 간내) 내, 점막, 비강, 경구, 직장, 피하, 설하, 국소, 기관 (기관내 점적에 의한 것을 포함함), 경피, 질 및 유리체의 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 간헐적 투여를 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여는 적어도 선택된 기간 동안 연속적인 투여 (예를 들면, 관류)를 수반할 수 있다. 본 기술분야에 알려진 바와 같이, 항체 요법은 일반적으로 (예를 들면, 정맥내 또는 피하 주사에 의해) 경구로 투여된다.

[0061]

본 발명의 방법은 방사선 요법 예컨대 국부 종양 방사선 요법을 포함하여 세포감소 요법의 조합을 위해 제공되고, 이는 조사된 암 세포를 사멸하고 면역요법 (IT)을 사용하여 종양에서의 면역 세포에 근접된 항원을 방출하고, 이는 조사된 종양에 대해 국부 면역 반응을 촉진하고, 면역 시스템이 조사 장 외부에서의 전이성 질환의 부위로의 반응을 야기한다.

[0062]

방사선 요법은 항원 전달 및 항원 제시 세포에 대한 T 세포 반응을 개선하는 것으로 알려져 있다. APC 제시 종양 항원에 의한 T 세포 활성화를 조절하는 인자는 TCR:MHC 상호작용, 상호자극, 및 사이토카인을 포함한다. 상호자극은 T 세포 및 항원 제시 세포의 세포 표면에서 잔류하는 보조자극 및 보조억제의 수용체/리간드 쌍에 의해 결정된다. 면역 기억을 발생하고 생성하기 위한 효과적인 적응성 면역 반응을 위해, 상호작용이 요구된다. CD28, ICOS, HVEM, CD27, CD30, CD40L, OX40, 4-1BB, TIM-1, 및 SLAM이 주요 공동자극 수용체이다.

[0063]

예를 들면, 이온화 방사선 (IR)은 치료되는 면적에서 세포를 손상시키거나 파괴하는 에너지를 부가함으로써 암 환자의 약 60%를 치료하는데 사용되고, 본 발명의 목적을 위해 종래의 용량 및 요법으로, 또는 감소된 용량으로 전달될 수 있다. 세포에 대한 방사선 손상은 비특이적이고, 복합체는 DNA에 영향을 준다. 요법의 효능은 일반 세포보다 큰 암 세포에 대한 세포 손상에 좌우된다. 방사선요법은 모든 유형의 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 일부 유형의 방사선 요법은 광자, 예컨대 X-선 또는 감마선과 관련된다. 암 세포로 방사선을 전달하기 위한 다른 기술은 내부 방사선 요법이고, 이는 방사선량이 작은 면적에 놓축되도록 종양 또는 체강으로 직접적으로 방사성 이식물을 배치한다. 이온화 방사선의 적합한 용량은 적어도 약 2 Gy 내지 약 10 Gy, 보통 약 5 Gy 이하의 범위일 수 있다. 자외선 방사선의 적합한 용량은 적어도 약 5 J/m² 내지 약 50 J/m², 보통 약 10 J/m² 이하의 범위일 수 있다.

[0064]

국소로 투여된 아쥬반트와 달리, 상호자극-향상 요법 예컨대 아넥신 V은 정맥내로 단회 용량으로서 투여될 수 있고, 침습 과정 없이 RT 이후 국소 반응을 '높일 수 있다. 이러한 방식으로, 아넥신 V는 내부 종양 표적에 적

용되는 국소 RT 또는 단일 증상 전이와 동반하여 사용될 수 있고, RT-관련된 면역 반응을 촉진하고, 전신 (압스 코팔) 면역 반응을 발생시킨다.

[0065] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "병용 요법"은 대상체가 2개 이상의 치료 요법 (예를 들면, 2개 이상의 치료제)에 동시에 노출되는 경우와 관련된다. 일부 구현예에서, 2개의 제제는 동시에 투여될 수 있고; 일부 구현예에서, 이러한 제제는 순차적으로 투여될 수 있고; 일부 구현예에서, 이러한 제제는 중첩 투여 요법으로 투여된다.

[0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "투여 요법"은 통상적으로 일정 기간으로 나누어지는 대상체로 개별적으로 투여되는 한 세트의 단위 용량 (통상적으로 1개 초파)과 관련된다. 일부 구현예에서, 특정 치료제는 하나 초파의 용량을 수반할 수 있는 권고된 투여 요법을 가진다. 일부 구현예에서, 투여 요법은 동일한 기간으로 서로 분리되는 각각의 복수의 용량을 포함하고; 일부 구현예에서, 용량 요법은 복수의 용량 및 개개의 용량으로 분리되는 적어도 2개의 상이한 기간을 포함한다. 일부 구현예에서, 투여 요법 내의 모든 용량은 동일한 단위 투여양의 것이다. 일부 구현예에서, 투여 요법 내의 상이한 용량은 상이한 양의 것이다. 일부 구현예에서, 투여 요법은 제1 투여량으로의 제1 투여, 이후 제1 투여량과 상이한 제2 투여량으로의 하나 이상의 추가의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여 요법은 제1 투여량으로의 제1 투여, 이후 제1 투여와 동일한 제2 투여에서의 하나 이상의 추가의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 투여 요법은 관련 집단에 대해 투여되는 경우 (즉, 치료적 투여 요법임) 원하거나 유리한 결과와 상관된다.

[0067] 맥락으로부터 달리 명확하지 않는 한, 본 발명의 모든 성분, 단계 또는 특징은 다른 성분, 단계 또는 특징과의 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0068] 분자 및 세포 생화학에서의 일반 방법은 문헌 [Molecular Cloning:A Laboratory Manual, 3rd Ed.(Sambrook 등, Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed.(Ausubel 등 eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag 등, John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner 등 eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kaplifit & Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I.Lefkovits ed.,Academic Press 1997); 및 Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)]과 같은 이러한 표준 문헌에서 발견될 수 있다. 본 개시물에 언급된 유전자 조작을 위한 시약, 클로닝 백터, 및 키트는 상업적 판매자 예컨대 BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, 및 ClonTech로부터 이용가능하다.

[0069] 본 발명은 본 발명의 실시를 위한 바람직한 방식을 포함하도록 본 발명의 발명자에 의해 발견되거나 제시되는 특정 구현예와 관련하여 기술된다. 본 개시물과 관련하여, 수많은 수정과 변화는 본 발명의 의도된 범위를 벗어남 없이 예시되는 특정 구현예에서 이루어질 수 있음을 본 기술분야의 당업자에게 이해될 수 있다. 예를 들면, 코돈 중복으로 인해, 단백질 서열에 영향을 주지 않고 기저 DNA 서열에서 변화가 이루어질 수 있다. 또한, 생물학적인 기능적 등가성 고려사항으로 인해, 변화, 특히 보존적 변화(conservative change)가 종류 또는 양에서의 생물학적 작용에 영향을 주지 않고 단백질 구조에서 이루어질 수 있다. 모든 이러한 수정은 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0070] 방법

[0071] 암 면역요법

[0072] 일 양태에서, 본 발명은 종양 세포 성장과 관련된 면역억제를 감소시키는 것에 의한 암의 치료 방법을 개시하고 있다. 본 발명의 방법은 유효량의 아넥신 V를 투여하여 종양 세포 상의 PS를 차단하고, 이에 의해 종양 세포와 면역조절 세포 사이의 바람직하지 않은 상호작용을 방해한다.

[0073] 일부 구현예에서, 아넥신 V의 투여 방법은 예를 들면 면역 체크포인트 저해제를 표적화하는 항체와 조합하여 투여함으로써 종양 세포와 면역조절 세포 사이의 상호작용을 표적화하는 제2 요법과 조합된다. 조합은 단일요법으로서의 아넥신 V 또는 체크포인트 저해제의 효과인 개개의 요법의 효과와 관련하여 상승작용되는 종양 성장 또는 생존에 대한 효과를 제공할 수 있다.

[0074] 암 면역요법은 암을 거부하는 면역계의 사용이다. 주요 전제는 환자의 면역계가 질환과 관련된 악성 종양 세포를 공격하도록 자극하는 것이다. 이는 환자 자신의 면역계가 파괴될 표적으로서 종양 세포를 인식하는 것으로 훈련된 환자의 면역을 통한 것이거나, 또는 환자의 면역계가 종양 세포를 파괴하도록 소집된 면역억제를 감소시키는 치료제의 투여를 통한 것일 수 있다.

- [0075] 면역계가 환경 인자에 반응하기 때문에, 이는 자기 및 비자기 사이의 구별에 기초하여 암의 개시의 결과로서 일어나는 수많은 종류의 종양 세포가 이는 환자 자신의 면역계에 의해 더 많거나 적게 허용되는 것을 겪게 되고, 이는 종양 세포가 본질적으로 적절한 조절 제어 없이 성장하고, 분열되고, 확산되는 환자 자신의 세포이기 때문이다. 그러나, 이러한 사실에도 불구하고, 수많은 종류의 종양 세포는 세포 유형 및/또는 이의 환경에 대해 부적절하거나, 또는 이는 단지 유기체 발달 과정에서 일반적으로 존재하는 특이한 항원을 나타낸다. 다른 종류의 종양 세포는 건강한 세포의 표면 상에 드물거나 부재하는 세포 표면 수용체를 나타내고, 이는 종양 세포의 비제어적인 성장 및 분화를 야기하는 세포 신호 경로를 활성화하는 것과 관련된다. 면역계의 효력 및 특이성에도 불구하고, 종양 항원으로의 예방접종은 일반적으로 마우스 및 인간에서 암을 근절하지 못한다.
- [0076] 본 발명의 방법은 신체 선천적 방어 시스템이 암 세포에 대해 작용하게 한다. 방법은 대상체를 비제한적으로 인간 아넥신 V 단백질 또는 이의 활성 절편 또는 유도체를 포함하는 치료적 용량의 아넥신 V 제제로 치료하기 위해 제공된다. 본 방법은 대상체에게 치료적 유효 용량의 아넥신 V 제제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0077] 치료적 유효 용량의 아넥신 V 제제의 투여는 다수의 상이한 방식으로 달성될 수 있다. 치료적 유효 용량의 적합한 투여는 단일 용량의 투여를 수반할 수 있고, 또는 매일, 반-매주, 매주, 매2주에 한번, 한달에 한번, 일년에 한번 등. 용량의 투여를 수반할 수 있다.
- [0078] 인간에서의 유효량은 최대 약 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 최대 약 1 mg/kg, 최대 약 1.5 mg/kg, 최대 약 2 mg/kg, 최대 약 5 mg/kg, 최대 약 7.5 mg/kg, 최대 약 10 mg/kg, 최대 약 20 mg/kg일 수 있다. 유효 용량의 아넥신 V는 다른 치료 방식과 조합될 수 있고, 이는 비제한적으로 화학치료 약물, 방사선 요법, 항암 생물 제제 예컨대 종양 항원에 유도된 단클론성 항체, VEGF 등 및 기타 다른 것을 포함한다.
- [0079] 일부 경우에서, 치료적 유효량은 상승된 농도 (예를 들면, 증가된 용량)의 2회 이상의 용량으로서 투여되고, 여기서 (i) 모든 용량은 치료적 용량이거나, 또는 (ii) 하위-치료 용량 (또는 2개 이상의 하위-치료 용량)은 초기에 특정되고, 치료 용량은 상기 단계적 상승에 의해 달성된다. 상승하는 농도 (예를 들면, 증가된 용량)을 예시하는 하나의 비제한적인 예로서, 치료적 유효 용량은 매주 투여될 수 있고, 이는 하위-치료 용량으로 시작되고, 각각의 후속 용량은 특정한 증분 (예를 들면, 0.5 mg/kg 까지)까지 또는 변화된 증분까지 증가될 수 있고, 치료적 용량이 달성될 때까지, 이 시점의 투여가 중지될 수 있거나 지속될 수 있다 (예를 들면, 지속된 치료 용량). 일부 구현예에서, 치료적 유효 용량의 투여는 지속적인 주입일 수 있고, 용량은 시간에 따라 변경될 수 있다 (예를 들면 상승될 수 있다). 일부 구현예에서, 예를 들면, 방사선 요법, 면역 체크포인트 저해제 등을 사용한 병용 요법이 또한 투여된다.
- [0080] 용량 및 빈도는 환자에서의 제제의 반감기에 좌우되어 변화될 수 있다. 이러한 지침은 활성제의 분자량에 대해 조정될 수 있음은 본 기술분야의 당업자에게 이해될 수 있을 것이다. 또한, 용량은 국제화된 투여, 예를 들면 종양내, 등., 또는 전신 투여, 예를 들면, i.m., i.P., i.v., 등을 위해 변화될 수 있다.
- [0081] 본원에 사용되는 바와 같은 용어 "암"은 세포의 비정상, 비조절된 성장에 의해 야기되는 다양한 질병과 관련된다. "암 세포"로 지칭되는 암을 야기할 수 있는 세포는 특징적인 특성 예컨대 조절되지 않는 증식, 불멸성, 전이성 포텐셜, 급속 성장 및 증식 속도, 및/또는 특정 전형적인 형태적 특징을 가진다. 암은 비제한적으로 (예를 들면, 임상 또는 방사선적 수단에 의해) 종양 또는 종양들의 존재를 검출하는 것, 종양내 또는 다른 생물학적 샘플 (예를 들면, 조직 생검으로부터)로부터 세포를 조사하는 것, 암의 표시하는 혈액 마커를 측정하는 것, 및 암을 표시하는 유전자형을 검출하는 것을 포함하는 다수의 방식 중 임의의 것으로 검출될 수 있다. 그러나, 하나 이상의 상기 검출 방법에서의 부정적 결과는 필수적으로 암의 부재를 나타내는 것은 아니고, 예를 들면, 암 치료에 대한 완전한 반응을 나타내는 환자가 후속 재발에 의해 입증되는 바와 같이 암을 가질 수 있다.
- [0082] 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 "암"은 암종 (예를 들면, 제자리 암종, 침습성 암종, 전이성 암종) 및 전암-악성 질병, 즉, 이의 조직학적 기원과 별개의 신형태적 변화를 포함한다. 용어 "암"은 발병된 조직 또는 세포 응집의 임의의 단계, 등급, 조직형태학적 특징, 침습력, 공격성 또는 악성에 제한되지 않는다. 특히 단계 0 암, 단계 I 암, 단계 II 암, 단계 III 암, 단계 IV 암, 등급 I 암, 등급 II 암, 등급 III 암, 악성 암 및 원발성 암종이 포함된다.
- [0083] 본 발명의 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 유형은 비제한적으로 부신 피질암, 항문암, 재생불량빈혈, 담도암, 방광암, 골암, 골 전이, 뇌암, 중추신경계 (CNS) 암, 말초 신경계 (PNS) 암, 유방암, 자궁경부암, 소아기 비-호지킨 림프종, 결장 및 직장 암, 자궁내막 암, 식도 암, 유잉 패밀리의 종양 (예를 들면 유잉 육종), 안암,

담낭암, 위장 유암종, 위장 기질 종양, 임신 용모성 질환, 모발 세포 백혈병, 호지킨 림프종, 카포시 육종, 신장암, 후두 및 하인두 암, 급성 림프구 백혈병, 급성 골수 백혈병, 소아 백혈병, 만성적 림프구성 백혈병, 만성적 골수성 백혈병, 간암, 폐암, 폐 유암종, 비-호지킨 림프종, 남성 유방암, 악성 중피종, 다발성 골수종, 골수 이형성 증후군, 골수증식성 장애, 비강 및 부비강암, 비인두 암, 신경교세포종, 구강 및 구강인두 암, 골육종, 난소암, 췌장암, 음경암, 뇌하수체 종양, 전립선암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액샘 암, 육종, 흑색종 피부암, 비-흑색종 피부암, 위암, 고환암, 가슴샘 암, 갑상선암, 자궁암 (예를 들면 자궁 육종), 이행 세포 암종, 질암, 외음부암, 중피종, 편평 세포 또는 표피모양 암종, 기관지 선종, 용모막암종, 두경부 암, 기형암종, 또는 발렌스트롬의 거대글로불린혈증을 포함한다.

[0084] 바람직한 구현예에서, 본 발명은 고형암, 예를 들면, 결장직장암, 폐암, 간암, 유방암, 전립선암, 난소암 또는 췌장암을 치료하기 위해 사용된다.

[0085] 임상적 효능

[0086] 종양 성장 및 질환 진행은 본 발명의 방법을 통해 암의 치료 과정 및 이후 모니터링된다. 임상적 효능은 본 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 치료 방법의 임상적 효능은 임상적 이득 비율 (CBR)을 측정함으로써 결정된다.

[0087] 임상적 이득 비율은 완벽한 차도 (CR)의 환자의 백분율, 부분적 차도 (PR)의 환자의 수, 및 요법의 종료로부터 적어도 6개월 시점에서의 안정한 질환 (SD)을 갖는 환자의 수의 합을 결정함으로써 측정된다. 이러한 식에 대한 약기는 $CBR = CR + PR + SD$ 개월이다. 일부 구현예에서, 본 치료 방법에 대한 CBR은 적어도 약 50%이다. 일부 구현예에서, 본 치료 방법에 대한 CBR은 적어도 약 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상이다.

[0088] 약제학적 조성물.

[0089] 적합한 아넥신 V 제제는 치료적 용도 예를 들면 인간 치료에 적합한 약제학적 조성물에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 치료적 독립체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 에스테르 또는 용매화물을 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 아넥신 V 제제의 사용은 다른 치료제 (예를 들면, 또 다른 항암제)와 조합되는 사용을 포함한다. 본 발명의 1종 이상의 아넥신 V 제제를 포함하는 치료적 제형은 동결건조된 제형 또는 수용액의 형태로의 선택적인 생리적으로 허용가능한 캐리어, 부형제 또는 안정제와 원하는 정도의 순도를 갖는 제제를 혼합함으로써 저장을 위해 제조된다 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]). 제제 조성물은 양호한 의약 실시와 일치되는 방식으로 제형화되고, 투여되고, 그리고 투여될 것이다. 본 맥락에서 고려되는 인자는 치료되는 특정 장애, 치료되는 특정 포유동물, 개개의 환자의 임상적 조건, 장애의 원인, 제제의 전달 부위, 투여 방법, 투여의 일정, 및 의사에게 공지된 다른 인자를 포함한다.

[0090] 아넥신 V 제제는 임의의 적합한 수단, 특히 비경구에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내 (볼리스 또는 슬로우 드립(slow drip)), 동맥내, 복강내, 척추강내, 종양내, 또는 피하 투여를 포함한다.

[0091] 아넥신 V 제제는 필요하지 않으나, 임의로 활성을 강화하거나, 또는 그렇지 않으면 치료적 효과를 증가시키는 하나 이상의 제제와 함께 제형화된다. 이는 일반적으로 이하에서 사용되는 바와 동일한 용량 및 투여 경로 또는 지금까지 이용된 용량의 1 내지 99%로 사용된다.

[0092] 아넥신 V 제제는 대개 활성 치료제 및 다른 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 투여된다. 바람직한 형태는 투여 및 치료적 응용의 의도된 방식에 좌우된다. 또한, 조성물은 원하는 제형에 따라 약제학적으로-허용가능한, 무독성 캐리어 또는 희석제를 포함할 수 있고, 이는 동물 또는 인간 투여를 위해 약제학적 조성물을 제형화하기 위해 일반적으로 사용되는 비히클로서 정의된다. 희석제는 조합의 생물학적 활성에 영향을 주지 않도록 선택된다. 이러한 희석제의 예는 증류수, 생리적 포스페이트-완충된 염수, 링거액, 텍스트로오스 용액, 및 한스 용액이다. 또한, 약제학적 조성물 또는 제형은 다른 캐리어, 아쥬반트, 또는 비독성, 비치료적, 비면역원성 안정제 등도 포함할 수 있다.

[0093] 일부 다른 구현예에서, 약제학적 조성물은 큰, 서서히 대사작용된 거대분자 예컨대 단백질, 다당류 예컨대 키토산, 폴리락트산, 폴리글리콜 산 및 코폴리머 (예컨대 라텍스 작용화된 세파로오스TM, 아가로스, 셀룰로오스, 등), 폴리머성 아미노산, 아미노산 코폴리머, 및 지질 응집체 (예컨대 오일 액적 또는 리포좀)을 포함할 수 있다.

[0094] 캐리어는 연결기를 통해 또는 직접적인 공유 결합, 및 비공유 결합을 포함하는 다양한 방식으로 제제를 함유할

수 있다. 적합한 공유 결합 캐리어는 단백질 알부민, 펩타이드, 및 다당류 예컨대 아미노렉스트란을 포함하고, 이의 각각은 모이어티의 부착을 위한 다중 부위를 가진다. 캐리어는 비공유결합 회합, 예컨대 비공유결합 또는 캡슐화에 의해 항-CD47 제제 또는 프라이머 제제를 함유할 수 있다. 캐리어의 특성은 본 발명의 목적을 위해 사용성이거나 또는 불용성일 수 있다. 본 기술분야의 당업자는 항-CD47 제제 및/또는 프라이머 제제를 결합하기 위한 다른 적합한 캐리어를 잘 인지할 것이거나, 또는 일상적인 실험 과정을 사용하여 확인할 수 있을 것이다.

[0095] 적합한 캐리어, 부형제, 또는 안정제는 이용되는 용량 및 농도에서 수령체에 대해 비독성이고, 베피 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코오스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 퀸레이트제 예컨대 EDTA; 당류 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스 또는 소르비톨; 염 형성 반대 이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들면, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 TWEENTM, 플루로닉스TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 생체내 투여를 위해 사용되는 제형은 멸균되어야 한다. 이는 멸균된 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0096] 또한, 활성 성분은 예를 들면 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들면 각각 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포좀, 알부민 마이크로구형체, 마이크로에멀젼, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀젼에서의 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸 메타실레이트) 마이크로캡슐에 포집될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0097] 방사선핵종 제제에 대해 특이적인 캐리어 및 링커는 방사선활로젠햄된 소분자 및 퀸레이트 화합물을 포함한다. 방사선핵종 퀸레이트는 금속, 또는 금속산화물, 방사선핵종을 결합하기 위한 공여체 원자로서 질소 및 황 원자를 함유하는 것을 포함하는 퀸레이트 화합물로부터 형성될 수 있다.

[0098] 본 발명에서 영상화 모이어티로서 사용하기 위한 방사선촬영 모이어티는 상대적으로 큰 원자, 예컨대 금, 이리듐, 테크네튬, 바륨, 탈륨, 요오드, 및 그것의 동위원소를 갖는 화합물 및 퀸레이트를 포함한다. 덜 독성인 방사선촬영 이미지화 모이어티, 예컨대 요오드 또는 요오드 동위원소는 본 발명의 방법에 이용되는 것이 바람직하다. 이러한 모이어티는 허용가능한 화학 링커 또는 퀸레이트화 캐리어를 통한 아넥신 V 제제와 콘주케이션될 수 있다. 본 발명에 사용하기 위한 양전자 방출 모이어티는 ¹⁸F를 포함하고, 이는 아넥신 V 제제와의 불소화 반응에 의해 용이하게 콘주케이션될 수 있다.

[0099] 통상적으로, 조성물은 액체 용액 또는 혼탁액으로서의 주사제로서 제조될 수 있고; 주입 이전에 용액, 또는 혼탁액, 액체 비히클에 적합한 고체 형태가 제조될 수 있다. 제제는 또한 리포좀 또는 마이크로 입자 예컨대 상기 논의된 바와 같은 향상된 아쥬반트 효과를 위한 폴리락타이드, 폴리글라이콜라이드, 또는 공중합체에서 에멀젼화되거나 캡슐화될 수 있다. 문헌 [Langer, Science 249:1527, 1990 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119, 1997]. 본 발명의 제제는 세포 주사 또는 임플란트 제제의 형태로 투여될 수 있고, 이는 활성 성분의 지속적 또는 맥동 방출을 가능하도록 이러한 방식으로 제형화될 수 있다. 약제학적 조성물은 일반적으로 멸균되고, 실질적으로 등장성이고, 미국식품 의약품 안전청의 우수 제약품 제조 관리 (GMP) 제제에 완전하게 준수하도록 제형화된다.

[0100] 아넥신 V 제제의 독성은 예를 들면, LD₅₀ (집단의 50%에 치명적인 용량) 또는 LD₁₀₀ (집단의 100%에 치명적인 용량)을 결정함으로써 실험 동물의 세포 배양액에서의 표준 약제학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 및 치료적 효과 사이의 용량 비율은 치료적 지수이다. 이러한 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 수득한 데이터는 인간에 사용하기 위한 치료적 용량 범위 및/또는 촉발하는 용량 범위를 추가로 최적화하기 위해 사용될 수 있다. 정확한 제형, 투여 경로 및 용량은 환자의 조건과 관련하여 개인적 의사에 의해 선택될 수 있다.

[0101] 병용 요법

[0102] 일부 구현예에서, 본 방법은 방사선 요법, 항-종양제, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 전구약물을 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 항-종양제는 비제한적으로 항종양 알킬

화제, 항종양 항대사물질, 항종양 항생제, 식물-유도된 항종양 제제, 항종양 오르가노백금 화합물, 항종양 캄포테신 유도체, 항종양 티로신 키나제 저해제, 단클론성 항체, 인터페론, 생물학적 반응 조절제, 및 항종양 활성을 갖는 다른 제제, 또는 그것의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "병용 요법"은 대상체가 2개 이상의 치료 요법 (예를 들면, 2개 이상의 치료제)에 동시에 노출되는 경우와 관련된다. 일부 구현예에서, 2개의 제제는 동시에 투여될 수 있고; 일부 구현예에서, 이러한 제제는 순차적으로 투여될 수 있고; 일부 구현예에서, 이러한 제제는 중첩 투여 요법으로 투여된다.

- [0103] 일부 구현예에서, 본 방법은 본원에 개시된 본 방법과 조합되는 하기 요법 중 하나 이상으로 이를 필요로 하는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0104] 본 발명에서 사용되는 적합한 항신생물성 항종양제는 비제한적으로 알킬화제, 항대사물질, 천연 항신생물성 제제, 호르몬 항신생물성 제제, 혈관신생 저해제, 분화하는 시약, RNA 저해제, 항체 또는 면역치료적 제제, 유전자 요법 제제, 소분자 효소 저해제, 생물학적 반응 조절제, 및 항-전이성 제제를 포함한다.
- [0105] 알킬화제는 거대분자 예컨대 암세포의 DNA의 알킬화를 통해 작용하는 것으로 알려져 있고, 이는 보통 강한 친전자체이다. 이러한 활성은 DNA 합성 및 세포 분열을 방해할 수 있다. 본원에 사용하기에 적합한 알킬화제의 예는 질소 머스타드 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함하고, 이는 사이클로포스파마이드, 이포스파마이드, 클로르암부실, 에스트라무스틴, 메클로르에타민 하이드로클로라이드, 멜팔란, 및 우라실 머스타드를 포함한다. 알킬화제의 다른 예는 알킬 살포네이트 (예를 들면 부설판), 니트로소우레아 (예를 들면 카르무스틴, 로무스틴, 및 스트렙토조신), 트리아젠 (예를 들면 다카바진 및 테모졸로마이드), 에틸렌이민/메틸멜라민 (예를 들면 알트레타민 및 티오텐파), 및 메틸하이드라진 유도체 (예를 들면 프로카바진)를 포함한다. 알킬화제 군에 카보플라틴, 시스플라틴, 및 옥살리플라틴을 포함하는 알킬화-유사 백금-합유 약물이 포함된다.
- [0106] 항대사성 항신생물성 제제는 구조적으로 천연 대사물과 유사하고, 암 세포의 일반 대사 과정 예컨대 핵산 및 단백질의 합성에 관련된다. 이는 암 세포의 대사 과정으로 방해되게 하는 천연 대사물과 충분하게 상이하다. 본 발명에 사용되기에 적합한 항대사성 항신생물성 제제는 이들이 영향을 주는 대사 과정에 따라 분류될 수 있고, 이는 비제한적으로 엽산, 피리미딘, 퓨린, 및 시티딘의 유사체 및 유도체를 포함할 수 있다. 본원에 사용되기에 적합한 제제의 엽산 그룹의 성분은 비제한적으로 메토트렉세이트 (아메토프테린), 폐메트렉세드 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 피리미딘은 비제한적으로 사이타라빈, 플록수리딘, 플루오로우라실 (5-플루오로우라실), 카페시타빈, 쟈시타빈, 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 퓨린 제제는 비제한적으로 머캅토퓨린 (6-머캅토퓨린), 웬토스타틴, 티오구아닌, 클라드리빈, 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 시티딘 제제는 비제한적으로 사이타라빈 (시토신 아라비노드사이드), 아자시티딘 (5-아자시티딘) 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다.
- [0107] 천연 항신생물성 제제는 세포분열저지성 제제, 항생제 항신생물성 제제, 캄프토테신 유사체, 및 효소를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 세포분열저지성 제제는 비제한적으로 빈카 알카로이드 유사 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 비노렐빈, 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 이는 일일초(Madagascar periwinkle plant)로부터 유도되고, 보통 암 세포의 미세소관에서의 튜불린에 결합되는 M 단계에 특이적인 세포 주기-특이적이다. 본원에 사용되기에 적합한 다른 세포분열저지성 제제는 포도필로톡신이고, 이는 비제한적으로 에토포시드, 테니포시드, 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 이러한 시약은 주로 세포 주기의 G2 및 S 말기를 표적화한다.
- [0108] 또한, 천연 항신생물성 제제 중에서 항생제 항신생물성 제제가 포함된다: 항생제 항신생물성 제제는 보통 암 세포 DNA와 상호작용을 통한 항-종양 특성을 갖는 항미생물 약물이다. 본원에 사용되기에 적합한 항생제 항신생물성 제제는 비제한적으로 베로마이신, 닉티노마이신, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미토마이신, 미톡산트론, 웬토스타틴, 플리카마이신, 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다.
- [0109] 또한, 천연 항신생물성 제제 분류는 캄프토테신 유사체 및 유도체를 포함하고, 이는 본원에 사용하기에 적합하고, 캄프토테신, 토포테칸, 및 이리노테칸을 포함한다. 이를 제제는 주로 핵 효소 토포이소마라제 I를 표적화하여 작용한다. 천연 항신생물성 제제 하의 다른 하위부류는 효소, L-아스파라기나제 및 그것의 변이체이다. L-아스파라기나제는 순환하는 아스파라긴을 아스파르트산 및 암모니아로의 가수분해를 촉매화시킴으로써 L-아스파라긴의 일부 암 세포를 제거함으로써 작용한다.
- [0110] 호르몬 항신생물성 제제는 주로 전립선 조직, 유방 조직, 자궁내막 조직, 난소 조직, 림프종, 및 백혈병과 관련된 호르몬-의존적 암 세포에 대해 작용한다. 이러한 조직은 글루코코르티코이드, 프로게스틴, 에스트로겐, 및 안드로겐과 같은 제제의 이러한 부류의 제제에 반응하고 좌우될 수 있다. 작용제 또는 길항제인 유사제 및 유도

체 모두는 종양을 치료하기 위해 본 발명에 사용되기에 적합한다. 본원에 사용하기에 적합한 글루코코르티코이드 작용제/길항제의 예는 텍사메타손, 코트리졸, 코르티코스테론, 프레드니손, 미페프리스톤 (RU486), 그것의 유사체 및 유도체이다. 본원에 사용하기에 적합한 프로게스틴 작용제/길항제 하위부류는 비제한적으로 하이드록시프로게스테론, 메드록시프로게스테론, 메게스트롤 아세테이트, 미페프리스톤 (RU486), ZK98299, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 에스트로겐 작용제/길항제 하위부류의 예는 비제한적으로 에스트로겐, 타목시펜, 토레미펜, RU58668, SR16234, ZD164384, ZK191703, 풀베스트란트, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 에스트로겐 제조를 억제하는 본원에 사용되기에 적합한 방향화효소 저해제의 예는 비제한적으로 안드로스테네디온, 포르메스탄, 엑세메스탄, 아미노글루테티미드, 아나스트로졸, 레트로졸, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 안드로겐 작용제/길항제 하위부류로부터의 예는 비제한적으로 테스토스테론, 디하이드로테스토스테론, 플루옥시메스테론, 테스토락톤, 테스토스테론 에난테이트, 테스토스테론 프로피오네이트, 성선자극호르몬-방출 호르몬 작용제/길항제 (예를 들면 륨프롤라이드, 고세렐린, 트립토렐린, 부세렐린), 디에틸스틸베스트롤, 아바렐릭스, 사이프로테론, 플루타미드, 닐루타마이드, 바이칼루타마이드, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다.

[0111]

신생혈관 저해제는 종양의 혈관형성을 억제함으로써 작용한다. 신생혈관 저해제는 RNA 기능을 표적화하는 소분자 제제, 항체 제제, 및 제제를 포함하는 다양한 제제를 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 신생혈관 저해제의 예는 비제한적으로 라니바이주맙, 베바시주맙, SU11248, PTK787, ZK222584, CEP-7055, 안지오자임, 달테파린, 탈리도마이드, 수라민, CC-5013, 콤브레티스타틴 A4 포스페이트, LY317615, 콩추출 이소플라본, AE-941, 인터페론 알파, PTK787/ZK 222584, ZD6474, EMD 121974, ZD6474, BAY 543-9006, 셀레콕십, 할로푸기논 하이드로브로마이드, 베바시주맙, 그것의 유사체, 변이체, 또는 유도체를 포함한다.

[0112]

분화 제제는 암 세포가 분화하는 것을 유도하는 기전을 통해 종양 성장을 저해한다. 본원에 사용되기에 적합한 이러한 제제의 이러한 하나의 하위부류는 비제한적으로 비타민 A 유사체 또는 레티노이드, 및 폐록시솜 증식체-활성화된 수용체 작용제 (PPAR)를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 레티노이드는 비제한적으로 비타민 A, 비타민 A 알데하이드 (레티날), 레티노산, 웬레티나이드, 9-시스-레티노이드 산, 13-시스-레티노이드 산, 모든-트랜스-레티노산, 이소트레티노인, 트레티노인, 레티닐 팔미테이트, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 PPAR의 작용제는 비제한적으로 트로글리타존, 시글리타존, 테사글리타자르, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다.

[0113]

항체 제제는 암 세포에서 선택적으로 발현된 표적을 결합하고, 표적과 결합된 세포를 사멸시키기 위해 콘주케이트를 이용하거나, 또는 암 세포를 파괴하기 위한 신체 면역 반응을 유도할 수 있다. 면역치료제는 다클론성 또는 단클론성 항체를 포함할 수 있다. 항체는 비-인간 동물 (예를 들면 마우스) 및 인간 구성성분을 포함할 수 있거나, 또는 전적으로 인간 구성성분 ("인간화된 항체")를 포함할 수 있다. 본원에 사용하기에 적합한 단클론성 면역치료제의 예는 비제한적으로 리툭시맙, 토실투모맙, 이브리투모맙을 포함하고, 이는 CD-20 단백질을 표적화한다. 본원에 사용하기에 적합한 다른 예는 트라스투주맙, 에드레콜로맙, 베바시주맙, 세톡시맙, 암종배아항원 항체, 젠투주맙, 알렘투주맙, 마파투무맙, 파니투무맙, EMD 72000, TheraCIM hR3, 2C4, HGS-TR2J, 및 HGS-ETR2를 포함한다.

[0114]

유전자 치료제는 유전자 복제물을 특정 부류의 환자의 세포에 삽입되고, 암 및 비암성 세포 모두를 표적화할 수 있다. 유전자 치료의 목표는 기능성 유전자로 변경된 유전자를 대체하여 암에 대한 환자의 면역 반응을 자극하고, 암 세포를 화학요법에 보다 민감성 있게 하고, "자살" 유전자를 암 세포로 배치하거나, 또는 혈관신생을 저해할 수 있다. 유전자는 바이러스, 리포좀, 또는 다른 캐리어 또는 백터를 사용하는 표적 세포로 전달될 수 있다. 이는 환자로 다시 유입되는 감염된 세포로 직접적으로 또는 생체외로 환자에게 유전자-캐리어 조성물을 주입함으로써 실시될 수 있다. 이러한 조성물은 본 발명에 사용하기에 적합하다.

[0115]

나노미터-크기의 입자는 개개의 문자 또는 벌크 고형물로부터 이용가능하지 않은 신규한 광학, 전자, 및 구조적 특성을 가진다. 종양-표적화 모이어티, 예컨대 종양 특이적 리간드 또는 단클론성 항체와 연결되는 경우, 이러한 나노입자는 높은 친화도 및 정확성을 갖는 암-특이적 수용체, 종양 항원 (바이오마커), 및 종양 맥판구조를 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 암 나노치료를 위한 제형 및 제조 방법은 미국 특허 번호 7,179,484, 및 문헌 [M.N.Khalid, P. Simard, D.Hoarau, A.Dragomir, J. Leroux, Long Circulating Poly(Ethylene Glycol)Decorated Lipid Nanocapsules Deliver Docetaxel to Solid Tumors, Pharmaceutical Research, 23(4), 2006]에 개시되어 있고, 이 모두는 본원에 그 전문이 참조로 포함되어 있다.

[0116]

비제한적으로 siRNA, shRNA, 마이크로RNA를 포함하는 RNA는 유전자 발현을 조절하고 암을 치료하기 위해 사용될

수 있다. 이중가닥 올리고뉴클레오타이드는 2개의 상이한 올로고뉴클레오타이드 서열의 어셈블리에 의해 형성되고, 이에서 한 가닥의 올리고뉴클레오타이드 서열은 제2 가닥의 올리고뉴클레오타이드 서열에 상보적이고; 이러한 이중가닥 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 2개의 별개의 올리고뉴클레오타이드 (예를 들면, siRNA)로부터, 또는 이중가닥 구조를 형성하기 위해 그 자체에 접혀지는 단일 분자 (예를 들면, shRNA 또는 짧은 헤어핀 RNA)로부터 어셈블리된다. 본 기술분야에 알려진 이러한 이중가닥 올리고뉴클레오타이드 모두는 듀플렉스의 각각의 가닥이 별개의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 일반적인 특징을 가지고, 여기서 단 하나의 뉴클레오타이드 서열 영역 (가이드 서열 또는 안티센스 서열)은 표적 핵산 서열에 대한 상보성을 가지고, 다른 가닥 (센스 서열)은 표적 핵산 서열에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0117] 마이크로RNA (miRNA)는 길이에 있어서 약 21-23개의 뉴클레오타이드 단일가닥 RNA 분자이고, 이는 유전자 발현을 조절하고, miRNA는 단백질 (비-코딩된 RNA)로 변역되지 않는 DNA로부터 전사되는 유전자에 의해 인코딩되고; 대신 이들은 pri-miRNA로 지칭되는 짧은 줄기-루프 구조에 대한 그리고 최종적으로 기능성 miRNA에 대한 pri-miRNA로서 공지된 1차 전사체로부터 가공된다. 성숙한 miRNA 분자는 하나 이상의 메신저 RNA (mRNA) 분자에 대해 부분적으로 상보적이고, 이의 주요 기능은 유전자 발현을 하향조절하는 것이다.

[0118] 특정 RNA 저해제는 암 표현형과 결합되는 메신저 RNA ("mRNA")의 발현 또는 번역을 저해하기 위해 이용될 수 있다. 본원에 사용되기에 적합한 이러한 제제의 예는 비제한적으로 짧은 간섭 RNA ("siRNA"), 리보자임, 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 RNA 저해제의 특정 예는 비제한적으로 Cand5, Sirna-027, 포미비르센, 및 안지오자임을 포함한다.

[0119] 특정 소분자 치료제는 특정 세포 수용체 예컨대 표피 성장 인자 수용체 ("EGFR") 또는 혈관 내피 성장 인자 수용체 ("VEGFR")의 티로신 키나제 효소 활성 또는 다운스트림 신호 전달 신호를 표적화할 수 있다. 소분자 치료제에 의한 이러한 표적화는 항암 효과를 초래할 수 있다. 본원에 사용되기에 적합한 이러한 제제의 예는 비제한적으로 이마티닙, 게피티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 카네르티닙, ZD6474, 소라페닙 (BAY 43-9006), ERB-569, 및 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다.

[0120] 특정 단백질 또는 소분자 제제는 직접적인 항종양 효과 또는 간접적인 효과를 통해 항암 요법에서 사용될 수 있다. 본원에 사용되기에 적합한 직접-작용제의 예는 비제한적으로 분화제 예컨대 레티노이드 및 레티노이드 유도체를 포함한다. 본원에 사용되기에 적합한 간접적인-작용제는 비제한적으로 면역 또는 다른 시스템 예컨대 인터페론, 인터류킨, 조혈 성장 인자 (예를 들면 에리트로포이에틴), 및 항체 (단클론성 및 다클론성)를 개질하거나 항상시키는 제제를 포함한다.

[0121] 암 세포를 최초 종양의 부위로부터 신체 주변의 다른 위치로 확산된 과정은 암 전이로 일컬어진다. 특정 제제는 암 세포의 확산을 억제하도록 설계된 항-전이성 특성을 가진다. 본원에 사용하기에 적합한 이러한 제제의 예는 비제한적으로, 마리마스타트, 베바시주맙, 트라스투주맙, 리툭시맙, 에를로티닙, MMI-166, GRN163L, 헌터-킬러 웹타이드, 메탈로프로테이나제 (TIMP)의 조직 저해제, 그것의 유사체, 유도체 및 변이체를 포함한다.

[0122] 특정 약제학적 제제는 암의 초기 발생을 방지하기 위해, 또는 재발 또는 전이를 방지하기 위해 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 방법으로의 암의 치료는 화학예방적 제제의 사용이 동반된다. 본원에 사용하기에 적합한 이러한 화학예방적 제제의 예는 비제한적으로, 타목시펜, 럴록시펜, 티볼론, 비스포스포네이트, 이반드로네이트, 에스트로겐 수용체 조절물질, 방향화효소 저해제 (레트로졸, 아나스트로졸), 황체형성 호르몬-방출 호르몬 효능제, 고세렐린, 비타민 A, 레티날, 레티노산, 펜레티나이드, 9-시스-레티노이드 산, 13-시스-레티노이드 산, 모든-트랜스-레티노산, 이소트레티노인, 트레티노이드, 비타민 B6, 비타민 B12, 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E, 사이클로옥시게나제 저해제, 비-스테로이드 항-염증성 약물 (NSAID), 아스피린, 이부프로펜, 셀레 콍십, 폴리페놀, 폴리페놀 E, 녹차 추출물, 엽산, 글루카르산, 인터페론-알파, 아네톨 디티울티온, 아연, 피리독신, 피나스테라이드, 독사조신, 셀레늄, 인돌-3-카비날, 알파-디플루오로메틸오미틴, 카로테노이드, 베타-카로텐, 라이코펜, 항산화제, 조효소 Q10, 플라보노이드, 쿠에르세틴, 쿠르쿠민, 카테킨, 에피갈로카테킨 갈레이트, N-아세틸시스테인, 인돌-3-카비놀, 이노시톨 혼사포스페이트, 이소플라본, 글루칸산, 로즈마리, 대두, 톱풀메토, 및 칼슘을 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 화학예방적 제제의 추가적인 예는 암 백신이다. 이는 예방접종 과정에 의해 표적화된 모든 또는 일부의 암 세포 유형을 갖는 환자를 면역화하여 생성될 수 있다.

[0123] 일부 구현예에서, 본 방법으로의 암의 치료는 항신생물성 제제에 의해 제조된 부작용을 완화할 수 있는 약제학적 제제의 투여가 동반된다. 본원에 사용되기에 적합한 이러한 제제는 비제한적으로 항-구토제, 항-점막염 제제, 통증 관리 제제, 감염 조절제, 및 항-빈혈/항-혈소판감소증 제제를 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 항-구토제의 예는 비제한적으로 5-하이드록시트립타민 3 수용체 길항제, 메토클로프라마이드, 스테로이드, 로라

제팜, 온단세트론, 칸나비노이드, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 항-점막염 제제의 예는 비제한적으로 팔리페르민 (케라틴생성세포 성장 인자), 글루카곤-유사 웹타이드-2, 테두글루타이드, L-글루타민, 아미포스틴, 및 섬유아세포 성장 인자 20을 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 통증 관리 제제의 예는 비제한적으로 오피오이드, 아편체, 및 비-스테로이드 항-염증성 화합물을 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 감염의 조절을 위해 사용되는 제제의 예는 비제한적으로, 항균제 예컨대 아미노글리코시드, 페니실린, 세팔로스포린, 테트라사이클린, 클린다마이신, 린코마이신, 매크롤라이드, 반코마이신, 캐바페넴, 모노박탐, 플루오로퀴놀론, 살폰아미드, 니트로푸란토인, 그것의 유사체 및 유도체를 포함한다. 본원에 사용하기에 적합한 화학요법과 관련된 빈혈 또는 혈소판감소증을 치료할 수 있는 제제의 예는 비제한적으로 에리트로포이에틴, 및 트롬보포이에틴을 포함한다.

[0124] 키트

또한, 본 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다. 본 키트는 아넥신 V 제제, 예를 들면 야생형 또는 돌연변이체 아넥신 V 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 복용 형태 (예를 들면, 치료적으로 유효한 복용 형태)로 제공된다. 일부 구현예에서, 항-CD47 제제는 2종 이상의 상이한 복용 형태 (예를 들면, 2종 이상의 상이한 치료적으로 유효한 복용 형태)로 제공된다. 키트의 맥락에서, 제제는 편리한 패키징 (예를 들면, 스틱 팩, 투여 팩 등)으로의 액체 또는 고체 형태로 제공될 수 있다.

[0126] 상기 성분 이외, 본 키트는 본 방법을 실시하기 위한 (특정 구현예에서의) 지침을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 지침은 다양한 형태로 본 키트에 존재할 수 있고, 이의 하나 이상의 키트에 존재할 수 있다. 이러한 지침이 제공될 수 있는 한 형태는 적합한 매체 또는 기재에의 인쇄된 정보, 예를 들면 정보가 인쇄된 키트의 패키징, 패키지 삽입물 등에서의 한 조각 또는 조각들의 종이이다. 이러한 지침의 또 다른 형태는 컴퓨터 판독가능 매체, 예를 들면, 디스크, 콤팩트 디스크 (CD), 플래시 드라이브 등이고, 이에 정보가 기록된다. 제공될 수 있는 이러한 지침의 또 다른 형태는 원격 사이트에서 정보에 접근하는 인터넷을 통해 사용될 수 있는 웹사이트 주소이다. 키트는 본 방법으로 치료하기에 적합한 PS 양성 암 세포를 영상화하고 검출을 위한 조영제를 포함할 수 있다.

[0127] 본 발명은 완전하게 이하에서 기술되고, 다양한 변화 및 수정은 본 발명의 사상 또는 범위로부터 벗어남 없이 이루어질 수 있음을 본 기술분야의 당업자에게 자명할 것이다.

[0128] 실험

[0129] 하기 실시예는 본 발명의 제조 및 사용 방법의 완전한 개시 및 기술로 본 기술분야의 당업자에게 제공하도록 기재되어 있고, 발명자가 본 발명으로 여기는 범위를 하기 실험이 나타내는 것만으로 또는 수행되는 실험만으로 제한하는 것으로 의도하는 것은 아니다. 사용되는 수치 (예를 들면, 양, 온도, 등)와 관련하여 정확도를 보장하기 위한 노력이 이루어졌으나, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다. 달리 나타내지 않은 한, 부는 중량 부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨온도이고, 압력은 대기압에서의 것이거나 이 부근의 것이다.

[0130] 실시예 1

[0131] 한 세트의 실험에서, 도 1에 나타난 바와 같이, 단일 또는 분할 용량으로서 복강내로 (i.P.) 주입된 바와 같은 주어진 2 m/kg의 야생형 아넥신 V의 투여는 4T1-종양 (동계의, 저조하게 분화된, 젖과 유선 암종) 함유 Balb/c 마우스에서 종양 성장이 상당하게 감소하고, 심지어 단백질의 24시간의 단일 투여로 퇴행되었다. 2일에서의 반복 투여는 48 내지 72 시간까지 줄어드는 것으로 나타나는 효과를 향상시켰다.

[0132] 혈액 청정도는 도 2에 나타나 있다. 아넥신 V의 효과는 순환에서의 아넥신 V의 주입 및 연장의 속도에 좌우될 수 있다 (즉 장기적인 혈액 청소능). 복강내 주사에 의한 투여는 8분 내지 3.5 시간으로 아넥신 V의 반감기가 증가한다. 유사한 결과는 예를 들면 12-24 시간 기간에 걸쳐 아넥신 V의 느린 정맥내 주입을 통해 투여함으로써 수득될 수 있다.

[0133] 실시예 2

[0134] 선천적 면역 반응의 종양 유도 면역억제를 차단하기 위한 방법으로서의 아넥신 V의 사용

[0135] 저조하게 분화된 삼중 음성 유방 종양에서의 PS 유도된 면역억제를 역전하기 위한 방법이 기술되고 있고, 이는 1주 기간에 걸쳐 투여되는 최대 일일 NOAEL (래트에서 관찰되지 않은 부작용 수준 = 2.5 mg/kg/일)에서의 재조합 야생형 아넥신 V의 느린 연속적인 주입을 사용한다. rh-아넥신 V는 PS에 대한 높은 결합 친화도를 갖는 내인

성 인간 단백질 (MW=36,000)이다. rh-아넥신 V는 300명의 환자에 걸쳐 단백질의 2개 이상의 정맥내 주사 이후 기록된 부작용이 없는 이전의 임상 시험에서 조영제로서 광범위하게 시험하였다. 아넥신 V의 항종양 면역자극 성 기전은 PD-1 및 CTLA-4 항체를 포함하는 다른 유형의 면역요법과 독립적인 것이고, 아넥신 V와 이들 및 다른 제제와의 상승작용 상호작용이 예상된다. 또한, 아넥신 V 주입은 국소적 뿐만 아니라 방사선 장 이외에서의 질환 부위에서의 방사선 요법 이후 세포자멸적 종양의 인식을 상승작용으로 향상시킬 수 있다.

[0136] 대부분의 인간 종양에 대한 면역 반응의 결여는 세포자멸적 종양 세포 내에 함유된 특정 종양 관련 항원 (TAA)에 대한 PS 매개 주위 내성의 발달에 의해 부분적으로 설명될 수 있다. 세포자멸사가 진행되는 세포는 일반적으로 NK 세포, T-세포 및 단핵구/대식세포 (M1)를 포함하는 선천적 면역계가 인식하고 무해하게 염증성 반응을 유발함 없이 죽어가는 세포를 이동시키는 보편적인 "잇 미 신호"로서 작용하는 높은 수준의 PS를 발현한다. 그러나, 식균작용에 대한 역치 이하로의 중간 및 가역적 수준의 PS 노출이 또한 생존가능 세포뿐만 아니라 대사작용으로 스트레스 받은 세포 또는 활성화된 T 림프구에 대해 관찰될 수 있다. 종양 세포 및 종양 반응성 T 림프구 단독에 대한 높은 또는 중간 수준의 PS의 존재는 선천적 및 적응성 면역계 모두에 의해 TAA에 대한 인식 및 반응을 충분하게 억제한다.

[0137] PS의 면역억제 효과는 TIM-4 (T 세포 면역글로불린- 및 뮤신 도메인-함유 분자-4)를 포함하는 PS에 특별하게 결합하는 다수의 새롭게 기술된 면역 세포 수용체에 의해 중재된다. TIM-4는 T 세포 막통과, 면역글로불린, 및 뮤신 (TIM) 유전자 패밀리의 일 부류이고, MΦs 및 수지상 세포 (DC) 상에서 배타적으로 발현된다. TIM-4는 세포자멸적 세포의 식균작용을 중재하고, 비-세포자멸적 세포에 대한 중간 수준의 PS 노출에 반응한다. 종양 세포 및 TAA에 대한 높은 및 중간 수준의 PS 및 TAA 반응성 T 림프구 모두는 활성 (M1)으로부터 관용성 (M2, TAM = 종양 관련된 대식세포) 표현형으로의 MΦs의 전이를 유도한다. M2 표현형 (\uparrow IL-10 & TGF- β , \downarrow IL-12)을 갖는 TAM은 종양-특이적 T-regs (T 세포, 조절); TAA에 의한 이의 활성화에 대해 CD8+ (세포독성) T 세포 (CTL)를 활성적으로 억제하는 세포의 발달을 유도한다. TAM은 또한 DC 성숙을 예방하고, DC에 의해 제공되는 TAA에 의한 미접촉 CD4+ T 세포의 교차-촉발을 근절하고, DC 공통자극 세포에 대해 NK (자연 살해 T 세포)와의 세포 상호작용을 억제한다. 골수 유도된 줄기세포 또는 MDSC는 또한 PS+ 세포의 섭취 또는 이와의 접촉시 고도로 면역억제 성이고, 종양 특이적 T-reg의 클론 팽창을 유도함으로써 종양 특이적 CTL의 기능을 억제할 수 있다. MDSC는 또한 미접촉 CD4+ 세포를 종양 특이적 T-reg로 전환할 수 있다. TAM 및 MDSC PS 매개-식균작용의 봉쇄는 종양 특이적 CTL에 대한 T-regs의 면역억제 효과를 방해하는 것으로 예상된다.

[0138] 아넥신 V 및 젖과 키메라성 PS-결합 항체 (바비톡시맙)은 면역계에 의한 PS-의존적 인식을 차단함으로써 종양 세포의 항원성을 증가시키기 위해 사용되었다. 아넥신 V는 또한 M1 활성 (\uparrow IL-1 β & TNF- α , \downarrow TGF- β)을 증가시키면서 DC로 죽어가는 종양 세포의 청소능을 이동시키는 MII에 의해 세포자멸적 종양 세포의 식균작용을 차단하기 위해 사용하였다. 흥미롭게도, 아넥신 V를 사용한 세포자멸적 종양 세포의 MII 식균작용의 봉쇄는 성숙한 DC에 의한 죽어가는 종양 세포 또는 이의 TAA의 청소능 및 처리에 영향을 주지 않았다. PS 매개된 식균작용의 아넥신 V 봉쇄에 대한 반응시의 세포자멸적 종양 세포의 지연된 청소능은 또한 (포자멸적 세포가 ATP를 소모한 이후) TAA의 면역원성을 추가로 고조하는 2차 괴사의 개시를 가능하게 한다. 바비톡시맙, 인간 사용을 위한 항-PS 항체의 젖과 키메라성 형태가 현재 다수의 III상 임상 시험에서 시험되고 있다. 불행하게도, 바비톡시맙은 최근 PS를 직접적으로 결합하는 것이 아닌 베타-2 당단백질 1, 아넥신 V와 비교하여 제한된 PS 친화도를 갖는 혈청 단백질에 특이적 결합을 통해 간접적으로 결합하는 것이 발견되었다. PS에 대해 높은 특이성을 갖는 완전하게 인간화된 형태의 항-PS 항체는 또한 다수의 젖과 모델에서의 생체내에서 종양을 국재화하지 못하였고, 이는 특이성과 무관하게 항-PS 유도 항체로 종양을 표적화하는 생존가능한 치료적 전략인지 여부에 대한 의심을 일으킨다.

[0139] 조사된 종양 세포 백신에 대한 아넥신 V의 부가 또는 종양 조사 이후 아넥신 V의 종양내 주사는 다수의 동물 모델 내의 생체내에 관찰되는 면역 반응을 향상시켰다. 또한, 이온화 방사선은 결론적으로 방사선의 장 외부에서 종양 성장을 감소시킬 수 있고(암스코팔 효과), RT에 대한 반응하는 면역 반응은 전신적으로 암 세포의 근절에 기여할 수 있는 것으로 인식되었다. 전신적으로 투여하는 아넥신 V를 차단하는 RT 및 PS는 상승작용 효과를 제공할 수 있다. 최종적으로, 유전적으로 조작된 신경교세포종 세포주에 의한 아넥신 V의 내인성 분비에 의한 PS의 봉쇄는 면역 능력이 있는 젖과 종양 모델에서의 상당한 항-종양 반응을 촉진하였다. 또한, 아넥신 V 분비 신경교세포종 종양의 자기-거부는 T 세포 의존적이고, 마우스의 40%에서 장기 지속된 것으로 발견되었다.

[0140] 본 발명자는 8 내지 10일에 걸쳐 2 내지 4 mg/kg의 일일 용량으로 복강내로 (i.P.) 주입된 본원에서 야생형 아넥신 V는 Balb/c 마우스에서의 동소이식 동계의 4T1 액와 지방체 종양, 도 3 & 4에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 60 내지 70%까지 크게 공격성이고 좋지 않은 면역원성인 유선 암종의 성장을 감소시키는데 매우 효과

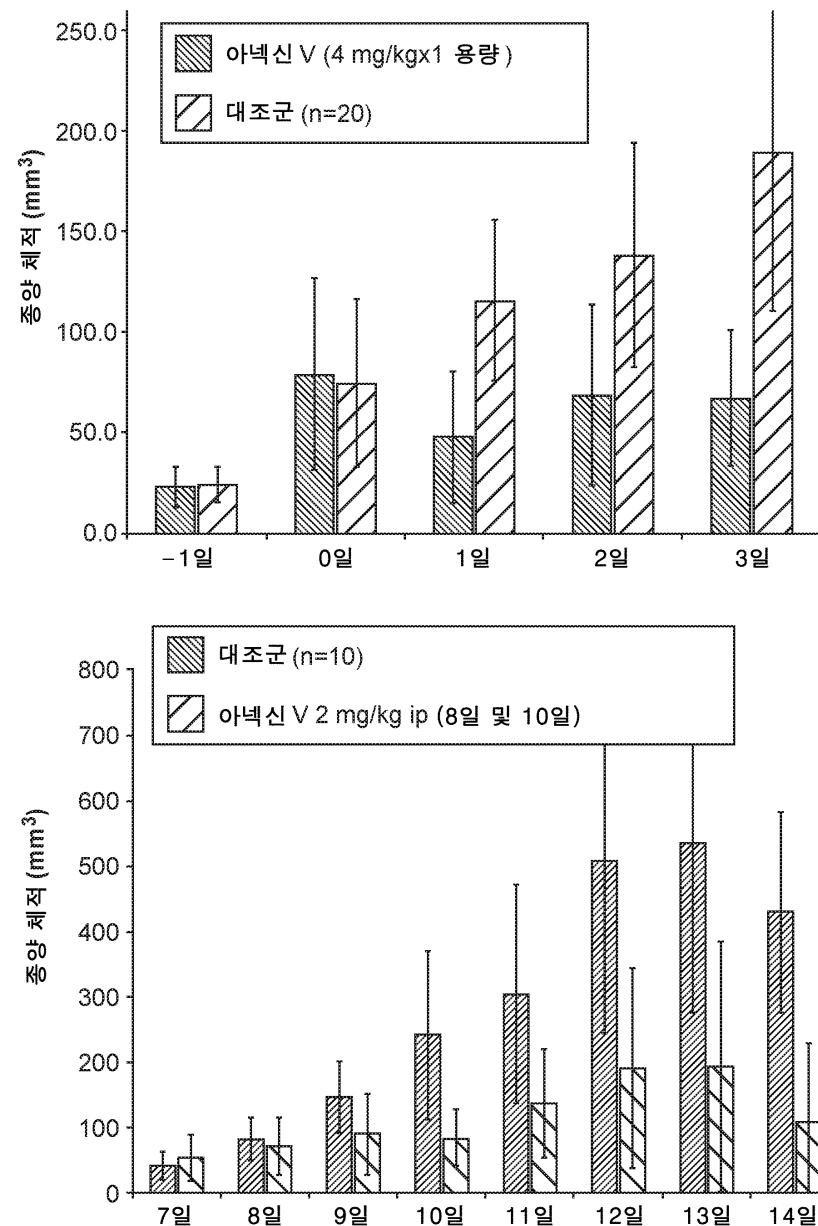
적인 것을 나타내었다. 본 발명자는 또한 i.P. 경로의 주사는 도 5 & 6에 나타나는 바와 같이 3.7 시간까지 Tc99m-아넥신 V-128의 순환 반감기를 상당하게 연장할뿐 아니라 11시간 초과로 종양에서의 Tc99m-아넥신 V-128의 체류 반감기를 증가시키는 것을 발견하였다. 이러한 데이터는 아넥신 V (또는 아넥신 V-128)은 다른 면역 요법과 쌍을 이루어 느린 정맥내 주입으로서 투여되는 경우 아쥬반트로서 유용하다.

[0141] 암 세포주 4T1 (급속 성장, 고전이성) 또는 JC (느린 성장, 저공격성) 저조한 면역원성 동계의 유선 암종 (모두 루시퍼라아제 발현 세포주)는 영 어덜트 암컷 BALB/C 마우스의 좌측 액와 유선 지방체로 동이식적으로 이식된다. 6-7 mm의 종양 크기에 도달된 이후, 종양 함유 마우스 (n=15 / 그룹)는 복강내 배치된 삼투 펌프 (1007D, Alzet)에 의해 전달되는 일주일간의 연속적인 아넥신 V 주입 (2 mg/kg/d)을 받고, 이후 미처리된 대조군과 비교하여 종양 크기 및 생존율의 연속적 측정이 후속된다. 마우스의 별개의 그룹에서, 원발성 종양이 절제되고, 마우스는 펌프 이식 및 아넥신 V 주입의 1주일의 개시 이전 일주일 동안 회수하였다. 이러한 마우스는 미처리된 대조군과 비교되는 생존률에 따라 전이성 종양 성장을 검출하고 평가하기 위해 매주 BLI (생물발광 영상화)를 후속하였다. 이러한 실험을 원발성 또는 전이성 질환을 갖는 마우스에서의 아넥신 V 주입 요법으로의 상승효과에 대해 시험하기 위해 항-젖과 PD-1 및 CLTA-4 항체 (10 mg/kg ip qod x 4 용량)로의 면역 체크 포인트 요법을 추가하여 반복하였다.

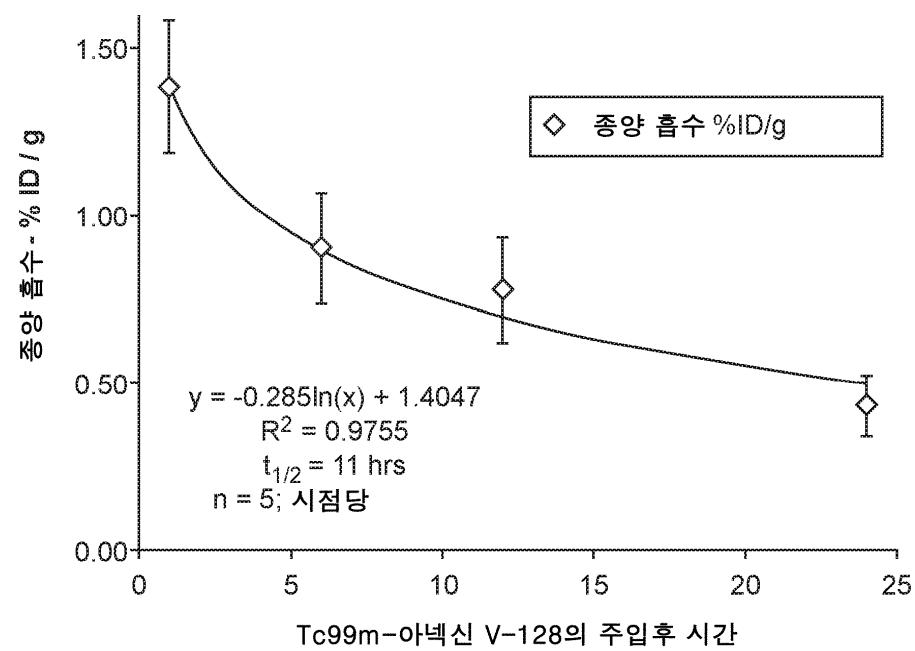
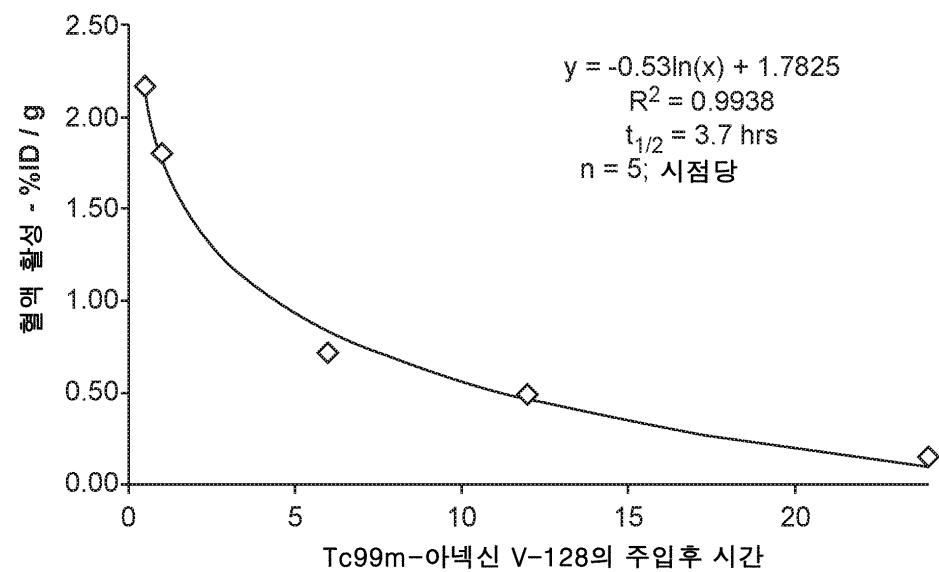
[0142] (생명중추 기관을 조사하지 않고 말단 종양으로의 방사선의 국소 전달을 촉진하기 위해) 오른쪽 옆구리에 피하로 이식된 원발성 JC 및 4T1 종양 (크기에 있어서 6-7 mm)에 대한 일주일의 아넥신 V 주입 요법의 효과를 결정하였다. 30 Gy의 단일 용량을 소동물 X-선 빔 (2 cm 직경 장)을 사용하여 납 지그에 수동적으로 저지된 미마취된 마우스로 전달하였다. 아넥신 V 처리된 마우스에서의 조사된 원발성 종양의 성장 및 생존률은 조사된 대조군과 비교하였다. 마우스의 별개의 군에서, 원발성 옆구리 종양은 방사선 및 일주일의 아넥신 V 주입 요법을 완료한 이후 절제하고, 마우스에 대해 아넥신 V 주입 없이 조사된 마우스와 비교하여 생존율에 따른 전이성 종양 부담을 연속적으로 모니터링하기 위해 일주일 BLI를 후속하였다. 이러한 실험을 항-젖과 PD-1 및 CLTA-4 항체 (10 mg/kg ip qod x 4 용량)의 부가로 반복하여 원발성 또는 전이성 질환을 갖는 조사된 마우스에서 아넥신 V 주입 요법으로의 상승효과에 대해 시험하였다.

도면

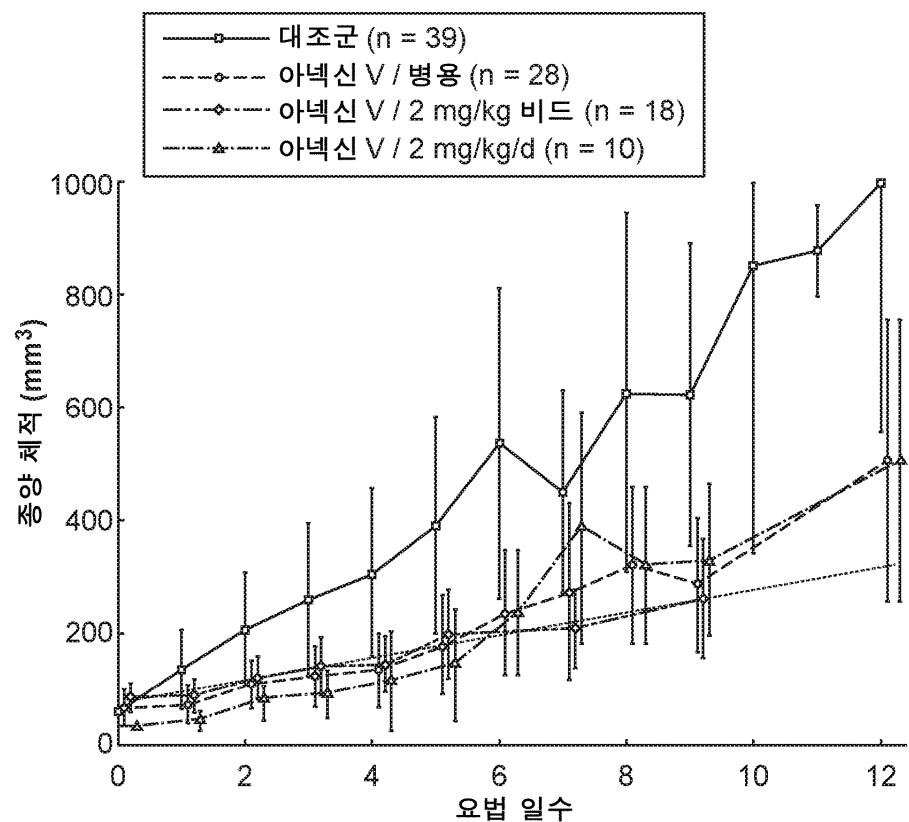
도면1



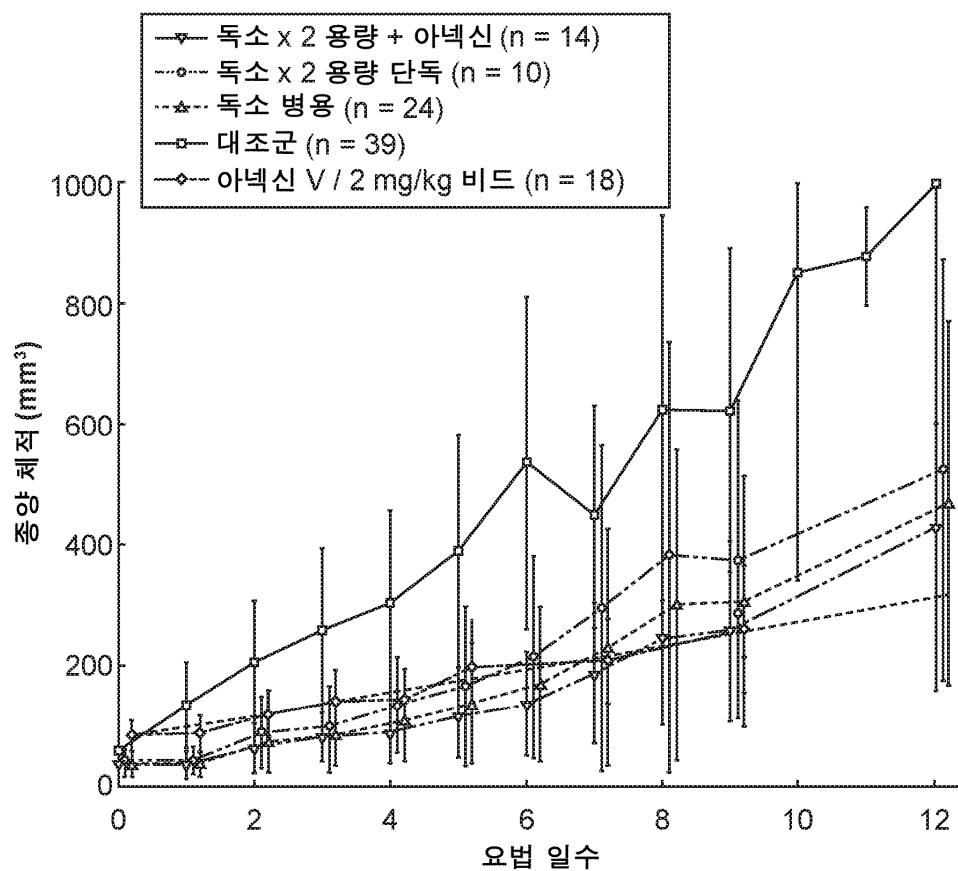
도면2



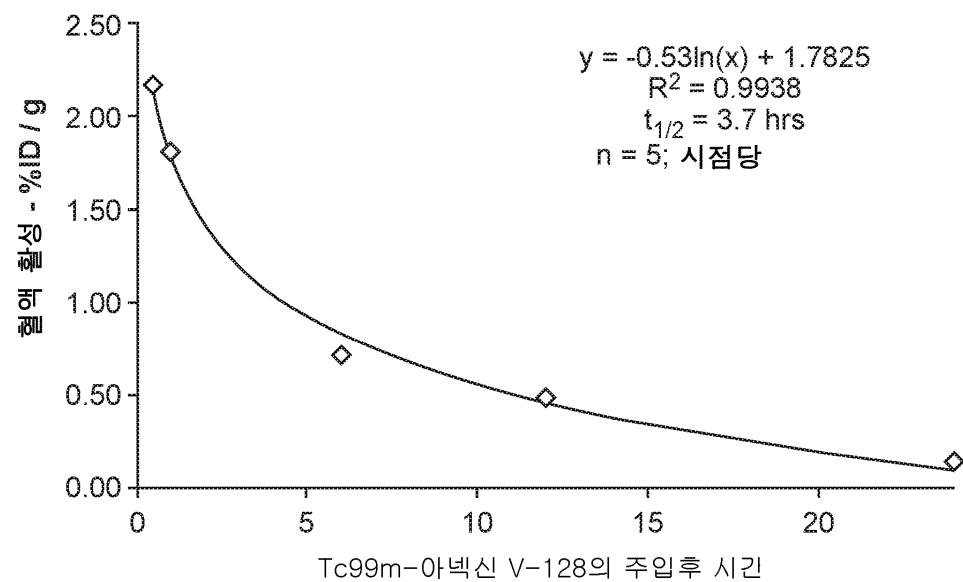
도면3



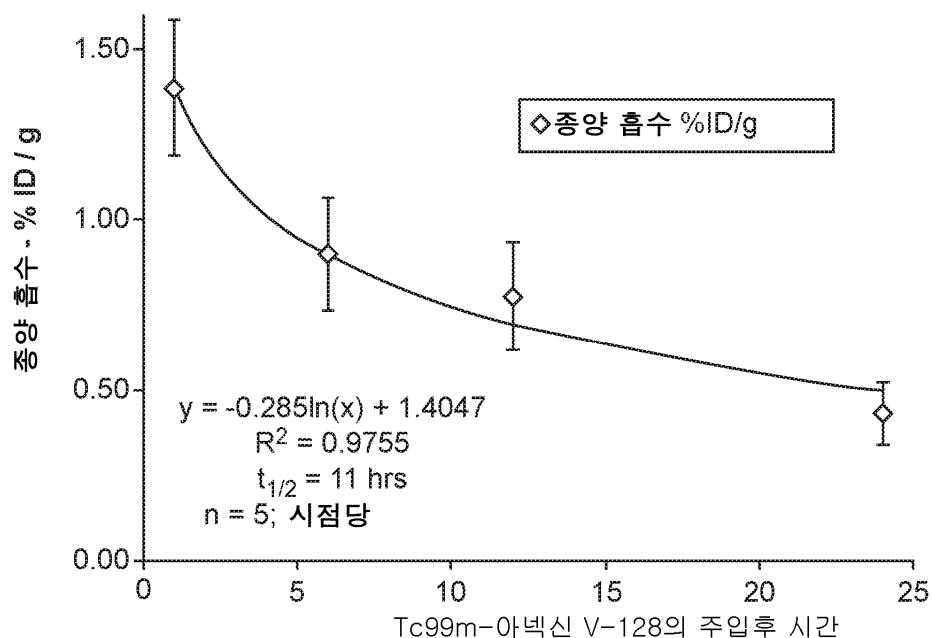
도면4



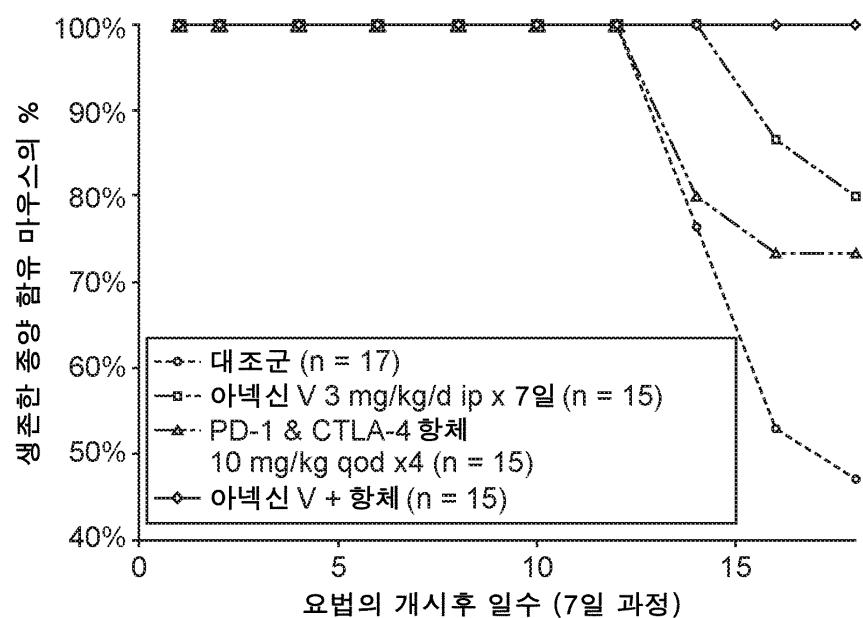
도면5



도면6



도면7a



도면7b

