



등록특허 10-2207767



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월26일

(11) 등록번호 10-2207767

(24) 등록일자 2021년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 47/26 (2017.01) C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39558 (2013.01)

A61K 47/26 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7009708

(22) 출원일자(국제) 2013년09월17일

심사청구일자 2018년09월14일

(85) 번역문제출일자 2015년04월15일

(65) 공개번호 10-2015-0085508

(43) 공개일자 2015년07월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/060182

(87) 국제공개번호 WO 2014/043708

국제공개일자 2014년03월20일

(30) 우선권주장

61/701,914 2012년09월17일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US20080089959 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

갈렉틴 테라퓨티스, 임크.

미국 30071 조지아주 노크로스 스위트 240 피치트리 인더스트리얼 블러바드 4960

프로비던스 헬스 앤드 서비스 - 오레곤 디/비/에이 얼 에이. 칠리스 리서치 인스티튜트 오브 더 로버트 더블유. 프란츠 캔서 리서치 센터 옛 프로비던스 포틀랜드 메디칼 센터

미국, 오레곤 97213, 2엔35 포틀랜드, 4805 엔이길산 스트리트

(72) 별명자

트라버 피터 쥐.

미국 30097 조지아주 둘루쓰 피치트리 파크웨이 4850

래드몬드 윌리암 엘.

미국 97124 오리건주 힐스보로 엔이 63번 웨이 483

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 18 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 암 치료에서의 특이적 면역요법을 강화하는 방법

(57) 요약

본 발명의 방법 및 조성물은 암 치료에 있어 특이적 면역요법의 강화에 관한 것이다. 특히, 본 발명의 양태들은 암 면역요법의 효능을 증가시키기 위해 복합 탄수화물 약학적 화합물을 단독으로 또는 다른 표적화된 면역요법과 함께 사용하여 면역 기능을 증강시키기 위한 신규 접근법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

C07K 16/3069 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

(72) 발명자

조머 엘리저

미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 켄릭 스트리트 374

클리오소브 아나톨레

미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 웰시 로드 36

린치 스텔파니 엔.

미국 97213 오리건주 2엔35 포틀랜드 엔이 길산 스
트리트 4805

(30) 우선권주장

61/756,818 2013년01월25일 미국(US)

61/759,532 2013년02월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

허용가능한 약학적 담체에

(i) α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 갈락투론산(GalA) 잔기의 교호 올리고머의 분지된 헤테로폴리머에 연결된 1,4-연결된 GalA 및 메틸 갈락투로네이트(MeGalA) 잔기 백분율 포함하는 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트로서, 람노스 잔기가 1,4- β -D-갈락토스 잔기, 1,5- α -L-아라비노스 잔기, 또는 이의 조합의 올리고머의 일차 분지를 보유하는 것인 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트, 및

(ii) 치료적 유효량의 면역조절체

를 포함하는, 암을 치료하기 위한 비경구 또는 장내 투여용 조성물로서,

면역조절체는 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2 또는 이의 조합이고,

필요로 하는 대상체에 조성물의 유효 용량의 투여는 치료적 유효량의 면역조절체 단독으로 치료된 대조군 대상체와 비교했을 때

CD8+ T-세포, CD4+ T-세포, 또는 CD8+ T-세포와 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 10% 이상의 증가,

종양-항원 특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 10% 이상의 증가,

종양 크기에 있어 10% 이상의 감소,

전이 크기에 있어 10% 이상의 감소,

전이 개수에 있어 10% 이상의 감소,

총 종양 부담의 감소

중 하나 이상을 유도하는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 투여는 대상체에서 총 종양 부담의 50% 이상의 감소를 유도하여 암을 치료하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트에 있어서, 가스 크로마토그래피/질량 분광분석법으로 특정 규명했을 때, 1,4-연결된 갈락투론산 및 메틸 갈락투로네이트 잔기 백분이 총 탄수화물 몰 함량의 55 내지 85 몰%를 나타내고, 교호 α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 GalA 잔기의 분지된 헤�테로폴리머가 총 탄수화물 몰 함량의 1 내지 6 몰%를 나타내고, 일차 분지의 올리고머 1,4- β -D-갈락토스가 총 탄수화물 몰 함량의 6 내지 15 몰%를 나타내고 일차 분지의 올리고머 1,5- α -L-아라비노스가 총 탄수화물 몰 함량의 2 내지 8 몰%를 나타내는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 20 kDa 내지 70 kDa 범위의 평균 분자량을 가지는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 자일로스, 글루코스, 푸코스 잔기 또는 이의 조합을 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 면역조절체는 OX40에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, CTLA-4에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, PD-1에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, PD-L2에 결합할 수 있는 모노클로날

항체, PD-L1에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, 또는 이의 조합인 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, LAG-3에 결합할 수 있는 치료적 유효량의 모노클로날 항체를 포함하는 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, CD134, CD27, 및 4-1BB에 결합할 수 있는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 또는 이의 조합을 더 포함하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, OX40L, CD70, 및 4-1BBL에 결합할 수 있는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 또는 이의 조합을 더 포함하는 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

제1항에 있어서, 조성물의 유효 용량은 그랜자임 B 발현으로 측정했을 때 CD8+의 활성화의 10% 이상의 증가를 유도하는 것인 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서, 조성물의 유효 용량은 Ki-67 발현으로 측정했을 때 CD4+의 활성화의 10% 이상의 증가를 유도하는 것인 조성물.

청구항 24

제1항에 있어서, 조성물의 유효 용량은 GR-1 음성/CD11b 양성 세포의 10% 이상의 증가를 유도하는 것인 조성물.

청구항 25

제1항에 있어서, 조성물의 유효 용량은 GR-1 중간/CD11b 양성 세포의 10% 이상의 감소를 유도하는 것인 조성물.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

필요로 하는 대상체에 비경구 투여를 위한 암을 치료하기 위한 조성물로서, 조성물은 허용가능한 약학적 담체 내에 존재하고

a. α-1,2 연결된 람노스 및 α-1,4-연결된 갈락투론산(GalA) 잔기의 교호 올리고머의 분지된 헤테로폴리머에 연결된 1,4-연결된 GalA 및 메틸 갈락투로네이트(MeGalA) 잔기 백본을 포함하는 치료적 유효량의 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트로서, 람노스 잔기가 1,4-β-D-갈락토스 잔기, 1,5-α-L-아라비노스 잔기, 또는 이의 조합의 올리고머의 일차 분지를 보유하는 것인 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트, 및

b. 치료적 유효량의 면역조절제를 포함하고,

면역조절제는 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2 또는 이의 조합인 조성물.

청구항 35

삭제

청구항 36

제34항에 있어서, 면역조절체는 면역조절체는 OX40에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, CTLA-4에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, PD-1에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, PD-L2에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, PD-L1에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, 또는 이의 조합인 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

제34항에 있어서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트에 있어서, 가스 크로마토그래피/질량 분광분석법으로 특징규명했을 때, 1,4-연결된 갈락투론산 및 메틸 갈락투로네이트 잔기 백분이 총 탄수화물 몰 함량의 55 내지 85 몰%를 나타내고, 교호 α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 GaIA 잔기의 분지된 헤테로폴리머가 총 탄수화물 몰 함량의 1 내지 6 몰%를 나타내고, 일차 분지의 올리고머 1,4- β -D-갈락토스가 총 탄수화물 몰 함량의 6 내지 15 몰%를 나타내고 일차 분지의 올리고머 1,5- α -L-아라비노스가 총 탄수화물 몰 함량의 2 내지 8 몰%를 나타내는 것인 조성물.

청구항 39

제34항 또는 제38항에 있어서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 20 kDa 내지 70 kDa 범위의 평균 분자량을 가지는 것인 조성물.

청구항 40

제34항 또는 제38항에 있어서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 자일로스, 글루코스, 푸코스 잔기 또는 이의 조합을 더 포함하는 것인 조성물.

발명의 설명**기술 분야****관련 출원**

[0001] 본 출원은 2012년 9월 17일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제61/701,914호, 2013년 1월 25일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제61/756,818호, 및 2013년 2월 1일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 제61/759,532호에 대한 이익 및 우선권을 주장하며, 이를 각각의 전체 개시내용은 그 전문이 본원에서 참고적으로 도입된다.

발명의 분야**[0004]**

본 발명의 방법 및 조성물은 암 치료에서의 특이적 면역요법의 강화에 관한 것이다.

배경 기술**[0005]**

면역계는 외래 항원을 인식하고, 외래 항원, 또는 외래 항원을 발현하는 병원체 또는 세포를 없애는, 복수 세포 타입을 수반하는 조직화된 반응을 조정한다. 면역계는 박테리아, 바이러스, 및 기생충(이에 한정되지 않음)을 포함한 침입 미생물로부터의 보호와, 비정상 또는 돌연변이된 세포(암)에 대한 감시 및 이의 제거에 있어 매우 중요하다. 이러한 면역계는 또한 체내에 의료용 디바이스의 삽입 또는 이종 장기 또는 세포의 이식에 대한 반응에 의해 치료적 중재에 있어 장애가 되고 있다.

[0006]

숙주 동물을 보호하는데 있어 면역계의 기본적 기능 이외에, 질환 치료를 위해 면역계를 조절하는 것에 대한 굉장한 기대가 존재한다. 이러한 관점에서, 환자의 암을 공격하여 치료하기 위해 환자 자신의 면역계를 활용하는 것은 많은 다양한 종류의 암에 대한 매우 전도 유망한 치료적 접근법일 수 있다.

[0007]

암 치료를 위한 면역요법의 최근 성공에도 불구하고, 인간 종양의 반응은 개인별로 그리고 그것이 작용하는 것

들에서 차이가 있으며, 이는 종종 단지 부분적으로 성공적이다.

[0008] 따라서, 암 치료를 위한 면역요법의 역량을 강화할 수 있는 접근법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명의 양태들은 복합 탄수화물 약학적 화합물을 단독으로 또는 암 면역요법의 효능을 증가시킬 수 있는 다른 표적화된 면역요법과 함께 사용하여 면역 기능을 증강시키는 신규의 접근법에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 양태들은 면역 기능을 증강시킬 수 있는 조성물, 이러한 조성물의 사용 방법 및 이러한 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 양태들은 이를 필요로 하는 대상체의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 본 방법은 정맥내, 피하, 비경구의 다른 루트, 또는 경구 투여용 조성물을 수득하는 단계로서, 조성물이 허용가능한 약학적 담체에 화합물을 포함하는 것인 단계, 및 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0012] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈락토-람노갈락투로네이트(GRG), 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트(GA-RG), 갈락토만난(GM), 변형된 합성 이당류(MSD), 펩티드/단백질 억제제(PIA), 펩티드 모방제(PMA), 갈렉틴-특이적 항체(GSA) 또는 작은 유기 분자(SOM) 또는 상기 것들의 임의의 조합 중 하나일 수 있다.

[0013] 일부 실시양태들에서, 특정 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 갈렉틴 1 내지 15를 포함한 갈렉틴 단백질 부류의 다양한 도메인과 상호작용하여 이들의 기능을 억제하거나, 강화시키거나, 조절하는 능력을 가질 수 있다.

[0014] 일부 실시양태들에서, 특정 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 N-말단 도메인 및 탄수화물 인식 도메인의 S- 및 F-면(face)(이에 한정되지 않음)을 포함한 갈렉틴-3 단백질의 다양한 도메인과 상호작용하여, 천연 리간드와 이의 상호작용을 억제하여 갈렉틴-3 기능을 억제하는 능력을 가질 수 있다.

[0015] 일부 실시양태들에서, 특정 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 탄수화물 인식 도메인 및 이랑체화 도메인(이에 한정되지 않음)을 포함한 갈렉틴-1 단백질의 다양한 도메인과 상호작용하여, 천연 리간드와 이의 상호작용을 억제하여 갈렉틴-1 기능을 억제하는 능력을 가질 수 있다.

[0016] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈락토-람노갈락투로네이트(GRG)로서 화학적으로 규명된 다당류, 보다 적은 양의 1,5-a-L-아라비노스(Ara) 잔기와 함께 주로 1,4-b-D-갈락토스(Gal)를 포함하는, 임의 개수의 측쇄에 연결되는, 백본이 주로 1,4-연결된 갈락투론산(GalA) 모이어티로 구성되고, 교호(alternating) 1,4-연결된 GalA와 1,2-연결된 람노스(Rha)의 보다 적은 백본 조성을 갖는, 선택적으로 해중합된 분지형 혜테로폴리머일 수 있다. 다른 측쇄 부(minor) 성분은 자일로스(Xyl), 글루코스(Glu), 및 푸코스(Fuc) 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0017] 일부 실시양태들에서, GRG 화합물은 현재 미국 특허 제8,236,780호로서 등록된 미국 특허 출원 공보 제2008/0107622호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0018] 일부 실시양태들에서, GRG 화합물은 미국 특허 제8,128,966호, 제8,187,624호, 미국 특허 출원 공보 제2012/0315309호 및 제2012/0309711호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 이들 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0019] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트(GA-RG)로서 화학적으로 규명된 다당류, 주로 1,4-b-D-갈락토스(Gal) 및 1,5-a-L-아라비노스(Ara) 잔기를 포함하는, 임의 개수의 측쇄에 연결되는, 백본이 주로 1,4-연결된 갈락투론산(GalA) 및 메틸 갈락투로네이트(MeGalA) 잔기로 구성되고, 교호 1,4-연결된 GalA와 1,2-연결된 람노스(Rha)의 보다 적은 백본 조성을 갖는, 선택적으로 해중합된 분지형 혜테로폴리머일 수 있다. 다른 측쇄 부 성분은 자일로스(Xyl), 글루코스(Glu), 및 푸코스(Fuc) 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 양태들은 (a) α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 갈락투론산(GalA) 잔기의 교호 올리고머의 분지된 혜테로폴리머에 연결된 1,4-연결된 GalA 및 메틸 갈락투로네이트(MeGalA) 잔기 백본을 포함하는 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트로서, 람노스 잔기는 1,4- β -D-갈락토스 잔기, 1,5- α -L-아라비노스 잔기, 또는 이의 조합의 올리고머의 일차 분지(primary branching)를 보유하는 것인 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트, 및 치료적 유효량의 면역조절제를 허용가능한 약학적 담체에 포함하는 비경구 또는 장내(enteral) 투여용 조성물을 수득하는 단계; 및 (b) 치료적 유효량의 면역조절제 단독으로 치료된 대조군 대상체와 비교했을 때, CD8+ T-세포, CD4+ T-세포, 또는 CD8+ T-세포와 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 10% 이상 증가, 종양-항원 특이적 CD8+ 또

는 CD4+ T-세포의 10% 이상의 증가, 종양 크기에 있어 10% 이상의 감소, 전이 크기에 있어 10% 이상의 감소, 전이 개수에 있어 10% 이상의 감소, 총 종양 부담(total tumor burden)의 감소 중 하나 이상을 유도하는 조성물의 유효 용량을, 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 이를 필요로 하는 대상체는 암을 가진 대상체이다. 일부 실시양태들에서, 투여 단계는 암 치료를 위해 대상체에서 총 종양 부담의 50% 이상의 감소를 유도한다.

[0021] 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트를 수득하는 단계에서, 가스 크로마토그래피/질량 분광분석법으로 특징규명되었을 때, 1,4-연결된 갈락투론산 및 메틸 갈락투로네이트 잔기 백분은 총 탄수화물 몰 함량의 55 내지 85 몰%를 나타낼 수 있고, 교호 α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 GalA 잔기의 분지된 헤테로폴리머는 총 탄수화물 몰 함량의 1 내지 6 몰%를 나타낼 수 있고, 일차 분지의 올리고머 1,4- β -D-갈락토스는 총 탄수화물 몰 함량의 6 내지 15 몰%를 나타낼 수 있고, 일차 분지의 올리고머 1,5- α -L-아라비노스는 총 탄수화물 몰 함량의 2 내지 8 몰%를 나타낼 수 있다.

[0022] 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 20 kDa 내지 70 kDa 범위의 평균 분자량을 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 자일로스, 글루코스, 푸코스 잔기 또는 이의 조합을 더 포함한다.

[0023] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈렉틴에 결합하여 갈렉틴 기능을 억제할 수 있는 펩티드/단백질 억제제(PIA)일 수 있다. 일부 실시양태들에서, 펩티드/단백질 억제제는 안지넥스(anginex)를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 안지넥스는 일부 실시양태들에서는, 미국 특히 제6,770,622호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 상기 문현은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0024] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈렉틴에 결합하여 갈렉틴 기능을 억제할 수 있는 펩티드 모방제(peptidomimetic agent; PMA)일 수 있다. 일부 실시양태들에서 PMA는 OTX-008(PTX-008으로도 알려짐)일 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 일부 실시양태들에서, 펩티드 모방제는 미국 특히 제8,207,228호에 기재된 바와 같이 제조된 PMA를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않으며, 상기 문현은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0025] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈렉틴-3 또는 갈렉틴 단백질 패밀리의 다른 멤버에 결합하여 이를 억제하는 모노클로날 항체(이에 한정되지 않음)를 포함한, 갈렉틴-특이적 항체(GSA)일 수 있다.

[0026] 일부 실시양태들에서, 화합물은 탄수화물 결합 도메인 및 단백질 이량체화 도메인(이에 한정되지 않음)을 포함하는 갈렉틴 분자의 다양한 도메인과 상호작용할 수 있는 작은 유기 분자(SOM)일 수 있다.

[0027] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 림프구 공동자극 리간드 또는 수용체에 결합하여 공동자극의 길항제 또는 작용제로서 작용하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. 공동자극 수용체는 CD28 및 ICOS를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 공동자극 리간드는 CD80, CD86, 및 ICOS 리간드를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0028] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 림프구 억제성 리간드 또는 수용체에 결합하여 림프구 억제의 길항제 또는 작용제로서 작용하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. 억제성 수용체는 CTLA-4 및 LAG-3(림프구-활성화 유전자 3; CD223으로도 명명됨)을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 억제성 리간드는 CD80 및 CD86을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0029] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 CTLA-4에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-CTLA4)와 함께 사용될 수 있다.

[0030] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 림프구 상에서 발현되어 림프구 공동자극의 길항제 또는 작용제로서 작용하는 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼페밀리의 수용체들 또는 이의 리간드들에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. TNFR 슈퍼페밀리의 수용체들의 멤버는 CD134(OX40으로도 알려짐), CD27, 및 4-1BB, 및 OX40L 및 CD70, 및 4-1BBL(CD137L)(이에 한정되지 않음)을 포함하는 TNFR 수용체 리간드를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.

[0031] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 OX40에 결합하

는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-OX40)와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GA-RG 또는 GM 화합물은 치료적 유효량의 재조합 OX40L 또는 OX40의 다른 작용제와 함께 사용될 수 있다.

[0032] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 PD-리간드에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-PD-L1 및 PD-L2)와 함께 사용될 수 있다.

[0033] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 PD-1에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-PD-1)와 함께 사용될 수 있다.

[0034] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 수지상 세포의 활성화 또는 기능을 변경하여 항원 프로세싱 또는 반응을 바꾸는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제(들)와 함께 사용될 수 있다.

[0035] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 치료적 유효량의 암 백신과 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 치료적 유효량의 종양-항원에 대한 백신(tumor-antigen directed vaccine)과 함께 사용될 수 있다.

[0036] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 감염성 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용된 치료적 유효량의 백신과 함께 사용될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일부 양태에서, 암 치료 방법은 (a) 허용가능한 약학적 담체에 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트를 포함하는 비경구 또는 장내 투여용 조성물을 수득하는 단계로서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 갈락투론산(Ga1A) 잔기의 교호 올리고머의 분지된 헤테로폴리머에 연결된 1,4-연결된 Ga1A 및 메틸 갈락투로네이트(MeGa1A) 잔기 백본을 포함하고, 람노스 잔기는 1,4- β -D-갈락토스 잔기, 1,5- α -L-아라비노스 잔기, 또는 이의 조합의 올리고머의 일차 분지를 보유하는 것인 단계; 및 (b) 치료적 유효 용량의 암 치료를 위해 승인된 요법으로 치료된 대조군 대상체와 비교했을 때, CD8+ T-세포, CD4+ T-세포, 또는 CD8+ T-세포와 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 10% 이상 증가, 종양-항원 특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 10% 이상의 증가, 종양 크기에 있어 10% 이상의 감소, 전이 크기에 있어 10% 이상의 감소, 전이 개수에 있어 10% 이상의 감소, 총 종양 부담의 감소 중 하나 이상을 유도하는 조성물의 유효 용량을, 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 투여 단계는 암 치료를 위해 대상체에서 총 종양 부담의 50% 이상의 감소를 유도할 수 있다.

[0038] 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트를 수득하는 단계에서, 가스 크로마토그래피/질량 분광분석법으로 특정규명되었을 때, 1,4-연결된 갈락투론산 및 메틸 갈락투로네이트 잔기 백본은 총 탄수화물 몰 함량의 55 내지 85 몰%를 나타낼 수 있고, 교호 α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 Ga1A 잔기의 분지된 헤테로폴리머는 총 탄수화물 몰 함량의 1 내지 6 몰%를 나타낼 수 있고, 일차 분지의 올리고머 1,4- β -D-갈락토스는 총 탄수화물 몰 함량의 6 내지 15 몰%를 나타낼 수 있고, 일차 분지의 올리고머 1,5- α -L-아라비노스는 총 탄수화물 몰 함량의 2 내지 8 몰%를 나타낼 수 있다.

[0039] 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 20 kDa 내지 70 kDa 범위의 평균 분자량을 가질 수 있다. 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 자일로스, 글루코스, 푸코스 잔기 또는 이의 조합을 더 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일부 양태에서, 본 방법은 (a) (i) 갈락토-람노갈락투로네이트(GRG), 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트(GA-RG), 갈락토만난(GM), 변형된 합성 이당류(MSD), 펩티드/단백질 억제제(PIA), 펩티드 모방제(PMA), 갈렉틴-특이적 항체(GSA) 또는 작은 유기 분자(SOM) 또는 상기 것들의 임의의 조합 중 하나, 및 (ii) 치료적 유효량의 면역조절제를 포함하는 비경구 또는 장내 투여용 조성물을 수득하는 단계로서, 면역조절제는 림프구 공동 자극 리간드 또는 수용체, 림프구 억제성 리간드 또는 수용체, 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼페밀리의 수용체들, PD-리간드 중 하나 이상에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, 펩티드, 제제 또는 상기 것들의 임의의 조합을 포함하고; 조성물은 허용가능한 약학적 담체 내에 존재하는 것인 단계를 포함한다. 본 방법은 치료적 유효량의 면역조절제 단독으로 치료된 대조군 대상체와 비교했을 때, CD8+ T-세포, CD4+ T-세포, 또는 CD8+ T-세포와 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 10% 이상 증가, 종양-항원 특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 10% 이상의 증가, 종양 크기에 있어 10% 이상의 감소, 전이 크기에 있어 10% 이상의 감소, 전이 개수에 있어 10% 이상의 감소, 총 종양 부담의 감소 중 하나 이상을 유도할 수 있는 조성물의 유효 용량을, 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시양태들에서, 투여 단계는 암 치료를 위해 대상체에서 총 종양 부담의 50% 이상

의 감소를 유도할 수 있다.

[0041] 일부 실시양태들에서, 면역조절제는 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항 PD-L2, 4-1BB/4-1BBL에 대한 항체, LAG-3에 대한 항체, 또는 이의 조합일 수 있다.

[0042] 다른 본 발명의 양태들은 비경구 투여용 조성물에 관한 것으로, 여기서 조성물은 허용가능한 약학적 담체 내에 존재하고 (a) α-1,2 연결된 람노스 및 α-1,4-연결된 갈락투론산(Ga1A) 잔기의 교호 올리고머의 분지된 헤테로 폴리머에 연결된 1,4-연결된 Ga1A 및 메틸 갈락투로네이트(MeGa1A) 잔기 백분율 포함하는, 치료적 유효량의 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트로서, 람노스 잔기는 1,4-β-D-갈락토스 잔기, 1,5-α-L-아라비노스 잔기, 또는 이의 조합의 올리고머의 일차 분지를 보유하는 것인 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트, 및 (b) 치료적 유효량의 면역조절제를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 조성물은 암 치료에 사용될 수 있다.

[0043] 일부 실시양태들에서, 면역조절제는 림프구 공동자극 리간드 또는 수용체, 림프구 억제성 리간드 또는 수용체, 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼페밀리의 수용체들, PD-리간드 중 하나 이상에 결합할 수 있는 모노클로날 항체, 웨티드, 제제 또는 상기 것들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태들에서, 면역조절제는 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항 PD-L2, 4-1BB/4-1BBL에 대한 항체, LAG-3에 대한 항체, 또는 이의 조합일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 본 발명은 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명될 것이며, 몇몇 도면에서 유사한 구조는 유사한 번호로 지칭되어진다. 도시된 도면은 비율에 따를 필요는 없으며, 대신에 일반적으로 본 발명의 원리를 예시하기 위한 것임을 강조한다.

도 1은 그랜자임 B를 발현하는 CD8+ 세포의 %에 대해 분석된 다양한 실험군으로부터 얻은 말초 혈액 림프구의 백분율을 도시한다.

도 2는 Ki-67을 발현하는 CD8+ 세포의 %에 대해 분석된 다양한 실험군으로부터 얻은 말초 혈액 림프구의 백분율을 도시한다.

도 3은 Ki-67을 발현하는 CD4+ 세포의 %에 대해 분석된 다양한 실험군으로부터 얻은 말초 혈액 림프구의 백분율을 도시한다.

도 4는 다양한 실험군에서 13일째 마우스 중의 TRAMP-C1 전립선 종양의 크기를 도시한다.

도 5는 다양한 실험군에서 19, 25, 29 및 33일째 마우스 중의 TRAMP-C1 전립선 종양의 크기를 도시한다.

도 6은 TRAMP-C1 전립선 암을 가진 다양한 실험군에 대한 생존 곡선을 도시한다.

도 7은 다양한 실험군에 대해 11, 14, 20, 및 25일째에 마우스 중의 유방 종양의 크기를 도시한다.

도 8A는 aOX40을 단독으로 또는 GA-RG와 함께(MD02로서 표시됨) 사용하여 치료한 마우스에서 4T1 유방암 종양을 이용한 실험에서의 생존율을 도시한다. 도 8B는 aOX40을 단독으로 또는 GA-RG와 함께(MD02로서 표시됨) 사용하여 치료된 마우스에서 4T1 유방암 종양을 이용한 실험에서의 폐 전이를 도시한다.

도 9A는 aOX40을 단독으로 또는 GA-RG와 함께(MD02로서 표시됨) 사용하여 치료된 4T1 유방 종양 보유 마우스의 순환계(circulation)에서 GR-1 음성/CD11b 양성 세포의 백분율을 도시한다. 도 9B는 aOX40을 단독으로 또는 GA-RG와 함께(이들 도면에서 MD02로서 표시됨) 사용하여 치료된 4T1 유방암 종양 보유 마우스의 순환계에서 GR-1 중간(intermediate)/CD11b 양성 세포의 백분율을 도시한다. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

도 10a는 aOX40을 단독으로 또는 GA-RG와 함께(이들 도면에서 MD02로서 표시됨) 사용한 치료에 대한 MCA-205 육종 종양 보유 마우스의 반응을 도시한다. 도 10b는 동일한 동물 군에 대한 생존 곡선을 도시한다.

도 11A는 다양한 종양 세포주에서 배지 중으로 분비된 갈렉틴-3 단백질의 발현을 도시한다. 도 11B는 다양한 종양 세포주에서 전세포 용해물(whole cell lysate) 중의 갈렉틴-3 단백질의 발현을 도시한다.

도 12A는 다양한 마커의 유동 세포분석에 의한, 야생형 CD8 T 세포에 대한 나이브 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포의 표현형 비교를 도시한다. 도 12B는 실험에 사용된 모델의 모식도이다.

도 13A-C는 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포가 생체내 항원 자극 이후에 감소된 이펙터(effector) 기능을 나타내는 것을 도시한다. 도 13A는 야생형 및 gal-3 널(null) 동물에서 OT-I 양성/총 CD8 세포의 %를 도시한다. 도 13B

는 야생형 및 gal-3 널 CD8 림프구에서 마키의 발현에 있어 차이를 도시한다. 도 13C는 야생형 및 gal-3 널 CD8 림프구에서 사이토킨 분비에 있어 차이를 도시한다.

도 14는 선택된 유전자들이 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포에서 하향 조절됨을 도시한다. 도 14A는 야생형 세포에 대한 Gal 3 -/- OT-I 세포에서 하향 조절되는 것으로 밝혀진 몇몇 유전자들의 그래프 표시도이다. 도 14B는 선택된 유전자들에 대한 상대 단위(relative units) 및 배수 변화를 도시한다.

도 15는 세포 유동분석에 의한 CD25(IL2-Ra) 또는 OX40의 발현을 도시한다. 도 15는 갈렉틴-3 결손 CD8T 세포가 항원 자극 이후에 감소된 CD25 및 OX40 발현을 나타낸다.

도 16A는 7일째에, 미처리된 마우스(검은색 막대) 또는 Gal-3 억제제 GR-MD-02로 처리된 마우스의 말초 혈액 또는 비장에서 공여자 세포의 표현형을 도시한다. 도 16B는 29째에, 미처리된 마우스(검은색 막대) 또는 Gal-3 억제제 GR-MD-02로 처리된 마우스의 말초 혈액 또는 비장에서 공여자 세포의 표현형을 도시한다. 도 16A-B는 GA-RG를 이용한 갈렉틴-3 억제(이 도면에서 GR-MD-02로 표시됨)가 CD8 T 세포 증식 및 이펙터 기능을 증강시킴을 도시한다.

도 17은 항-CTLA4 요법과 병용된 갈렉틴-3 억제는 항-CTLA4 단독에 비해 비장에서 항원-특이적 기억 CD8 T 세포의 생성을 증강시킴을 도시한다. GA-RG는 이 도면에서 MD02로서 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

본 발명의 상세한 실시양태가 여기에 개시된다; 그러나, 개시된 실시양태는 다양한 형태로 구현될 수 있는 본 발명을 단지 예시하기 위한 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명의 다양한 실시양태와 관련하여 제공된 각각의 예는 예시적인 것이며, 한정하는 것은 아닌 것으로 의도된다. 또한, 도면은 비율에 따를 필요는 없으며, 몇몇 특징은 특정 구성요소를 상세하게 나타내기 위하여 과장될 수 있다. 또한, 도면에 도시된 임의의 측정, 사양 등은 예시적인 것이며 한정하는 것은 아닌 것으로 의도된다. 따라서, 여기에서 개시된 특정 구조 및 기능적 세부 사항은 제한적인 것으로 해석되어지는 것은 아니며, 단지 본 발명을 다양하게 실시하도록 당업자에게 교시하기 위한 대표적인 기초로서 해석되어야 한다.

[0046]

달리 명시하지 않았다면, 본원에서 표현된 모든 백분율은 중량/중량이다.

[0047]

용어 "대상체"는 영장류(예를 들면, 인간)(이에 한정되지 않음)를 포함한 동물을 지칭한다. 용어 "대상체" 및 "환자"는 본원에서 예를 들어, 인간 대상체와 같은 포유동물 대상체를 언급함에 있어 상호교환적으로 사용된다.

[0048]

암 면역요법을 위해 추구되어지고 있는 일 접근법은 종양 특이적 또는 과발현된 항원을 이용한 면역화를 포함한 용어 "종양 백신"에 의해 커버되는 영역이다. 이러한 접근법에서, 종양 세포에 특이적이거나 또는 종양 세포에서 과발현되는 항원 또는 항원들은 단독으로, 아쥬번트와 함께, 항원을 전달하는 미생물(예를 들어, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria Monocytogenes*))의 일부로서, 또는 면역 세포(수지상 세포를 포함하지만 이에 한정되지 않음)를 이용한 생체외 인큐베이션 후에 주입되어 세포성 및/또는 체액성 면역 반응을 유발한다.

[0049]

암 면역요법을 위해 추구되어지고 있는 또 다른 접근은 특이적 면역 세포 수용체 또는 이들의 리간드의 기능 조절을 통하는 것이다. 이는 면역 세포 수용체 및/또는 리간드를 인식하여 여기에 결합하는 모노클로날 항체를 이용하여 달성되어지고 있다. 표적 수용체 또는 리간드에 대한 모노클로날 항체의 결합은 그 수용체 또는 리간드의 기능을 억제하거나 강화하는 것으로 드러났다.

[0050]

종양에 대한 면역 반응을 강화하는 것으로 밝혀진 모노클로날 항체는 CTLA-4(세포독성 T-림프구-회합된(associated) 항원-4), PD-1 수용체(프로그래밍된 사멸-1), 및 OX40(CD134로도 알려짐)과 결합하는 항체를 포함한다. 항-CTLA-4 및 항-PD-1 모노클로날 항체는, 세포 실험 및 종양을 갖는 동물에서의 이들의 활성 이외에, 인간에서 중요한 항-종양 활성을 가지는 것으로 드러났다.

[0051]

본 발명의 양태들은 본원에 기재된 복합 탄수화물 약학적 생성물 또는 다른 제제를 단독으로 또는 면역계의 활성화를 이용하는 암 및 다른 질환의 면역요법의 효능을 증가시킬 수 있는 다른 표적화된 면역요법과 함께 사용하여 면역 기능을 증강시키는 신규의 접근법에 관한 것이다. 용어 "표적화된 면역요법" 및 "면역조절제"는 상호교환적으로 사용된다.

[0052]

본 발명의 일부 양태들은 이를 필요로하는 대상체의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 본 방법은 정맥내, 피하, 비경구의 다른 루트, 또는 경구 투여용 조성물을 수득하는 단계로서, 조성물은 허용 가능한 약학적 담체에 화합물을 포함하는 것인 단계 및 조성물을 이를 필요로하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일

부 실시양태들에서, 조성물은 허용가능한 약학적 담체에 화합물과 면역조절제를 포함한다.

- [0053] 본 발명의 다른 양태들은 비경구 투여용 제제에 관한 것이며, 여기서 제제는 허용가능한 약학적 담체 내에 존재하고 치료적 유효량의 화합물과 치료적 유효량의 면역조절제를 포함한다.
- [0054] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈락토-람노갈락투로네이트(GRG), 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트(GA-RG), 갈락토만난(GM), 변형된 합성 이당류(MSD), 웨티드/단백질 억제제(PIA), 웨티드 모방제(PMA), 갈렉틴-특이적 항체(GSA) 또는 작은 유기 분자(SOM) 중 하나 또는 상기 것들의 임의의 조합일 수 있다.
- [0055] 일부 실시양태들에서, 특정 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 갈렉틴 1 내지 15를 포함한, 갈렉틴 단백질 부류의 다양한 도메인과 상호작용하여 이들의 기능을 억제하거나, 강화하거나 조절하는 능력을 가질 수 있다.
- [0056] 일부 실시양태들에서, 특정 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 N-말단 도메인 및 탄수화물 인식 도메인의 S- 및 F-면(이에 한정되지 않음)을 포함한, 갈렉틴-3 단백질의 다양한 도메인과 상호작용하여, 천연 리간드와 이의 상호작용을 억제하여 갈렉틴-3 기능을 억제하는 능력을 가질 수 있다.
- [0057] 일부 실시양태들에서, 특정 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 탄수화물 인식 도메인과 이량체화 도메인(이에 한정되지 않음)을 포함한, 갈렉틴-1 단백질의 다양한 도메인과 상호작용하여, 천연 리간드와 이의 상호작용을 억제하여 갈렉틴-1 기능을 억제하는 능력을 가질 수 있다.
- [0058] 용어 "유효 용량"은 비경구 용량으로서 동물 또는 인간에 투여될 때 면역 반응을 조절하는 1 이상의 항체, 단백질 또는 다른 제제와 병용되어 면역 반응의 마커의 10% 이상, 20% 이상, 또는 25% 이상의 증가를 나타내는, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물의 양을 의미한다. 면역 반응의 마커는 CD8 수용체를 갖는 T 림프구(본원에서 CD8 림프구로서 지칭됨)의 증식(Ki-67에 대한 염색(이에 한정되지 않음)을 포함한 다양한 방법에 의해 확인됨), CD8 세포의 활성화된 기능의 마커(그랜자임 B에 대한 염색(이에 한정되지 않음)을 포함한 다양한 방법에 의해 확인됨) 또는 다른 세포 조절 또는 이펙터 세포에 있어 변화를 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 다른 면역 마커는 GR-1+ 및 CD11b+ 단핵 세포의 상대적 발현 및/또는 빈도를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 면역조절제는 OX40에 대한 항체(항-OX40), CTLA-4에 대한 항체(항-CTLA-4), PD-1에 대한 항체(항-PD-1), PD-1L/2L에 대한 항체(항-PD-L1 또는 항-PD-L2), 4-1BB/4-1BBL에 대한 항체, LAG-3에 대한 항체, 또는 상기 항체들 중 2 이상의 조합을 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0060] 면역조절제는 또한 면역 반응의 프로세스, 예컨대 항원-의존적 인식, 항원 프로세싱, 림프구 공동자극, 및 림프구 억제에 영향을 미치는 항체, 단백질, 웨티드, 또는 작은 유기 분자를 포함할 수 있다.
- [0061] 용어 "효능(efficacy)"은, 면역조절제를 단독으로 또는 이를 제제의 2 이상의 조합을 이용한 치료와 비교했을 때, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물을 단독으로 또는 면역조절제 또는 이를 제제의 2 이상과 조합한 치료를 이용하는 경우 종양 성장, 진행 또는 전이를 10% 이상 감소시키는 것을 의미한다.
- [0062] 본 발명의 양태들은 면역 기능을 증강시킬 수 있는 조성물 및 이러한 조성물을 이용하는 방법에 관한 것이다.
- [0063] 본 발명의 양태들은 이를 필요로하는 대상체의 치료 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태들에서, 대상체는 암을 앓고 있다. 일부 실시양태들에서, 본 방법은 허용가능한 약학적 담체에 화합물을 포함하는 정맥내 또는 피하 또는 경구 투여용 조성물을 수득하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태들에서, 본 방법은 비경구 투여용 조성물을 수득하는 단계를 포함한다. "비경구 투여"는 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추 강내, 캡슐내, 안와내(intraorbital), 심장내, 피부내, 복강내, 기관지경(transtracheal), 피하, 피부밑(subcuticular), 관절내, 피막하(subcapsular) 거미막하(subarachnoid), 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입에 의한 투여 뿐만 아니라 볼루스 주사 또는 주입에 의한 투여를 포함한다.
- [0064] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈락토-람노갈락투로네이트(GRG)로서 화학적으로 규명된 다당류, 주로 1,4-b-D-갈락토스(Gal) 및 1,5-a-L-아라비노스(Ara) 잔기를 포함하는, 임의 개수의 측쇄에 연결되는, 백분이 주로 1,4-연결된 갈락투론산(Ga1A) 모이어티 및 메틸 갈락투로네이트(MeGa1A) 잔기로 구성되고, 교호 1,4-연결된 Ga1A 및 1,2-연결된 람노스(Rha)의 보다 적은 백분 조성을 갖는, 선택적으로 해중합된 분지형 혜테로폴리머이다. 다른

측쇄 부 성분은 자일로스(Xyl), 글루코스(Glu), 및 푸코스(Fuc) 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0065] 일부 실시양태들에서, GRG 화합물은 현재 미국 특허 제8,236,780호로서 등록된 미국 특허 출원 공보 제2008/0107622호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0066] 일부 실시양태들에서, GRG 화합물은 미국 특허 제8,128,966호, 제8,187,624호, 미국 특허 출원 공보 제2012/0315309호 및 제2012/0309711호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 이들 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0067] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트(GA-RG)로서 화학적으로 규명된 다당류, 주로 1,4-b-D-갈락토스(Gal) 및 1,5-a-L-아라비노스(Ara) 잔기를 포함하는, 임의 개수의 측쇄에 연결되는, 백본이 주로 1,4-연결된 갈락투론산(Ga1A) 모이어티로 구성되고, 교호 1,4-연결된 Ga1A 및 1,2-연결된 람노스(Rha)의 보다 적은 백본 조성을 갖는, 선택적으로 해중합된 분지형 혼테로폴리머이다. 일부 실시양태들에서, 가스 크로마토그래피/질량 분광분석법으로 특징규명되었을 때, 1,4-연결된 갈락투론산 및 메틸 갈락투로네이트 잔기 백본은 총 탄수화물 물 함량의 55 내지 85 몰%를 나타내고, 교호 α -1,2 연결된 람노스 및 α -1,4-연결된 Ga1A 잔기의 분지된 혼테로폴리머는 총 탄수화물 물 함량의 1 내지 6 몰%를 나타내고, 일차 분지의 올리고머 1,4- β -D-갈락토스는 총 탄수화물 물 함량의 6 내지 15 몰%를 나타내고 일차 분지의 올리고머 1,5- α -L-아라비노스는 총 탄수화물 물 함량의 2 내지 8 몰%를 나타낸다.

[0068] 다른 측쇄 부 성분은 자일로스(Xyl), 글루코스(Glu), 및 푸코스(Fuc) 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

[0069] 일부 실시양태들에서, 본 발명의 GA-RG 화합물 중의 1,4-b-D-Gal 및 1,5-a-L-Ara 잔기의 몰%는 21.5%이며 이때 1,4-b-D-Gal : 1,5-a-L-Ara의 몰비는 3:1이다.

[0070] 일부 실시양태들에서, 화합물은, SEC-RI 방법으로 확인한 문자량 범위가 20,000 내지 70,000 돌턴인, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트(GA-RG)로서 화학적으로 규명된 다당류이다. 일부 실시양태들에서, 갈락토아라비노-람노갈락투로네이트는 20 kDa 내지 70 kDa 범위의 평균 문자량을 가진다.

[0071] 일부 실시양태들에서, GA-RG 화합물은 국제 특허 출원 제PCT/US12/55311호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0072] 일부 실시양태들에서, 화합물은 미국 특허 출원 공보 제US20110077217호에 기재된 바와 같이 제조된 갈락토만난(GM) 다당류 조성물이며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 그 전문이 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0073] 일부 실시양태들에서, GM 화합물의 평균 문자량은 SEC-MALLS 방법으로 측정시 대략 4,000 내지 60,000 kD이다.

[0074] 일부 실시양태들에서, 화합물은 미국 특허 제6,444,655호, 제7,230,096호, 제7,638,623호, 제7,700,763호, 및 제8,092,825호에 기재된 바와 같이 제조된 변형된 합성 이당류(MSD)이며, 상기 문헌들은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0075] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈렉틴에 결합하여 갈렉틴 기능을 억제할 수 있는 펩티드/단백질 억제제(PIA)이고, 이는 미국 특허 제6,770,622호에 기재된 바와 같이 제조된 PIA(이에 한정되지 않음)를 포함할 수 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0076] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈렉틴에 결합하여 갈렉틴 기능을 억제할 수 있는 펩티드 모방제(PMA)이고, 이는 미국 특허 제8,207,228호에 기재된 바와 같이 제조된 안지넥스 및 OTX-008(PTX-008로도 알려짐)(이에 한정되지 않음)를 포함할 수 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 명시적으로 참고적으로 도입된다.

[0077] 일부 실시양태들에서, 화합물은 갈렉틴-특이적 모노클로날 항체(GSA)이다.

[0078] 일부 실시양태들에서, 화합물은 탄수화물 결합 도메인과 단백질 이랑체화 도메인(이에 한정되지 않음)을 포함한 갈렉틴 문자의 다양한 도메인과 상호작용하는 작은 유기 문자(SOM)이다.

[0079] 일부 실시양태들에서, GRG 및 GA-RG는 b-샌드위치 결합 도메인의 S-면 상의 표준(canonical) 탄수화물 인식 도메인 내의 복수 아미노산 잔기뿐만 아니라 상기 단백질의 대향되는 F-면 상의 아미노산 잔기에서 갈렉틴-3 문자에 결합한다.

[0080] 일부 실시양태들에서, 갈렉틴-3 문자 내의 아미노산 잔기에 대한 GRG 및 GA-RG의 결합은 갈렉틴-3 문자의 기능을 방해하는 역할을 한다.

- [0081] 일부 실시양태들에서, 변형된 합성 이당류(MSD)는 GA-RG와 마찬가지로 갈렉틴-3 탄수화물 도메인 내의 유사 부위에 결합하여 갈렉틴-3 분자의 기능을 억제하는 유사 기능을 가질 수 있다.
- [0082] 일부 실시양태들에서, 펩티드/단백질 억제제(PIA)는 GA-RG와 마찬가지로 갈렉틴-3 탄수화물 도메인 내의 유사 부위에 결합하여 갈렉틴-3 분자의 기능을 억제하는 유사 기능을 가질 수 있다.
- [0083] 일부 실시양태들에서, 펩티드 모방제(PMA)는 GA-RG와 마찬가지로 갈렉틴-3 탄수화물 도메인 내의 유사 부위에 결합하여 갈렉틴-3 분자의 기능을 억제하는 유사 기능을 가질 수 있다.
- [0084] 일부 실시양태들에서, 갈렉틴-특이적 항체(GSA)는 GA-RG와 마찬가지로 갈렉틴-3 탄수화물 도메인 내의 유사 부위에 결합하여 갈렉틴-3 분자의 기능을 억제하는 유사 기능을 가질 수 있다.
- [0085] 일부 실시양태들에서, 작은 유기 분자(SOM)는 GA-RG와 마찬가지로 갈렉틴-3 탄수화물 도메인 내의 유사 부위에 결합하여 갈렉틴-3 분자의 기능을 억제하는 유사 기능을 가질 수 있다.
- [0086] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 CTLA-4에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-CTLA-4)와 함께 사용된다. CD152(분화 무리(Cluster of differentiation) 152)라고도 알려진 CTLA-4(세포독성 T-림프구 항원 4)는 면역계를 하향 조절하고 T 세포 표면상에서 발견될 수 있는 단백질 수용체로서, 항원에 대한 세포성 면역 공격을 유도한다.
- [0087] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 작용제로서 작용하는 OX40 (항-OX40) 또는 재조합 OX40L에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 작용제 항체와 함께 사용된다. OX40은 종양 괴사 인자/신경 성장 인자 수용체(TNFR/NGFR) 패밀리의 멤버이다. OX40은 정상 및 악성 림프 세포의 분화, 증식 또는 아폽토시스의 조절뿐만 아니라 T-세포 활성화에 있어 역할을 담당할 수 있다.
- [0088] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 PD-1에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-PD-1)와 함께 사용된다. PD-1은 CD28/CTLA-4 패밀리의 T 세포 조절자의 멤버인 프로그래밍된 세포 사멸 단백질 1을 지칭한다.
- [0089] 일부 실시양태들에서 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 림프구 공동자극 리간드 또는 수용체에 결합하여 공동자극의 길항제 또는 작용제로서 작용하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. 공동자극 수용체는 CD28 및 ICOS를 포함하지만 이에 한정되지 않고 리간드는 CD80, CD86, 및 ICOS 리간드를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0090] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 림프구 억제성 리간드 또는 수용체에 결합하여 림프구 억제의 길항제 또는 작용제로서 작용하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. 억제성 수용체는 CTLA-4를 포함하지만 이에 한정되지 않고 리간드는 CD80 및 CD86을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0091] 일부 실시양태들에서 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 CTLA-4에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-CTLA-4)와 함께 사용될 수 있다.
- [0092] 일부 실시양태들에서 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 림프구 상에서 발현되어 림프구 공동자극의 길항제 또는 작용제로서 작용하는 종양 괴사 인자 수용체(TNFR) 슈퍼패밀리의 수용체들 또는 이들의 리간드들에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다. TNFR 슈퍼패밀리의 수용체들의 멤버는 CD134(OX40으로도 알려짐), 4-1BB (CD137), 및 CD27, 및 OX40L, 4-1BBL(CD137L) 및 CD70(이에 한정되지 않음)을 포함하는 TNFR 수용체 리간드를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0093] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 OX40에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-OX40)와 함께 사용될 수 있고, 본원에 기재된 GA-RG 또는 GM 화합물을 치료적 유효량의 재조합 OX40L 또는 OX40의 다른 작용제와 함께 사용될 수 있다.
- [0094] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 PD-리간드에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-PD-L1 및 PD-L2)와 함께 사용될 수 있다.
- [0095] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 PD-1에 결합하는 치료적 유효량의 모노클로날 항체(항-PD-1)와 함께 사용될 수 있다.

- [0096] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 수지상 세포의 활성화 또는 기능을 변경하여 항원 프로세싱 또는 반응을 바꾸는 치료적 유효량의 모노클로날 항체, 펩티드 또는 다른 제제와 함께 사용될 수 있다.
- [0097] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 치료적 유효량의 종양-항원에 대한 백신 또는 암 백신과 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 아쥬번트와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 아쥬번트는 TLR 리간드 예컨대 폴리I:C, CpG, 등을 포함할 수 있다.
- [0098] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 단독으로 또는 치료적 유효량의 종양-항원에 대한 백신 또는 암 백신과 함께 사용될 수 있다.
- [0099] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 감염성 질환의 치료 또는 예방을 위해 사용된 치료적 유효량의 백신과 함께 사용될 수 있다.
- [0100] 일부 실시양태들에서, 본원에 기재된 GRG, GA-RG, GM, MSD, PIA, PMA, GSA, 또는 SOM 화합물은 단독으로 또는 치료적 유효량의, 상기 제제들 중 임의의 제제 또는 상기 제제들의 임의의 조합과 함께 사용될 수 있다.
- [0101] 실험 동물(예를 들면 마우스)에 대해 치료적 유효 용량의 항-OX40, 항-CTLA4, 항-PD-1, 또는 다른 면역조절제, 또는 상기 것들의 임의의 조합과 함께 사용되는 GRG 또는 GA-RG 다당류의 유효 복강내 또는 정맥내 용량은 주당 1회, 주당 2회, 또는 주당 3회로 제공되는 10 내지 120 mg/mg일 수 있다.
- [0102] 인간 대상체에 대해 치료적 유효 용량의 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 다른 면역조절제 또는 상기 것들의 임의의 조합과 함께 사용되는 GRG 또는 GA-RG의 유효 정맥내 용량은 동물 용량으로부터 등가(equivalency)로부터 계산시 주당 1회, 주당 2회, 또는 주당 3회로 제공되는 0.5 내지 15 mg/kg일 수 있다.
- [0103] 인간 대상체에 대해 치료적 유효 용량의 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 다른 면역조절제 또는 상기 것들의 임의의 조합과 함께 사용되는 GRG 또는 GA-RG의 유효 용량은 정맥내 용량의 1 내지 100배의 배수(multiples)로 피하, 다른 비경구 루트, 또는 경구로 투여될 수 있다.
- [0104] 실험 동물(예를 들면 마우스)에 대해 치료적 유효 용량의 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 다른 면역조절제 또는 상기 것들의 임의의 조합과 함께 사용되는 본원에 기재된 GM 화합물의 유효 복강내 또는 정맥내 용량은 주당 1회, 주당 2회, 또는 주당 3회로 제공되는 10 내지 180 mg/mg일 수 있다.
- [0105] 인간 대상체에 대해 치료적 유효 용량의 항-OX40, 항-PD-1, 또는 다른 면역조절제 또는 상기 것들의 임의의 조합과 함께 사용되는 GM의 유효 정맥내 용량은 동물 용량으로부터 등가로부터 계산시 주당 1회, 주당 2회, 또는 주당 3회로 제공되는 0.5 내지 20 mg/kg일 수 있다.
- [0106] 인간 대상체에 대해 치료적 유효 용량의 항-OX40, 항-CTLA-4, 항-PD-1, 또는 다른 면역조절제 또는 상기 것들의 임의의 조합과 함께 사용되는 GM 화합물의 유효 용량은 정맥내 용량의 1 내지 100배의 배수로 피하, 다른 비경구 루트, 또는 경구로 투여될 수 있다.
- [0107] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 증식에 있어 10% 이상 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 증식에 있어 15% 이상 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 증식에 있어 20% 이상 증가로 결정된다.
- [0108] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 Ki-67의 발현에 의해 측정될 때 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 증식에 있어 10% 이상 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 Ki-67의 발현에 의해 측정될 때 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 증식에 있어 15% 이상 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 Ki-67의 발현에 의해 측정될 때 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 증식에 있어 20% 이상 증가로 결정된다.
- [0109] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 일반적인 증식과 관련되지 않는다.
- [0110] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 적어도 10% 최대 25%의 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 적어도 15% 최대 25%의 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조

성물의 효능은 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 20% 이상의 증가로 결정된다.

[0111] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 그랜자임 B의 발현에 의해 측정될 때 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 10% 이상의 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 그랜자임 B의 발현에 의해 측정될 때 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 15% 이상의 증가로 결정된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 그랜자임 B의 발현에 의해 측정될 때 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-세포의 활성화에 있어 20% 이상의 증가로 결정된다.

[0112] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 CD8+ 또는 CD4+ T-세포에서 그랜자임 B 발현에 있어 일반적인 증가와 관련되지 않는다.

[0113] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양 항원-특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 10% 이상의 증가와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양 항원-특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 15% 이상의 증가와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양 항원-특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포의 20% 이상의 증가와 관련된다.

[0114] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 GR-1 음성/CD11b 양성 세포의 10% 이상의 증가와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 GR-1 음성/CD11b 양성 세포의 15% 이상의 증가와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 GR-1 음성/CD11b 양성 세포의 20% 이상의 증가와 관련된다.

[0115] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 GR-1 중간 또는 양성/CD11b 양성 세포의 10% 이상의 감소와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 GR-1 중간 또는 양성/CD11b 양성 세포의 15% 이상의 감소와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 GR-1 중간 또는 양성/CD11b 양성 세포의 20% 이상의 감소와 관련된다.

[0116] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 (치료 개시 시점에서의 크기와 비교했을 때) 종양 크기의 10% 이상의 감소와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양 크기의 15% 이상의 감소와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양 크기의 20% 이상의 감소와 관련된다.

[0117] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 일차 종양으로부터 원격 전이의 크기 또는 개수의 10% 이상의 감소와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 일차 종양으로부터 원격 전이의 크기 또는 개수의 15% 이상의 감소와 관련된다. 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 일차 종양으로부터 원격 전이의 크기 또는 개수의 20% 이상의 감소와 관련된다.

[0118] 일부 실시양태들에서, 모든 병변이 차지하는 부피의 총합은 "총 종양 부담"(Total Tumor Burden; TTB)로 불리는 단일 수치로 표시될 수 있다. 이에, 임의 종양이 선택된 치료 계획에 반응하는 경우, TTB는 변할 것이다. 일부 실시양태들에서, TTB는 대상체에서 면역조절제와 함께 본원에 기재된 화합물(예를 들면 탄수화물 화합물)을 포함하는 병용 요법으로 치료 후 측정될 수 있고 면역조절제 단독으로 치료된 대상체의 TTB와 비교된다. 그러나, 다른 실시양태들에서, TTB는 대상체에서 본원에 기재된 화합물(예를 들면 탄수화물 화합물)로 치료 후 측정될 수 있고 표준 요법(예를 들면 암 치료를 위해 승인된 제제)으로 치료된 대상체의 TTB와 비교된다.

[0119] 일부 실시양태들에서, 탄수화물 화합물(예를 들면 GA-RG)을 단독으로 또는 다른 면역요법(예를 들면 면역조절제)과 함께 치료된 종양은 고형 종양에 있어 면역-관련 반응 기준을 이용하여 평가될 수 있다. 일부 실시양태들에서, 사용된 면역-관련 반응 기준은 Hoos 등(J Natl Cancer Inst. 102:1388-1397 and Clinical Cancer research 15:74, 2009)에 기재된 기준일 수 있으며, 이 문헌은 그 전문이 본원에서 참고적으로 도입된다. 종양 가측성(measurability)은 나선형 컴퓨터 단층촬영(tomography) 스캔 상에서 5 X 5 mm 또는 그 이상으로 정의될 수 있다. 하기 식에 따라 총 종양 부담(TTB)을 계산하기 위해 기준치의 인덱스 병변의 수직 직경의 합(SPD)이 새로운 병변의 것에 추가될 수 있다: 총 종양 부담 = 인덱스 병변의 SPD + 새로운 측정가능한 병변의 SPD.

[0120] 일부 실시양태들에서, 종양 부담에 있어 변화는 기준 종양 부담, 즉, 기준치의 모든 인덱스 병변의 SPD에 대해 평가될 수 있다. 기준 종양 부담에 대해 인덱스 및 새로운 측정가능한 종양 부담의 100% 감소가 존재한다면, 전체 반응은 irCR (면역-관련 반응 전체 반응(Complete Response))이다. 기준 종양 부담에 대해 인덱스 및 새로운 측정가능한 종양 부담의 50% 이상의 감소가 존재한다면, 전체 반응은 irPR (면역-관련 반응 부분 반응(Partial Response))이다. 기준 종양 부담에 대해 인덱스 및 새로운 측정가능한 종양 부담의 50% 미만 감소 내지 25% 미

만 증가가 존재한다면, 전체 반응은 irSD(면역-관련 반응 안정성 질환(Stable Disease))이다. 반응 및 진행을 적어도 4주 간격으로 제2 평가에 의해 확인한다는 전제하에, 기준 종양 부담에 대해 인덱스 및 새로운 측정 가능한 종양 부담의 25% 이상의 증가가 존재한다면, 전체 반응은 irPD(면역-관련 반응 진행성 질환(Progressive Disease))이다.

- [0121] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양에서 갈렉틴-3의 발현 수준과 직접적으로 관련되며 증가된 효능은 종양에서 증가된 갈렉틴-3 발현과 연관된다.
- [0122] 일부 실시양태들에서, 암 요법에서 비경구 투여용 조성물의 효능은 종양 세포에서 갈렉틴-3의 발현 수준 및 종양 마이크로환경 중으로 분비된 갈렉틴-3의 발현 수준과 직접적으로 관련될 수 있으며, 증가된 갈렉틴-3 수준은 보다 우수한 효능과 관련된다.
- [0123] 일부 실시양태들에서, 비경구 투여용 조성물의 효능은 위장관암(식도, 위, 소장, 결장, 및 항문), 혀장암(내분비 및 선암), 담도암, 다양한 종류의 간암, 육종, 근육종, 유방암, 폐암, 두경부암, 구강암, 피부암, 흑색종, 신장암, 비뇨기 및 방광, 전립선 암, 고환암, 난소암, 자궁내막암, 신경계암(뇌 및 신경), 내분비선암(갑상선, 부신, 부갑상선, 뇌하수체), 뼈암(골육종), 혈액암(림프종, 백혈병), 다발성 골수종, 및 골수암유증(이에 한정되지 않음)을 포함한 다수 암의 요법에 사용될 수 있다.
- [0124] 일부 실시양태들에서, 치료 방법은 하기 중 하나 이상을 유도하는 유효 용량의 비경구 투여용 조성물을 또는 이를 면역조절 항체와 함께 대상체에 투여하는 단계를 더 포함한다:
- [0125] Ki-67 및/또는 그랜자임 B 발현(이에 한정되지 않음)을 포함한 다양한 방법에 의해 측정될 때 순환 CD8+ 또는 CD4+ T-세포에 있어 활성화 정표에 있어 10% 이상 증가;
- [0126] 종양 항원-특이적 CD8+ 또는 CD4+ T-세포에 있어 10% 이상의 증가;
- [0127] 종양 크기 또는 진행에 있어 10% 이상의 반응률;
- [0128] 무진행 생존(암의 진행없이 환자 생존) 또는 환자 생존에 있어 전체적 증가;
- [0129] 일차 종양으로부터 원격 전이의 크기 또는 개수에 있어 10% 이상 감소;
- [0130] 표준 치료 단독, 무 치료 또는 면역조절제만을 포함한 치료와 비교했을 때, 면역-관련 반응 기준으로 평가시 종양 부담에 있어 통계적으로 유의한 차이.
- [0131] 실시예 1: 항-CTLA-4, 항-OX40, 또는 항-PD-1을 GA-RG 및 GM과 함께 처리 후의 면역 및 전립선 종양 반응의 증진
- [0132] 본 실시예에서, 실험들은 마우스 암의 동계 모델에서 실시되었다. 사용된 종양 세포는 마우스 전립선암에서 유래한 TRAMP-C1 세포주였다. 이를 세포를 얻기 위해, SV40 거대 T 항원을 전립선 특이적 유전자 프로모터를 갖는 트랜스제닉 마우스에서 발현시켜, 전립선 조직에서 SV40 거대 T를 특이적으로 발현시켰다. TRAMP-C1 세포주는 얻어진 전립선 종양으로부터 유래했으며; 중요하게도, 이 세포주는 SV40 거대 T-항원을 발현하지 않는다. 종양 모델을 위해, TRAMP-C1 세포(1 X 10⁶ 세포)를 피하 주사를 통해 정상 C57BL/6 마우스에 접종시켰다.
- [0133] TRAMP-C1 세포를 접종한 후, 마우스 군에 복강내 주사를 통해 IgG(대조군으로서, 접종 후 4일, 6일 및 8일째), 또는 항-CTLA-4(접종 후 4일, 6일 및 8일째 200 마이크로그램), 또는 항-PD-1(접종 후 4일, 6일 및 8일째 200 마이크로그램), 또는 항-OX40 (접종 후 4일 및 8일째 250 마이크로그램)을 처리했다.
- [0134] 다른 동물 군에 하기에 기재된 바와 같이 상기와 동일한 화합물 + GA-RG 또는 GM을 처리했다: GA-RG, 4일, 6일 및 8일째 2.4 mg/용량, 또는 GM, 4일, 6일 및 8일째 2.4 mg/용량 이후에 GA-RG 28, 30, 및 32.
- [0135] 도 1은 실험 동물의 다양한 군(군당 5마리 마우스)에 대한 실험 결과를 도시한다. y 축상에 표시된 치수는 그랜자임 B에 대해 양성인 단리된 CD8+ 세포의 %이다. 단백질 그랜자임 B는 CD8 양성 림프구의 이펙터 기능에 대한 마커이다. 그랜자임은 표적 세포 예컨대 종양 세포 또는 바이러스 감염된 세포에서 아폽토시스를 유도할 수 있는 CD8+ 세포독성 T-세포 내의 원형질 과립에 의해 분비되는 세린 프로테아제이다. 항-OX40(aOX40), 항-CTLA-4(aCTLA-4), 또는 항-PD-1(aPD-1)로 처리된 동물에 대한 래트 IgG 단독(대조군)의 비교는, 항체 대조군 처리가 그랜자임 B를 발현하는 CD8+ 세포의 %에 있어 통계적으로 유의하지 않은 증가를 유도했음을 보여준다.
- [0136] 도 1은 또한 aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 이용한 처리에 GM 처리를 부가한 경우에 대한 결과를 도시한다. IgG 단독 요법에 GM을 부가하는 경우 CD8+ 세포의 약간의 활성화가 나타나지만, 이러한 변화는 유의한 수준이

아니며, aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 이용한 처리에 GM을 부가한 경우 그랜자임 B 양성 세포의 추가 상승은 없었다.

[0137] 이에 반해, aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 이용한 처리에 GA-RG 처리의 부가는 CD8+ 세포의 활성화에 있어 놀라운 증가를 나타내었다. aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 이용한 처리에 GA-RG 처리의 부가는 그랜자임 B 양성 CD8+ 세포의 %를 각각 2배, 5배 및 4배 증가시켰다. 이는 GA-RG가 치료에 부가되는 경우 CD8+ 세포의 활성화에 있어 매우 유의한 그리고 놀라운 증가를 나타낸다.

[0138] 도 2는 실험 동물의 다양한 군에 대해 CD8+ T 세포에서 증식 마커의 결과를 도시한다. 증식 마커는 세포 증식과 연관된 핵 단백질인 Ki-67이다. aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 단독 또는 GM과의 병용 처리 후 CD8+ 세포의 증식에 있어 거의 변화가 없다. 그러나, Ki-67은 aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 GA-RG와 함께 투여한 경우 도 1에 도시된 그랜자임 B 발현%와 매우 유사한 정도로 현저하게 상승했다.

[0139] 도 3은 실험 동물의 다양한 군에 대해 CD4+ T 세포에서 증식 마커 Ki-67의 결과를 도시한다. aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 단독 또는 GM과의 병용 처리 후 CD4+ 세포의 증식에 있어 변화가 거의 없다. 그러나, Ki-67은 aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 GA-RG와 함께 투여한 경우 CD8+ 세포(도 2)에서 보여진 것과 매우 유사한 정도로 현저하게 상승했다.

[0140] 도 4는 실험 동물의 다양한 군에 대해 종양 성장의 결과를 도시한다. GA-RG 처리가 aCTLA4 또는 aPD-1을 이용한 처리에 부가되는 경우, 항체만을 이용한 요법과 비교해서 종양 성장의 유의한 감소가 있었다.

[0141] 이들 실험 결과는 aOX40, aCTLA-4, 또는 aPD-1을 GA-RG와 함께 마우스에 처리하는 경우 CD8+ 세포독성 T-세포의 증식 및 활성화에 있어 현저한 증가, CD4+ T 조절 세포의 증식에 있어 증가, 및 종양 크기에 있어 감소가 있음을 입증해준다.

실시예 2: 항-CTLA4 또는 항-OX40을 GA-RG와 함께 투여 후의 면역 및 전립선 종양 반응의 증진

[0143] 본 실시예에서, 실험들은 마우스 암의 동계 모델에서 실시되었다. 사용된 종양 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 마우스 전립선암에서 유래한 TRAMP-C1 세포주였다.

[0144] 본 실시예는 2개 군의 종양 접종된 마우스의 6개 처리 군을 포함하며 각각 하기와 같다: 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (1.2 mg/용량)의 존재 및 부재의, IgG 처리된 대조군 마우스; 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (1.2 mg/용량)의 존재 및 부재의, aOX40(250 마이크로그램 또는 mcg)로 처리된 마우스; 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (1.2 mg/용량)의 존재 및 부재의, 접종 후 4일, 6일, 8일, 11일, 13일 및 15일째 aCTLA4 (200 mcg)로 처리된 마우스.

[0145] 도 5는 접종 후 다양한 시점에 종양 크기에 대한 이러한 처리 결과를 도시한다. aOX40, aCTLA4, 및 GA-RG 단독 처리가 종양 크기에 대해 최소한의 효과를 나타낸 반면에, aOX40 및 aCTLA4와 GA-RG의 병용은 종양 접종 후 33일째까지 각 시점에 종양 크기의 감소에 있어 상당한 효과를 나타내었다.

[0146] 도 6은 6개 처리군의 마우스에 대한 생존 곡선을 도시한다. aOX40 및 aCTLA4와 GA-RG의 병용 처리 군은 생존율이 2배였다.

[0147] 이러한 실험 결과는 aOX40 또는 aCTLA-4를 GA-RG와 함께 마우스에 처리하는 경우 약물 단독 사용시보다 전립선 종양에 있어 유의하게 더 큰 감소율 및 생존율에 있어 증가가 있음을 입증한다. aOX40 또는 aCTLA4의 병용 처리된 마우스의 20%가 100일 동안 생존한 반면, 약물만으로 처리된 마우스는 58일까지 모두 죽었다.

실시예 3: 항-CTLA4 또는 항-OX40을 GA-RG와 함께 처리 후의 면역 및 유방 종양 반응의 증진

[0149] 본 실시예에서, 실험들은 마우스 유방암의 동계 모델에서 실시되었다. 사용된 종양 세포는 자발 발생 BALB/c 유방 종양에서 유래한 동계 유방암 세포주인 4T1이었다. 동소이식으로 도입되는 경우, 4T1 주는 일차 부위에서 빠르게 성장하여 3-6주 기간에 걸쳐 폐, 간, 뼈 및 뇌에 전이를 형성한다. 꼬리 정맥 또는 동맥혈로 주입되는 경우, 1-2주 후 동일 장기에서 전이가 나타난다. 인간 유방암에서 영향받은 장기로의 빠르고도 효율적인 전이는 4T1 모델이 인간에서 유방암의 전이성 진행의 연구를 위한 우수한 마우스 모델이도록 해준다. 이 모델은 BALB/c 마우스에서 동계이기 때문에, 종양 성장 및 전이에 있어 면역계의 역할을 연구하는데 사용될 수 있다. 이 실험에서 종양 모델을 위해, 4T1 세포(5 X 10⁶ 세포)는 피하 주사를 통해 정상 C57BL/6 마우스에 접종되었다.

[0150] 본 실시예는 2개 군을 갖는 종양 접종된 마우스의 6개 처리 군을 포함하며 각각은 하기와 같다: 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG(1.2 mg/용량) 존재 및 부재의 IgG 처리된 대조군 마우스; 접종 후 4일, 8일, 11일

및 15일째 GA-RG(1.2 mg/용량) 존재 및 부재의 aOX40(250 mcg)로 처리된 마우스; 및 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (1.2 mg/용량) 존재 및 부재의 접종 후 4일, 6일, 8일, 11일, 13일, 및 15일째 aCTLA4 (200 mcg)로 처리된 마우스.

[0151] 도 7은 접종 후 다양한 시점에 종양 크기에 대한 이들 처리의 결과를 도시한다. aOX40, aCTLA4, 및 GA-RG 단독 처리가 종양 크기에 대해 약간의 효과를 나타냈지만, aOX40 및 aCTLA4와 GA-RG의 병용은 종양 접종 후 25일까지 각 시점에 종양 크기의 감소에 있어 상당한 효과를 나타내었다.

[0152] 이들 실험의 결과는 aOX40 또는 aCTLA-4를 GA-RG와 함께 마우스에 처리하는 경우 약물 단독으로 처리된 경우보다 유방 종양의 유의하게 더 큰 감소 및 생존에 있어 증가를 유도함을 입증한다.

실시예 4: 항-OX40을 GA-RG와 함께 처리한 후의 폐 전이에 있어 감소 및 생존율의 증가

[0154] 본 실시예에서, 실험들은 마우스 유방암의 동계 모델에서 4T1 세포를 사용하여 실시되었다.

[0155] 본 실시예는 2개 군을 갖는 종양 접종된 마우스의 4개 처리군을 포함하며 각각은 하기와 같다: 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (2.4 mg/용량)의 존재 및 부재의 IgG 처리된 대조군 마우스; 및 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (2.4 mg/용량)의 존재 및 부재의 aOX40(250 mcg)로 처리된 마우스.

[0156] 도 8A에 도시된 바와 같이, aOX40 및 GA-RG의 병용 처리된 마우스는 aOX-40 단독 처리된 마우스보다 더 높은 생존율을 나타내었다.

[0157] 폐 전이 수는 균질화된 폐 밖에서 성장하는 독립 세포 클론의 수를 평가하는 클론아케닉(clonagenic)분석을 이용하여 해당 동물에서 평가되었다. 도 8B에 도시된 바와 같이, aOX-40 만으로 처리된 마우스보다 aOX40 및 GA-RG의 병용 처리된 마우스에서 폐 전이 수에 있어 10배 감소가 있었다.

[0158] 이러한 결과는 aOX40 및 GA-RG의 병용 처리된 마우스가 aOX-40 만으로 처리된 마우스보다 더 긴 생존율을 나타내었고 이러한 효과는 부분적으로는 전이성 질환에 있어 감소와 관련될 수 있음을 보여준다.

실시예 5: 단핵구 집단의 변경

[0160] 본 실시예에서, 실험들은 마우스 유방암의 동계 모델에서 4T-1 세포를 사용하여 실시되었다.

[0161] 이 실시예는 2개 군을 갖는 종양 접종된 마우스의 4개 처리군을 포함하며 각각은 하기와 같다: 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (2.4 mg/용량)의 존재 및 부재의 IgG 처리된 대조군 마우스; 및 접종 후 4일, 8일, 11일 및 15일째 GA-RG (2.4 mg/용량)의 존재 및 부재의 aOX40(250 mcg)으로 처리된 마우스.

[0162] 도 9A에 도시된 바와 같이, GR-1 음성/CD11b 양성 세포의 백분율은 (이 그래프에서 MD02로 표시된) aOX-40 및 GA-RG의 병용 처리된 동물의 순환계에서 증가되었다.

[0163] 이에 반해, GR-1 중간/CD11b 양성 세포의 수는 (이 그래프에서 MD02로 표시된) aOX-40 및 GA-RG의 병용 처리된 동물에서 상반되게 감소되었다.

[0164] GR-1 neg/CD11b 양성 세포에 있어 상승은 종양에 대한 치료 효과와 연관될 수 있는 보다 적은 면역 세포 억제와 연관된 비-억제자 타입 단핵 세포에 있어 증가의 표시이다.

[0165] 이러한 결과는 또한, 단핵 세포/대식 세포의 표현형이 병용 치료시 종양 보유 마우스에서 순환계 및 종양 마이크로환경에서 변경될 수 있음을 시사한다.

실시예 6: 항-OX40을 GA-RG와 함께 처리 후의 MCA205 종양, 육종 종양 세포주에 있어 효능 증진

[0167] 본 실시예에서, 실험들은 마우스 육종 암의 동계 모델에서 MCA205 세포를 이용하여 실시되었다.

[0168] 이 실시예는 2개 군을 갖는 종양 접종된 마우스의 4개 처리군을 포함하며 각각은 하기와 같다: 접종 후 4일, 6일, 8일, 11일, 13일 및 15일째 GA-RG (2.4 mg/용량)의 존재 및 부재의 IgG(250 mcg; 4일째, 8일째) 처리된 대조군 마우스; 및 접종 후 4일, 6일, 8일, 11일, 13일 및 15일째 GA-RG (2.4 mg/용량)의 존재 및 부재의 aOX40 (250 mcg; 4일째, 8일째)로 처리된 마우스.

[0169] 도 10a는 aOX40을 (본 도면에서 GR-MD-02로서 표시된) GA-RG와 함께 투여시 시간에 따라 종양 크기에 있어 현저한 감소를 보여주며, 병용 처리된 동물에서 종양 성장은 극히 거의 없었다.

[0170] 도 10b는 동물의 생존 곡선을 도시한다. aOX40을 (본 도면에서 GR-MD-02로서 표시된) GA-RG와 함께 제공받은 동

물에서 생존율에 있어 통계적으로 유의한 개선이 존재했다.

[0171] 이는 육종 종양 세포의 경우 전립선 및 유방암 세포와 유사한 효과가 나타나며, 몇몇 양태에서는 이 효과가 이들 종양 모델에서보다 더 우수함을 입증한다.

실시예 7: 종양 세포주에서 갈렉틴-3의 발현

[0173] 본 실험에서 사용된 종양 세포주 및 다른 종양 세포주에서 갈렉틴-3의 발현을 평가했다.

[0174] 도 11A는 다수 세포주에서 배양 배지 중으로 갈렉틴-3 단백질이 상당량 분비되었음을 보여준다(NOP-17 및 SCN 세포주에서는 낮은 분비 또는 분비 없음). 중요하게도, 이전 실시예에서 사용된 세포주 중 2종, 4T1 및 TRAMP-C1은 다량의 갈렉틴-3을 분비했다. 이러한 데이터는 약물 효능과 관련될 수 있는 세포주에서의 갈렉틴-3의 다양한 발현 수준이 존재함을 보여준다.

[0175] 도 11B는 다수 세포주의 전세포 용해물에서 상당량의 갈렉틴-3 단백질이 존재함을 보여준다(NOP-17 및 SCN 세포주에서는 낮은 수준의 양). 중요하게도, 이전 실시예에서 사용된 세포주 중 3종, 4T1, TRAMP-C1, 및 MCA-205는 다량의 갈렉틴-3을 발현했다.

[0176] 주목할 점은, 가장 많은 양의 갈렉틴-3을 발현하는 세포주, MCA-205(도 11B)는 aOX40 및 GA-RG를 이용한 병용요법에 가장 잘 반응했다(실시예 6).

[0177] 이러한 결과는 GA-RG를 이용한 병용 치료에 대한 종양의 반응이 갈렉틴-3의 발현 수준과 연관성이 있음을 추가로 시사한다.

실시예 8: T-세포 활성화에 있어 갈렉틴-3의 이중 역할

[0179] 종양 침윤 림프구의 감소된 세포용해 기능 및 면역억제는 환자에 대한 효과적인 치료법을 구축하는데 있어 주된 장애물이다. 렉틴 패밀리 멤버인 갈렉틴-3은 유방 및 전립선을 포함한 다수 암에서 발현된다. 나아가, 이는 전립선 상피, 대식 세포, 및 활성화된 림프구에 의해 도처에 발현된다.

[0180] 내인성 갈렉틴-3은 대체(alternative) 대식세포 활성화를 촉진하고 항종양 면역력을 제한하는 TCR-매개된 CD4 T 세포 활성화를 제한한다.

[0181] 염증 및 CD8 T 세포 기능에 대한 갈렉틴-3의 조절 효과가 알려져 있지 않기 때문에, 실험은 이러한 이슈를 확인하기 위해 이루어졌다.

[0182] 종양 마이크로환경 내의 갈렉틴-3은 CD8 T 세포의 기능을 음성적으로 조절함으로써 종양 진행을 촉진하는 것으로 가정된다. 이를 시험하기 위해, CD8 T-세포에서 내인성 갈렉틴-3 결실의 효과를 시험했다.

[0183] 생체내에서, 항원-특이적 Ga13/- CD8 T-세포는 야생형(WT) 대조군에 비해 감소된 이펙터 기능(감소된 증식, 그랜자임 B, IFN-감마, 및 IL-2)을 나타내었다.

[0184] 항원-특이적 Ga13/- 또는 Ga13+/+ CD8 T-세포에서 차별적인 유전자 발현의 분석은 그랜자임 B, CD25, KLRG-1, 및 Blimp-1 유전자 발현이 대조군에 비해 Ga13/- CD8 T 세포에서 감소했음을 밝혀내었다.

[0185] 시험관내 연구는 항원-특이적 Ga13/- CD8 T 세포가 CD25 및 OX40 발현에 있어 상당한 감소를 나타냄을 입증해 주었다. 이들 데이터는 신규의 놀라운 발견, 즉 갈렉틴-3이 CD4 기능에 대한 이의 억제성 기능과 대조적으로 CD8 T 세포 기능을 촉진하는데 있어 중요한 역할을 담당함을 시사한다.

[0186] 종양 마이크로환경에서 갈렉틴 3에 대한 역할을 평가하기 위해, 갈렉틴 3 발현은 전립성 암종의 TRAMP 모델을 이용하여 종양 내에서 시험되었다. 갈렉틴 3은 종양 내의 암세포 및 대식세포 상에서 발현되었다.

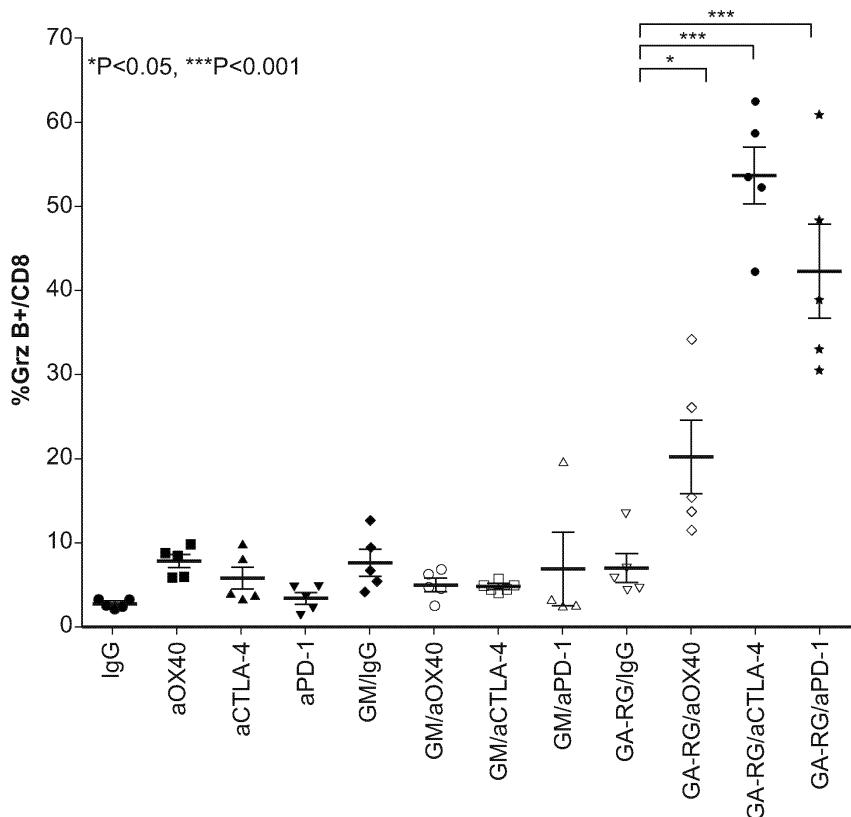
[0187] 생체내에서 GA-RG(GR-MD-02)를 이용한 갈렉틴 3 억제는 CD8 T 세포 증식 및 CD62L 발현을 증가시켰으며, 이는 CD8 T 세포 기능에서 Ga13에 대한 이중 역할을 시사한다.

[0188] 도 12는 세포 유동분석에 의한 나이브 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포 및 야생형(WT) CD8 T 세포 간의 표현형 비교를 도시한다. 도 12A는 WT, Ga13/-, WTOT-1, 또는 Ga13/- OT-1 마우스의 나이브 CD8 및 CD4에 대한 표현형 마커의 기준 발현을 미처리 비장세포 상에서 평가한 결과를 도시한다. CD8 및 CD4에 대해, 수록된 %발현은 CD8 또는 CD4를 발현하는 생세포의 %이다. 도 12B는 모델: 야생형 C57BL/6 마우스가 1일째 3x10e6 나이브 WT 또는 Ga13/- OT-I CD8 T 세포(iv)를 제공받았음을 보여준다. 공여자 OT-I T 세포를 500 mcg 가용성 OVA (sq; d0)로 자극했다.

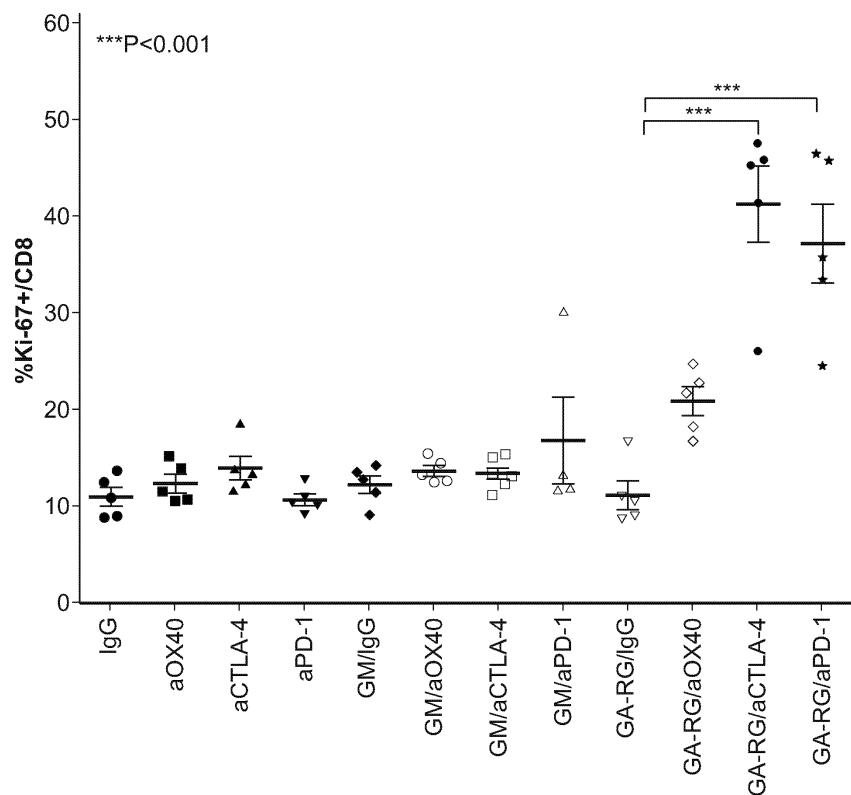
- [0189] 도 13은 생체내 항원 자극 후 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포가 감소된 이펙터 기능을 나타냄을 보여준다. 도 13A-C는 비장에서 공여자 OT-I T 세포의 표현형을 보여주며 이는 자극 후 7일째 유동 세포분석에 의해 확인되었다. 그래프는 3가지 독립 실험들 중 하나로부터 개개 마우스(n=4/군)로부터의 평균을 나타낸다 (*P<0.05; **P<0.01).
- [0190] 도 14는 갈렉틴-결손 CD8 T 세포에서 선택된 유전자들이 하향 조절됨을 보여준다. 야생형 또는 Ga13-/- OT-1 T 세포는 야생형 숙주로 귀화식으로 전달된 다음 OVA로 자극되었다. 4일 후, 림프절을 수거하고 공여자 CD8 T 세포를 세포 분류(sorting)로 정제했다. RNA를 이들 세포로부터 추출하고 유전자 발현에 있어 변화를 Affymetrix DNA 마이크로어레이를 사용하여 평가했다. 도 14A는 WT에 대해 Ga13-/- OT-1에 있어 하향 조절되는 것으로 밝혀진 몇몇 유전자들의 그래프 도이다. 도 14B는 선택된 유전자들에 대한 상대 단위 및 배수 변화를 도시한다.
- [0191] 도 15는 갈렉틴-결손 CD8 T 세포가 항원 자극 후 감소된 CD25 및 OX40 발현을 나타냄을 보여준다. 시험관내에서, 나이브 정제된 야생형 또는 Ga13-/- OT-1 CD8을 IL-2(100 ng/ml)의 존재 또는 부재하에 웨티드-펄싱된 (5 또는 0.0005 마이크로그램/ml) DC2.4 수지상 세포로 자극했다. 세포를 48 또는 72 시간 후에 수거하여 유동 세포분석에 의해 CD25 (IL-2Ra) 또는 OX40의 발현을 조사했다.
- [0192] 도 16은 갈렉틴-3 억제가 CD8 T 세포 이펙터 기능을 증강시킴을 보여준다. 야생형 C57BL/6 마우스는 1일째 3x10e6 나이브 WT OT-I CD8 T 세포를 제공받았다(iv). 공여자 OT-I T 세포, Ga1-3 억제제, GR-MD-02(특정 GA-RG)(백색 막대) (sq; d0, 1). 7일(도 16A) 또는 29일(도 16B) 후 말초 혈액 또는 비장 각각에서 공여자 세포의 표현형을 유동 세포분석으로 확인했다. Ki-67, 그랜자임 B, 또는 KLRG-1의 발현에 대해 군 간에 차이가 없었다.
- [0193] 도 17은 GA-RG (GR-MD-02)를 이용한 갈렉틴-3 억제가 앞서 기재된 바와 같이 29일째 단리된 비장세포에서 항-CTLA-4와 함께 사용될 경우 CD8 T 세포 증식을 증강시킴을 보여준다.
- [0194] 이러한 연구는 내인성 갈렉틴-3 결핍이 항원에 반응하여 CD8 T 세포 증식 및 활성화를 감소시키고 사이토카인 생성을 감소시켰음을 보여준다.
- [0195] 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포는, 이펙터 CD8에서 모두 증가되는 KLRG, CD25, IFNg, 그랜자임 B, 및 FasL을 감소시킨다.
- [0196] 갈렉틴-3 결손 CD8 T 세포는 시험관내에서 감소된 CD25 및 OX40 발현을 나타낸다. CD25 발현은 IL-2의 첨가에 의해 구제될 수 있지만, OX40 발현은 IL-2의 첨가에 의해 구제될 수 없다.
- [0197] GA-RG(또한 GR-MD-02로 불림)를 이용한 생체내 갈렉틴-3 억제는 항원에 반응하여 CD8 T 세포 증식 및 활성화를 증진시킨다.
- [0198] 따라서, 세포외 구획에서 실질적으로 또는 배타적으로 작용하는 억제제를 이용한 갈렉틴-3의 억제는 T-세포에서 내생적으로 생성되는 갈렉틴-3의 완전한 결핍과는 다른 효과를 나타내는 것으로 보인다.
- [0199] 본 발명은 이의 바람직한 실시양태들을 참조하여 보다 구체적으로 도시 및 기재되고 있지만, 업계의 숙련인은 본 발명의 범위에서 벗어남이 없이 형태 및 디테일에 있어 다양한 수정이 이루어질 수 있음을 인지할 것이다. 본원에서 언급된 모든 공보, 특허 및 서열 데이터는 개개 공보 또는 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 참고적으로 도입되는 것으로 기재된 것처럼 그 전문이 본원에 참고적으로 도입된다.

도면

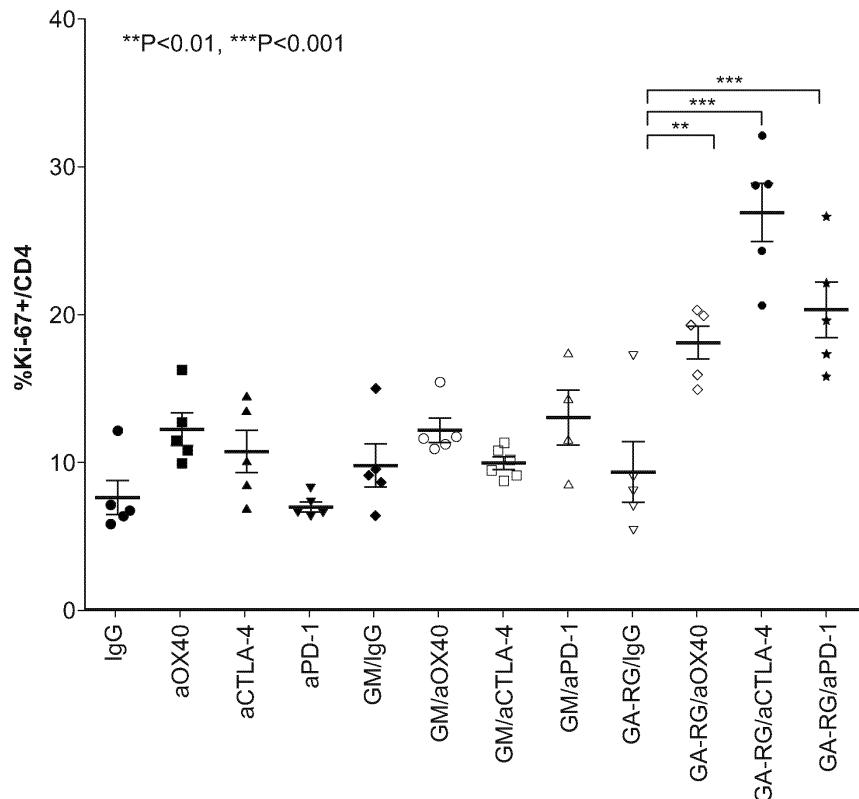
도면1



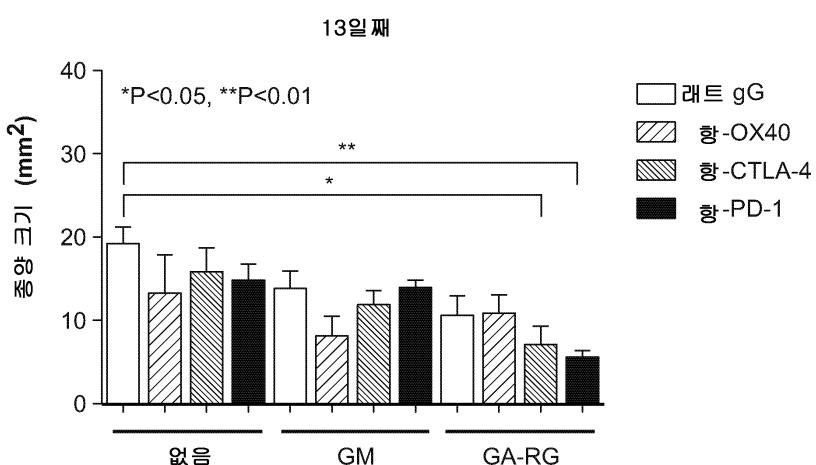
도면2



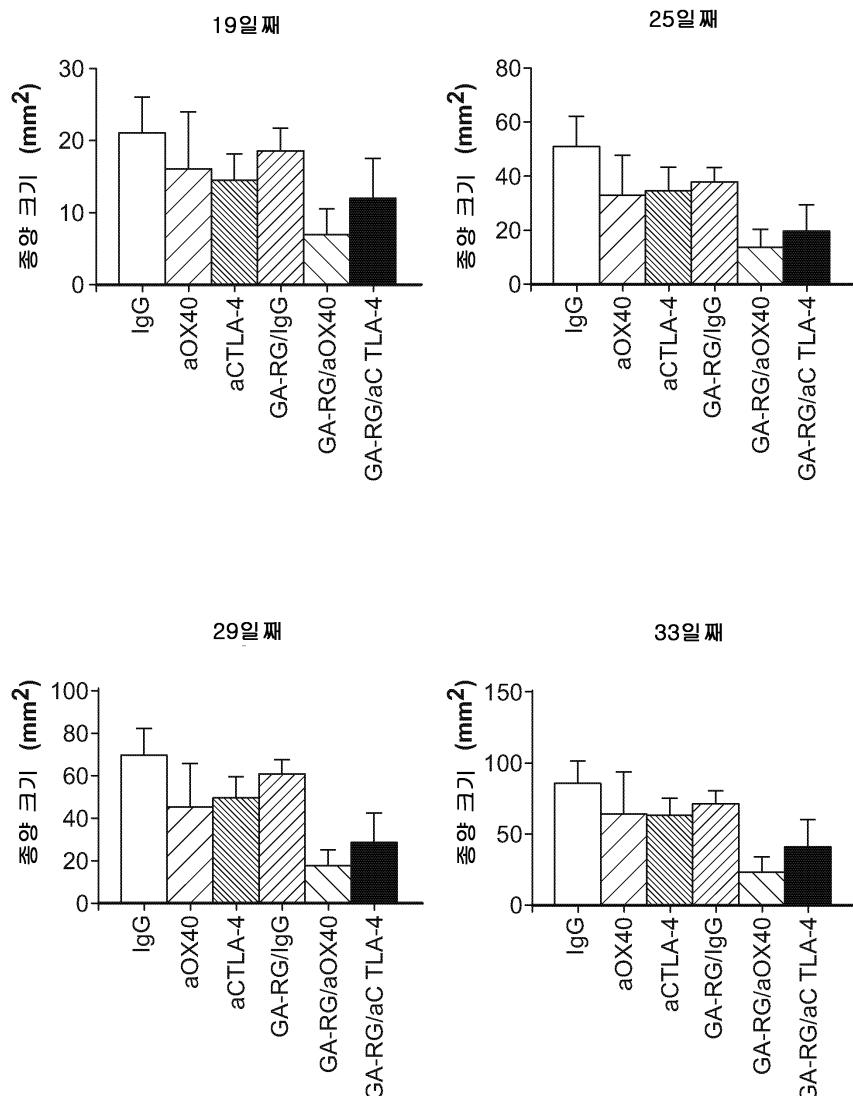
도면3



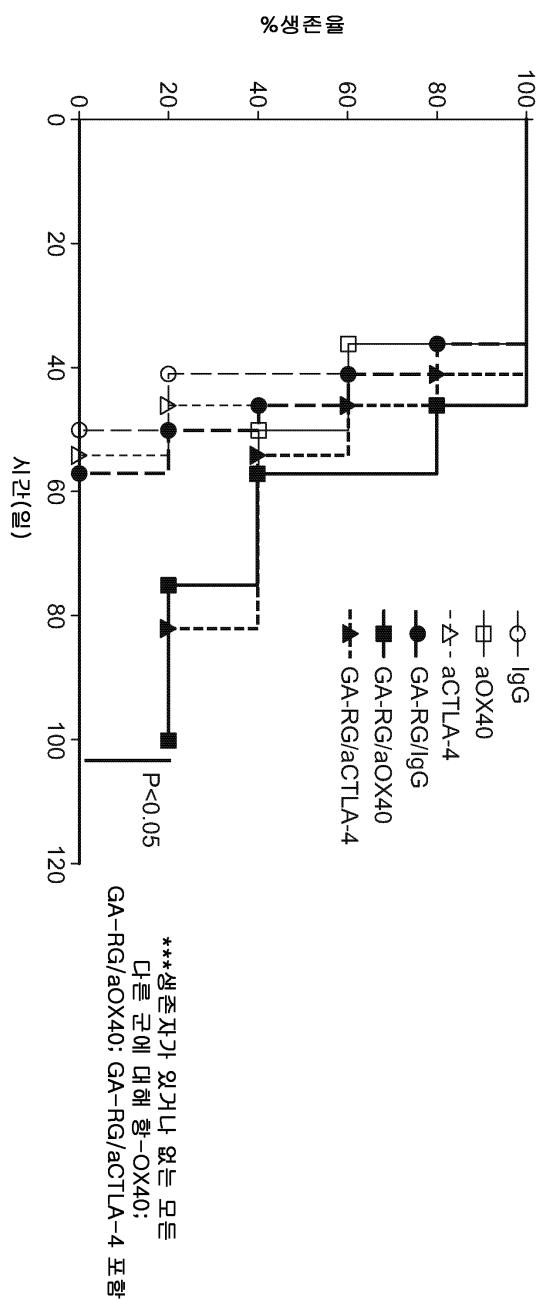
도면4



도면5

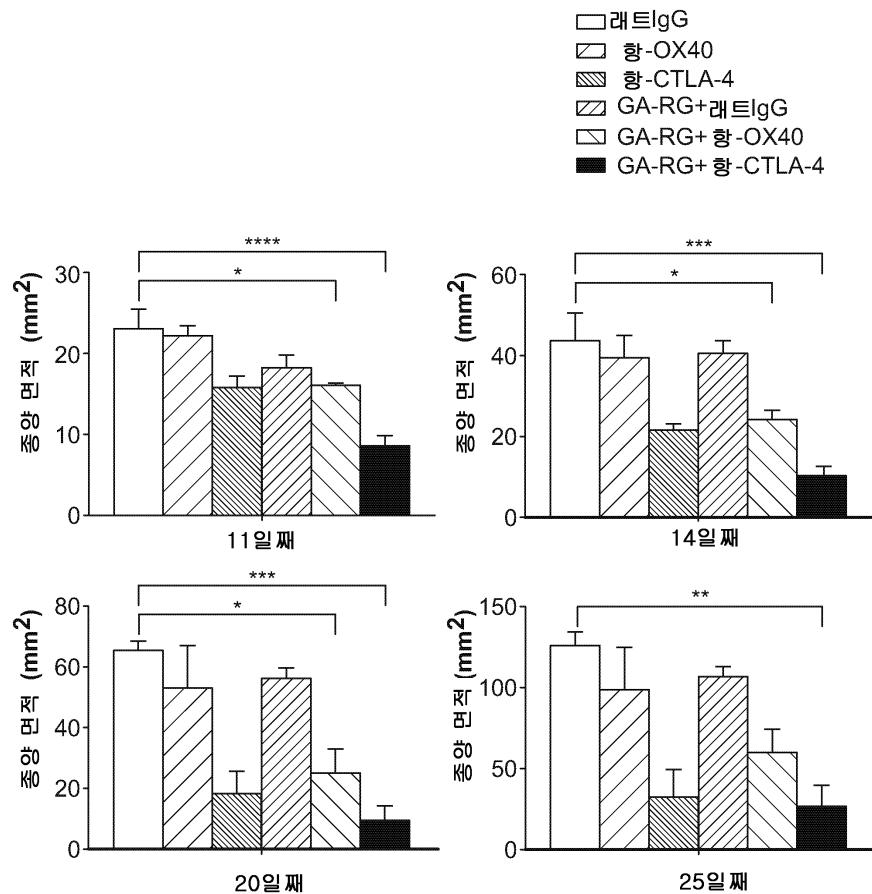


도면6



도면7

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001

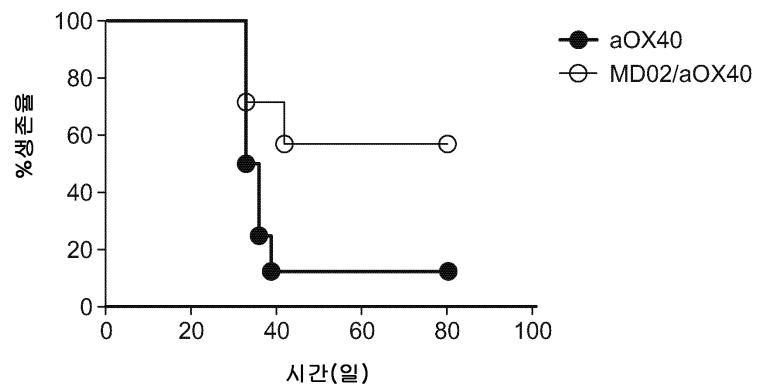


***GA-RG+항-CTLA-4는 11일째 모든 군에 대해 P<0.05이다

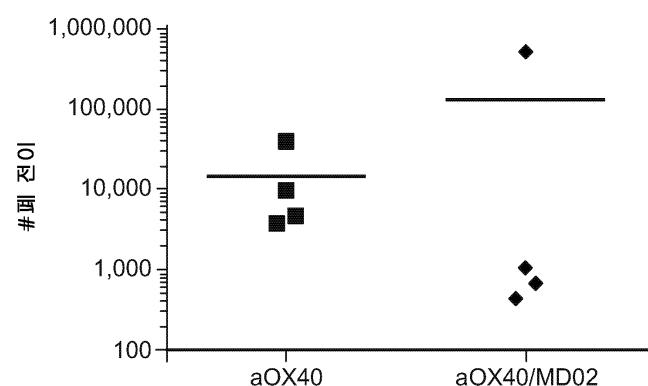
*** GA-RG+항-CTLA-4는 또한 모든 시점에서 GA-RG+래트 IgG에 대해 P<0.05이다

도면8

A

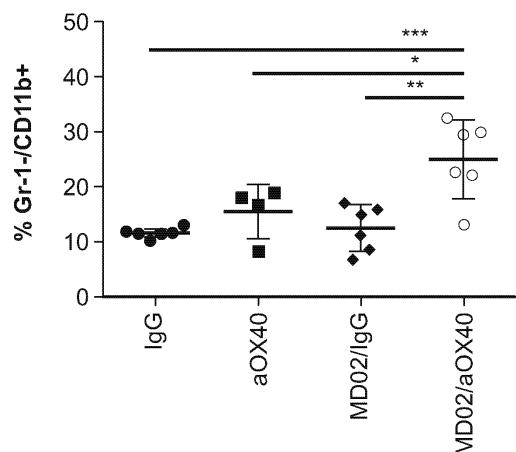


B

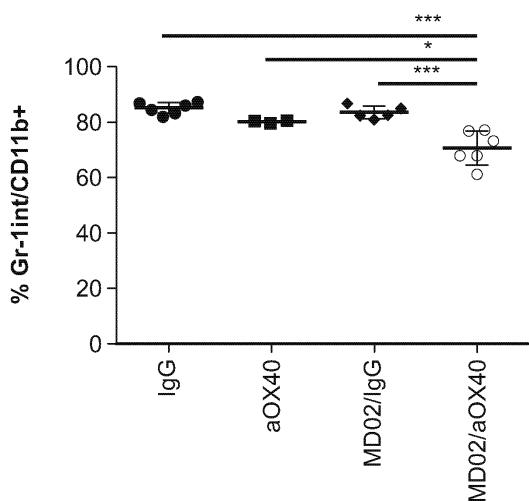


도면9

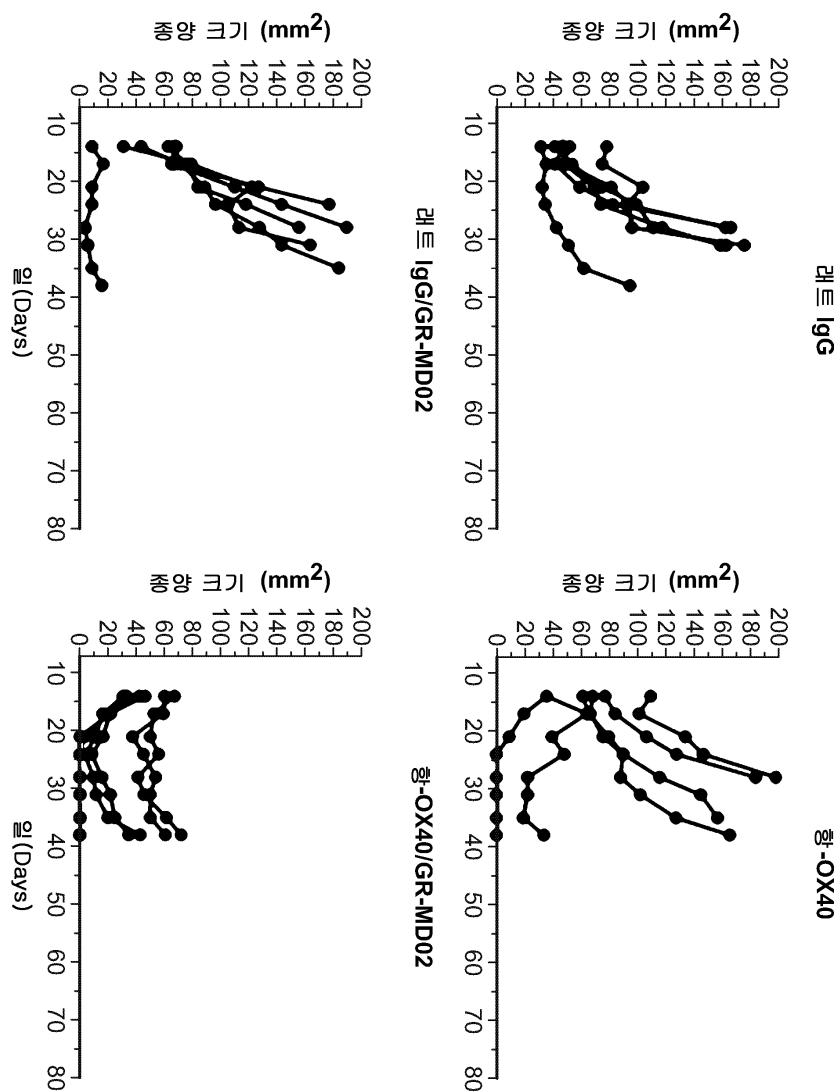
A



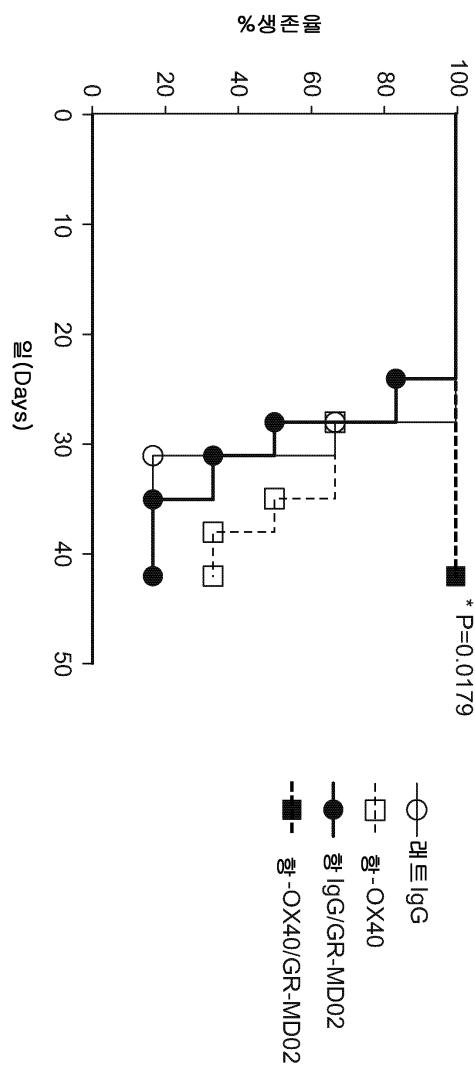
B



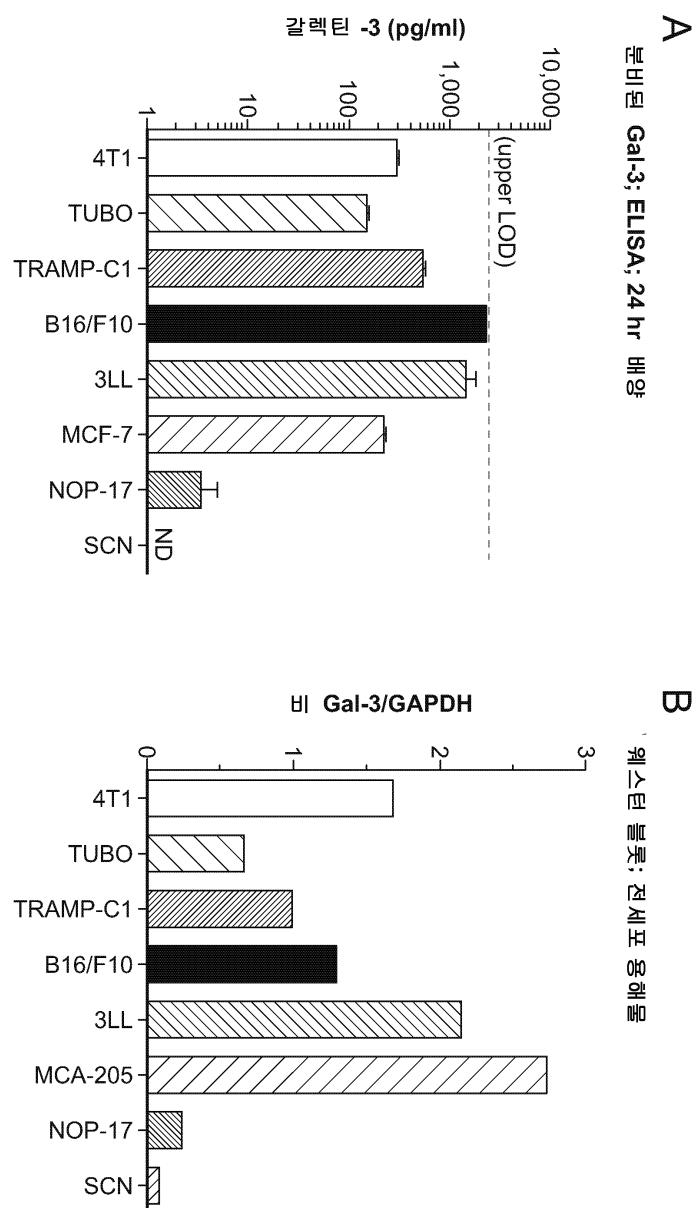
도면 10a



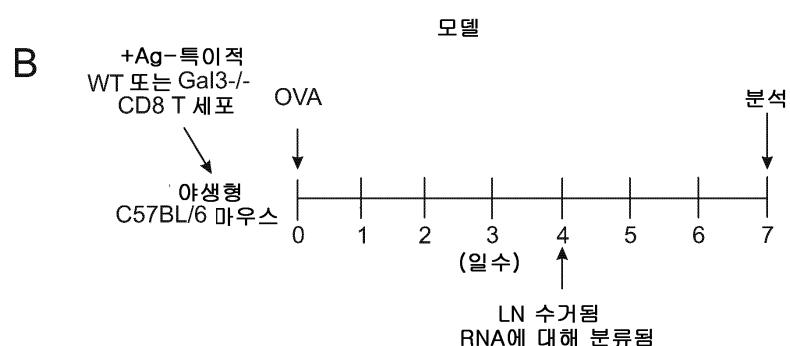
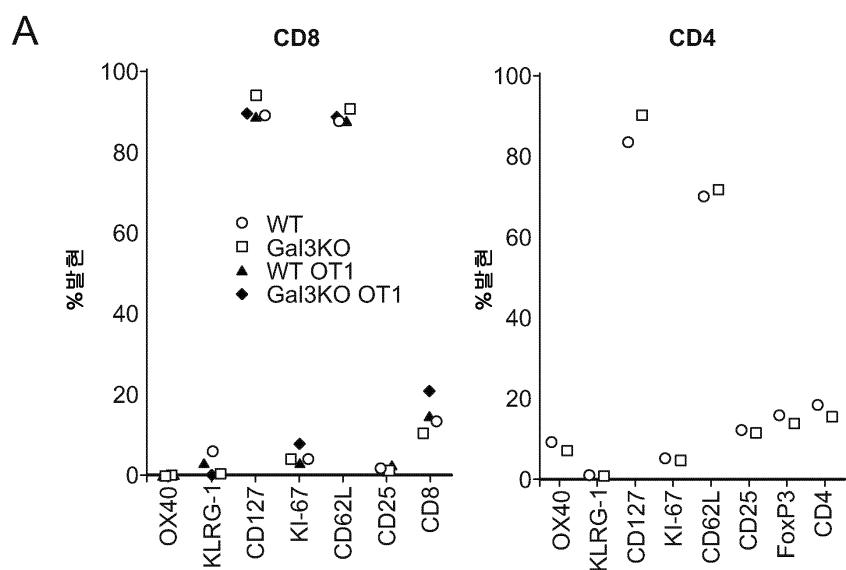
도면 10b



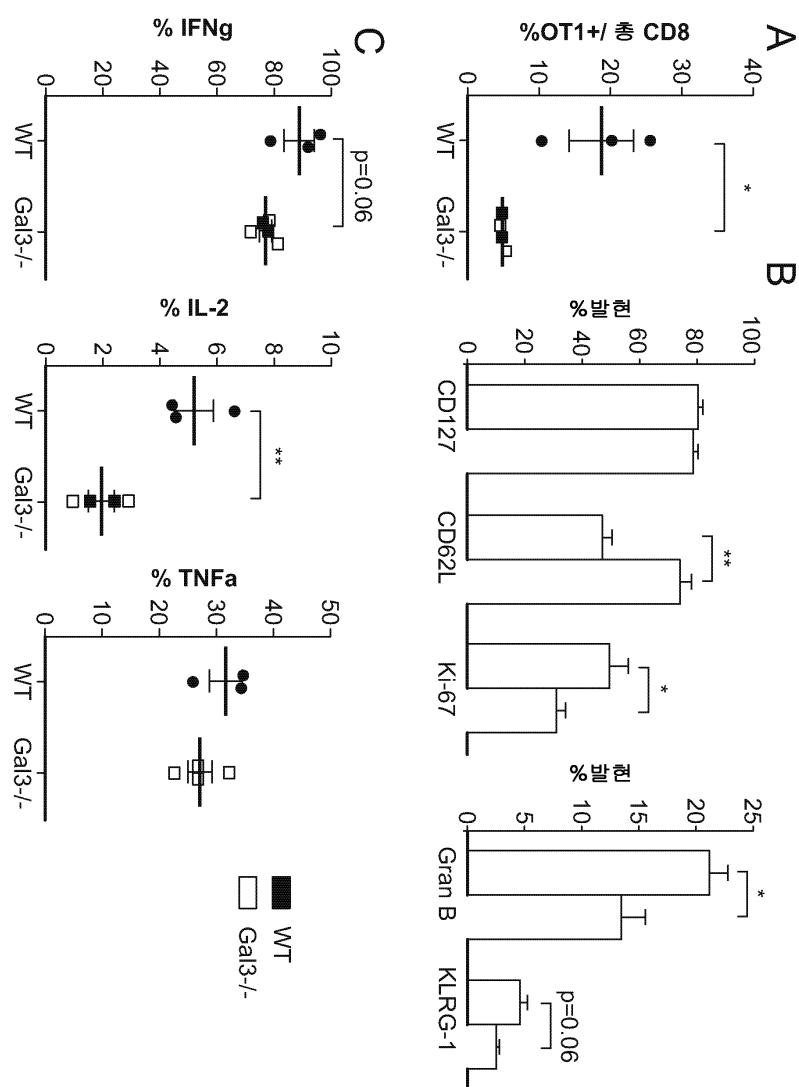
도면11



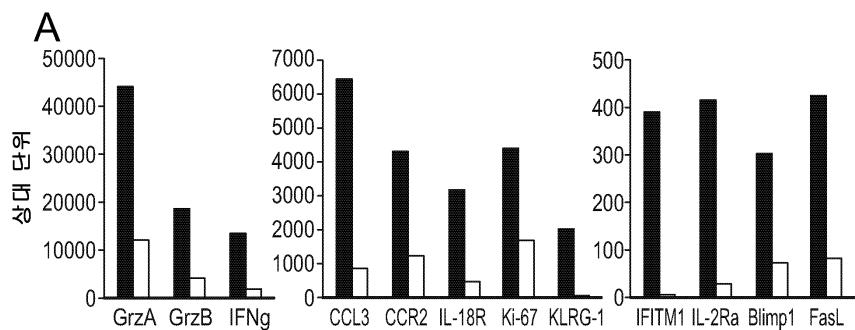
도면12



도면 13

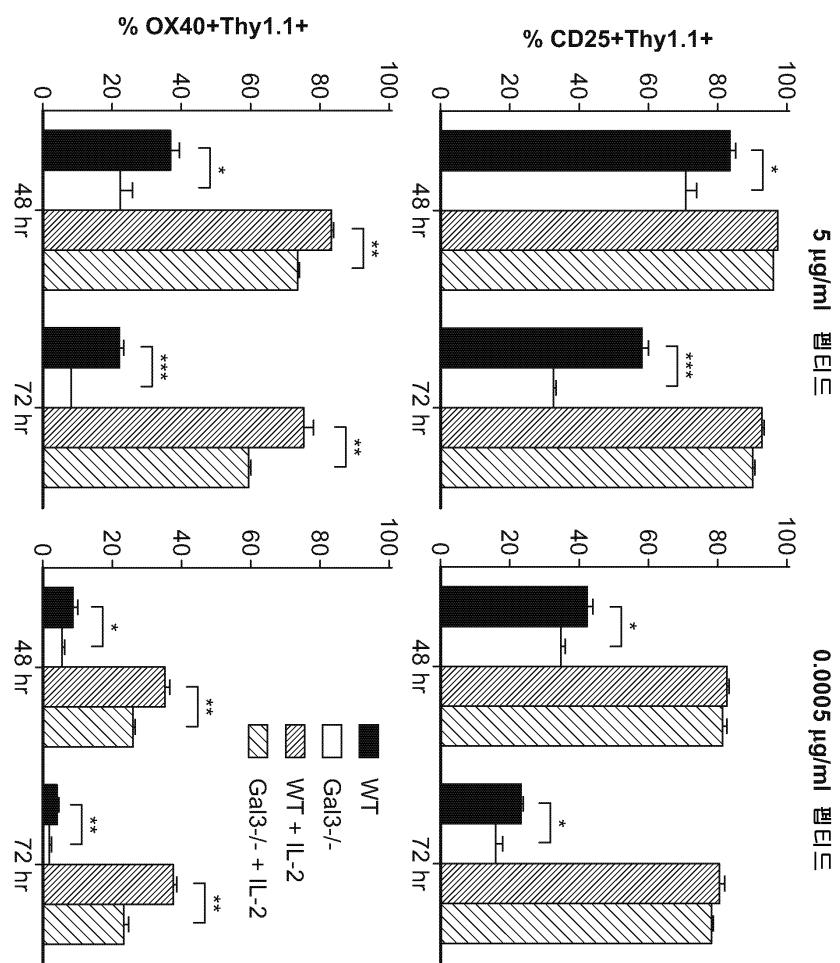


도면14

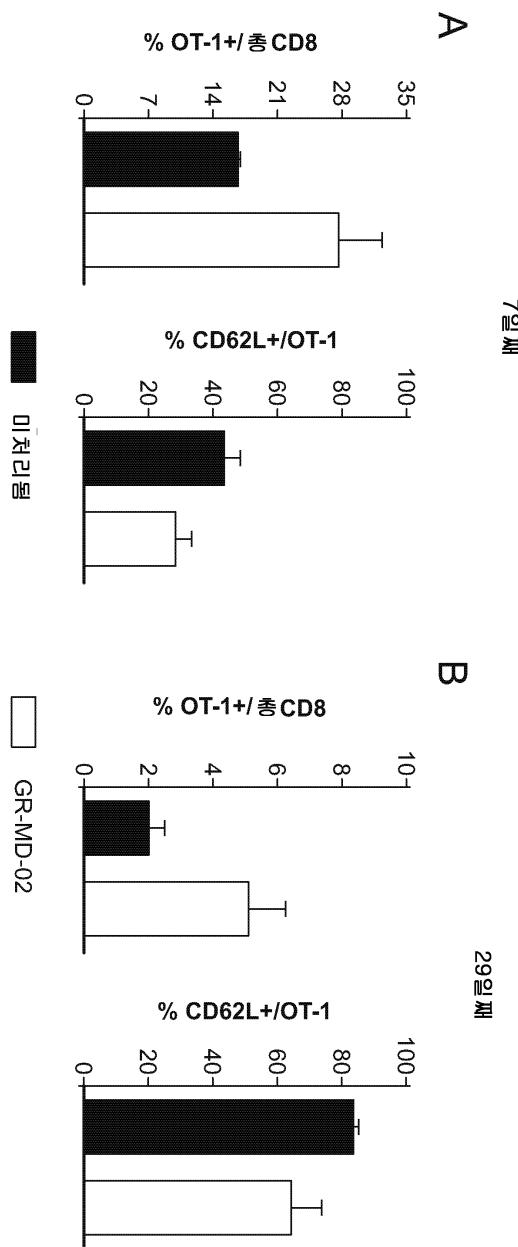
**B**

	유전자	WT (상대 단위)	Gal3 -/- (상대 단위)	배수 변화
Gal3 -/-에서 감소됨	그랜자임 A	44146	11948	-4
	그랜자임 B	18561	4111	-5
	IFNg	13477	1991	-7
	CCL3	6415	853	-8
	CCR2	4300	1214	-4
	IL-18R	3178	508	-6
	Ki-67	4380	1680	-3
	KLRG-1	2072	15	-138
	IFITM1	392	5	-84
	IL-2Ra (CD25)	415	28	-15
	Blimp1	304	73	-4
	FasL	423	82	-5

도면15



도면 16



도면17

29일째; 비장