



등록특허 10-2779525



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월12일
(11) 등록번호 10-2779525
(24) 등록일자 2025년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7125 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/04* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/7125 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7035856

(22) 출원일자(국제) 2016년05월23일
심사청구일자 2021년05월18일

(85) 번역문제출일자 2017년12월13일

(65) 공개번호 10-2018-0021700

(43) 공개일자 2018년03월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/033817

(87) 국제공개번호 WO 2016/196062
국제공개일자 2016년12월08일

(30) 우선권주장

(56) 선행기술조사문헌
KR1020050089983 A*
WO2004058179 A2
US20100184834 A1
CN101134046 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
다이나박스 테크놀로지 코퍼레이션
미국 94608 캘리포니아 에머리빌 스위트 720 파월
스트리트 2100

(72) 발명자
귀두치 크리스티아나
미국 캘리포니아 94706 알바니 탈봇 아베뉴 1048
코프만 로버트 엘.
미국 캘리포니아 94028 포르톨라 밸리 에코 레인
239

(74) 대리인
특허법이와이에스작

(74) 대리인
특허법이와이에스장

전체 청구항 수 : 총 19 항

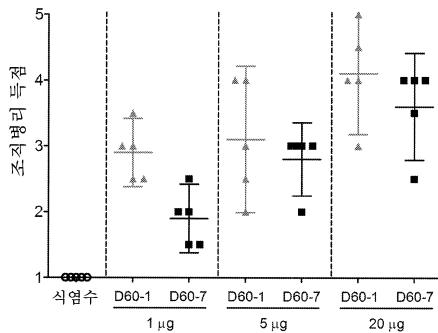
심사관 : 윤미란

(54) 별명의 명칭 폐암을 치료하기 위한 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트의 폐내 투여

(57) 요약

본 개시는 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트의 폐내 투여에 의해 암을 치료하는 방법에 관련된다. 본 개시의 방법은 폐의 원발성 암, 뿐만 아니라 폐에 대한 전이성 암 및 그것의 폐외 암을 치료하기에 적합하다. 추가로, 본 개시는 폐내 투여에 적합한 면역 자극성 및 독성 프로파일을 가진 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61K 9/0073 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/04 (2018.01)

(30) 우선권주장

62/168,470 2015년05월29일 미국(US)
62/169,309 2015년06월01일 미국(US)
62/169,321 2015년06월01일 미국(US)
62/276,767 2016년01월08일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

분리된 폴리뉴클레오티드로서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:7로 구성되고, 적어도 하나의 뉴클레오티드간 결합이 포스포로티오에이트 결합인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 모든 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제1항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 포유류 대상체에서 암의 치료를 위한 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 조성물은 멸균성, 등장성 용액인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 조성물은 탈수된 고체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제3항에 있어서, 폴리뉴클레오티드는 2'-데옥시리보폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제3항에 있어서, 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 조성물은 포유류 대상체에서 항원에 대한 면역 반응을 자극하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 조성물은 대상체에서 인터페론-알파 (IFN- α)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제3항에 있어서, PD-1의 길항제와 함께 사용하기 위한 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 조성물은 폐내 투여에 의해 대상체에게 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 폐내 투여는 분무기, 계량-용량 흡입기, 분사기, 및 건조-분말 흡입 장치로 구성되는 군으로부터 선택되는 장치의 사용을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제9항에 있어서, 조성물은 주사에 의해 대상체에게 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 조성물은 정맥내, 근육내, 및 피하로 구성되는 군으로부터 선택된 경로를 통해 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제3항에 있어서, 포유류 대상체는 인간인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제9항에 있어서, 포유류 대상체는 인간인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

제13항의 조성물, 및 포유류 대상체에게 조성물을 투여하기 위한 장치를 포함하는 키트.

청구항 19

제15항의 조성물, 및 포유류 대상체에게 조성물을 투여하기 위한 장치를 포함하는 키트.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

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

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2016년 1월 8일에 출원된 미국 가출원 번호 62/276,767의 이익을 주장하며, 상기 출원의 전체 내용은 참조로 포함된다. 본 출원은 또한 2015년 6월 1일에 출원된 미국 가출원 번호 62/169,309 및 62/169,321와, 2015년 5월 29일에 출원된 미국 가출원 번호 62/168,449 및 62/168,470의 이익을 주장한다.

[0003] ASCII 텍스트 파일로서 서열 목록의 제출

[0004] 없음.

[0005] 기술분야

[0006] 본 개시는 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트의 폐내 투여에 의한 암 치료 방법에 관한 것이다. 본 개시의 방법은 폐의 원발성 (primary) 암, 뿐만 아니라 폐에 대한 전이성 암 및 그것의 폐외 암의 치료에 적합하다. 추가로, 본 개시는 폐내 투여에 적합한 면역 자극성 및 독성 프로파일을 가지는 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트를 제공한다.

배경기술

[0007] 세계보건기구에 따르면, 암은 전세계적으로 사망의 선두 요인이고 폐암은 남성 및 여성에게서 모두 가장 흔한 5 대암 중 하나이다. 치료에 진전이 이루어졌음에도 불구하고, 초기 임상 시기에서 진단되지 않는 한, 미국에서 대부분의 폐암 환자들은 진단 후 5년 이내에 사망한다.

[0008] 메틸화되지 않은 CG 다이뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드는 Toll-유사 수용체 9 (TLR9)를 발현하는 세포들을 활성화함으로써 선천적인 면역 시스템을 자극한다. 여러 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트가 암에 대한 면역치료제로서 시험되었다. 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트의 전임상 및 단계 II 실험의 결과가 전도유망한 한편으로, 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트는 화학요법 양생법에 첨가되었을 때 비-소세포 폐암에 걸린 환자들의 생존율을 개선하지 못하였다 (Schmidt, *Nature Biotechnology*, 25:825-826, 2007). 보다 최근에, 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트의 투여 경로가 중요한 것으로 밝혀진 가운데, 종양내 주입이 정맥내 주입보다 월등한 항종양 면역반응을 초래하였다 (Lou et al., *J Immunother*, 34:279-288, 2011).

[0009] 폐에서 원발성 및 전이성 종양의 직접적인 종양내 주입은 일반적으로 실현가능하지 않다. 그러나, 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트의 폐내 전달은 폐 전이의 마우스 모델에서 강력한 항-종양 반응을 초래하는 것으로 밝혀졌다 (Sato et al., *Mol Cancer Ther*, 14:2198-2205, 2015; 및 Sfondrini et al., *Inter J Cancer*, 133:383-394, 2013). 그렇기는 하지만, 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트는 인간 암환자들에게 폐내 투여하기 위해서는 적절한 치료 범위를 가져야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 그러므로, 기술분야가 필요로 하는 것은 고효능 및 저독성을 가지는 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 개시는 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트의 폐내 투여에 의해 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 개시의 방법은 폐의 원발성 암, 뿐만 아니라 폐에 대한 전이성 암 및 그것의 폐외 암의 치료에 적합하다. 추가로, 본 개시는 폐내 투여에 적합한 면역 자극성 및 독성 프로파일을 가진 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트를 제공한다.

[0012] 구체적으로, 본 개시는 그런 필요가 있는 포유류 대상체에서 폐의 암을 치료하는 방법을 제공하며, 그 방법은 폐내 전달에 의해 유효량의 폴리뉴클레오티드를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 폴리뉴클레오티드는 5'-TCGTAACGTTCGAACGTTCGANx-3' (SEQ ID NO:2)의 서열로 구성되며, 여기서 x는 0, 1 또는 2이고, 각각의 N은 A, C 또는 T이며, 적어도 하나의 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 바람직한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9로 구성된다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 이중-가닥인 한편, 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥이다. 일부 구체예에서, 모든 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 구체예에서, 대상체는 원발성 폐암 및 폐외 암으로 구성되는 군으로부터 선택된 원발성 암을 가진다. 일부 구체예에서, 폐암은 원발성 폐암이다. 이를 구체예의 하위세트에서, 원발성 폐암은 비-소세포 폐암종 (NSCLC) 또는 소세포 폐암종 (SCLC)이다. 일부 구체예에서, 폐암은 폐에 대한 전이성 암이다. 일부 구체예에서, 전이성 암은 방광암, 유방암, 대장암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 췌장암, 전립선암 및 난소암으로 구성되는 군으로부터 선택된 원발성 암의 전이이다. 바람직한 구체예에서, 포유류 대상체는 인간이다. 추가로, 본 개시는 대상체에 유효량의 제2 치료제를 투여하는 단계를 더 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 제2 치료제는 악티노마이신, 아파티닙, 알렉티닙, 아스파라기나제, 아자시티딘, 아

자티오프린, 비칼루타미드, 블레오마이신, 보르테조립, 캄프토테신, 카르보플라틴, 카페시타빈, 세르티닙, 시스플라틴, 클로람부실, 크리조티닙, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에를로티닙, 에피루비신, 에포틸론, 에토포시드, 플루다라빈, 플루타민, 플루오로우라실, 계페티닙, 겹시타빈, 하이드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙, 이리노테칸, 라파티닙, 레트로졸, 메클로르에타민, 메르캅토퓨린, 메토트랙세이트, 미토마이신, 미토크산트론, 옥트레오티드, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 랄티트랙세드, 소라페닙, 수니티닙, 타목시펜, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오구아닌, 토포테칸, 발루비신, 빈블라스틴, 빙크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 및 그것들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된 화학요법제를 포함한다. 일부 구체예에서, 화학요법제는 i) 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 빙크리스틴; ii) 미토마이신, 빈데신 및 시스플라틴; iii) 시스플라틴 및 비노렐빈; 및 iv) 시스플라틴, 에토포시드 및 이포스파미드로 구성되는 군으로부터 선택된 조합을 포함한다. 일부 구체예에서, 제2 치료제는 억제성 면역 체크포인트 분자의 길항제를 포함한다. 이들 구체예의 하위세트에서, 억제성 면역 체크포인트 분자는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 (CD152), LAG-3, TIM-3, TIGIT, IL-10 및 TGF-베타로 구성되는 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 억제성 면역 체크포인트 분자는 인돌아민 2,3-다이옥시게나제 (IDO) 또는 트립토판 2,3-다이옥시게나제 (TDO)이다. 일부 구체예에서, 제2 치료제는 면역 자극성 분자의 아고니스트를 포함한다. 이들 구체예의 하위세트에서, 면역 자극성 분자는 CD27, CD40, OX40 (CD134), GITR, CD137, CD28 및 ICOS (CD278)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 제2 치료제는 단클론성 항체, 그것의 단편 또는 유도체를 포함한다. 본 개시는 또한 원발성 암을 절제하는 단계 및 방사선 요법을 투여하는 단계 중 하나 또는 둘 다를 더 포함하는 방법을 제공한다. 일부의 특히 바람직한 구체예에서, 유효량의 폴리뉴클레오티드 및 유효량의 제2 치료제는 함께 폐암에 대해 상승 효과를 초래한다. 일부 바람직한 구체예에서, 유효량의 폴리뉴클레오티드 및 유효량의 제2 치료제는 함께 폐암에 대해 협동적 효과를 초래한다. 일부 바람직한 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 다음: (a) 대상체의 생존 시간을 증가시키는 것; (b) 원발성 암의 부피를 감소시키는 것; (c) 원발성 암의 성장을 지연시키는 것; (d) 전이성 종양의 수를 감소시키는 것; (e) 전이성 종양의 부피를 감소시키는 것; 및 (f) 전이성 종양의 성장을 지연시키는 것 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 케모카인 CC 모티프 리간드 2 (CCL2), 케모카인 CXC 모티프 리간드 10 (CXCL10), 인터페론-알파 (IFN- α), 인터페론-감마 (IFN- γ), 인터류킨-1알파 (IL-1 α), 인터류킨-6 (IL-6), 인터류킨-10 (IL-10), 인터류킨-12 p70 (IL-12p70), 과립구 콜로니-자극 인자 (GCSF) 및 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α)로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인의 폐에서의 분비를 유도하는 단계를 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 폴리뉴클레오티드의 반복된 투여가 금지될 정도의 심각한 폐의 폴리뉴클레오티드-유도 독성을 초래하지 않는다. 일부 바람직한 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 폴리뉴클레오티드의 반복된 투여가 금지될 정도의 심각한 폴리뉴클레오티드-유도된 독감-유사 증상을 초래하지 않고, 여기서 독감-유사 증상은 열, 두통, 오한, 근육통 및 피로로 구성되는 군의 하나 이상을 포함한다.

[0013] 뿐만 아니라 본 개시는 분리된 폴리뉴클레오티드를 제공하는데, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 또는 SEQ ID NO:9로 구성되고, 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 일부 바람직한 구체예에서, 모든 폴리뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 결합이다. 추가로, 본 개시는 폴리뉴클레오티드와 제약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 일부 구체예에서, 조성물은 멸균성, 등장성 용액이다. 다른 구체예에서, 조성물은 탈수된 고체이다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 추가로 폴리펩티드 항원을 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 폴리펩티드 항원은 종양 항원이다. 본 개시는 또한 대상체에서 면역 반응을 자극하기에 충분한 양의 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상체에서 IFN- α 를 증가시키는 방법을 제공한다. 더욱이, 본 개시는 대상체에서 암을 치료하기에 충분한 양의 제약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 그것을 필요로 하는 포유류 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 바람직한 구체예에서, 제약학적 조성물은 대상체에게 폐내 투여에 의해 투여되고, 그 것은 분무기, 계량-용량 흡입기, 분사기 및 견조-분말 흡입 장치로 구성되는 군으로부터 선택된 장치의 사용을 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 제약학적 조성물은 정맥내, 근육내 및 피하로 구성되는 군으로부터 선택된 경로를 통한 주사에 의해 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 증가하는 용량의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-1 또는 TLR9 아고니스트 D60-7에 대한 반응으로

인간 PBMC에 의한 IFN- α 생성 (pg/mL)을 도시하는 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 표시된다.

도 2는 증가하는 용량의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-1 또는 TLR9 아고니스트 D60-7에 대한 반응으로 인간 B 림프구에 의한 IL-6 생성 (pg/mL)을 도시하는 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 표시된다.

도 3a 및 3b는 식염수, 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-1 또는 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-7을 0, 14, 28 및 42일에 1, 5 또는 20 μ g으로 비강내 투여한 후에 마우스의 기관지폐포 세척액 (BALF)에서 사이토카인의 수준을 나타내는 다중 그래프를 도시한다. BALF는 네 번째 치료 후 24시간 후에 얻어졌다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 표시된다.

도 4는 식염수, 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-1 또는 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-7을 0, 14, 28 및 42일에 1, 5 또는 20 μ g으로 비강내 투여한 후에 마우스로부터의 폐 조직의 조직병리학적 득점을 나타내는 그래프이다. 마우스를 희생시키고 폐 샘플을 네 번째 치료 후 24시간 후에 수득하였다. 데이터는 95% 신뢰도 간격의 평균으로서 표시한다.

도 5는 식염수, 20 μ g의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-1 또는 20 μ g의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-7을 0, 14, 28 및 42일에 비강내 투여한 후에 마우스의 체중 (기준선의 백분율)의 변화를 보여주는 그래프이다. 데이터는 평균 \pm SEM으로 표시된다.

도 6은 폐-내 D60-7, 전신성 항-PD-1 항체 또는 두 제제의 조합으로 치료된, 전이성 종양 4T1을 가진 마우스의 생존을 도시한다.

도 7은 폐-내 D60-7, 전신성 항-PD-1 항체 또는 두 제제의 조합으로 치료된 마우스의 폐에서 전이성 4T1 세포의 수를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본 개시는 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트의 폐내 투여에 의해 암을 치료하는 방법에 관련된다. 본 개시의 방법은 폐의 원발성 암, 뿐만 아니라 폐에 대한 전이성 암 및 그것의 폐외 암을 치료하기에 적합하다. 추가로, 본 개시는 폐내 투여에 적합한 면역 자극성 및 독성 프로파일을 가진 폴리뉴클레오티드 Toll-유사 수용체 9 아고니스트를 제공한다.

[0016]

I. 일반적인 방법 및 정의

[0017]

본 개시의 실시는 다른 표시가 없는 한, 기술분야의 숙련도 내에 있는 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 핵산 화학 및 면역학의 종래 기법을 사용할 것이다. 그런 기법들은 전체적으로 문헌에 기술되어 있고, 예를 들면 *Animal Cell Culture*, sixth edition (Freshney, Wiley-Blackwell, 2010); *Antibodies, A Laboratory Manual*, second edition (Greenfield, ed., Cold Spring Harbor Publications, 2013); *Bioconjugate Techniques*, third edition (Hermanson, Academic Press, 1996); *Current Protocols in Cell Biology* (Bonifacino *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Inc., 1996, including supplements through 2014); *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., 1991 including supplements through 2014); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., 1987, including supplements through 2014); *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (Egli *et al.*, ed., John Wiley & Sons, Inc., 2000, including supplements through 2014); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third edition (Sambrook and Russell, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, fourth edition (Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012); *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications* (Herdewijn, ed., Humana Press, 2004); *Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties* (Agrawal, ed., Humana Press, 1993); 및 *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998)을 참조한다.

[0018]

본원에서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 단일 형태를 나타내는 단어들은 다르게 표시되지 않는 한 복수의 대상물을 포함한다. 예를 들어, "한" 부형체는 하나 이상의 부형체를 포함한다.

[0019]

본원에서 사용되는 구절 "포함하는"은 제약을 두지 않는 것이고, 그런 구체예들은 추가의 요소들을 포함할 수 있는 것을 가리킨다. 대조적으로, 구절 "구성되는"은 제약이 있는 것으로, 그런 구체예들은 추가의 요소들을 포함하지 않는 (미량의 불순물은 제외함) 것을 가리킨다. 구절 "본질적으로 ~으로 구성되는"은 부분적으로 제약이

있고, 그런 구체예들은 그런 구체예들의 기본적인 특성을 실질적으로 변화시키지 않는 요소들을 추가로 포함할 수 있는 것을 가리킨다. "포함하는"으로서 본원에 기술된 측면들 및 구체예들은 구체예들로 "구성되는" 및 "본질적으로 구성되는"을 포함하는 것이 인지된다.

[0020] 본원에서 값과 관련하여 사용되는 용어 "약"은 그 값의 90% 내지 110%를 포함한다 (예컨대 약 20 μg 의 서비빈 항원은 18 μg 내지 22 μg 의 서비빈 항원을 나타내고 20 μg 의 서비빈 항원을 포함한다).

[0021] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 단일-가닥 DNA (ssDNA), 이중-가닥 DNA (dsDNA), 단일-가닥 RNA (ssRNA) 및 이중-가닥 RNA (dsRNA), 변형된 올리고뉴클레오티드 및 올리고뉴클레오시드, 또는 그것들의 조합을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 일반적으로, 포스포다이에스테르 결합을 통해 연결된 뉴클레오시드의 중합체이지만, 대체 결합, 예컨대 포스포로티오에이트 에스테르가 또한 사용될 수 있다. 뉴클레오시드는 당에 결합된 퓨린 (아데닌 (A) 또는 구아닌 (G) 또는 그것들의 유도체) 또는 페리미딘 (티민 (T), 시토신 (C) 또는 우라실 (U) 또는 그것들의 유도체) 염기로 구성된다. DNA의 4개의 뉴클레오시드 유닛 (또는 염기)는 테옥시아데노신, 테옥시구아노신, 티미딘 및 테옥시시티딘으로 불린다. RNA의 4개의 뉴클레오시드 유닛 (또는 염기)는 아데노신, 구아노신, 우리딘 및 시티딘으로 불린다. 뉴클레오티드는 뉴클레오시드의 포스페이트 에스테르이다.

[0022] 용어 "회문 서열 (palindromic sequence)" 또는 "회문"은 반전된 반복인 핵산 서열, 예컨대 ABCDD'C'B'A'를 나타내고, 여기서 염기, 예컨대 A 및 A', B 및 B', C 및 C', D 및 D'는 왓슨-크릭 염기쌍을 형성할 수 있다. 그런 서열은 단일-가닥이거나 이중-가닥 구조를 형성하거나 또는 일부 조건 하에서 헤어핀 루프 구조를 형성할 수 있다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 "8 염기 회문"은 회문 서열이 8 염기 길이인, 예컨대 ABCDD'C'B'A'인 핵산 서열을 나타낸다. 회문 서열은 또한 비-회문 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드의 부분일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 회문 서열 부분 및 하나 이상의 비-회문 서열 부분을 함유할 수 있다. 다르게는, 폴리뉴클레오티드 서열은 전체적으로 회문성일 수 있다. 하나 이상의 회문 서열 부분을 가진 폴리뉴클레오티드에서 회문 서열 부분은 서로 중복될 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.

[0023] 용어 "개별적인" 및 "대상체"는 포유류를 나타낸다. "포유류"는 한정하는 것은 아니지만, 인간, 비-인간 영장류 (예컨대 원숭이), 가축, 스포츠용 동물, 설치류 (예컨대 마우스 및 래프) 및 애완동물 (예컨대 개 및 고양이)을 포함한다.

[0024] 용어 "항원"은 항체에 의해 또는 T 세포 항원 수용체에 의해 특이적으로 인지되고 결합되는 물질을 나타낸다. 항원은 웨პ티드, 폴리웨პ티드, 단백질, 당단백질, 다당류, 복합 탄수화물, 당, 강글리오시드, 지질 및 인지질; 그것들의 일부 및 조합물을 포함할 수 있다. 본 개시의 조성물에 존재할 때 항원은 합성적이거나 자연으로부터 분리될 수 있다. 본 개시의 방법에서 투여에 적합한 항원은 항원-특이적 B 세포 또는 T 세포 반응을 유도할 수 있는 임의의 문자를 포함한다. 합텐은 "항원"의 범주 내에 포함된다. "합텐"은 그 자체로는 면역원성이 아니지만 일반적으로 더 큰 면역원성 문자 (담체)와 콘쥬게이션될 때 면역원성이 되기 쉬운 저분자량 화합물이다.

[0025] "폴리웨პ티드 항원"은 정제된 천연 웨პ티드, 합성 웨პ티드, 재조합 웨პ티드, 미정제 웨პ티드 추출물 또는 부분적으로 정제된 또는 미정제 활성 상태의 웨პ티드 (예컨대 약화된 또는 비활성화된 바이러스, 미생물 또는 세포의 부분인 웨პ티드), 또는 그런 웨პ티드의 단편들을 포함할 수 있다. 폴리웨პ티드 항원은 바람직하게는 적어도 6개의 아미노산 잔기의 길이이다.

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "면역원성"은 포유류 대상체에게 적합한 조건하에서 투여될 때 적응성 면역 반응을 유도하는 제제 (예컨대 폴리웨პ티드 항원)의 능력을 나타낸다. 면역 반응은 B 세포 (체액성) 및/또는 T 세포 (세포성) 반응일 수 있다.

[0027] "보조제"는 항원과 같은 면역원성 제제와 혼합될 때, 그 혼합물에 노출될 때 제제에 대한 면역 반응을 비특이적으로 증대시키거나 강화시키는 물질을 나타낸다.

[0028] 용어 "아고니스트"는 가장 넓은 의미로 사용되고 수용체를 통해 신호화를 활성화하는 임의의 문자를 포함한다. 일부 구체예에서, 아고니스트는 수용체에 결합한다. 예를 들어, TLR9 아고니스트는 TLR9 수용체에 결합하고 TLR9-신호화 경로를 활성화시킨다. 다른 실례에서, 면역 자극성 문자 CD27의 아고니스트는 CD27 신호화 경로에 결합하고 CD27 신호화 경로를 활성화시킨다.

[0029] 용어 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 적어도 부분적으로, 아고니스트의 생물학적 활성을 차단하는 임의의 문자를 포함한다. 일부 구체예에서, 길항제는 아고니스트에 결합하는 한편, 다른 구체예에서, 길항제는 아고니스트의 리간드에 결합한다. 예를 들어, 억제성 면역 체크포인트 문자 PD-1의 길항제는 PD-1 신호화 경로에 결

합하고 PD-1 신호화 경로를 차단한다.

- [0030] 용어 "면역자극성 서열" 및 "ISS"는 측정 가능한 면역 반응 (예컨대 시험관 내에서, 생체 내에서 및/또는 생체 외에서 측정됨)을 자극하는 핵산 서열을 나타낸다. 본 개시의 목적에 대해, 용어 ISS는 메틸화되지 않은 CG 다이뉴클레오티드를 포함하는 핵산 서열을 나타낸다. 측정 가능한 면역 반응의 실례는, 한정하는 것은 아니지만 항원-특이적 항체 생성, 사이토카인 분비, 림프구 활성화 및 림프구 증식을 포함한다.
- [0031] 용어 "CpG" 및 "CG"는 포스페이트에 의해 분리된 시토신과 구아닌을 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이를 용어는 시토신 및 구아닌의 염기-쌍과 반대로 선형 서열을 나타낸다. 본 개시의 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 메틸화되지 않은 CpG 다이뉴클레오티드를 함유한다. 즉 CpG 다이뉴클레오티드의 시토신은 메틸화되지 않는다 (즉 5-메틸시토신이 아님).
- [0032] 본원에서 사용되는 용어 "안티센스" 및 "안티센스 서열"은 mRNA의 코딩 가닥에 상보하는 서열을 가지는 폴리뉴클레오티드의 비-코딩 가닥을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 본 개시의 폴리뉴클레오티드는 안티센스 서열, 또는 RNAi 분자 (miRNA 및 siRNA)가 아니다. 즉 바람직한 구체예에서, 본 개시의 폴리뉴클레오티드는 그것이 사용될 포유류 대상체의 전사물에 대해 유의미한 상동성 (또는 상보성)을 갖지 않는다. 예를 들어, 인간 대상체에서 면역 반응을 조절하기 위한 본 개시의 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 인간 게놈의 핵산 서열에 대해 그것의 길이에 걸쳐 90% 미만으로 동일하다 (예컨대 길이가 50개의 뉴클레오티드인 폴리뉴클레오티드는 인간 전사물과 50개의 염기 중 40개 이하를 공유할 것이다). 즉, 바람직한 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 그것들이 사용될 포유류 대상체 (예컨대 인간, 비인간 영장류, 가축, 개, 고양이, 토끼, 래트, 마우스 등)의 핵산 서열에 대해 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25% 또는 20% 미만으로 동일하다.
- [0033] 반응 또는 매개변수의 "자극"은 그렇지 않으면 관심의 매개변수를 제외한 동일 조건과 비교할 때, 또는 다르게는, 다른 조건과 비교하여, 그 반응 또는 매개변수를 유도 및/또는 증대시키는 것을 포함한다 (예컨대 TLR 아고니스트의 부재와 비교하여 TLR 아고니스트의 존재하에 TLR-신호화의 증가). 예를 들어, 면역 반응의 "자극"은 반응의 증가를 의미한다.
- [0034] 반응 또는 매개변수의 "억제"는 그렇지 않으면 관심의 매개변수를 제외한 동일 조건과 비교할 때, 또는 다르게는, 다른 조건과 비교하여, 그 반응 또는 매개변수를 차단 및/또는 억제하는 것을 포함한다 (예컨대 PD-1 길항체의 부재하에 PD-1 리간드의 존재와 비교하여 PD-1 리간드 및 PD-1 길항체의 존재하에 PD-1-신호화의 감소). 예를 들어, 면역 반응의 "억제"는 반응의 감소를 의미한다.
- [0035] 본원에 개시된 제제의 "유효량"은 특이적으로 진술된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 진술된 목적과 관련하여 실험적으로 측정될 수 있다. 제제의 "유효량" 또는 충분한 양은 원하는 생물학적 효과, 예컨대 유익한 임상 결과를 포함하여 유익한 결과에 영향을 미치기에 적당한 양이다. 용어 "치료적 유효량"은 대상체 (예컨대 인간과 같은 포유류)에서 질환 또는 장애를 "치료"하기에 효과적인 제제 (예컨대 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트)의 양을 나타낸다. 제제의 "유효량" 또는 "충분한 양"은 하나 이상의 용량으로 투여될 수 있다.
- [0036] 용어 질환의 "치료하는" 또는 "치료"는 프로토콜을 실행하는 것을 나타내고, 그것은 하나 이상의 약물을 질환의 신호 또는 증상을 완화시키기 위한 노력으로, 개체 (인간 또는 그렇지 않으면)에게 투여하는 것을 포함할 수 있다. 그러므로, "치료하는" 또는 "치료"는 신호 또는 증사의 완전한 완화를 필요로 하지 않으며, 치유를 필요로 하지 않고, 구체적으로 개체에 대해 일시적인 효과만을 나타내는 프로토콜을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 그리고 기술분야에 잘 알려져 있는 것과 같이, "치료"는 임상 결과들을 포함하여, 유익한 또는 원하는 결과를 얻기 위한 접근법이다. 유익한 또는 원하는 임상 결과들은, 한정하는 것은 아니지만, 검출 가능하거나 검출할 수 없거나 간에, 하나 이상의 증상의 완화 또는 개선, 질환의 정도의 감소, 질환의 안정화된 (즉 악화되지 않는) 상태, 질환의 확산의 방지, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 일시 완화 및 퇴행 (부분적이거나 전체적이거나간에)을 포함한다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 개체의 예상된 생존과 비교하여 연장된 생존을 의미할 수 있다. 질환 또는 장애를 "일시 완화시키는" 것은 예상된 미처리 결과와 비교하여, 질환 또는 장애의 정도 및/또는 바람직하지 못한 임상적 표시가 감소되고 및/또는 질환 또는 장애가 진행되는 시간 과정이 둔화되는 것을 의미한다. 나아가, 일시 완화 및 치료는 한 용량의 투여에 의해 본질적으로 일어나는 것이 아니라, 자주 연속적인 용량의 투여시에 일어난다.
- [0037] II. 폴리뉴클레오티드 Toll 유사 수용체 9 (TLR9) 아고니스트
- [0038] 본 개시는 5'-TCGTAACGTTCGAACGTTCGANx-3' (SEQ ID NO:2)의 서열로 구성되는 폴리뉴클레오티드를 제공하고, 여

기서 x는 0, 1 또는 2이며, 각 N은 A, C 또는 T이고, 적어도 하나의 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 에스테르 결합이다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 SEQ ID NO:7 (D60-7), SEQ ID NO:8 (D60-8) 또는 SEQ ID NO:9 (D60-9)의 서열로 구성된다. 일부 구체예에서, 뉴클레오티드들 사이의 하나 이상의 결합은 포스포 다이에스테르 결합이다. 일부 구체예에서, 뉴클레오티드들 사이의 모든 결합은 포스포로티오에이트 에스테르 결합이다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥이다. 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 이중-가닥이다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 2'-데옥시리보폴리뉴클레오티드이다.

[0039] SEQ ID NO:1 (D60-1) 및 SEQ ID NO:3 (D60-3)의 폴리뉴클레오티드는 인간 PBMC로부터 고수준의 IFN- α 를 강력하게 유도한다. 그로써, 이들 폴리뉴클레오티드는 폐내 투여에 덜 바람직한 것처럼 보였다. 본 개시의 폴리뉴클레오티드는 D60-3의 3' 단부로부터 뉴클레오티드들을 효과적으로 제거함으로써 D60-3의 서열 및 회문 길이를 점차적으로 단축시킴으로써 개발되었다 (표 1-1 및 1-2 참조). 놀랍게도, 인간 PBMC로부터 더 낮은 최대 수준의 IFN- α 를 유도하는 한편, 효능은 보유하고 있는 D60-3의 더 짧은 변이체들이 확인되었다 (표 1-3 참조). D60-3과 관련하여 8 염기만큼 회문을 감소시키고 4 염기만큼 서열 길이를 감소시키는 것은 이 바람직한 활성 프로파일을 초래하는 것으로 예측되지 않았다.

[0040] 실험 실례에서 증명되는 것과 같이, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트는 특히 그것들이 바람직한 자극성 및 독성 프로파일을 가진다는 점에서 폐내 투여에 특히 잘 맞는다. 구체적으로, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트는 포유류 PBMC로부터의 적당한 수준의 IFN- α 의 강력한 유도자이지만, 반복된 폐내 전달 후에도 실질적인 독성과 관련되지는 않는다. 그로써, 본 개시의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트는 저용량에서 효력이 있을 것으로 예상되며, 단위용량 감소, 일시적인 치료 철회 또는 영구적인 치료 중단을 필요로 하게 될 심각한 또는 생명을 위협하는 부작용을 유발할 것으로 예상되지 않는다. 본 개시의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트는 본원에서 상세하게 설명되는 것과 같이, 폐암을 치료하기에 특히 유용한 것으로 예상된다.

III. 제약학적 조성물

[0041] 본 개시의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 포함하는 제약학적 조성물이 또한 제공된다. 제약학적 조성물은 기본적으로 제약학적으로 허용되는 부형제를 함유한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 추가로 항원을 포함한다. 본 개시의 제약학적 조성물은 용액의 형태일 수 있다. 다르게는, 제약학적 조성물은 탈수된 고체일 수 있다 (예컨대 냉동 건조된 또는 분무 건조된 고체). 본 개시의 제약학적 조성물은 바람직하게는 멸균되고, 바람직하게는 필수적으로 내독소가 없다. 용어 "제약학적 조성물"은 본원에서 용어 "의학적 생성물" 및 "의약"과 상호교환적으로 사용된다.

A. 부형제

[0042] 본 개시의 제약학적으로 허용되는 부형제는 예를 들면, 용매 벌크화제, 완충제, 등장성 조정제 및 보존제를 포함한다 (예컨대 Pramanick et al., Pharma Times, 45:65-77, 2013 참조). 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 용매, 벌크화제, 완충제 및 등장성 조정제 (예컨대 식염수 중의 염화나트륨이 수성 비히클 및 등장성 조정제 둘다로서 작용할 수 있음) 중 하나 이상으로서 기능하는 부형제를 포함할 수 있다. 본 개시의 제약학적 조성물은 비경구 투여에 적합하다. 즉 본 개시의 제약학적 조성물은 장 투여를 위해 의도된 것이 아니다.

[0043] 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 용매로서 수성 비히클을 포함한다. 적합한 비히클은 예를 들면 멸균수, 식염수 용액, 포스페이트 완충 식염수 및 링거액을 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 등장성이다.

[0044] 제약학적 조성물은 벌크화제를 포함할 수 있다. 벌크화제는 특히 제약학적 조성물이 투여 전에 동결건조될 때 유용하다. 일부 구체예에서, 벌크화제는 냉동 또는 분무 건조 중에 및/또는 보관 중에 활성 제제들의 안정화 및 분해 방지를 보조하는 보호제이다. 적합한 벌크화제는 당 (단일-, 이- 및 다당류), 예컨대 슈크로오스, 락토오스, 트레할로오스, 만니톨, 소르비톨, 글루코오스 및 라피노오스이다.

[0045] 제약학적 조성물은 완충제를 포함할 수 있다. 완충제는 쳐리, 보관 및 선택적으로 복원 중에 활성 제제의 분해를 억제하기 위해 pH를 조절한다. 적합한 완충제는 예를 들면 아세테이트, 시트레이트, 포스페이트 또는 셀페이트를 포함하는 염을 포함한다. 다른 적합한 완충제는 예를 들면 아르기닌, 글리신, 히스티딘 및 리신과 같은 아미노산을 포함한다. 완충제는 추가로 염산 또는 수산화 나트륨을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 완충제는 조성물의 pH를 4 내지 9의 범위 내에서 유지한다. 일부 구체예에서, pH는 4, 5, 6, 7 또는 8보다 크다 (하한선). 일부 구체예에서, pH는 9, 8, 7, 6 또는 5 미만이다 (상한선). 즉, pH는 약 4 내지 9의 범위에 있고 이때 하한선은 상한선 미만이다.

[0046] 제약학적 조성물은 등장성 조정제를 포함할 수 있다. 적합한 등장성 조정제는 예를 들면 텍스트로오스, 글리세

롤, 염화 나트륨, 글리세린 및 만니톨을 포함한다.

[0049] 제약학적 조성물은 보존제를 포함할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들면 항산화제 및 항미생물제를 포함한다. 그러나, 바람직한 구체예에서, 제약학적 조성물은 멸균 조건하에 제조되고 단일 사용 용기에 있으며, 그러므로 보존제를 포함할 필요가 없게 된다.

B. 항원

[0051] 본 개시는 추가로 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트에 더불어 항원 및 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다. 항원을 포함하는 본 개시의 바람직한 조성물에서, 항원은 폴리뉴클레오티드에 공유적으로 결합되지 않는다. 일부 바람직한 구체예에서, 항원은 폴리펩티드 항원이다. 일부 바람직한 구체예에서, 항원은 다행 항원이고, 바람직하게는 담체 단백질에 공유적으로 부착되어 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 항원은 종양 항원이다. 다른 구체예에서, 항원은 미생물 항원 또는 알레르기 유발원이다.

[0052] 제약학적 조성물은 종양 항원을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 종양 항원은 포유류 항원이다. 적합한 종양 항원은 기술분야에 기술되어 있다 (예컨대 Cheever et al., Clinical Cancer Research, 15:5323-5337, 2009 참조). 예를 들어, 적합한 종양 항원은 WT1, MUC1, LMP2, HPV E6 E7, EGFRvIII, Her-2/neu, 이디오타입, MAGE A3, p53, NY-ESO-1, PSMA, GD2, CEA, MelanA/Mart1, Ras, gp100, 라프로테이나제3 (PR1), bcr-able, 티로시나제, 서비빈, PSA, hTERT, 육종 전위 브레이크포인트, EphA2, PAP, MP-IAP, AFP, EpCAM, ERG, NA17, PAX3, ALK, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, 폴리살리실산, MYCN, PhoC, TRP-2, GD3, 퓨코실, GM1, 메조텔린, PSCA, MAGE A1, sLe(a), CYP1B1, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GloboH, ETV6-AML, NY-BR-1, RGS5, SART3, STn, 탄산 탈수효소 IX, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인, Tie 2, Page4, VEGFR2, MAD-CT-1, FAP, PDGFR-베타, MAD-CT-2 및 Fos-관련 항원 1을 포함한다.

[0053] 제약학적 조성물은 바이러스 항원, 박테리아 항원, 진균류 항원 및 기생충 항원으로 구성되는 군으로부터 선택된 미생물 항원을 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구체예에서, 미생물 항원은 바이러스 항원 또는 박테리아 항원이다. 일부 구체예에서, 미생물 항원은 비인간, 포유류 대상체에서 감염성 질환을 유발하는 미생물이다. 일부 구체예에서, 미생물 항원은 인간 대상체에서 감염성 질환을 유발하는 미생물이다. 일부 구체예에서, 감염성 질환은 바이러스, 박테리아, 진균 또는 원생동물 기생충에 의해 유발된다.

[0054] 제약학적 조성물은 알레르기 유발원을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 알레르기 유발원은 포유류, 곤충, 식물 및 곰팡이 알레르기 유발원과 같이 환경적 항원이다. 일부 구체예에서, 포유류 알레르기 유발원은 퍼 및 비듬을 포함한다.

C. 키트

[0056] 추가로, 본 개시는 제약학적 조성물 (부형제와 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 포함함) 및 본원에 기술된 방법을 위한 조성물의 사용에 관련된 설명서 세트를 포함하는 키트를 제공한다. 키트의 제약학적 조성물은 적절하게 포장된다. 예를 들어, 만약 제약학적 조성물이 냉동-건조된 분말이라면, 탄성 스톱퍼가 달려있는 바이알이 정상적으로 사용되어 탄성 스톱퍼를 통해 유체가 주입됨으로써 분말이 쉽게 혼탁될 수 있다. 일부 구체예에서, 키트는 추가로 제약학적 조성물의 투여를 위한 장치 (예컨대 주사기 및 바늘, 분무기, 건조 분말 흡입 장치 등)를 포함한다. 제약학적 조성물의 사용과 관련된 설명서는 일반적으로 의도된 사용 방법에 대한 투여의 단위 용량, 스케줄 및 경로에 관한 정보를 포함한다. 키트가 항원을 포함하고 있는 일부 구체예에서, 항원은 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트와 동일한 용기에 포장될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

IV. 사용 방법

[0058] 본 개시의 제약학적 조성물은 그런 필요가 있는 포유류 대상체에서 면역 반응을 자극하는 것을 포함하는 복수의 용도에 적합하다. 포유류 대상체는 한정하는 것은 아니지만, 인간, 비인간 영장류, 설치류, 애완동물 및 가축을 포함한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 특이적 결과를 이루기 위해 유효량으로 대상체에게 투여될 수 있다.

A. 투여의 단위용량 및 모드

[0060] 모든 제약학적 조성물에 있어서, 유효량 및 투여 모드는 기술분야의 숙련자에게 명백한 여러 인자들을 기반으로 다를 수 있다. 고려되어야 할 중요한 인자는 어떤 제약학적 조성물이 독립적 치료로서, 또는 치료제들의 조합의 일부로서 투여되어야 하는가이다. 다른 인자는 어떤 제약학적 조성물이 추가로 항원을 함유하는가 하는 것이다.

고려되어야 할 다른 인자들은 이루어져야 할 결과 및 투여되어야 할 용량의 횟수이다.

[0061] 적합한 단위용량 범위는 원하는 효과를 제공하는 것이다. 단위용량은 대상체에게 투여된 폴리뉴클레오티드의 양에 의해 결정될 수 있다. 대상체 체중에 의해 전달될 양으로 주어진 폴리뉴클레오티드의 예시적인 단위용량 범위는 약 5 내지 5000 mcg/kg이다. 일부 구체예에서, 단위용량은 약 5, 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 또는 1000 mcg/kg (하한선)보다 크다. 일부 구체예에서, 단위용량은 약 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 750, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 또는 100 mcg/kg (상한선)보다 적다. 즉, 단위용량은 약 5 내지 5000 mcg/kg의 범위에서 어느 곳에나 있고, 이때 하한선은 상한선보다 적다. 인간 대상체에게 전달될 양으로 주어진 폴리뉴클레오티드의 예시적인 단위용량 범위는 약 100 mcg 내지 약 100 mg이다. 일부 구체예에서, 단위용량은 약 100, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 또는 5000 mcg (하한선)보다 크다. 일부 구체예에서, 단위용량은 약 100, 75, 50, 25, 20, 15 또는 10 mg (상한선)보다 적다. 즉, 단위용량은 약 100 내지 100,000 mcg의 범위 내에서 어느 곳에나 있고, 이때 하한선은 상한선보다 적다.

[0062] 일부 구체예에서, 제약학적 조성물이 추가로 항원을 포함할 때, 전달될 양으로의 항원 단위용량은 약 1 mcg 내지 50 mcg이다. 일부 구체예에서, 항원 단위용량은 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 mcg (하한선)보다 크다. 일부 구체예에서, 항원 단위용량은 약 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 또는 10 mcg (상한선)보다 적다. 즉, 항원 단위용량은 약 1 내지 50 mcg의 범위 내에서 어느 곳에나 있고, 이때 하한선은 상한선보다 적다.

[0063] 일부 구체예에서, 본 개시의 제약학적 조성물은 비경구 투여를 위해 의도된다 (예컨대 경구 또는 직장 투여용이 아님). 적합한 투여 경로는 주사, 국소 및 흡입을 포함한다. 특히, 본 개시의 제약학적 조성물은 정맥내, 근육내, 피하, 피부 (유전자 총), 경피 및 흡입과 같은 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0064] 일부 바람직한 구체예에서, 본 개시의 제약학적 조성물은 폐내 투여를 위해 의도된다 (또한 본원에서 폐 투여로도 언급된다). 폐내 투여는 폐의 질환, 예컨대 폐암의 치료를 위해, 의도된 작용 부위에 치료용 폴리뉴클레오티드의 국소 전달을 이루는 한편 해로운 전신성 부작용의 가능성을 줄이기 위해 바람직하다. 폐내 투여에 적합한 장치는 분무기, 계량-용량 흡입기, 분사기 및 건조-분말 흡입 장치를 포함한다.

[0065] 적합한 투약 양생법은 예방적 또는 치료적 맥락에서 원하는 효과를 제공하는 것이다. 선택된 경로에 의해 투여된 용량의 횟수는 1회 또는 1회 이상일 수 있다. 투약의 빈도는 주마다, 2-주마다, 월마다, 2-개월마다, 또는 용량 사이에 3 내지 12개월의 범위일 수 있다. 일부 구체예에서, 2 용량이 투여되는데 제1 용량 후 1 내지 2개월 후에 제2 용량이 투여된다. 일부 구체예에서, 3 용량이 투여되는데 제2 용량은 제1 용량 후 1 내지 2개월 후에 투여되고, 제3 용량은 제2 용량 후 1 내지 5개월 후에 투여된다. 다른 구체예에서, 3 또는 4 용량이 2주마다 또는 월 기준으로 투여될 수 있다. 다른 구체예에서, 더 짧거나 더 긴 시간이 용량들 사이에 경과할 수 있다. 특정 구체예에서, 연속적인 단위용량 사이의 간격은 여러 주 또는 여러 개월의 관점에서 달라질 수 있다. 한 구체예에서, 연속적으로 2, 3, 4, 5 또는 6주마다의 용량이 투여되고 이어서 후기 시점에 많은 주 간격 용량의 제2 시리즈가 투여될 수 있다. 기술분야의 당업자는 실시예에서 예시되는 것과 같이 생물학적 결과, 예컨대 항원-특이적 항체 반응 또는 종양 퇴행을 측정함으로써 단위용량 양생법을 조정할 수 있을 것이다.

B. 면역 반응의 자극

[0066] 간단히 설명하면, 본 개시는 포유류 대상체에서 면역 반응을 자극하는 방법을 제공하는데, 그 방법은 포유류 대상체에서 면역 반응을 자극하기에 충분한 양의 제약학적 조성물을 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 면역 반응을 "자극하는 것"은 면역 반응을 증가시키는 것을 의미하고, 그것은 드노보 면역 반응을 유도하는 것 (예컨대 초기 백신접종 양생법의 결과로서) 또는 기존의 면역 반응을 증대시키는 것 (예컨대 부스터 백신접종 양생법의 결과로서)으로부터 발생할 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 반응을 자극하는 것은 사이토카인 생성을 자극하는 것; B 림프구 증식을 자극하는 것; 인터페론 경로-관련 유전자 발현을 자극하는 것; 화학유인물질-관련 유전자 발현을 자극하는 것; 및 형질 세포양 수지 세포 (pDC) 성숙으로 구성되는 군 중 하나 이상을 포함한다. 면역 반응의 자극을 측정하는 방법은 기술분야에 알려져 있고 본 개시의 생물학적 실시예에서 기술된다. 제약학적 조성물이 추가로 항원을 포함하는 구체예들에서, 면역 반응을 자극하는 것은 항원-특이적 항체 반응을 유도하는 것을 포함한다.

[0068] 예를 들어, 제약학적 조성물이 추가로 항원을 포함하는 일부 구체예에서, 본 개시는 포유류 대상체에서 항원-특이적 항체 반응을 유도하기에 충분한 양의 제약학적 조성물을 포유류 대상체에게 투여함으로써 포유류 대상체에서 항원-특이적 항체 반응을 유도하는 방법을 제공한다. 항원-특이적 항체 반응을 "유도하는 것"은 전-투여 기준선 역가 또는 혈청보호 수준과 같은 한계값 수준을 초과하여 항원-특이적 항체의 역가를 증가시키는 것을 의

미한다.

[0069] 한정하는 것은 아니지만, 항원-특이적 항체 생성의 측정 (특이적 항체 하위부류의 측정을 포함함), B 세포 및 헬퍼 T 세포와 같은 림프구의 특이적 집단의 활성화, IFN-알파, IL-6, IL-12와 같은 사이토kin의 생성 및/또는 히스타민의 방출을 포함하여, 면역 반응의 분석 (정성적 및 정량적 둘 다)은 기술분야에 공지되어 있는 임의의 방법에 의한 것일 수 있다. 항원-특이적 항체 반응의 측정 방법은 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)을 포함한다. 림프구의 특이적 집단의 활성화는 증식 분석에 의해 측정될 수 있고, 형광-활성화 세포 분류 (FACS)를 포함한다. 사이토카인의 생성은 또한 ELISA에 의해 측정될 수 있다.

[0070] 바람직하게, Th1-형 면역 반응이 자극된다 (즉 유도되거나 증대된다). 본 개시를 참조하면, Th1-형 면역 반응을 자극하는 것은 활성 제제로 처리되지 않은 대조 세포들과 비교하여 본 개시의 활성 제제 (폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트)로 처리된 세포들로부터의 사이토카인 생성을 측정함으로써 시험관 내에서 또는 생체 외에서 측정될 수 있다. "Th1-형 사이토카인"의 실례는, 한정하는 것은 아니지만, IL-2, IL-12, IFN-감마 및 IFN-알파를 포함한다. 대조적으로, "Th2-형 사이토카인"은, 한정하는 것은 아니지만, IL-4, IL-5 및 IL-13을 포함한다. 면역자극성 활성의 측정에 유용한 세포들은 면역 시스템의 세포들, 예컨대 항원 제공 세포 림프구, 바람직하게는 대식세포 및 T 세포를 포함한다. 적합한 면역 세포는 형질 세포양 수지 세포 및 B 세포를 포함하여 말초혈 단핵세포와 같은 일차 세포, 또는 포유류 대상체로부터 분리된 비장세포를 포함한다.

[0071] Th1-형 면역 반응을 자극하는 것은 또한 투여 전 및 후에 또는 활성 제제로 처리되지 않은 대조 대상체와 비교하여 IL-2, IL-12 및 인터페론의 수준을 측정함으로써 본 개시의 활성 제제 (폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트)로 처리된 포유류 대상체에서 측정될 수 있다. Th1-형 면역 반응을 자극하는 것은 또한 Th1-형 대 Th2-형 항체 역가의 비율을 측정함으로써 측정될 수 있다. "Th1-형" 항체는 인간 IgG1 및 IgG3 및 쥐과 IgG2a를 포함한다. 대조적으로, "Th2-형" 항체는 인간 IgG2, IgG4 및 IgE 및 쥐과 IgG1 및 IgE를 포함한다.

암

[0073] 본 개시는 포유류 대상체에서 암을 치료하기에 충분한 양의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 포함하는 제약 학적 조성물을 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 암을 "치료하는 것"은 퇴행을 유발하거나 그렇지 않으면 치료가 없을 때의 예상된 생존과 비교하여 생존을 연장시키는 것과 같은 유익한 임상 결과를 불러오는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 암이 고체 종양일 때, 암을 "치료하는 것"은 고체 종양의 크기를 수축시키거나 그렇지 않으면 독자 생존이 가능한 암세포 수를 감소시키는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 암이 고체 종양일 때, 암을 "치료하는 것"은 고체 종양의 성장을 지연시키는 것을 포함한다. 일부 바람직한 구체예에서, 본 개시는 폐내 전달에 의해 유효량의 본 개시의 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 그것을 필요로 하는 포유류 대상체에서 폐암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가로 부형제를 포함하는 제약학적 조성물에 존재한다.

[0074] 폐암은 원발성 폐암 또는 폐에 대한 전이성 암일 수 있다. 일부 구체예에서, 대상체는 원발성 폐암 및 폐외 암으로 구성되는 군으로부터 선택된 원발성 암을 가진다. 일부 구체예에서, 원발성 폐암은 소-세포 폐암종 (SCLC)인 한편, 다른 구체예에서 원발성 폐암은 비-소-세포 폐암종 (NSCLC)이다. NSCLC의 세 가지 주요 유형은 선암 종, 편평-세포 암종 및 큰-세포 암종이다. 폐에 대한 전이성 암은 면 부위에 있는 원발성 암으로부터 폐로 확산된 이차 암이다. 일부 구체예에서, 전이성 암은 방광암, 유방암, 대장암, 두경부암, 신장암, 흑색종, 췌장암, 전립선암 및 난소암으로 구성되는 군으로부터 선택된 원발성 암의 전이이다. 다른 구체예에서, 전이성 암은 미지의 원발성 기원의 암으로부터 유래된다.

[0075] 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 단독 치료제로서 투여되는 한편 (단일 치료법), 다른 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 유효량의 제2 치료제와 함께 투여된다 (조합 치료법). 조합 치료법에서 각 치료제는 동시에 (동일한 제약학적 조성물로), 함께 (임의의 순서로 하나씩 투여된 별도의 제약학적 조성물로) 또는 임의의 순서로 순차적으로 (별도의 기회에 투여된 별도의 제약학적 조성물로) 투여될 수 있다. 순차적 투여는 특히 조합 치료법의 치료제들이 상이한 단위용량 형태로 있을 때 특히 유용하다 (예컨대 한 제제는 폐 투여를 위한 건조 분말이고 다른 제제는 주사에 의한 투여를 위한 용액이다). 순차적 투여는 또한 조합 치료법의 치료제들이 상이한 투약 스케줄로 투여될 때 유용하다 (예컨대 한 제제는 매 1, 2, 3 또는 4주에 1회 투여되는 폴리뉴클레오티드이고, 다른 제제는 매일 또는 더 자주 투여되는 화학요법제이다). 일부 구체예에서, 폴리뉴클레오티드는 원발성 암의 수술적 절제와 함께 투여되고, 수술 전에, 중에 및/또는 후에 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 수술적 절제는 폐엽 절제술인 한편, 다른 구체예에서 수술적 절제는 설상 절제술이다 (하엽 적출).

- [0076] 본 개시는 제1 치료제 및 제2 치료제로서 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조합 치료법을 제공한다. 일부 구체예에서, 제2 치료제는 화학요법제, 생물학적 제제 및 그것들의 조합으로 구성되는 군 중 하나를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 원발성 암을 절제하는 단계 및 방사선 요법을 투여하는 단계 중 하나 또는 둘 다를 포함한다. 제2 치료제는 단일치료법으로서 사용하기 위해 관련 정부 기관 (예컨대 FDA, EMA 등)에 의해 승인된 용량 및 스케줄로 투여된다. 다르게는, 제2 치료제는 단일치료법으로서 사용하기 위해 관련 정부 기관에 의해 승인된 것보다 적은 용량 및/또는 덜 빈번한 스케줄로 투여된다.
- [0077] 일부 구체예에서, 화학요법제는 악티노마이신, 아파티닙, 알렉티닙, 아스파라기나제, 아자시티딘, 아자티오프린, 비칼루타미드, 블레오마이신, 보르테조닙, 캄프토테신, 카르보플라틴, 카페시타빈, 세르티닙, 시스플라틴, 클로람부실, 크리조티닙, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에를로티닙, 에피루비신, 에포ти론, 에토포시드, 플루다라빈, 플루타민, 플루오로우라실, 게피티닙, 켐시타빈, 하이드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙, 이리노테칸, 라파티닙, 레트로졸, 메클로로에타민, 메르캅토퓨린, 메토트렉세이트, 미토마이신, 미토크산트론, 옥트레오티드, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 랄티트렉세드, 소라페닙, 수니티닙, 타목시펜, 테모졸로미드, 테니포시드, 티오구아닌, 토포테칸, 발루비신, 빙글라스틴, 빙크리스틴, 빈데신, 비노렐빈 및 그것들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0078] 일부 구체예에서, 생물학적 제제는 사이토카인 또는 항체이다. 사이토카인 또는 항체는 단편, 유도체 또는 융합 단백질일 수 있다. 일부 구체예에서, 항체는 단클론성 항체, 바람직하게는 전체 인간 단클론성 항체 또는 인간화된 단클론성 항체이다. 일부 구체예에서, 항체는 항-EGF 항체, 예컨대 네시투무맙이다.
- [0079] 본 개시는 제1 치료제로서 폴리뉴클레오티드와, 억제성 면역 체크포인트 분자의 길항제를 포함하는 제2 치료제를 포함하는 조합 치료법을 제공한다. 일부 구체예에서, 억제성 면역 체크포인트 분자는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4 (CD152), LAG-3, TIM-3, TIGIT, IL-10 및 TGF-베타로 구성되는 군으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 억제성 면역 체크포인트 분자는 인돌아민 2,3-다이옥시게나제 (IDO) 또는 트립토판 2,3-다이옥시게나제 (TDO)이다.
- [0080] 여전히 추가의 구체예에서, 본 개시는 제1 치료제로서 폴리뉴클레오티드, 및 면역 자극성 분자의 아고니스트를 포함하는 제2 치료제를 포함하는 조합 치료법을 제공한다. 일부 구체예에서, 면역 자극성 분자는 CD27, CD40, OX40 (CD134), GITR, CD137, CD28 및 ICOS (CD278)로 구성되는 군으로부터 선택된다.
- [0081] 바람직하게, 유효량의 폴리뉴클레오티드와 유효량의 제2 치료제는 함께 폐암에 대한 협동 효과를 초래한다. 협동 효과는 제2 치료제가 없을 때 폴리뉴클레오티드의 투여로부터 유발되는 효과보다 크지만, 부가 효과보다는 적은 효과이다. 보다 바람직하게, 유효량의 폴리뉴클레오티드와 유효량의 제2 치료제는 함께 폐암에 대한 부가 효과를 초래한다. 부가 효과는 단일치료법으로서 폴리뉴클레오티드와 제2 치료제의 투여로부터 유발되는 효과들의 대략적인 합이지만, 상승 효과보다는 적은 효과이다. 보다 더 바람직하게, 유효량의 폴리뉴클레오티드와 유효량의 제2 치료제는 함께 폐암에 대한 상승 효과를 초래한다. 상승 효과는 단일치료법으로서 폴리뉴클레오티드와 제2 치료제의 투여로부터 유발되는 효과들의 합보다 큰 효과이다.
- [0082] 본 개시는 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 포함하는 단일치료법 또는 조합 치료법으로서 폐암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 방법은 치료법의 중단 후 일정 시간 동안 완전한 또는 부분적인 차도를 이룬다. 일부 구체예에서, 방법은 다음의 결과들 중 하나 이상을 이룬다:
- [0083] (a) 대상체의 생존 시간을 증가시킴;
- [0084] (b) 원발성 암의 부피를 감소시킴;
- [0085] (c) 원발성 암의 성장을 지연시킴;
- [0086] (d) 전이성 종양의 수를 감소시킴;
- [0087] (e) 전이성 종양의 부피를 감소시킴; 및
- [0088] (f) 전이성 종양의 성장을 지연시킴;
- [0089] 이때 원발성 암은 폐암 또는 폐외 암이다. 일부 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 케모카인 CC 모티프 리간드 2 (CCL2), 케모카인 CXC 모티프 리간드 10 (CXCL10), 인터페론-알파 (IFN- α), 인터페론-감마 (IFN- γ), 인터류킨-1알파 (IL-1 α), 인터류킨-6 (IL-6), 인터류킨-10 (IL-10), 인터류킨-12 p70 (IL-12p70), 과립구 콜로니-

자극 인자 (GCSF) 및 종양 괴사 인자-알파 (TNF- α)로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 사이토카인의 폐에서의 분비를 유도하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 심각한 폐의 폴리뉴클레오티드-유도 독성을 초래하지 않도록 폴리뉴클레오티드의 반복된 투여가 금지된다. 일부 구체예에서, 폐암을 치료하는 것은 심각한 폴리뉴클레오티드-유도된 독감-유사 증상을 초래하지 않도록 폴리뉴클레오티드의 반복된 투여가 금지되고, 여기서 독감-유사 증상은 열, 두통, 오한, 근육통 및 피로로 구성되는 군의 하나 이상을 포함한다.

[0090] 다른 질환 및 장애

본 개시는 추가로 포유류 대상체에서 감염성 질환을 예방하기에 충분한 양의 본 개시의 제약학적 조성물을 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상체에서 감염성 질환을 예방하는 방법을 제공한다. 즉, 일부 구체예에서, 본 개시는 예방용 백신을 제공한다. 일부 구체예에서, 포유류 대상체는 감염성 병원체에 노출될 위험이 있다. 감염성 질환을 "예방하는 것"은 대상체가 감염성 질환이 발생하는 것으로부터 보호하는 것을 의미한다. 일부 구체예에서, 감염성 질환을 예방하는 것은 추가로 대상체가 감염성 병원체로 감염되는 것으로부터 보호하는 것을 포함한다 (예컨대 대상체가 급성 또는 만성 감염을 발생시키는 것으로부터 보호함). 추가로 본 개시는 포유류 대상체에서 감염성 질환의 증상을 개선하기에 충분한 양의 제약학적 조성물을 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상체에서 감염성 질환의 증상을 개선하는 방법을 제공한다. 즉, 일부 구체예에서, 본 개시는 치료용 백신을 제공한다. 일부 구체예에서, 대상체는 감염성 병원체로 급성 또는 만성적으로 감염된다. 감염성 질환은 바이러스성, 박테리아성, 진균성 또는 기생충성 질환일 수 있다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 추가로 바이러스, 박테리아, 진균 또는 기생충 항원을 포함할 수 있다. 감염성 질환의 증상을 "개선하는 것"은 증상을 개선하는 것, 바람직하게는 질환의 정도를 감소시키는 것을 의미한다.

더욱이 본 개시는 포유류 대상체에서 IgE-관련 장애의 증상을 개선하기에 충분한 양의 본 개시의 제약학적 조성물을 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 대상체에서 IgE-관련 장애의 증상을 개선하는 방법을 제공한다. 일부 바람직한 구체예에서, IgE-관련 장애는 알레르기이다. 알레르기는 한정하는 것은 아니지만 알레르기성 비염 (건초열), 부비강염, 습진 및 두드러기를 포함한다. 일부 구체예에서, 제약학적 조성물은 추가로 알레르기 유발원을 포함할 수 있다. IgE-관련 장애의 증상을 "개선하는 것"은 증상을 개선하는 것, 바람직하게는 장애의 정도를 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 만약 IgE-관련 장애가 알레르기성 비염이면, 증상을 개선하는 것은 코 점막의 팽윤을 감소시키고, 비루 (콧물)를 감소시키며, 및/또는 채채기를 감소시키는 것을 의미한다.

[0093] 실시예

약어: CTRL (대조표준); DNA (데옥시리보핵산); BALF (기관지폐포 세척액); ELISA (효소-결합 면역흡착 분석); EC₅₀ (절반 최대 효과 농도); (FACS) 형광 활성화 세포 분류; mcg 또는 μ g (마이크로그램); PBMC (말초혈 단핵 세포); PN (폴리뉴클레오티드); TLR9 (Toll-유사 수용체 9); 및 WT (야생형).

비록 전술한 개시가 명료함 및 이해의 목적으로 예시 및 실례에 의해 일부 상세하게 기술되었지만, 기술분야의 숙련자들에게 특정 변화 및 변형이 실시될 수 있다는 것이 분명할 것이다. 그러므로, 기술 및 실시예들은 개시의 범주를 제한하는 것으로서 해석되지 않아야 한다.

표 1-1: 폴리뉴클레오티드 서열[^]

| PN | SEQ ID NO: | 서열 |
|-------|------------|---|
| D60-1 | 1 | 5'-TCG AAC GTT CGA ACG TTC GAA CGT TCG AAT-3' |
| D60-2 | 2 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA Nx-3' |
| D60-3 | 3 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA ACG TTA-3' |
| D60-4 | 4 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA ACG TT-3' |
| D60-5 | 5 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA ACG T-3' |
| D60-6 | 6 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA ACG-3' |
| D60-7 | 7 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA AC-3' |
| D60-8 | 8 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA A-3' |
| D60-9 | 9 | 5'-TCG TAA CGT TCG AAC GTT CGA-3' |

[^] 가장 긴 가능한 회문은 진하게 표시된다. 적어도 하나의 뉴클레오티드간 결합은 D60-2 및 SEQ ID NO:2에서 포스포로티오에이트 결합이고, x는 0, 1 또는 2이며, N은 A, C 또는 T이다.

표 1-2: 폴리뉴클레오티드 특성

| PN | SEQ ID NO: | # CpGs | 폴리뉴클레오티드 길이 | 회문 길이 |
|-------|------------|--------|-------------|-------|
| D60-1 | 1 | 7 | 30 | 28 |
| D60-2 | 2 | 5 | 21-24 | 12-16 |
| D60-3 | 3 | 6 | 27 | 24 |
| D60-4 | 4 | 6 | 26 | 22 |
| D60-5 | 5 | 6 | 25 | 20 |
| D60-6 | 6 | 6 | 24 | 18 |
| D60-7 | 7 | 5 | 23 | 16 |
| D60-8 | 8 | 5 | 22 | 14 |
| D60-9 | 9 | 5 | 21 | 12 |

[0098]

표 1-1은 뉴클레오티드 서열을 나타내고 표 1-2는 실시예에서 언급된 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트의 서열 특성을 요약한 것이다. 다르게 주지되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드는 2'-데옥시리보폴리뉴클레오티드이고 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 에스테르 결합이다.

실시예 1: 폴리뉴클레오티드에 의한 인간 백혈구의 분리 및 자극

[0101] 폴리뉴클레오티드 (PN)의 활성을 인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 분리된 B 세포에 의한 사이토카인 분비의 측정에 의해 시험관 내에서 평가하였다.

[0102] PBMC를 건강한 인간 도너의 혈액으로부터 Ficoll-Paque를 사용하여 분리하였다. B 세포를 제조자의 설명서에 따라 항-CD19 마이크로비드 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 사용하여 포지티브 선택에 의해 벼피 코트로부터 분리하였다. IFN- α 유도를 위해, PBMC (2.5×10^6 세포/mL)의 중복 배양물을 24시간 동안 증가하는 농도의 폴리뉴클레오티드와 함께 인큐베이션하였다. 세포 배양 상층액 중의 IFN- α 수준을 ELISA (n=4명의 도너)에 의해 측정하였다. IL-6 유도를 위해, B 세포 (0.75×10^6 세포/mL)의 중복 배양물을 96시간 동안 증가하는 농도의 폴리뉴클레오티드와 함께 인큐베이션하였다. 세포 배양 상층액 중의 IL-6 수준을 ELISA (n=12명의 도너)에 의해 측정하였다.

[0103] 시험한 모든 폴리뉴클레오티드는 광범위한 농도 범위에 걸쳐 인간 PBMC로부터 IFN- α 생성을 유도하였다 (도 1). D60-1이 D60-7과 비교하여 더 높은 최대 IFN- α 수준을 유도한 한편, D60-7은 D60-1과 D60-7이 표 1-3에서 나타낸 것과 같이 비교할만한 IFN- α 값을 가졌다는 점에서 뜻지 않게 강력하였다. D60-1 및 D60-7은 둘 다 광범위한 농도 범위에 걸쳐 인간 B 세포로부터 IL-6 생성을 또한 유도하였다 (도 2). D60-7은 D60-1과 비교하여 약간 더 높은 최대 IL-6 수준을 유도하였다.

표 1-3: 인간 PBMC에 의한 IFN- α 분비

| 폴리뉴클레오티드 | IFN- α EC ₅₀ (μ M) | IFN- α 최대 (pg/mL) |
|----------|---|--------------------------|
| | 평균 \pm SEM | 평균 \pm SEM |
| D60-1 | 0.0353 \pm 0.0014 | 2819 \pm 1295 |
| D60-2 | 0.0220 \pm 0.0066 | 1919 \pm 839 |
| D60-3 | 0.0228 \pm 0.0433 | 2473 \pm 1068 |
| D60-4 | 0.0285 \pm 0.0050 | 2893 \pm 1300 |
| D60-5 | 0.0293 \pm 0.0083 | 2965 \pm 1340 |
| D60-6 | 0.0238 \pm 0.0055 | 2902 \pm 1335 |
| D60-7 | 0.0248 \pm 0.0088 | 1869 \pm 856 |
| D60-8 | 0.0253 \pm 0.0077 | 1647 \pm 813 |

[0104]

실시예 2: 마우스에서 폴리뉴클레오티드의 평가

[0105] 폴리뉴클레오티드 (PN)의 활성을 격주의 스케줄로, 기관지폐포 세척액 (BALF)에서 사이토카인의 측정, 폐 조직의 조직병리학적 득점 채점 및 식염수, D60-1 또는 D60-7의 비강 내 투여 후 마우스의 체중의 변화의 측정에 의해 생체 내에서 평가하였다.

[0106] 1, 5 또는 20 μ g 용량의 식염수 또는 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 폐에의 전달을 보장하기 위하여 50 μ L의 부피로 비강내 경로를 통하여 BALB/c 마우스 (n=5마리/그룹)에 투여하였다. 마우스에게 0, 14, 28 및 42 일에, 총 4회 치료 동안 비강내 치료를 제공하였다. 마우스를 주 2회 체중을 측정하였다. 마지막 (제4 회) 치료 후 24시간 후에, 마우스를 희생시키고 기관지폐포 세척액을 식염수를 사용하여 수행하여 하부 호흡기의 액체 세척액을 얻었다. 계속해서, 폐 조직을 수득하고 10% 포르말린에 파라핀 삽입을 위해 보존하였고, 섹션화하고 조직

병리학적 평가 및 득점 채점을 위해 제제 중의 혜마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 폐 조직 섹션을 1 내지 5의 규모로 득점을 매겼는데, 1은 변하지 않은 폐를 나타내고 더 높은 득점은 세-기관지주위 및 혈관주위 염증 침윤의 증가된 발생률, 뿐만 아니라 구조적 변화 및 폐 조직 리모델링의 증가된 발생률을 나타낸다. BALF의 사이토카인 수준을 MAGPIX® 복합 시스템 (Luminex, Austin, TX)을 사용하여 측정하였다.

[0108] 비강내 경로를 통한 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트의 투여는 BALF에서의 사이토카인의 측정에 의해 측정되는 바 국소 면역 반응을 유도한다 (도 3). 시험한 저용량 (1 또는 5 μ g)에서, D60-1 및 D60-7은 비교할만한 수준의 많은 사이토카인을 유도하였다. 그러나, 더 높은 시험 용량 (20 μ g 또는 약 1 mg/kg 용량)에서, D60-1은 D60-7과 비교하여 모든 사이토카인의 더 높은 수준을 유도하였다.

[0109] 폴리뉴클레오티드 유도된 독성을 폐 조직의 현미경 검사에 의해 국소적으로 및 체중의 변화를 측정함으로써 전신적으로 관찰하였다 (Campbell et al., J Clin Invest, 119:2564-2576, 2009). 용량-의존 방식으로 포획된 폐 조직 섹션의 조직병리학적 득점은, D60-1의 수령체에서, 각 용량 수준에서, D60-1 및 D60-7 둘 다에 대한 반응으로 더 현저한 효과를 보이며 세-기관지주위 및 혈관주위의 세포 침윤에서 기도 및 혈관 벽 및 조직 리모델링에 대한 변화를 증가시킨다 (도 4). 시험된 최고 용량 (20 μ g)에서 D60-1은, 특히 14 및 28일에 각각 제2 및 제3 치료 후 더 현저한 후-처리 중량 손실을 유발하였다 (도 5). 함께 고려하면, 이들 데이터는 D60-7의 비강내 투여가 D60-1과 비교하여 감소된 독성과 관련되어 있음을 나타낸다.

실시예 3: 폐암의 마우스 모델에서 폴리뉴클레오티드의 평가

[0111] 폴리뉴클레오티드 (PN)의 활성을 폐에 대한 전이성 암의 여러 상이한 마우스 모델에서 생체 내 평가한다 (Heppner et al., Breast Cancer Res. 2:331-334, 2000).

암종 세포의 피하 (SC) 주사.

[0113] D60-7 및 항-PD-1은 협력 작용을 하여 폐 종양을 가진 마우스의 생존을 증가시킨다.

[0114] 4T1 유방 암종 세포는 피하 공간으로부터 폐, 간, 췌장, 뼈 및 혈액으로 자발적으로 전이한다. 약 10,000개의 T41 세포를 BALB/c 마우스에 피하로 주사하였다. 6일 후 항-PD-1 차단 항체 (Ab)로 치료를 개시하였다. 차단 Ab를 IP 주사에 의해 5주 동안 매 3 또는 4일마다 250 μ g의 용량으로 투여하였다. 원발성 종양을 15일에 수술로 제거하였다. 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 D60-7을 16일에 시작하여 50 μ L의 식염수 중의 10 μ g의 용량으로, 그 후에는 3주 동안 주 2회로 (예컨대 16, 19, 23, 26, 30, 34 및 41일에) 비강내로 투여하였다. 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 (D60-7) 및 차단 Ab (항-PD-1)를 단독으로, 또는 조합하여 제공하였다. 식염수를 마우스의 별도의 그룹에 대하여 및 항-PD-1을 단독으로 받은 마우스에 대하여 대조표준으로서 투여하였다. 그룹 당 마우스의 수는 다음과 같았다: 식염수 (대조표준) n=11; ○ 60-7 n=10; 항-PD-1 n=10; 항-PD-1 플러스 D60-7 n=12. 종양을 가진 마우스의 생존을 증가시키는 치료의 능력을 90일 동안 평가하였다. 도 6은 제제 단독으로 처리된 마우스에 비교하여, D60-7 및 항-PD-1 둘 다로 치료된 마우스의 증대된 생존을 보이는 2개의 독립적인 실험의 복합물이다.

[0115] D60-7 및 항-PD-1은 협력 작용하여 폐 전이의 수를 감소시킨다.

[0116] 약 10,000개의 4T1 세포를 BALB/c 마우스로 피하로 주사하였다. 6일 후 항-PD-1 차단 항체로의 치료를 개시하였다. 항-PD-1을 IP 주사에 의해 6일부터 34일까지 주 2회 250 μ g의 용량으로 투여하였다. 원발성 종양을 15일에 수술에 의해 제거하였다. D60-7을 50 μ L의 식염수 중의 10 μ g의 용량으로 16, 19, 21, 23, 27 및 30일에 비강내로 투여하였다. D60-7 및 항-PD-1을 단독으로, 또는 조합하여 제공하였다. 식염수를 마우스의 별도의 그룹에 대하여 및 항-PD-1을 단독으로 받은 마우스에 대하여 대조표준으로서 투여하였다. 34일에, 마우스를 희생하였다. 폐를 수득하고 처리하여 분석을 플레이팅함으로써 폐 전이의 수를 카운팅하였다. 간단히 설명하면, 폐를 가위로 15회 절단하고 30분 동안 37°C에서 1 mg/mL의 콜라제나제 타입 IV 및 0.25 mg/mL의 DNase I을 함유한 5 mL의 HBSS에서 소화시켰다. 인큐베이션 후에 혼탁액을 HBSS로 2회 세척하고 5 mL의 배양 배지 (RPMI 플러스 10% FBS)에 재현탁하였다. 혼탁액을 10 mL의 조직 배양 배지에 1:2 내지 1:1000의 범위의 상이한 희석률로 희석하고 페트리 접시에 플레이팅하였다. 10일 후에, 종양 콜로니를 카운팅하여 폐에서 전이성 콜로니를 형성하는 세포의 수를 평가하였다. 그룹당 마우스의 수는 다음과 같았다: 식염수 (대조표준) n=13; D-60-7 n=11; 항-PD-1 n=14; 항-PD-1 플러스 D60-7 n=14. 도 7은 D60-7 또는 항-PD-1이 둘 다 단일 제제로서 전이 수의 유의미한 감소를 유도하였음을 보여주는, 2개의 독립적인 실험의 누적이다. 놀랍게도, D60-7 또는 항-PD-1의 조합은 협력 작용하여 폐 전이의 수의 더 큰 감소를 생성하였다. P 값을 쌍을 이루지 않은 Mann Whitney 쌍을 이루지 않은 T 시험을 사용하여 프리즘 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

[0117]

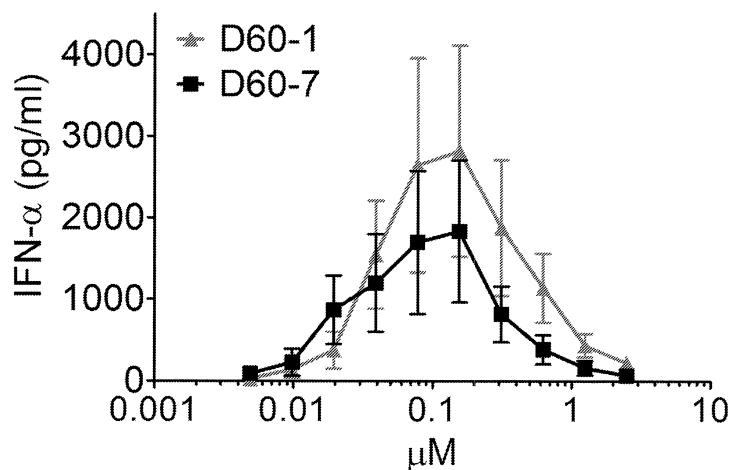
암종 세포의 정맥 내 (IV) 주사.

[0118]

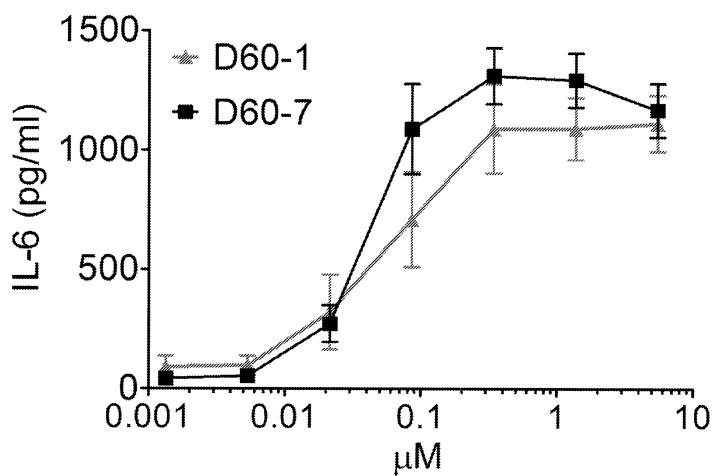
약 20,000개의 CT26 콜론 암종 세포를 BALB/c 마우스에 정맥 내로 주사하거나, 약 50,000개의 루이스 폐 암종 세포를 C57BL/6 마우스에 정맥 내로 주사한다. 항-PD-1 또는 항-PDL-1 차단 항체 (Ab)를 IP 주사에 의해 250 μ g의 용량으로 7, 11, 15, 18, 21, 25, 28 및 32일에 투여한다. 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트를 50 μ L의 식염수 중의 10 또는 5 또는 1 μ g의 용량으로 7, 11, 15, 18, 21, 25, 28 및 32일에 비강 내로 투여한다. 폴리뉴클레오티드 TLR9 아고니스트 및 차단 Ab를 단독으로, 또는 조합하여 제공한다. 종양을 가진 마우스의 생존율을 증가시키는 치료의 능력을 최대 200일 동안 평가한다.

도면

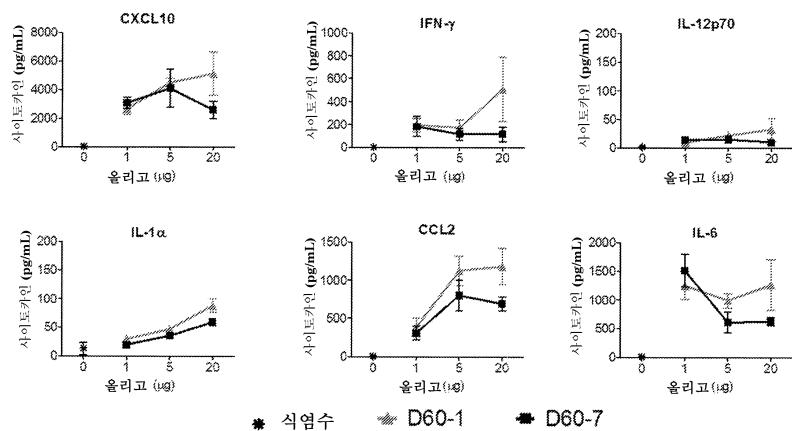
도면1



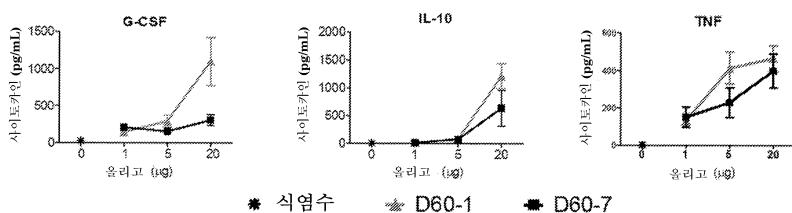
도면2



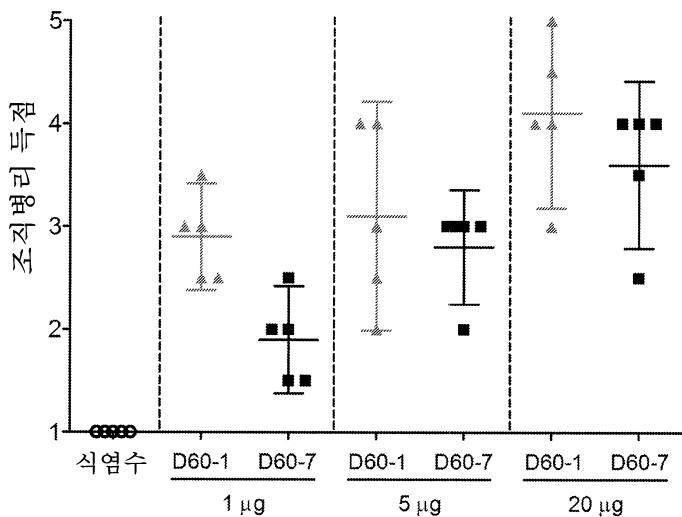
도면3a



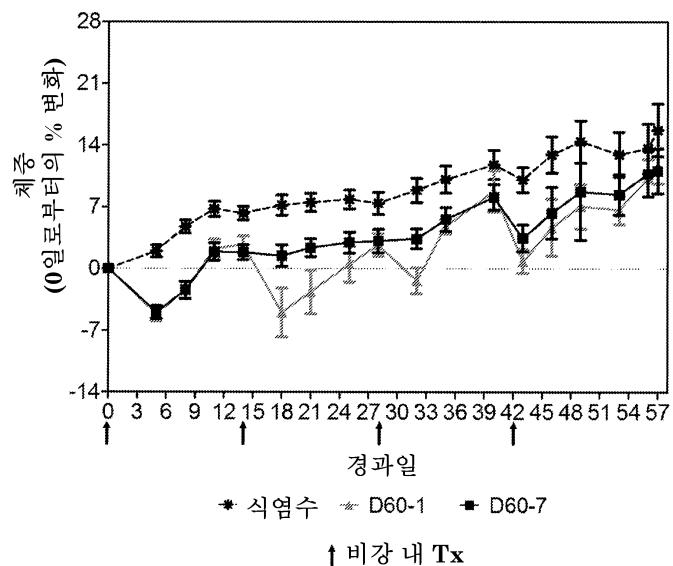
도면3b



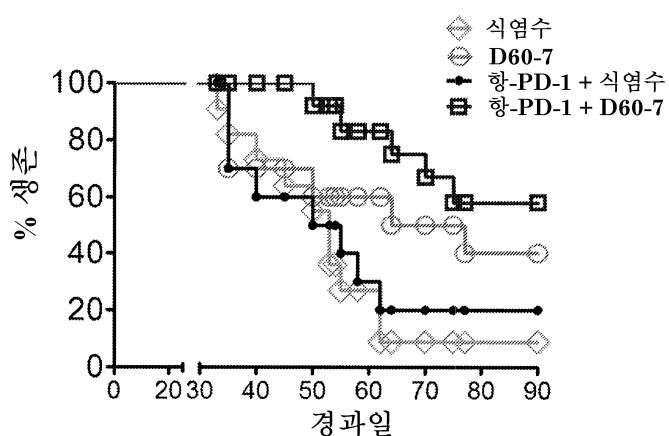
도면4



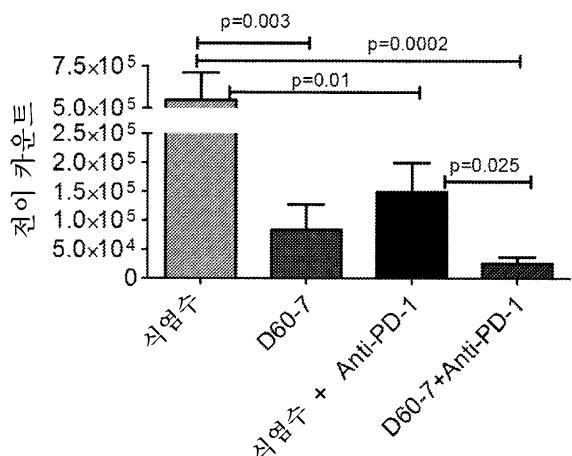
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> DYNAVAX TECHNOLOGIES CORPORATION

<120> INTRAPULMONARY ADMINISTRATION OF POLYNUCLEOTIDE TOLL-LIKE RECEPTOR 9 AGONISTS FOR TREATING CANCER OF THE LUNG

<130> 377882006040

<140> PCT/US2016/033817

<141> 2016-05-23

<150> US 62/276,767

<151> 2016-01-08

<150> US 62/169,309

<151> 2015-06-01

<150> US 62/169,321

<151> 2015-06-01

<150> US 62/168,449

<151> 2015-05-29

<150> US 62/168,470

<151> 2015-05-29

<160> 9

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

tcgaacgttc gaacgttcga acgttcgaat 30

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> misc_feature

<222> 22, 23

<223> n = A, C or T and up to 2 of them can be present or absent

<400> 2

tcgtaacgtt cgaacgttcg ann 23

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

tcgtaacgtt cgaacgttcg aacgtta 27

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 4

tcgtaacgtt cgaacgttcg aacgtt 26

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 5

tcgtaacgtt cgaacgttcg aacgt 25

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

tcgtaacgtt cgaacgttcg aacg 24

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 7

tcgtaacgtt cgaacgttcg aac 23

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

tcgtaacgtt cgaacgttcg aa 22

<210> 9

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

tcgtaacgtt cgaacgttcg a 21