



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0093012
(43) 공개일자 2016년08월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) **A61F 7/00** (2006.01)
A61K 35/15 (2014.01) **A61K 38/20** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01)
A61N 5/10 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)

- (52) CPC특허분류
A61K 39/3955 (2013.01)
A61F 7/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7014867

(22) 출원일자(국제) 2014년11월05일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2016년06월03일

(86) 국제출원번호 PCT/US2014/064133

(87) 국제공개번호 WO 2015/069770
국제공개일자 2015년05월14일

(30) 우선권주장
61/900,355 2013년11월05일 미국(US)
61/900,309 2013년11월05일 미국(US)

(71) 출원인
코그네이트 바이오서비스, 인코포레이티드
미국 메릴랜드주 21076 하노버 코넬리 드라이브
7513
레브이뮨, 인코포레이티드

미국 메릴랜드주 21076 하노버 코넬리 드라이브
7513
(뒷면에 계속)

(72) 발명자
보쉬 마르ニ스 레오
미국 워싱턴주 98004 클라이드 힐 90쓰 애비뉴 엔
이 1735
간제이 제임스 켈리
미국 메릴랜드주 20814 베세즈다 스위트 800 몽고
메리 레인 4800
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
장훈

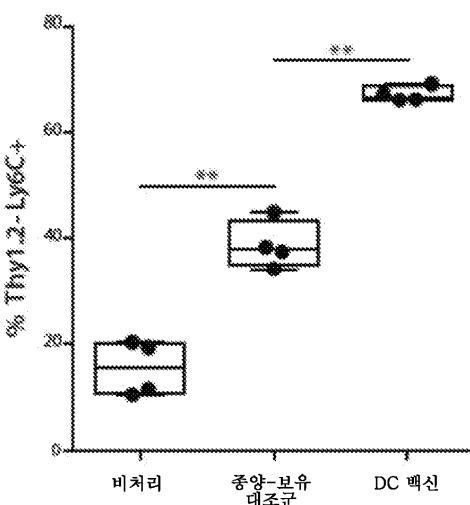
전체 청구항 수 : 총 47 항

(54) 발명의 명칭 암 치료를 위한 체크포인트 억제제 및 치료제의 배합물

(57) 요약

본 발명은 하나 이상의 사이클 및/또는 용량의 체크포인트 억제제 및 치료제를 어느 순서든 순차적으로 또는 실질적으로 동시에 포함하는 병용 치료 요법이 몇몇 피험자에서 암을 치료하는데 더욱 효과적일 수 있고/있거나 면역 세포의 활성 및/또는 수 또는 종양에 의한 의학적으로 유리한 반응을 개시하거나 가능하게 하거나 증가시키거나 향상시키거나 연장시킬 수 있다는 중대한 인식으로부터 적어도 부분적으로 비롯된다.

대 표 도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A61K 35/15 (2013.01)
A61K 38/20 (2013.01)
A61K 38/2046 (2013.01)
A61K 38/2086 (2013.01)
A61K 39/0011 (2013.01)
A61K 39/39 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
A61N 5/10 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)

(71) 출원인

더 리전트 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아
미합중국 캘리포니아 94607-5200 오클랜드 프랭클린 스트리트 1111
노쓰웨스트 바이오씨라퓨틱스, 임크.
미국 메릴랜드주 20814 베데스다 스위트 800 몽고메리 레인 4800

(72) 발명자

파워스 린다 애프.
미국 메릴랜드주 20814 베세즈다 스위트 800 몽고메리 레인 4800
리아우 린다 엠.
미국 캘리포니아주 90077 로스앤젤레스 윈드트리 드라이브 10418
프린스 로버트 엠.
미국 캘리포니아주 90272 퍼시픽 팰리세이드 해버포드 애비뉴 715

명세서

청구범위

청구항 1

암의 치료 또는 항종양 반응의 개시, 향상 또는 연장을 필요로 하는 피험자에게 치료제를 체크포인트 억제제와 함께 투여함을 포함하는, 상기 피험자에서 암을 치료하거나 항종양 반응을 개시, 향상 또는 연장하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 생물학적 치료제 또는 소분자인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 단클론 항체, 사람화된 항체, 전장 사람 항체 및 융합 단백질 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR 및 B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 체크포인트 단백질을 억제하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR 및 B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 체크포인트 단백질의 리간드와 상호작용하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 치료제가 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체 및 백신 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인터류킨이 IL-7 또는 IL-15인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 인터류킨이 글리코실화된 IL-7인, 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 백신이 수지상 세포 백신인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제 및 상기 치료제가 동시에 또는 어느 순서든 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 치료제가 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여되는, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 치료제가 백신이고 상기 체크포인트 억제제가 PD-1 억제제인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 백신이 수지상 세포 백신인, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 처리가 임상적 결과; T 세포에 의한 항종양 활성의 증가, 향상 또는 연장; 치료 전의 수와 비교하여 항종양 T 세포 또는 활성화된 T 세포의 수의 증가 또는 이들의 조합에 의해 결정되는, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 임상적 결과가 종양 퇴행; 종양 수축; 종양 괴사; 면역계에 의한 항종양 반응; 종양 확대, 재발 또는 확산 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 처리 효과가 T 세포의 존재, 또는 T 세포 염증을 표시하는 유전자 서명(gene signature)의 존재, 또는 이들의 조합에 의해 예측되는, 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 피험자가 암을 갖는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 암이 비뇨생식기암, 부인과암, 폐암, 위장암, 두경부암, 악성 교모세포종, 악성 중피종, 비-전이성 또는 전이성 유방암, 악성 흑색종, 메르켈 세포 암종 또는 골 및 연조직 육종, 혈액 신생물, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군 및 급성 림프모구 백혈병, 비-소(小)세포 폐암(NSCLC), 유방암, 전이성 결장직장암, 호르몬 민감성 또는 호르몬 무반응성 전립선암, 결장직장암, 난소암, 간세포암, 신장 세포암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포암, 담관세포암, 두경부 편평세포암 연조직 육종 및 소(小)세포 폐암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 병용 요법으로의 처리 전, 처리와 동시에 또는 처리 후 피험자에게 화학요법제, 표적화된 요법 또는 방사선을 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

체크포인트 억제제의 효과를 향상시키거나 연장하거나, 피험자가 체크포인트 억제제에 반응하게 하거나, 체크포인트 억제제의 독성을 감소시키는 방법으로서, 치료제를 체크포인트 억제제와 함께 이를 필요로 하는 피험자에게 투여함을 포함하고, 상기 피험자는 암을 갖는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 생물학적 치료제 또는 소분자인, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 단클론 항체, 사람화된 항체, 전장 사람 항체 및 융합 단백질 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR 및 B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 체크포인트 단백질을 억제하는, 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3,

GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR 및 B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 체크포인트 단백질의 리간드와 상호작용하는, 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 치료제가 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체 및 백신 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 인터류킨이 IL-7 또는 IL-15인, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 인터류킨이 글리코실화된 IL-7인, 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 백신이 수지상 세포 백신인, 방법.

청구항 29

제20항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제 및 상기 생물학적 치료제가 동시에 또는 어느 순서든 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 치료제가 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여되는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 치료제가 백신이고 상기 체크포인트 억제제가 PD-1 억제제인, 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 백신이 수지상 세포 백신인, 방법.

청구항 33

제20항에 있어서, 상기 암이 비뇨생식기암, 부인과암, 폐암, 위장암, 두경부암, 악성 교모세포종, 악성 중피종, 비-전이성 또는 전이성 유방암, 악성 흑색종, 메르켈 세포 암종 또는 골 및 연조직 육종, 혈액 신생물, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군 및 급성 림프모구 백혈병, 비-소 세포 폐암(NSCLC), 유방암, 전이성 결장직장암, 호르몬 민감성 또는 호르몬 무반응성 전립선암, 결장직장암, 난소암, 간세포암, 신장 세포암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포암, 담관세포암, 두경부 편평세포암 연조직 육종 및 소세포 폐암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 34

제20항에 있어서, 병용 요법으로의 처리 전, 처리와 동시에 또는 처리 후 피험자에게 화학요법제, 표적화된 요법 또는 방사선을 투여함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 35

체크포인트 억제제를 생물학적 치료제와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 생물학적 치료제가 백신인, 조성물.

청구항 37

수지상 세포 백신 및 PD-1 억제제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 38

입양(adoptive) T 세포 요법 및 체크포인트 억제제를 포함하는, 암 치료용 병용 요법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 입양 T 세포 요법이 자가 T-세포를 포함하는, 병용 요법.

청구항 40

제39항에 있어서, 상기 자가 T-세포가 종양 항원에 대해 표적화된, 병용 요법.

청구항 41

제38항에 있어서, 상기 입양 T 세포 요법이 동종이형 T-세포를 포함하는, 병용 요법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 자가 T-세포가 종양 항원에 대해 표적화된, 병용 요법.

청구항 43

제38항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 PD-1 또는 PDL-1 체크포인트 억제제인, 병용 요법.

청구항 44

입양 T 세포 요법 및 체크포인트 억제제를 피험자에게 투여함을 포함하는, 항종양 또는 항암 면역 반응을 향상시키는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 입양 T 세포 요법이 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여되는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 입양 T 세포 요법이 체크포인트 억제제의 투여 1일 내지 30일 전에 투여되는, 방법.

청구항 47

제44항에 있어서, 상기 항종양 반응이 종양 성장 억제; 종양 세포사 유도; 종양 퇴행; 종양의 재발, 성장, 또는 확산의 예방 또는 지연; 및 종양 제거로부터 선택되는, 방법.

발명의 설명**기술 분야****[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조**

본원은 35 USC § 119(e) 하에 2013년 11월 5일자로 출원된 미국 출원 제61/900,309호 및 2013년 11월 5일자로 제출된 미국 출원 제61/900,355호에 대한 우선권의 이익을 주장한다. 선행 출원의 개시내용은 본원의 개시내용의 일부로 여겨지며 이의 전문이 본원의 개시내용에 참조로 포함되어 있다.

[0003] 본 발명의 분야

본 발명은 일반적으로 암을 치료하는 방법, 더 구체적으로는 체크포인트 억제제 및 치료제의 배합물을 사용하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 점점 더 증가하는 증거에 의하면 신체의 면역 반응을 앞지르는 능력이 종양 발생의 특징임을 시사한다. 이와 같이, 연구자들은 본질적으로 면역계를 치료함으로써 암을 직접적으로 치료하는, 표적화된 제제에 의해 면역 반

응을 복귀시키는 방법을 검토하기 시작했다. 상기와 같이 실행하기 위한 특히 촉망되는 한 가지 전략은 면역계의 T 세포에 오프-스위치(off-switch)로서 작용하는, 소위 면역 체크포인트를 표적화하는 것이다.

[0006] 존재하는 면역 반응을 '차단해제'하거나 면역 반응의 개시를 차단해제하는 체크포인트 억제제 요법은 하위그룹의 피험자에서 암을 치료하는데 매우 효과적이다. 그러나, 하위그룹의 피험자는 암 피험자 집단 중 단지 대략 25%를 구성하는 비교적 소 집단(즉, "반응 피험자 집단")이다. 따라서, 체크포인트 억제제가 반응 피험자 집단에서 암을 치료하는데 대단히 효과적일지라도, 대략 75%의 암 피험자는 요법에 반응하지 않을 것이다. 또한, 심지어 반응 집단에서도 반응은 항상 완전하거나 최적이지 않다.

[0007] 다수의 면역 체크포인트가 특이적 수용체 및 리간드 쌍 사이의 상호작용에 의해 조절되기 때문에, 단클론 항체 또는 다른 제제는 이러한 상호작용을 차단하고 면역억제를 방지하는데 사용될 수 있다. 최근에 가장 많은 주목을 받는 2개의 체크포인트 수용체는 CTLA-4 및 PD-1이다.

[0008] CTLA-4, PD-1 및 이의 리간드는 T-세포 기능 및 다른 세포 기능의 모든 단계들에 걸쳐 중요한 역할을 하는 공동-신호전달 분자의 CD28-B7 패밀리의 일원이다. PD-1 수용체는 활성화된 T 세포(및 B 세포)의 표면에서 발현되며, 정상 상황 하에, 항원-제시 세포, 예를 들면, 수지상 세포 또는 대식세포의 표면에서 발현되는 이의 리간드(PD-L1 및 PD-L2)에 결합한다. 이러한 상호작용은 신호를 T 세포로 전달하고 본질적으로 T 세포를 스위치 오프(switch off)하거나 억제한다. 암세포는 이의 표면에서 PD-L1의 발현을 높은 수준으로 유도함으로써 이러한 시스템을 이용한다. 이는 암세포가 PD-1 경로의 통제권을 쥐게 하여 종양 미세환경으로 도입될 수 있는 PD-1을 발현시키는 T 세포를 스위치 오프시키며, 이에 따라 항암 면역 반응을 억제시킨다.

[0009] 퍼스트-인-클래스(first-in-class) 면역요법, 이필리무맙(여보이(Yervoy)), T 세포의 표면상에 세포독성 T-림프구-관련된 항원 4(CTLA-4)를 표적화하는 단클론 항체는 흑색종의 치료에 승인되었다. 현재, 예정된 사멸-1(PD-1) T-세포 수용체 또는 이의 리간드(PD-L1 또는 PD-L2)를 겨냥하는 새로운 표적화 면역요법이 이필리무맙보다 더 효과적이며 심지어 더 안전한 것으로 입증될 수 있다. 추가의 체크포인트 표적이 또한 예를 들면, TIM-3, LAG-3, 다양한 B-7 리간드, CHK 1 및 CHK2 키나제, BTLA, A2aR 등에 효과적인 것으로 입증될 수 있다.

[0010] 현재, 적어도 7개의 체크포인트 억제제 제제가 임상시험중이다. 전장 사람 및 사람화된 단클론 항-PD-1 항체, 뿐만 아니라 전장 사람 항-PD-L1 항체, 및 PD-L2의 세포외 도메인 및 IgG1을 조합한 융합 단백질이 이들 중에 대표적이다. 각각의 이들 제제는 PD-1 및 이의 리간드 사이의 상호작용을 차단하여 T-세포(또는 다른 세포) 온/오프 스위치를 "온" 위치로 유지시키도록 디자인되지만, 이들 각각은 약간 상이한 작용 기전을 갖는다.

[0011] 암의 치료를 위한 또 다른 전략은 체크포인트 억제제를 치료제와 배합하는 것이다. 항체 및 백신을 포함하는, 생물학적 치료제는 암의 치료에 효과적인 것으로 입증되었다. 체크포인트 억제제 및 치료제(예를 들면, 생물제제)의 병용은 피험자에서 항종양 반응을 향상시키거나 연장시킬 수 있다. 추가로, 체크포인트 억제제와 함께 생물학적 치료제의 투여는 상기 체크포인트 억제제의 효과를 향상 또는 연장시키거나, 피험자가 체크포인트 억제제에 반응하게 하거나, 체크포인트 억제제의 독성 또는 용량을 감소시킬 수 있다.

[0012] 따라서, 비반응 피험자 집단 및 반응 피험자 집단 모두에서 체크포인트 억제제의 유효성을 개시시키거나 향상시키기 위한 방법 및 병용 요법을 개발하는 것이 필요하다. 본 발명은 이후 체크포인트 억제제에 대한 피험자 또는 종양 반응을 가능하게 하거나 향상시키거나 개선시키기 위한 항종양 면역 반응을 개시시키거나 가능하게 하거나 향상시키거나 개선시키는 방법 및 병용 요법을 개시한다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 하나 이상의 사이를 및/또는 용량의 체크포인트 억제제 및 치료제를 어느 순서든 순차적으로 또는 실질적으로 동시에 포함하는 병용 치료 요법이 몇몇 피험자에서 암을 치료하는데 더욱 효과적일 수 있고/있거나 면역 세포의 활성 및/또는 수 또는 종양에 의한 의학적으로 유리한 반응을 개시하거나 가능하게 하거나 증가시키거나 향상시키거나 연장시킬 수 있다는 중대한 인식으로부터 적어도 부분적으로 비롯된다.

[0014] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 피험자에게 치료제를 체크포인트 억제제와 함께 투여함을 포함하여, 암의 치료 또는 항종양 반응의 개시, 향상 또는 연장을 필요로 하는 피험자에서 암을 치료하거나 항종양 반응을 개시, 향상 또는 연장시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 생물학적 치료제 또는 소분자이다. 또 다른 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 단클론 항체, 사람화된 항체, 전장 사람 항체, 융합 단백질 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드

또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질을 억제한다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질의 리간드와 상호 작용한다. 한 측면에서, 치료제는 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체, 백신 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 인터류킨은 IL-7 또는 IL-15이다. 구체적인 측면에서, 상기 인터류킨은 글리코실화된 IL-7이다. 추가의 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포(DC) 백신이다.

[0015] 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제 및 상기 치료제는 동시에 또는 어느 순서든 순차적으로 투여된다. 추가의 측면에서, 상기 치료제는 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료제는 백신이고 상기 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제이다. 추가의 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포 백신이다.

[0016] 한 측면에서, 치료는 임상적 결과; T 세포에 의한 항종양 활성의 증가, 향상 또는 연장; 치료 전의 수치와 비교하여 항종양 T 세포 또는 활성화된 T 세포의 수치의 증가 또는 이들의 조합에 의해 결정된다. 또 다른 측면에서, 임상적 결과는 종양 퇴행; 종양 수축; 종양 괴사; 면역계에 의한 항종양 반응; 종양 확대, 재발 또는 확산 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 치료 효과는 T 세포의 존재, T 세포 염증을 표시하는 유전자 서명(gene signature)의 존재 또는 이들의 조합에 의해 예측된다.

[0017] 또 다른 측면에서, 상기 피험자는 암을 갖는다. 추가의 측면에서, 상기 암은 비뇨생식기암(예를 들면, 전립선 암, 신장 세포암, 방광암), 부인과암(예를 들면, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암), 폐암, 위장암(예를 들면, 비-전이성 또는 전이성 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포암, 담관세포암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포 암), 악성 교모세포종, 악성 중피종, 비-전이성 또는 전이성 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 악성 흑색종, 메르켈 세포 암종 또는 골 및 연조직 육종 및 혈액 신생물, 예를 들면, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군 및 급성 림프모구 백혈병을 포함하는, 임의의 고형 종양 또는 액상 암(liquid cancer)이다. 바람직한 양태에서, 상기 질환은 비-소(小)세포 폐암(NSCLC), 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포 암), 전이성 결장직장암, 호르몬 민감성 또는 호르몬 무반응성 전립선암, 결장직장암, 난소암, 간세포암, 신장 세포암, 연조직 육종 또는 소(小)세포 폐암이다.

[0018] 추가의 측면에서, 상기 방법은 병용 요법으로의 치료 전, 치료와 동시에 또는 치료 후 피험자에게 화학요법제, 표적화된 요법 또는 방사선을 투여함을 추가로 포함한다. 추가의 측면에서, 상기 종양은 치료제 및 체크포인트 억제제의 투여 전에 절제될 수 있다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 체크포인트 억제제의 효과를 향상 또는 연장시키거나, 피험자가 체크포인트 억제제에 반응하게 하거나, 체크포인트 억제제의 독성 또는 용량을 감소시키는 방법으로서, 치료제를 체크포인트 억제제와 함께 이를 필요로 하는 피험자에게 투여함을 포함하고, 상기 피험자는 암을 갖는, 방법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 생물학적 치료제 또는 소분자이다. 또 다른 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 단클론 항체, 사람화된 항체, 전장 사람 항체, 융합 단백질 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질을 억제한다. 한 측면에서, 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질의 리간드와 상호 작용한다. 추가의 측면에서, 상기 치료제는 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체 및 백신 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 인터류킨은 IL-7 또는 IL-15이다. 구체적인 측면에서, 상기 인터류킨은 글리코실화된 IL-7이다. 한 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포(DC) 백신이다.

[0020] 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제 및 상기 치료제는 동시에 또는 어느 순서든 순차적으로 투여된다. 추가의 측면에서, 상기 치료제는 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료제는 백신이고 상기 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제이다. 추가의 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포 백신이다.

[0021] 또 다른 측면에서, 상기 암은 비뇨생식기암(예를 들면, 전립선암, 신장 세포암, 방광암), 부인과암(예를 들면, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암), 폐암, 위장암(예를 들면, 비-전이성 또는 전이성 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포암, 담관세포암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포 암), 악성 교모세포종, 악성 중피종, 비

-전이성 또는 전이성 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 악성 흑색종, 메르켈 세포 암종 또는 골 및 연조직 육종 및 혈액 신생물, 예를 들면, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수 이형성 증후군 및 급성 림프모구 백혈병을 포함하는, 임의의 고형 종양 또는 액상 암이다. 바람직한 양태에서, 상기 질환은 비-소세포 폐암(NSCLC), 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포 암), 전이성 결장직장암, 호르몬 민감성 또는 호르몬 무반응성 전립선암, 결장직장암, 난소암, 간세포암, 신장 세포암, 연조직 육종 또는 소세포 폐암이다.

[0022] 추가의 측면에서, 상기 방법은 병용 요법으로의 치료 전, 치료와 동시에 또는 치료 후 피험자에게 화학요법제, 표적화된 요법 또는 방사선을 투여함을 추가로 포함한다. 추가의 측면에서, 상기 종양은 치료제 및 체크포인트 억제제의 투여 전 절제될 수 있다.

[0023] 추가의 양태에서, 본 발명은 체크포인트 억제제를 치료제와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 상기 치료제는 생물 제제이고 생물학적 치료제는 백신이다.

[0024] 한 양태에서, 본원은 입양(adoptive) T 세포 요법 및 체크포인트 억제제를 포함하는, 암 치료용 병용 요법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 입양 T 세포 요법은 자가 및/또는 동종이형 T-세포를 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 자가 및/또는 동종이형 T-세포는 종양 항원에 대해 표적화된다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-1 또는 PDL-1 체크포인트 억제제이다.

[0025] 추가의 양태에서, 본 발명은 피험자에게 입양 T 세포 요법 및 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 항종양 또는 항암 면역 반응을 향상시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 추가의 측면에서, 상기 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 1 내지 30일 전에 투여된다. 추가의 측면에서, 상기 항종양 반응은 종양 성장의 억제; 종양 세포사의 유도; 종양 퇴행; 종양의 재발, 성장, 또는 확산의 예방 또는 지연; 또는 종양 제거이다.

[0026] 한 양태에서, 본 발명은 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제를 포함하는, 암 치료용 병용 요법을 위한 방법을 제공한다. 일 측면에서, 상기 치료적 암 백신은 수지상 세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신은 수지상 세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 수지상 세포 백신은 자가 수지상 세포 및/또는 동종이형 수지상 세포로 구성된다. 구체적인 측면에서 상기 자가 또는 동종이형 수지상 세포는 피험자로의 투여 전 암 항원과 결합된다. 구체적인 측면에서, 상기 자가 또는 동종이형 수지상 세포는 종양으로의 직접적인 투여를 통해 암 항원과 결합된다. 구체적인 측면에서, 상기 입양 T 세포 요법은 자가 및/또는 동종이형 T-세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 자가 및/또는 동종이형 T-세포는 종양 항원에 대해 표적화된다. 구체적인 양태에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-1, PDL-1 또는 CTLA-4 체크포인트 억제제이다.

[0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 피험자에게 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 항종양 면역 반응을 개시, 지속 또는 향상시키는 방법을 제공한다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 양태에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 1 내지 30일 전 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 항종양 반응은 종양 특이적 반응, 임상적 반응, 종양 크기의 감소, 종양 특이적 바이오마커의 감소, 사량체 염색의 증가, 항종양 사이토카인의 증가 또는 이들의 조합이다. 구체적인 측면에서, 상기 임상적 반응은 종양 성장의 감소 및/또는 종양 크기의 감소이다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 암세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 입양 T 세포 요법은 자가 및/또는 동종이형 T-세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신은 수지상 세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 수지상 세포 백신은 자가 수지상 세포 및/또는 동종이형 수지상 세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4 체크포인트 억제제이다. 구체적인 측면에서, 항종양 면역 반응의 개시, 지속 또는 향상은 암의 치료를 위한 것이다.

[0028] 추가의 양태에서, 본 발명은 피험자에게 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 효능을 향상시키거나, 피험자가 체크포인트 억제제에 반응하게 하는 방법을 제공한다. 구체적인 측면에서, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 피험자가 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 체크포인트 억제제의 투여에 반응한다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 TH1 T-세포를 활성화시킨다. 구체적인 측면에서, 상기 입양 T 세포 요법은 자가 및/또는 동종이형 T-세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 자가 및/또는 동종이형 T-세포는 종양 항원에 대해

표적화된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신은 암세포 백신 또는 수지상 세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 수지상 세포 백신은 자가 수지상 세포 및/또는 동종이형 수지상 세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4 체크포인트 억제제이다. 구체적인 측면에서, 상기 효능의 향상은 암의 치료를 위한 것이다. 구체적인 측면에서, 상기 피험자는 암을 갖는다.

[0029] 한 양태에서, 본 발명은 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 구체적인 양태에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 1 내지 30일 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 피험자는 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 체크포인트 억제제의 투여에 반응한다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 TH1 T-세포를 활성화시킨다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 암세포 백신 또는 수지상 세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 암세포 백신은 자가 및/또는 동종이형 T-세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 자가 및/또는 동종이형 T-세포는 종양 항원에 대해 표적화된다. 구체적인 측면에서, 상기 수지상 세포 백신은 자가 및/또는 동종이형 수지상 세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4 체크포인트 억제제이다.

[0030] 한 양태에서, 본 발명은 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 종양 성장의 억제, 종양 세포사의 유도, 종양 퇴행 또는 종양 제거를 위한 방법을 제공한다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 상기 체크포인트 억제제의 투여 1 내지 30일 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%의 피험자는 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 체크포인트 억제제의 투여에 반응한다. 구체적인 측면에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 TH1 T-세포를 활성화시킨다. 구체적인 양태에서, 상기 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 암세포 백신 또는 수지상 세포 백신이다. 구체적인 측면에서, 상기 암세포 백신은 자가 및/또는 동종이형 T-세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 자가 및/또는 동종이형 T-세포는 종양 항원에 대해 표적화된다. 구체적인 측면에서, 상기 수지상 세포 백신은 자가 및/또는 동종이형 수지상 세포를 포함한다. 구체적인 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 PD-1, PDL-1 및/또는 CTLA-4 체크포인트 억제제이다.

[0031] 추가의 양태에서, 본 발명은 피험자에게 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 본원에 기재된 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 종양 재발, 종양 성장 또는 종양 확산을 예방하거나 지연시키는 방법을 제공한다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 피험자에게 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 본원에 기재된 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 독성을 감소시키거나 저용량의 체크포인트 억제제로 치료 효과를 얻게 할 수 있는 방법을 제공한다.

[0033] 추가의 양태에서, 본 발명은 자가 또는 동종이형(예를 들면, 세포주 유래) 종양 항원이 결합된 자가 또는 동종이형 수지상 세포 또는 자가 또는 동종이형 T 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시시키거나 이를 가능하게 한 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0034] 한 양태에서, 본 발명은 자가 또는 동종이형 (예를 들면, 세포주 유래) 종양 항원이 결합된 자가 또는 동종이형 수지상 세포 또는 자가 또는 동종이형 T 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0035] 또 다른 양태에서, 본 발명은 생체내 항원 결합을 위해 종양으로 직접적으로 투여되거나 종양 주위에 투여된 자가 또는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시시키거나 가능하게 한 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

[0036] 추가의 양태에서, 본 발명은 생체내 항원 결합을 위해 종양으로 직접적으로 투여되거나 종양 주위에 투여된 자가 또는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.

- [0037] 한 양태에서, 본 발명은 자가 종양 항원이 결합된 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0038] 추가의 양태에서, 본 발명은 자가 종양 항원이 결합된 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 생체내 항원 결합을 위해 종양으로 직접적으로 투여되거나 종양 주위에 투여된 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0040] 추가의 양태에서, 본 발명은 생체내 항원 결합을 위해 종양으로 직접적으로 투여되거나 종양 주위에 투여된 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0041] 한 양태에서, 본 발명은 생체 외(ex vivo)에서 확장되고/되거나 활성화된 자가 항종양 T 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 생체 외에서 확장되고/되거나 활성화된 항종양 T 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시킨 후 본원에 기재된 하나 이상의 체크포인트 억제제를 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 투여 전에 면역 반응을 유도하는 방법을 제공한다.
- [0043] 추가의 양태에서, 본 발명은 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제를 사용하여 종양 반응을 유도하거나 향상시키는 방법을 제공한다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응은 유발된 세포 예정사(programmed cell death)이다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응은 종양 세포 수의 감소이다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응은 종양 성장 속도의 감소이다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응은 키나제 경로의 차단이다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응은 TH1 세포의 활성화이다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응은 활성화된 T-세포 반응이다. 구체적인 양태에서, 상기 종양 반응의 품질은 TH1 대 TH2 반응의 비율에 의해 측정될 수 있으며, 여기서 높은 TH1 반응은 고 품질 반응을 표시한다.
- [0044] 추가의 양태에서, 본원에 기재된 체크포인트 억제제는 하나 이상의 개별적인 체크포인트 억제제를 포함할 수 있다. 게다가, 본원에 기재된 (a) 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법 및 (b) 체크포인트 억제제의 투여는 피험자 또는 환자에게 투여되는 체크포인트 억제제의 유효성을 감소시킬 수 있다. 추가로, 상기 체크포인트 억제제의 감소된 양은 상기 체크포인트 억제제의 독성을 감소시키며 상기 체크포인트 억제제에 대한 피험자의 내성을 증가시킬 수 있다.
- ### 도면의 간단한 설명
- [0045] 도 1a 내지 1c는 DC 백신이 확립된 신경아교종에서 치료적 이점 없이 활성화된 림프구 침윤을 촉진시킴을 보여준다. (A) DC 백신은 대조군에 비해 림프구(CD3+)의 유의미한 종양 침윤을 촉진시켰다. (B) 상당 부분의 이들 세포는 활성화된 림프구(CD3+ CD8+ CD25+)였다. (C) DC 백신과 대조 그룹 사이의 생존 이익(survival benefit)은 관찰되지 않았다.
- 도 2a 및 2b는 DC 백신 후 종양 미세환경에서 억제성 골수 세포의 축적이 증가되었음을 보여준다. (A) 종양-보유 대조군은 종양-침윤 골수 세포(Thy1.2- Ly6C+)의 증가를 보여주었다. 이러한 집단은 DC 백신으로 처리된 마우스에서 유의미하게 더 커졌다. (B) 상당한 비율의 이들 골수 세포는 PD-L1(Thy1.2- Ly6C+ PD-L1+)을 발현시켰다.
- 도 3a 내지 3g는 PD-1의 차단이 억제성 골수 세포의 축적을 방지하고 치료적 이점을 가지면서 활성화된 림프구 침윤을 촉진시킴을 보여준다. (A) DC 백신화된 마우스 및 보조 항-PD-1 Ab로 처리된 DC 백신 마우스(DC 백신/항-PD-1 Ab) 사이에는 림프절에서 CD8+ 집단의 차이가 없었다. (B) 최소 집단의 활성화된 CD8+ CD25+ T 세포가 각각의 처리 그룹의 림프절에서 발견되었으며 통계상 두드러지지 않았다. (C, D) 억제성 골수 집단은 단지 DC 백신화된 그룹과 비교할 때 DC 백신/항-PD-1 처리된 마우스에서 유의미하게 감소되었다. (E) DC 백신화 단독과 비교하여 DC 백신/항-PD-1 처리된 마우스에서 활성화된 세포독성 종양-침윤 림프구 집단은 유사했다. (F) 조합 DC 백신/항-PD-1 처리는 유의미한 생존 이익을 나타내었다. (G) (F)로부터의 생존 DC 백신/항-PD-1 처리된 마

우스를 추가 처리 없이 75일째에 GL261 뮤린(murine) 신경아교종의 반대쪽 두개내 이식으로 재투여하였다. 대조군 마우스와 비교하여 유의미한 생존 이익이 관찰되었다.

도 4a 및 4b는 종양 용해물-펄싱된(pulsed) 수지상 세포가 PD-L1의 발현을 하향-조절함을 보여준다. (A) 용해물 펄싱(pulsing)전 및 용해물 펄싱후 PD-L1 발현의 변화를 도시하는 대표적인 히스토그램. (B) 종양 용해물로 24시간 펄싱한 후 PD-L1 발현에 대해 분석된 수지상 세포. PD-L1 발현의 중앙 형광 강도(MFI)를 그래프로 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046]

본 발명은 하나 이상의 사이클 및/또는 용량의 체크포인트 억제제 및 치료제를 어느 순서든 순차적으로 또는 실질적으로 동시에 포함하는 병용 치료 요법이 몇몇 피험자에서 암을 치료하는데 더 효과적일 수 있고/있거나 면역 세포의 활성 및/또는 수 또는 종양에 의한 의학적으로 유리한 반응을 개시하거나 가능하게 하거나 증가시키거나, 향상시키거나 연장시킬 수 있다는 중대한 인식으로부터 적어도 부분적으로 비롯된다.

[0047]

본 조성물 및 방법을 기재하기 전에, 본 발명은, 기재된 특정 조성물, 방법 및 조건이 변화될 수 있기 때문에, 기재된 특정 조성물, 방법 및 실험 조건에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는, 본 발명의 범위가 첨부된 청구범위로만 제한될 것이기 때문에, 특정 양태만을 기재하기 위한 것이며 제한하고자 하는 것이 아님을 이해해야 한다.

[0048]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 이하 기재된다.

[0049]

본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수형("a", "an" 및 "the")은 달리 문맥상 명확히 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들면, "방법"에 대한 언급은 본 개시내용 등을 판독할 때 당업자에게 분명할 하나 이상의 방법 및/또는 본원에 기재된 유형의 단계를 포함한다.

[0050]

본원에 사용된 용어 "치료제(therapeutic)" 또는 "치료제(therapeutic agent)"는 피험자에게 치료적 반응을 야기하는 임의의 의료 물품을 나타낸다.

[0051]

본원에 사용된 용어 "생물학적 치료제" 또는 "생물약제(biopharmaceutical)"는 생물학적 공급원으로 제조되거나 생물학적 공급원으로부터 추출된 임의의 의료 물품을 나타낸다. 생물약제는 화학적으로 합성된 의약품(pharmaceutical product)과는 다르다. 생물약제의 예는 백신, 혈액 또는 혈액 성분, 알레르게닉스(allergenics), 체세포, 유전자 요법, 조직, 항체 치료제 및 융합 단백질을 포함하는 재조합 치료 단백질, 및 생세포를 포함한다. 생물제제는 당, 단백질 또는 핵산 또는 이를 물질들의 복합적 조합으로 이루어질 수거나 살아있는 개체, 예를 들면, 세포 및 조직일 수 있다. 생물제제는 다양한 천연 공급원 - 사람, 동물 또는 미생물로부터 단리되고 생명공학 방법 및 다른 기술에 의해 생산될 수 있다. 생물학적 치료제의 구체적인 예는 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체, 융합 단백질 및 백신, 예를 들면, 암 백신을 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다.

[0052]

본원에 사용된 용어 "항체"는 면역글로불린 또는 이의 일부를 나타내고, 공급원, 기원 종, 제조 방법 및 특징과 무관한 항원-결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩타이드를 포함한다. 항체는 중쇄 및/또는 경쇄 또는 이의 단편으로 이루어질 수 있다. 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 변이체 또는 유도체는 다클론, 단클론, 다중특이적, 사람, 사람화된, 영장류화된(primatized) 또는 키메라 항체, 단일쇄 항체, 에피토프-결합 단편, 예를 들면, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fd, Fvs, 단일쇄 Fvs(scFv), 단일쇄 항체, 디설파이드-결합된 Fvs(sdfV), VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편 및 항-이디오타입(항-Id) 항체를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다. ScFv 분자는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면, 미국 특허 제5,892,019호에 기재되어 있다. 본 발명의 면역글로불린 또는 항체 분자는 면역글로불린 분자의 임의의 유형(예를 들면, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 아부류일 수 있다.

[0053]

세포 표면 수용체는 항체 요법에 통상적인 표적이며 표피 성장 인자 수용체 및 HER2를 포함한다. 항체는, 암 항원에 결합되면, 항체-의존적 세포-매개된 세포독성을 유도하거나 보체계(complement system)를 활성화시키거나 수용체가 이의 리간드와 상호작용하는 것을 방지하거나 화학요법 또는 방사선의 페이로드(payload)를 전달할 수 있으며, 이들 모두 세포사를 초래할 수 있다. 치료제로서 승인된 항체는 리툭신(리툭시맙); 제나팍스(다클

리주맙); 시뮬렉트(바실릭시맙); 시나기스(팔리비주맙); 레미케이드(인플릭시맙); 헤셉틴(트라스투주맙); 마일로타르그(憬투주맙 오조가미신); 캠판스(알렘투주맙); 제발린(이브리투모맙 티옥세탄); 휴미라(아달리무맙); 졸레어(오말리주맙); 벡사르(토시투모맙-I-131); 랍티바(에팔리주맙); 어비툭스(세툭시맙); 아바스틴(베바시주맙); 타이사브리(나탈리주맙); 악템라(토실리주맙); 벡티비스(파니투무맙); 루센티스(라니비주맙); 솔리리스(에콜리주맙); 심지아(세르톨리주맙 폐골); 심포니(골리무맙); 일라리스(카나키누맙); 스텔라라(우스테키누맙); 아르제라(오파투무맙); 프롤리아(데노수맙); 누막스(모타비주맙); 에이비트락스(락시바쿠맙); 벤리스타(벨리무맙); 여보이(이필리무맙); 애드세트리스(브렌툭시맙 베도틴); 퍼제타(퍼투주맙); 캐드실라(아도-트라스투주맙 엠탄신); 및 가지바(오비누투주맙)를 포함한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "융합 단백질"은, 예를 들면, 적어도 하나의 표적 결합 부위를 갖는 면역글로불린 항원-결합 도메인, 및 적어도 하나의 이종 부위, 즉, 사실상 천연적으로 연결되지 않은 부위를 포함하는 키메라 분자를 나타낸다. 아미노산 서열은 통상적으로 융합 폴리펩타이드에서 합쳐진 별개의 단백질로 존재할 수 있거나 이것은 통상적으로 동일한 단백질에 존재하지만 융합 폴리펩타이드에서 새롭게 배열될 수 있다. 융합 단백질은, 예를 들면, 화학적 합성에 의해 생성될 수 있거나 웹타이드 부위가 목적하는 관계로 인코딩된 폴리뉴클레오타이드를 생성하고 번역함으로써 생성될 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 용어 "표적화된 요법"은 면역계의 임의의 측면을 표적화하는 임의의 치료 분자를 나타낸다.

[0056] 본원에 사용된 용어 "암"은 시험관내(예를 들면, 형질전환된 세포) 또는 생체내에서 과증식성 세포 성장을 특징으로 하는 광범위한 부류의 장애를 나타낸다. 본 발명의 조성을 및 방법에 의해 치료되거나 예방될 수 있는 병태는, 예를 들면, 양성 또는 악성 종양을 포함하는 다양한 신생물, 다양한 과형성 등을 포함한다. 본 발명의 화합물 및 방법은 이러한 병태에 연루된 원하지 않는 과증식성 세포 성장의 억제 및/또는 역전을 달성할 수 있다. 암의 구체적인 예는 급성 림프모구 백혈병, 성인; 급성 림프모구 백혈병, 소아기; 급성 골수성 백혈병, 성인; 부신피질 암종; 부신피질 암종, 소아기; AIDS-관련된 림프종; AIDS-관련된 악성종양; 항문암; 성상세포종, 소아기 소뇌; 성상세포종, 소아기 대뇌; 담관암, 간외; 방광암; 방광암, 소아기; 골암, 골육종/악성 섬유 조직구종; 뇌줄기 신경아교종, 소아기; 뇌종양, 성인; 뇌종양, 뇌줄기 신경아교종, 소아기; 뇌 종양, 소뇌 성상세포종, 소아기; 뇌 종양, 대뇌 성상세포종/악성 신경아교종, 소아기; 뇌 종양, 뇌실막세포종, 소아기; 뇌 종양, 수모세포종, 소아기; 뇌 종양, 천막상 원시신경외배엽 종양, 소아기; 뇌 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경아교종, 소아기; 뇌 종양, 소아기(기타); 유방암; 유방암 및 임신; 유방암, 소아기; 유방암, 납성; 기관지 선종/카르시노이드, 소아기; 카르시노이드 종양, 소아기; 카르시노이드 종양, 위장; 암종, 부신피질; 암종, 섬세포; 원인 불명의 암종; 중추 신경계 림프종, 원발성; 소뇌 성상세포종, 소아기; 대뇌 성상세포종/악성 신경아교종, 소아기; 자궁경부암; 소아기 암; 만성 림프구 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수증식 장애; 건초의 투명 세포 육종; 결장암; 결장직장암, 소아기; 피부 T-세포 림프종; 자궁내막암; 뇌실막세포종, 소아기; 상피암, 난소; 식도암; 식도암, 소아기; 유잉(Ewing) 패밀리의 종양; 두개외 배세포 종양, 소아기; 고환외 배세포 종양; 간외 담관암; 안암, 안구내 흑색종; 안암, 망막모세포종; 담낭암; 위암; 위암, 소아기; 위장 카르시노이드 종양; 배세포 종양, 두개외, 소아기; 배세포 종양, 고환외; 배세포 종양, 난소; 임신 영양막 종양; 신경아교종. 소아기 뇌줄기; 신경아교종. 소아기 시각 경로 및 시상하부; 모발 세포 백혈병; 두경부암; 간세포(간) 암, 성인(원발성); 간세포(간) 암, 소아기(원발성); 호지킨(Hodgkin) 림프종, 성인; 호지킨 림프종, 소아기; 임신중 호지킨 림프종; 하인두암; 시상하부 및 시각 경로 신경아교종, 소아기; 안구내 흑색종; 섬세포 암종(내분비성 췌장); 카포시(Kaposi) 육종; 신장암; 후두암; 후두암, 소아기; 백혈병, 급성 림프아구성, 성인; 백혈병, 급성 림프아구성, 소아기; 백혈병, 급성 골수성, 성인; 백혈병, 급성 골수성, 소아기; 백혈병, 만성 림프구성; 백혈병, 만성 골수성; 백혈병, 모발 세포; 입술 및 구강 암; 간암, 성인(원발성); 간암, 소아기(원발성); 폐암, 비-소세포; 폐암, 소세포; 림프모구 백혈병, 성인 급성; 림프모구 백혈병, 소아기 급성; 림프구성 백혈병, 만성; 림프종, AIDS-관련됨; 림프종, 중추 신경계(원발성); 림프종, 피부 T-세포; 림프종, 호지킨, 성인; 림프종, 호지킨; 소아기; 림프종, 임신중 호지킨; 림프종, 비-호지킨, 성인; 림프종, 비-호지킨, 소아기; 림프종, 임신중 비-호지킨; 림프종, 일차 중추 신경계; 고분자글로불린혈증, 발덴스트롬(Waldenstrom); 남성 유방암; 악성 중피종, 성인; 악성 중피종, 소아기; 악성 흥선종; 수모세포종, 소아기; 흑색종; 흑색종, 안구내; 메르켈 세포 암종; 중피종, 악성; 잠복 원발성의 전이성 편평 경부암; 다발성 내분비 신생물 증후군, 소아기; 다발성 골수종/형질 세포 신생물; 균상식육종; 골수이형성 증후군; 골수성 백혈병, 만성; 골수성 백혈병, 소아기 급성; 골수종, 다발성; 골수증식 장애, 만성; 비강 및 부비동 암; 코인두암; 코인두암, 소아기; 신경모세포종; 신경섬유종; 비-호지킨 림프종, 성인; 비-호지킨 림프종, 소아기; 임신중 비-호지킨 림프종; 비-소세포 폐암; 구강암, 소아기; 구강 및 입술 암; 입인두암; 골육종/골의 악성 섬유 조직구종; 난소암, 소아기; 난소 상피암; 난소 배세포 종양; 난소 낮은 악성 잠재 종양; 췌장암; 췌장암, 소아기, 췌장암, 섬세포;

부비동 및 비강 암; 부갑상선암; 음경암; 크롬친화세포종; 솔방울샘 및 천막상 원시신경외배엽 종양, 소아기; 뇌하수체 종양; 형질 세포 신생물/다발성 골수종; 흉막폐 모세포종; 임신 및 유방암; 임신 및 호지킨 림프종; 임신 및 비-호지킨 림프종; 일차 중추 신경계 림프종; 원발성 간암, 성인; 원발성 간암, 소아기; 전립선암; 직장암; 신세포(신장) 암; 신장 세포암, 소아기; 신우 및 요관, 이행 세포 암; 망막모세포종; 횡문근육종, 소아기; 침샘 암; 침샘 암, 소아기; 육종, 유잉 패밀리의 종양; 육종, 카포시; 육종(골육종)/골의 악성 섬유 조직구종; 육종, 횡문근육종, 소아기; 육종, 연조직, 성인; 육종, 연조직, 소아기; 세자리(Sezary) 증후군; 피부암; 피부암, 소아기; 피부암(흑색종); 피부암종, 메르켈 세포; 소세포 폐암; 소장암; 연조직 육종, 성인; 연조직 육종, 소아기; 잠복 원발성의 편평 경부암, 전이성; 위암; 위암, 소아기; 천막상 원시신경외배엽 종양, 소아기; T-세포 림프종, 피부; 고환암; 흉선종, 소아기; 흉선종, 악성; 갑상선암; 갑상선암, 소아기; 신우 및 요관의 이행 세포 암; 영양막 종양, 임신성; 알려지지 않은 원발 부위, 이의 암, 소아기; 소아기의 드문 암; 요관 및 신우, 이행 세포 암; 요도암; 자궁 육종; 질암; 시각 경로 및 시상하부 신경아교종, 소아기; 외음부암; 벌텐 스트롬 마크로 글로불린혈증; 및 윌름스(Wilms) 종양을 포함한다.

[0057] 본원에 사용된 용어 "생존의 개선"은 암 또는 증식성 질환으로 고통받는 피험자의 수명 또는 삶의 질의 증가를 나타낸다. 예를 들면, 생존의 개선은 또한 암 완화의 촉진, 종양 침입의 방지, 종양 재발의 방지, 종양 성장을 늦춤, 종양 성장의 방지, 종양 크기의 감소 및 총 암세포 수의 감소를 포함한다.

[0058] 본원에 사용된 용어 "장애의 예방"은 절대적인 용어로서 의도되지 않는다. 대신에, 예를 들면, 암의 예방은 개시의 지연, 증상의 빈도 감소, 피험자가 장애와 관련된 증상을 나타내거나 본원에 기재된 방법, 조성을 또는 치료 중 적어도 하나를 수용하지 않은 유사한 피험자와 비교하여 장애를 회피할 가능성의 감소 또는 암과 관련된 증상의 중증도의 감소를 나타낸다. 따라서, 예방은 당업자에 의해 이해될 광범위한 예방적 조치를 나타낸다. 몇몇 상황에서는, 증상의 빈도 및 중증도가, 예를 들면, 비-병적 수준으로 감소되어 개체가 침습성 암 치료, 예를 들면, 적극적인 화학요법 및 수술을 지연할 수 있다.

[0059] 본원에 사용된 용어 "암의 치료"는 절대적인 용어로서 의도되지 않는다. 몇몇 측면에서, 본 발명의 조성을 및 방법은 종양의 크기 또는 암세포의 수를 감소시키거나 암이 차도를 나타내게 하거나 암세포의 크기 또는 세포 수에서의 성장을 방지하려고 한다. 몇몇 상황에서, 치료는 개선된 예후를 초래한다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "치료를 필요로 하는 피험자"는 암 또는 세포 증식성 장애로 진단된 개체 또는 피험자를 나타낸다.

[0061] 용어 "치료적으로 효과적인", "치료적 유효량", "유효량" 또는 "효과적인 양으로"는 목적하는 생리적 반응을 촉진시키기에 충분한 양 또는 투여량을 나타내지만, 예를 들면, T-세포 반응을 촉진시키기에 충분한 양 또는 투여량으로 제한되지 않는다.

[0062] 본원에 사용된 용어 "PD-1 항체"는 PD-1을 아고나이징(agonizing)하여 림프구의 활성 및/또는 증식을 길항하는 항체를 나타낸다. 용어 "활성을 길항하다"는 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상의 림프구 증식 또는 활성의 감소(또는 축소)에 관한 것이다. 용어 "길항하다"는 용어 "억제성" 및 "억제하다"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. PD-1-매개된 활성은 본원에 기재된 T 세포 증식 검정을 사용하여 정량적으로 측정될 수 있다.

[0063] 본 발명의 한 측면은 PD-1의 작용제(agonist)로서 작용하여 PD-1에 의해 조절된 면역 반응을 조절할 수 있는 항체를 제공한다. 한 양태에서, 항-PD-1 항체는 신규한 항원-결합 단편일 수 있다. 본원에 개시된 항-PD-1 항체는 사람 PD-1을 포함하는 것에 결합하여 PD-1을 아고나이징하며, 이에 의해 PD-1을 발현시키는 면역 세포의 기능을 억제할 수 있다. 몇몇 양태에서, 면역 세포는 활성화된 림프구, 예를 들면, T-세포, B-세포 및/또는 PD-1을 발현시키는 단핵구이다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "종양 반응"은 유발된 세포예정사를 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포 반응을 나타낸다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "항종양 반응"은 항원을 공격하는 T-세포 또는 항원 제시 세포를 활성화시킴을 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역계 반응을 나타낸다.

[0066] 본원에 사용된 용어 "개시하는"은 제1 항종양 반응의 개시 또는 제2 또는 "향상된" 항종양 반응의 개시를 나타낸다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "가능하게 하는"은 피험자가 본원에 개시된 치료에 반응하게 하거나 종양 세포가 본원에 개시된 치료에 반응하게 하는 것을 나타내며, 여기서 상기 피험자 또는 종양 세포는 이전에 치료에 반응하지 않거

나 치료에 낮은 반응을 가졌다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "향상시키는"은 피험자 또는 종양 세포가 본원에 개시된 치료에 반응하는 능력이 개선됨을 나타낸다. 예를 들면, 향상된 반응은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 또는 그 이상의 반응성의 증가를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "향상시키는"은 또한 치료, 예를 들면, 체크포인트 억제제 요법에 반응하는 피험자의 수를 높이는 것을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 향상된 반응은 치료에 반응하는 피험자의 총 백분율을 나타낼 수 있으며, 여기서 상기 백분율은 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 또는 그 초과의 백분율이다.

[0069] 본원에 사용된 용어 "소분자"는 대략 10^{-9} m³의 크기를 갖는, 생물학적 공정을 조절하는 것을 도울 수 있는 저분자량(<900달톤) 유기 화합물을 나타낸다. 대부분의 약물은 소분자이다.

[0070] 본 발명은 적응(adaptive) 면역 내성의 활성화를 토대로 하는 신규한 병용 치료를 기재한다. 적응 면역 내성 기전은, 유도된 면역-체크포인트 단백질을 차단할 수 있는 제제가, 기존의 항종양 면역 반응(즉, 활성화된 T-세포)이 존재할 때에만 작용할 것이기 때문에, 최소로 효과적일 것임을 암시한다. 기존의 항종양 반응을 갖지 않는 환자의 경우, 상기 체크포인트 억제제는 효과적이지 않을 것이다. 따라서, 항종양 활성(즉, 항종양 면역 반응)을 활성화시키고 체크포인트를 억제할 수 있는 병용 치료는 단독 치료에 반응하지 않는 피험자가 조합된 치료로부터 이익을 얻게 할 수 있기 때문에 바람직하다.

[0071] 수지상 세포(DC)는 T 세포 항종양 반응을 조정하는 것으로 나타났고, 교모세포종 피험자에서 항종양 면역을 유도하기 위한 DC를 사용한 능동 백신화 전략을 시험하였다. 다수의 연구는 DC 백신 처리 후 유의미하고 효과적인 면역 반응을 보고한다. 내인성 자가조절 기전의 보조적 조절과 함께 이러한 면역요법을 추가로 진행시킬 가능성이 흥미롭다.

[0072] 수지상 세포는 다양한 림프구 및 비-림프구 조직에서 발견되는 다양한 항원 제시 세포 집단이다(참조: Liu, Cell 106:259-62 (2001); Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9:271-96 (1991)). 수지상 세포는 비장의 림프구 수지상 세포, 표피의 랑게르ハン스 세포 및 혈액 순환 중 베일 세포(veiled cell)를 포함한다. 총괄하여, 수지상 세포는 이의 형태, 고 수준의 표면 MHC-부류 II 발현, 및 T 세포, B 세포, 단핵구 및 자연 살해 세포에서 발현되는 특정한 다른 표면 마커의 부재를 기준으로 한 그룹으로 분류된다. 특히, 단핵구-유도된 수지상 세포(또한 단구성 수지상 세포로도 지칭됨)는 통상적으로 CD11c, CD80, CD86을 발현시키며, HLA-DR⁺이지만 CD14⁻는 아니다.

[0073] 반대로, 단구성 수지상 세포 전구체(통상적으로 단핵구)는 통상적으로 CD14⁺이다. 단구성 수지상 세포 전구체는 이들이 체류하는 임의의 조직, 특히 림프구 조직, 예를 들면, 비장, 골수, 림프절 및 흉선으로부터 수득될 수 있다. 단구성 수지상 세포 전구체는 또한 순환계로부터 단리될 수 있다. 말초 혈액은 단구성 수지상 세포 전 구체의 용이하게 이용가능한 공급원이다. 제대혈은 단구성 수지상 세포 전구체의 또 다른 공급원이다. 단구성 수지상 세포 전구체는 면역 반응이 유도될 수 있는 다양한 유기체로부터 단리될 수 있다. 이러한 유기체는, 예를 들면, 사람 및 비-사람 동물, 예를 들면, 영장류, 포유동물(개, 고양이, 마우스 및 랫 포함), 조류(닭 포함) 뿐만 아니라 이의 유전자 이식(transgenic) 종들을 포함하는 동물을 포함한다. 특정 양태에서, 단구성 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙 수지상 세포는 건강한 피험자 또는 면역자극을 필요로 하는 피험자, 예를 들면, 암 피험자 또는 세포 면역자극이 유리하거나 바람직할 수 있는 기타 피험자(즉, 박테리아 또는 바이러스 감염 등을 갖는 피험자)로부터 단리될 수 있다. 수지상 세포 전구체 및/또는 미성숙 수지상 세포는 또한 부분적인 활성화 및 면역자극을 필요로 하는 HLA-매칭된 피험자로의 투여를 위해 HLA-매칭된(matched) 건강한 개체로부터 수득될 수 있다.

[0074] 수지상 세포 전구체를 단리하고 변형하는 방법은 미국 특허 공보 제20060057120호에서 발견될 수 있으며, 이는 참조로 본원에 포함되어 있다.

[0075] 면역 체크포인트는 면역계에서 T 세포 기능을 조절한다. T 세포는 세포-매개된 면역에서 중추적인 역할을 한다. 체크포인트 단백질은 T 세포로 신호를 전송하는 특정 리간드와 상호작용하여 본질적으로 T 세포 기능을 스위치 오프하거나 억제한다. 암세포는 종양 미세환경으로 도입되는 T 세포의 표면상에서 체크포인트 단백질을 발현시키는 T 세포를 조절하여 이의 표면상에서 높은 수준의 체크포인트 단백질 발현을 유도함으로써 이 시스템을 활용하며, 이에 따라 항암 면역 반응을 억제한다. 이와 같이, 체크포인트 단백질의 억제는 T 세포 기능 및

암세포에 대한 면역 반응을 회복시킬 것이다. 체크포인트 단백질의 예는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4(분자의 CD2 패밀리에 속하고 NK, γδ 및 메모리 CD8⁺(αβ) T 세포 모두에서 발현됨), CD160(BY55로도 지칭됨), CGEN-15049, CHK 1 및 CHK2 키나제, A2aR 및 다양한 B-7 패밀리 리간드를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다.

[0076] 세포 예정사 단백질 1(PD-1)은 288개의 아미노산 세포 표면 단백질 분자이며 T 세포 및 프로(pro)-B 세포에서 발현되며 이의 죽음/분화에 작용한다. PD-1은 2개의 리간드 PD-L1 및 PD-L2를 가지며, 이는 B7 패밀리의 일원이다. PD-L1 단백질은 LPS 및 GM-CSF 처리에 반응하여 대식세포 및 수지상 세포(DC) 상에서 상향조절되고 TCR 및 B 세포 수용체 신호전달시 T 세포 및 B 세포 상에서 상향조절되지만, 휴식중인 마우스에서 PD-L1 mRNA는 심장, 폐, 흉선, 비장 및 신장에서 검출될 수 있다. PD-1은 T 세포 반응을 음성적으로 조절한다.

[0077] PD-1은 T 세포 활성화 및 만성 항원(chronic antigen)에 반응하는 T 세포 내성 사이에 균형을 조절하는데 관여하는 것으로 나타났다. 예를 들면, PD-1 발현은 HIV 감염에서 광범위하게 연구되었다. HIV1 감염 동안, PD-1의 발현은 CD4+ T 세포에서 증가되는 것으로 밝혀졌다. PD-1 상향조절은, HIV 감염의 경우에서와 같이 T-세포 기능이상이 만성 항원 노출의 존재 하에 관찰될 때 T 세포 소모(주요 작동인자(effector) 기능의 점진적인 손실로서 정의됨)에 의존적인 것으로 사료된다. PD-1 상향조절은 또한 만성 바이러스 감염 동안 이들 동일한 세트의 세포에서 세포사멸(apoptosis) 증가와 관련될 수 있다(참조: Petrovas et al, (2009) J Immunol. 183 (2):1120-32).

[0078] PD-1은 또한 면역 감시로부터의 종양-특이적 도피에 작용한다. PD-1은 만성 골수성 백혈병(CML) 및 급성 골수성 백혈병(AML) 둘 모두의 종양-특이적 세포독성 T 림프구(CTL)에서 고도로 발현되는 것으로 입증되었다. PD-1은 또한 흑색종 침윤 T 림프구(TIL)에서 상향조절된다(참조: Dotti (2009) Blood 114 (8): 1457-58). 종양은 PD-1 리간드(PDL-1 및 PDL-2)를 발현시키는 것으로 밝혀졌으며, 이는 CTL에서 PD-1의 상향조절과 조합될 때, T 세포 기능을 감소시키고 CTL이 효과적인 항종양 반응을 매개하지 못하게 하는데 기여하는 인자일 수 있다. 연구자들은, 림프구성 맥락수막염 바이러스(LCMV)로 만성으로 감염된 마우스에서, 항-PD-1 항체의 투여가 PD-1-PDL 상호작용을 차단했으며 몇몇 T 세포 기능(증식 및 사이토카인 분비)을 회복시킬 수 있었으며, 바이러스 로드를 감소시켰음을 보여주었다(참조: Barber et al (2006) Nature 439 (9): 682-687).

[0079] 종양 세포 자체는 PD-L1을 발현시키고 이러한 기전을 통해 T 세포 반응을 제한하는 것으로 사료된다. PD-1의 억제가 B16 흑색종 모델에서 작동인자 T 세포를 확장시키고 T 조절 세포 집단을 제한하는 것으로 추가로 나타났다. PD-1, CTLA-4 또는 IDO의 차단은 IL-2 생산을 회복시키고 종양 미세환경에 존재하는 CD8+ T 세포의 증식을 증가시킨다. 항-PDL1 처리는 종양을 거부하는 항원-특이적 백신-생성 CD8+ T 세포를 지키고 이를 확장시키는 것으로 나타났다. 이들 데이터는 PD-1/PD-L1 축이 활성화된 종양-특이적 T 세포를 조절함을 시사한다.

[0080] 흑색종에서의 임상시험은 항-PD-1 차단과 함께 확고한 항종양 반응을 나타내었다. 진행된 흑색종, 비-소세포 폐암, 전립선암, 신장 세포암 및 결장직장암의 경우에 PD-1 억제에 의한 유의미한 이익이 또한 기재되었다. 뮤린 모델 연구에서는 이러한 증명을 신경아교종 요법에 응용하였다. 방사선에 대한 항-PD-1 차단 보강제는 신경 아교종 종양을 갖는 마우스에서 세포독성 T 세포 집단 및 관련된 장기간 생존 이점을 증진시켰다. IDO, CTLA-4 및 PD-L1 억제제의 조합 치료가 투여될 때 종양-침윤 Treg의 감소 및 생존 증가가 기재되었다.

[0081] 현재 임상시험에서 시험중인 몇몇 PD-1 억제제가 있다. CT-011은 PD-1에 대한 사람화된 IgG1 단클론 항체이다. 자가 줄기세포 이식술을 받은 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL)을 갖는 피험자에서의 II상 임상시험이 최근에 완료되었다. 예비 결과는 대조 그룹에서의 47%와 비교하여 70%의 피험자가 추적조사 기간 종료시 진행이 없었으며, 대조 그룹에서의 62%와 비교하여 82%의 피험자가 생존했음을 나타냈다. 이러한 시험은 CT-011이 PD-1 기능을 차단할 뿐만 아니라 자연 살해 세포의 활성을 증대시켜 항종양 면역 반응을 증강시키는 것으로 확인되었다.

[0082] BMS 936558은 PD-1 제제를 표적화하는 전장 사람 IgG4 단클론 항체이다. I상 시험에서, 진행된, 치료-무반응성 악성종양을 갖는 피험자에게 BMS-936558의 격주 투여는 지속적인 부분적 또는 완전한 퇴행을 나타냈다. 대부분의 유의미한 반응률은 흑색종(28%) 및 신세포 암종(27%)을 갖는 피험자에서 관찰되었지만, 비-소세포 폐암(NSCLC)을 갖는 피험자에서도 실질적인 임상적 활성이 관찰되었고 일부 반응은 1년이 넘는 기간 동안 지속되었다. 이는 또한 비교적 잘 허용되었고; 14%의 피험자에서 등급 ≥3의 유해 사건이 일어났다.

[0083] BMS 936559는 PD-1 리간드 PD-L1을 표적화하는 전장 사람 IgG4 단클론 항체이다. I상 결과는 이 약물의 격주 투여가 특히 흑색종을 갖는 피험자에서 지속적인 반응을 야기했음을 보여주었다. 객관적 반응률(objective

response rate)은 진행-단계 NSCLC, 흑색종, RCC 또는 난소암을 갖는 피험자에서 암 유형에 따라 6% 내지 17%의 범위였으며, 몇몇 피험자는 1년 이상 지속되는 반응을 경험했다.

[0084] MK 3475는 진행성, 국소 진행된, 또는 전이성 암종, 흑색종 또는 NSCLC를 갖는 피험자에서 약물의 투여, 안전성 및 내약성을 평가하는 5-파트 연구에서의 I상 전개시 사람화된 IgG4 항-PD-1 단클론 항체이다.

[0085] MPDL 3280A는 또한 PD-L1을 표적화하는 단클론 항체로서, BRAF V600-돌연변이 전이성 흑색종을 갖는 피험자에서 BRAF 억제제 베무라페닙과 함께 I상 시험 진행중이고 진행된 고형 종양을 갖는 피험자에서 화학요법의 존재 또는 부재 하에 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)를 표적화하는 베바시주맙과 함께 I상 시험 진행중이다.

[0086] AMP 224는 PD-L2/PD-1 상호작용을 차단하는 잠재력을 갖는, 제2 PD-1 리간드, PD-L2 및 IgG1의 세포외 도메인의 융합 단백질이다. AMP-224는 진행암을 갖는 피험자에서 단일요법으로서 현재 I상 시험을 진행하고 있다.

[0087] Medi 4736은 진행된 악성 흑색종, 신세포 암종, NSCLC 및 결장직장암을 갖는 피험자에서 I상 임상 시험중인 항-PD-L1 항체이다.

[0088] CTLA4(세포독성 T-림프구-관련 단백질)는 면역계를 하향 조절하는 단백질 수용체이다. CTLA4는 T 세포의 표면상에서 발견되며, 항원에 대해 세포 면역 공격을 일으킨다. T 세포 공격은 T 세포 상의 CD28 수용체를 자극하여 개시될 수 있다. T 세포 공격은 CTLA4 수용체를 자극하여 정지될 수 있다. 퍼스트-인-클래스 면역요법, 이퀼리무스(여보이), T 세포의 표면상의 CTLA-4를 표적화하는 단클론 항체가 흑색종의 치료를 위한 것이었다.

[0089] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 피험자에게 치료제를 체크포인트 억제제와 함께 투여함을 포함하는, 암의 치료 또는 항종양 반응의 개시, 향상 또는 연장을 필요로 하는 피험자에서 암을 치료하거나 항종양 반응을 개시, 향상 또는 연장시키는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 생물학적 치료제 또는 소분자이다. 또 다른 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 단클론 항체, 사람화된 항체, 전장 사람 항체, 융합 단백질 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질을 억제한다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질의 리간드와 상호작용한다. 한 측면에서, 치료제는 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체, 백신 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 인터류킨은 IL-7 또는 IL-15이다. 구체적인 측면에서, 상기 인터류킨은 글리코실화된 IL-7이다. 추가의 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포 백신이다.

[0090] 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제 및 상기 치료제는 동시에 또는 어느 순서든 순차적으로 투여된다. 추가의 측면에서, 상기 치료제는 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료제는 백신이고 상기 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제이다. 추가의 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포 백신이다.

[0091] 한 측면에서, 치료는 임상적 결과; T 세포에 의한 항종양 활성의 증가, 향상 또는 연장; 치료 전의 수와 비교하여 항종양 T 세포 또는 활성화된 T 세포의 수의 증가 또는 이들의 조합에 의해 결정된다. 또 다른 측면에서, 임상적 결과는 종양 퇴행; 종양 수축; 종양 괴사; 면역계에 의한 항종양 반응; 종양 확장, 재발 또는 확산 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 치료 효과는 T 세포의 존재, T 세포 염증을 표시하는 유전자 서명의 존재 또는 이들의 조합에 의해 예측된다.

[0092] 또 다른 측면에서, 상기 피험자는 암을 갖는다. 추가의 측면에서, 상기 암은 비뇨생식기암(예를 들면, 전립선암, 신장 세포암, 방광암), 부인과암(예를 들면, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암), 폐암, 위장암(예를 들면, 비-전이성 또는 전이성 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포암, 담관세포암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포암), 악성 교모세포종, 악성 중피종, 비-전이성 또는 전이성 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 악성 흑색종, 메르켈 세포 암종 또는 골 및 연조직 육종 및 혈액 신생물, 예를 들면, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군 및 급성 림프모구 백혈병을 포함하는, 임의의 고형 종양 또는 액상 암이다. 바람직한 양태에서, 상기 질환은 비-소세포 폐암(NSCLC), 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포암), 전이성 결장직장암, 호르몬 민감성 또는 호르몬 무반응성 전립선암, 결장직장암, 난소암, 간세포암, 신장 세포암, 연조직 육종 또는 소세포 폐암이다.

[0093] 추가의 측면에서, 상기 방법은 병용 요법으로의 치료 전, 치료와 동시에 또는 치료 후 피험자에게 화학요법제,

표적화된 요법 또는 방사선을 투여함을 추가로 포함한다. 추가의 측면에서, 상기 종양은 치료제 및 체크포인트 억제제의 투여 전 절제될 수 있다.

[0094]

체크포인트 억제제는 면역계의 억제 경로를 통계적으로 유의미한 방식으로 차단하거나 억제하는 임의의 제제를 포함한다. 이러한 억제제는 소분자 억제제를 포함할 수 있거나, 면역 체크포인트 수용체에 결합하여 이를 차단하거나 억제하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 면역 체크포인트 수용체 리간드에 결합하여 이를 차단하거나 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 차단 또는 억제를 위해 표적화될 수 있는 예시적인 체크포인트 분자는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, GAL9, LAG3, TIM3, VISTA, KIR, 2B4(분자의 CD2 패밀리에 속하고 NK, γδ 및 메모리 CD8⁺(αβ) T 세포 모두에서 발현됨), CD160(BY55로도 지칭됨), CGEN-15049, CHK1 및 CHK2 키나제, A2aR 및 다양한 B-7 패밀리 리간드를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다. B7 패밀리 리간드는 B7-1, B7-2, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 및 B7-H7을 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다. 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160 및 CGEN-15049 중 하나 이상에 결합하여 이의 활성을 차단하거나 억제하는, 항체, 또는 이의 항원 결합 단편, 다른 결합 단백질, 생물학적 치료제 또는 소분자를 포함한다. 예시적인 면역 체크포인트 억제제는 트레멜리무맙(CTLA-4 차단 항체), 항-OX40, PD-L1 단클론 항체(항-B7-H1; MEDI4736), MK-3475(PD-1 차단제), 니볼루맙(항-PD1 항체), CT-011(항-PD1 항체), BY55 단클론 항체, AMP224(항-PDL1 항체), BMS-936559(항-PDL1 항체), MPLDL3280A(항-PDL1 항체), MSB0010718C(항-PDL1 항체) 및 여보이/이필리무맙(항-CTLA-4 체크포인트 억제제)을 포함한다. 체크포인트 단백질 리간드는 PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7-H4, CD28, CD86 및 TIM-3을 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다.

[0095]

하나의 특정 양태에서, 본 발명은 면역 체크포인트 수용체 세포 예정사 단백질 1(PD-1) 및 이의 리간드 PDL-1 사이의 상호작용을 차단하는 약물인 특정 부류의 체크포인트 억제제의 사용을 포함한다(참조: A. Mullard, "New checkpoint inhibitors ride the immunotherapy tsunami," *Nature Reviews: Drug Discovery* (2013), 12:489-492). PD-1은 T-세포상에서 발현되어 이의 활성을 조절한다. 구체적으로는, PD-1이 PDL-1에 결합되지 않을 때, T-세포는 표적 세포를 사로잡아 사멸시킬 수 있다. 그러나, PD-1이 PDL-1에 결합되면, 이는 T-세포가 표적 세포를 사로잡아 사멸시키는 것을 중단시킨다. 더욱이, PD-1은, 다른 체크포인트와 달리, PDL이 암세포 상에서 직접적으로 과발현되어 PD-1 발현 T-세포로의 결합을 증가시키도록 인접하여 작용한다.

[0096]

본 발명의 한 측면은 PD-1의 작용제로서 작용하여 PD-1에 의해 조절된 면역 반응을 조절할 수 있는 항체인 체크포인트 억제제를 제공한다. 한 양태에서, 항-PD-1 항체는 항원-결합 단편일 수 있다. 본원에 개시된 항-PD-1 항체는 사람 PD-1에 결합하여 PD-1의 활성을 아고나이징할 수 있으며, 이에 의해 PD-1을 발현시키는 면역 세포의 기능을 억제할 수 있다.

[0097]

하나의 특정 양태에서, 본 발명은 CTLA-4를 억제하는 약물인 특정 부류의 체크포인트 억제제의 사용을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용하기에 적합한 항-CTLA4 길항제(antagonist) 제제는, 비제한적으로, 항-CTLA4 항체, 사람 항-CTLA4 항체, 마우스 항-CTLA4 항체, 포유동물 항-CTLA4 항체, 사람화된 항-CTLA4 항체, 단클론 항-CTLA4 항체, 다클론 항-CTLA4 항체, 키메라 항-CTLA4 항체, MDX-010(이필리무맙), 트레멜리무맙, 항-CD28 항체, 항-CTLA4 애드넥틴, 항-CTLA4 도메인 항체, 단일쇄 항-CTLA4 단편, 중쇄 항-CTLA4 단편, 경쇄 항-CTLA4 단편, 공동-자극(co-stimulatory) 경로를 아고나이징하는 CTLA4 억제제, PCT 공보 제WO 2001/014424호에 개시된 항체, PCT 공보 제WO 2004/035607호에 개시된 항체, 미국 공보 제2005/0201994호에 개시된 항체 및 승인된 유럽 특허 제EP 1212422 B1호에 개시된 항체를 포함한다. 추가의 CTLA-4 항체는 미국 특허 제5,811,097호, 제5,855,887호, 제6,051,227호 및 제6,984,720호; PCT 공보 제WO 01/14424호 및 제WO 00/37504호; 및 미국 공보 제2002/0039581호 및 제2002/086014호에 기재되어 있다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 다른 항-CTLA-4 항체는, 예를 들면, 문헌(참조: 제WO 98/42752호; 미국 특허 제6,682,736호 및 제6,207,156호; Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145):Abstract No. 2505 (2004) (antibody CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998), 및 미국 특허 제5,977,318호, 제6,682,736호, 제7,109,003호 및 제7,132,281호)에 개시된 것들을 포함한다.

[0098]

추가의 항-CTLA4 길항제는 하기를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다: CD28 항원의 이의 동족(cognate) 리간드로의 결합 능력을 파괴하고, CTLA4의 이의 동족 리간드로의 결합 능력을 억제하고, 공동-자극 경로를 통해 T 세포 반응을 증강시키고, B7의 CD28 및/또는 CTLA4로의 결합 능력을 파괴하고, 공동-자극 경로를 활성화시키는 B7의 능력을 파괴하고, CD80의 CD28 및/또는 CTLA4로의 결합 능력을 파괴하고, 공동-자극 경로를 활성화시키는 CD80의 능력을 파괴하고, CD86의 D28 및/또는 CTLA4로의 결합 능력을 파괴하고, 공동-자극 경로를 활성화시키는

CD86의 능력을 파괴하고, 일반적으로 활성화된 것으로부터 공동-자극 경로를 파괴할 수 있는 임의의 억제제. 이것은 필연적으로 다른 항-CTLA4 길항제 중에서도, 공동-자극 경로의 다른 일원들 중에서 CD28, CD80, CD86, CTLA4의 소분자 억제제; 공동-자극 경로의 다른 일원들 중에서 CD28, CD80, CD86, CTLA4로 유도되는 항체; 공동-자극 경로의 다른 일원들 중에서 CD28, CD80, CD86, CTLA4에 대해 유도된 안티센스 분자; 공동-자극 경로의 다른 일원들 중에서 CD28, CD80, CD86, CTLA4에 대해 유도된 애드넥틴, 공동-자극 경로의 다른 일원들 중에서 CD28, CD80, CD86, CTLA4의 RNAi 억제제(단일 가닥 및 이중 가닥 둘 모두)를 포함한다.

[0099] 하나의 특정 양태에서, 본 발명은 TIM-3을 억제하는 약물인 특정 부류의 체크포인트 억제제의 사용을 포함한다. 리간드에 의한 TIM-3 활성화의 차단은 Th1 세포 활성화를 증가시킨다. 더욱이, TIM-3은 소모성 CD8+ T 세포에 의해 발현되는 중요한 억제 수용체로 확인되었다. TIM-3은 또한 핵산 매개된 항종양 면역의 주요 조절인자인 것으로 보고되었다. 일 예로, TIM-3은 종양-관련 수지상 세포(TADC) 상에서 상향조절되는 것으로 나타났다.

[0100] 하나의 특정 양태에서, 본 발명은 면역자극제, T 세포 성장 인자 및 인터류킨의 사용에 관한 것이다. 면역자극제는 면역계 성분 중 어느 것의 활성화를 유도하거나 면역계 성분 중 어느 것의 활성을 증가시켜 면역계를 자극하는 물질(약물 및 영양소)이다. 면역자극제는 박테리아 백신, 접락 자극 인자, 인터페론, 인터류킨, 기타 면역자극제, 치료 백신, 백신 배합물 및 바이러스 백신을 포함한다.

[0101] T 세포 성장 인자는 T 세포의 증식을 자극하는 단백질이다. T 세포 성장 인자의 예는 IL-2, IL-7, IL-15, IL-17, IL21 및 IL-33을 포함한다.

[0102] 인터류킨은 처음에 백혈구에 의해 발현되는 것으로 나타난 사이토카인 그룹이다. 면역계의 기능은 대부분 인터류킨에 의존적이며, 이들 중 다수의 드문 결핍이 기재되었으며, 모두 자가면역 질환 또는 면역 결핍을 특징으로 한다. 대다수의 인터류킨은 헬퍼(helper) CD4 T 림프구에 의해서 뿐만 아니라 단핵구, 대식세포 및 내피 세포를 통해 합성된다. 이것은 T 및 B 림프구 및 조혈 세포의 발달 및 분화를 촉진시킨다. 인터류킨의 예는 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15 및 IL-17을 포함한다.

[0103] IL-15는 IL-2/IL-15 수용체 베타 사슬(CD122) 및 통상의 감마 사슬(감마-C, CD132)로 구성된 복합체에 결합하여 이를 통해 신호를 전달하는 사이토카인이다. IL-15는 바이러스에 의한 감염 후 단핵성 포식세포에 의해 분비된다. 이 사이토카인은 자연 살해 세포; 주요 역할이 바이러스 감염된 세포를 사멸시키는 것인 선천적 면역계의 세포의 세포 증식을 유도한다.

[0104] IL-7은 골수 및 흉선의 간질 세포에 의해 분비된 조혈 성장 인자이다. IL-7은 (IL-3에 의해 분화가 자극되는 골수성 전구 세포와 달리) 다분화능(multipotent) 및 전분화능(pluripotent) 조혈 줄기세포의 림프구 전구 세포로의 분화를 자극한다. 이는 또한 림프구 계통(B 세포, T 세포 및 NK 세포)에서 모든 세포의 증식을 자극한다. B-세포 성숙, T 및 NK 세포 생존, 발달 및 항상성의 특정 단계 동안의 증식이 중요하다. IL-7은 글리코실화될 수 있다.

[0105] 본원에 기재된 특정 방법 또는 조성물에서, 추가의 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 제제. 특정 양태에서, 상기 추가의 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 제제는 화학요법제, 사이토카인 요법, 인터페론 요법(예를 들면, INF-α), 인터류킨 요법(예를 들면, IL-2, IL-7 또는 IL-11), 접락-자극 인자 요법(예를 들면, G-CSF), 항체 요법, 바이러스 요법, 유전자 요법 또는 이들의 조합이다. 특정 양태에서, 상기 추가의 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9 또는 제10 제제는 본원에 기재된 방법 또는 조성물 중 어느 것으로의 치료 전, 치료와 동시에 또는 치료 후 사용될 수 있다.

[0106] 암 치료제 또는 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들면, 티오테파 및 사이클로포스파미드(CYTOXAN); 알킬 설포네이트, 예를 들면, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들면, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오프스파오르아미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸아멜라민; 질소 머스타드, 예를 들면, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 폐네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들면, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들면, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블래오마이신, 칙티노마이신, 칼리키아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신,

마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예를 들면, 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 엽산 유사체, 예를 들면, 테놉테린, 메토트렉세이트, 프테롭테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들면, 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들면, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로겐, 예를 들면, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항부신제(anti-adrenal), 예를 들면, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 엽산 보충물, 예를 들면, 프롤린산; 아세글라تون; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비스안트렌; 에다트락세이트; 테포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 웬토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK.RTM.; 라족산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가사이토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 티오텐; 탁소이드, 예를 들면, 파클리탁셀(탁솔(TAXOL™), Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) 및 도세탁셀(탁소테레(TAXOTERE™), Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France); 클로람부실; 켐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들면, 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 트라스투주맙, 도세탁셀, 백금; 에토포사이드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빙크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포사이드; 다우노마이신; 아미놉테린; 젤로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸로미틴(DMFO); 레티노산 유도체, 예를 들면, 타르그레틴™(벡사로텐), 판레틴™(알리트레티노인); ONTAK™(테니류킨 디프티톡스); 에스페라마이신; 카페시타빈; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 예를 들면, 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜(파레스톤)을 포함하는 항-에스트로겐; 및 항-안드로겐, 예를 들면, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 상기 중 어느 것의 약제학적으로 허용되는 염, 산 또는 유도체와 같이, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는데 작용하는 항-호르몬제도 이러한 정의 내에 포함된다. 추가의 암 치료제는 소라페닙 및 기타 단백질 키나제 억제제, 예를 들면, 아파티닙, 악시티닙, 베바시주맙, 세툭시맙, 크리조티닙, 다사티닙, 에를로티닙, 포스타마티닙, 게피티닙, 이마티닙, 라파티닙, 렌바티닙, 무브리티닙, 닐로티닙, 파니투무맙, 파조파닙, 폐갑타닙, 라니비주맙, 룩솔리티닙, 트라스투주맙, 반데타닙, 베무라페닙 및 수니티닙; 시롤리무스(라파마이신), 에베롤리무스 및 기타 mTOR 억제제를 포함한다.

[0107]

추가 화학요법제의 예는 토포이소머라제 I 억제제(예를 들면, 이리노테칸, 토포테칸, 캄프토테신 및 이들의 유사체 및 대사물질, 및 독소루비신); 토포이소머라제 II 억제제(예를 들면, 에토포사이드, 테니포사이드 및 다우노루비신); 알킬화제(예를 들면, 멜팔란, 클로람부실, 부설판, 티오텐, 이포스파미드, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 스트렙토조신, 데카르바진, 메토트렉세이트, 미토마이신 C 및 사이클로포스파미드); DNA 삽입제(intercalator)(예를 들면, 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카보플라틴); DNA 삽입제 및 자유 라디칼 발생제, 예를 들면, 블레오마이신; 및 뉴클레오사이드 미메틱(mimetic)(예를 들면, 5-플루오로우라실, 카페시티빈, 켐시타빈, 플루다라빈, 시타라빈, 머캅토퓨린, 티오구아닌, 웬토스타틴 및 하이드록시우레아)을 포함한다. 게다가, 세포 복제를 과괴하는 예시적인 화학요법제는 파클리탁셀, 도세탁셀 및 관련 유사체; 빙크리스틴, 빈블라스틴 및 관련 유사체; 탈미도마이드, 레날리도마이드 및 관련 유사체(예를 들면, CC-5013 및 CC-4047); 단백질 티로신 키나제 억제제(예를 들면, 이마티닙 메실레이트 및 게피티닙); 프로테아솜 억제제(예를 들면, 보르테조닙); I_KB 키나제의 억제제를 포함하는 NF-_KB 억제제; 암에서 과발현된 단백질에 결합하는 항체, 및 암에서 상향조절되거나, 과발현된거나 활성화되는 것으로 알려진 단백질 또는 효소의 다른 억제제(이의 억제는 세포 복제를 하향조절한다)를 포함한다.

[0108]

하나의 특정 양태에서, 본 발명은 암 백신 및 수지상 세포 백신을 포함하는 치료 백신의 용도에 관한 것이다. 암 백신의 목표는 체내 암세포에 대한 공격을 면역계에 탑재시키는 것이다. 다시 말해, 암 백신은 체내에서 암 세포를 공격하도록 면역계를 프라이밍(priming)함으로써 작동한다. 따라서, 암 백신은, 질환을 예방하는 대신에, 이미 존재하는 질환을 면역계가 공격하게 함을 의미한다. 암 백신은 체내에 이미 존재하는 암세포에 대한 면역 반응을 증가시키도록 암세포, 세포의 일부 또는 순수한 항원을 사용한다.

[0109]

암 백신은, 전통적인 면역 상승 요법과 달리, 단지 일반적으로 면역계를 향상시키지 않으며, 이는 면역계가 하나 이상의 특이적 항원을 갖는 세포를 공격하게 하고 면역계에서 "공격 메모리"를 생성한다. 이러한 "공격 메모리"는 암이 진행되는 것을 방지하고/하거나 회복될 때 암이 복귀되는 것을 방지하도록 면역계가 암세포를 계

속 공격하게 한다.

[0110] 암 백신은 피험자로부터 제거되었던 실제 암세포로부터 제조될 수 있다. 암세포는, 일단 제거되면, 실험실에서, 통상적으로 방사선으로 변형되어 암세포가 더 많은 종양을 형성할 수 없게 된다. 실험실에서, 암세포를 추가로 변형시키는 것은 과학자에게 또한 통상적이다. 예를 들면, 암세포는 종종, 상기 세포가 면역계에 의해 이물질로 관찰될 가능성을 더 높이기 위해, 화학물질 또는 신규 유전자를 부가하여 변형된다. 이어서 변형된 세포는 피험자에게 다시 주입된다. 면역계는 이들 세포 상의 항원을 인식할 수 있으며 자연스런 생리적 과정을 통해 의도된 항원을 발현시키는 세포를 찾아내고 이를 공격/사멸시킨다.

[0111] 대부분의 백신은 자가 백신이다. 자가 백신은 이것이 이후에 사용될 사람과 동일한 사람으로부터 채취된 사멸된 세포로부터 제조된다(예를 들면, 방사선 또는 화합물질로 처리하여 복제할 수 없는 암세포가 되게 함). 다시 말해, 피험자로부터 세포를 채취하고, 변형시킨 후 다시 동일한 피험자에게 주사된다.

[0112] 다른 백신은 동종이형 백신이다. 동종이형 백신은 한 피험자로부터 채취된 세포로부터 제조된 후 제2의 상이한 피험자에게 주사된다. 동종이형 백신이 자가 백신보다 더 용이하게 제조되지만, 피험자에게 외래 세포의 도입을 피하는 자가 백신을 사용하는 것이 이로울 수 있다.

[0113] 다양한 유형의 암 백신이 있다. 암 백신의 비제한적인 예는 종양 세포 백신, 항원 백신, 수지상 세포 백신, DNA 백신 및 벡터 기반 백신을 포함한다.

[0114] 항원 백신은 수천 개의 항원을 함유하는 전체 종양 세포와 달리, 하나 이상의 항원을 사용하여 면역계를 상승시킨다. 이들 항원은 일반적으로 웨타이드이다. 항원 백신은 각각의 종양 유형이 특이적 항원 프로파일에 의해 식별될 수 있기 때문에 특정 유형의 암에 특이적일 수 있다. 이들 백신의 효능을 최대화하기 위해, 특정 암의 항원 프로파일에 따라 백신에서 다수의 항원들을 조합하는 것이 유리할 수 있다.

[0115] 수지상 세포 백신은 종종 자가 백신이며 종종 각각의 피험자에 대해 개별적으로 제조되어야 한다. 상기 백신을 제조하는데 사용된 방법은 복잡하며 고가이다. 의사들은 혈액으로부터 몇몇 면역 세포를 제거하고 실험실에서 이들을 암세포 또는 암 항원, 뿐만 아니라 이들을 수지상 세포로 전환시키고 이들이 성장하는 것을 돋는 다른 화학물질에 노출시킨다. 이어서 수지상 세포를 피험자에게 다시 주사하며, 여기서 상기 세포는 체내에서 암세포에 대해 면역 반응을 유발하여야 한다. 수지상 백신의 비제한적인 예는 시푸류셀(Sipuleucel)-T(하기 기재됨)이다.

[0116] DNA 백신은 세 번째 비제한적인 암세포 백신이다. 전통적인 암세포 백신의 한 가지 한계는 종양 세포 또는 항원이 백신으로서 체내에 주사될 때, 이들은 처음에는 목적하는 면역 반응을 유발할 수 있지만 시간이 경과하면서 덜 효과적이 된다는 점이다. 이는 면역계가 이들을 이물질로서 인식하고 재빨리 이들을 파괴하기 때문이다. 임의의 추가 자극이 없으면, 면역계는 종종 이의 정상(전-백신(pre-vaccine)) 상태의 활성으로 복귀한다. 계속적인 면역 반응을 촉진시키는 하나의 방법은 DNA 백신을 사용하는 것이다.

[0117] DNA는 세포가 만드는 단백질에 대한 유전 부호를 함유하는 세포 내의 물질이다. 벡터는 피험자에게 주사될 수 있는 특정 DNA를 함유하도록 엔지니어링되어 세포에 의해 받아들여지는 DNA를 초래할 수 있다. 세포가 DNA를 받아들이면, DNA는 세포가 특이적 항원을 만들도록 프로그래밍할 것이고, 이는 이후 목적하는 면역 반응을 유발할 수 있다.

[0118] 네 번째 비제한적인 암 백신은 벡터 조성물이다. 벡터 백신은 DNA 백신의 DNA를 투여하는데 사용될 수 있다. 벡터는 특정 바이러스, 박테리아, 효모 세포, 또는 피험자의 세포에서 항원 또는 DNA를 얻는데 사용될 수 있는 기타 구조물이다. 벡터는 하나 이상의 암 항원을 한번에 전달하는데 사용될 수 있기 때문에 특히 유용하며, 이는 피험자의 면역계에서 반응을 더욱 증가시킬 수 있게 할 수 있다. 벡터는 또한 (임의의 추가의 DNA 또는 항원의 부재 하에) 스스로 면역 반응을 일으킬 수 있기 때문에 특히 유용하며, 이는 DNA 및/또는 항원과 조합될 때 더 강력한 면역 반응을 가져올 것이다.

[0119] 수지상 세포는 종양의 수술적 제거 또는 절제 후 종양, 종양 층(tumor bed)에 직접적으로, 종양주위로, 종양과 직접적으로 접촉하고 있는 배출 림프절(draining lymph node)에, 종양 또는 종양이 이환된 장기에 연결되거나 공급되는 혈관 또는 림프관, 예를 들면, 문맥 또는 폐정맥 또는 동맥 등에 투여될 수 있다. 부분적으로 성숙한 수지상 세포의 투여는 종양을 위한 다른 치료, 예를 들면, 화학요법 또는 방사선 요법과 동시에 또는 이후일 수 있다. 추가로, 부분적으로 성숙한 수지상 세포는 수지상 세포의 성숙 및/또는 종양 또는 종양 근처 또는 인접부위 내에서 항원의 프로세싱에 대한 보강제로서 작용하는 또 다른 제제와 공동-투여될 수 있다. 또한, 상기 수지상 세포는 또한 종양 또는 종양 층 내 또는 주변 영역으로 이식하기 위한 서방형(slow release) 매트릭스에

제형화되거나 화합되어 세포가 종양 항원과 접촉되도록 종양 또는 종양 층으로 서서히 방출될 수 있다.

[0120] 부분적으로 성숙한 수지상 세포는 또한 제형화 및 투여 방식에 적절한 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들면, 상기 세포는 약제학적으로 허용되는 담체와 배합될 수 있고 시린지, 카테터, 캐뉼라 등으로 투여될 수 있다. 상기와 같이, 상기 세포는 서방형 매트릭스 내에 제형화될 수 있다. 상기 제형은 이러한 방식으로 투여될 때 사용된 매트릭스에 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 본 발명에 적용될 수 있는 기타 투여 방법 및 투여 방식은 숙련가에게 익히 알려져 있다.

[0121] 수지상 세포 조성물은 그 자체로 개체의 치료에 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 종양을 치료하는 임의의 다른 방법과 함께 사용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 방법은 종양의 수술적 절제, 화학요법(세포독성약물, 세포사멸제, 항체 등), 방사선 요법, 냉동요법, 근접치료, 면역 요법(항원 특이적 성숙한 활성화된 수지상 세포, NK 세포, 종양 항원에 특이적인 항체 등의 투여) 등과 함께 사용될 수 있다. 이들 방법들 중 어느 것 및 모두는 또한 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 병용 치료는 동시 또는 순차적일 수 있으며 치료 의사에 의해 결정된 바와 같이 임의의 순서로 투여될 수 있다.

[0122] 상업적으로 이용가능한 암 백신의 일 예는 시푸류셀-T 또는 프로벤지(Provence®)이다. 이는 전통적인 화학요법제 또는 호르몬 요법에 의해 치료되지 않는 진행된 전립선암을 치료하는데 사용되는 암세포 백신이다. 이러한 백신을 위해, 피험자 자신의 면역 세포를 피험자로부터 단리한 후 면역 세포를 화학물질에 노출시켜 이들을 수지상 세포로 전환시킨다. 수지상 세포를, 피험자에게 재도입될 때 전립선암에 대한 면역 반응을 생성하는 전립선 산 포스파타제(PAP)에 노출시킨다. 특히 중요한 것은, 변형된 세포가 피험자에게 재도입되면, 피험자의 면역계는 "공격 메모리"를 생성하고 피험자 내의 다른 면역 세포를 암 공격 세포로 전환시킨다.

[0123] 수지상 세포 백신의 일 예는 DCVax이다. DCVax는 암을 공격하는 면역계를 소생시키고 훈련시키도록 디자인된, 활성화된 수지상 세포(면역계의 모세포(master cell))를 이용하하는 플랫폼 기술이다. DCVax는 암에 대한 다수의 표적을 타격하는 다수의 활성 제제를 사용한다(참조: Liau, LM et al. Journal of Neurosurgery 90: 1115-1124, 1999; Prins RM et al. J Immunother. 2013 Feb; 36(2):152-7).

[0124] 암을 치료하는데 효과적인 백신을 만드는, DCVax를 포함하는 수지상 세포 백신의 3가지 주요 측면이 있다: (1) 수지상 세포 백신은 전체 면역계에서 다수의 상이한 카테고리의 면역 제제들 중의 단지 하나가 아닌, 전체 면역계를 동원하도록 디자인된다. 상기 기재된 바와 같이, DCVax는 활성화된, 훈련된 수지상 세포로 구성되며 수지상 세포는 면역계의 모세포이며, 이는 전체 면역계를 동원하거나 이를 돋는다. 완전한 면역계는 다수 유형의 항체 및 또한 항체 이외에 많은 다른 종류의 물질을 수반한다. 수지상 세포는 전체 면역계 "아미(army)"를 포함하는 이들 상이한 카테고리의 물질 모두를 서로 조합하여 그리고 서로 이들의 자연적인 관계로 동원한다. (2) 수지상 세포 백신은 피험자의 종양에서 단지 하나가 아닌 완전한 세트의 바이오마커를 표적화하도록 디자인되며, 이는 종양이 돌연변이되거나 전이되기 더욱 어렵게 할 수 있다. (3) 수지상 세포 백신은 개개인에게 맞춰지고 피험자의 종양에서 발현되는 특정 바이오마커를 표적화한다.

[0125] 피험자를 위한 수지상 세포 백신을 제조하기 위해, 피험자의 면역 세포는 채혈을 통해 수득된다. 전신 투여를 위해, 단핵구는 수지상 세포로 분화되고, 성숙되고, 활성화되고 피험자 자신의 종양 조직으로부터의 바이오마커에 결합된다. 수지상 세포로의 바이오마커에의 결합은 면역계가 공격을 필요로 하는 것에 대해 세포를 "훈련한다". 이어서 활성화된, 훈련된 수지상 세포는 매우 고순도로 단리되고 상완에 단순한 피내 주사를 통해 피험자에게 투여된다. 이어서 수지상 세포는 종양 바이오마커 정보를 남은 면역계 물질(T 세포, B 세포 등)에 전달한 후 이들 바이오마커를 갖는 세포를 표적화한다.

[0126] 종양내 투여의 경우, 단핵구는 수지상 세포로 분화되고 부분적으로 성숙된다. 이어서 상기 세포를 종양으로 직접 주사하여 투여된다. 종양으로의 주사 후, 수지상 세포는 제자리에서 종양 바이오마커를 수집하고 종양 바이오마커 정보를 남은 면역계 물질(T 세포, B 세포 등)에게 전달한 후 이들 바이오마커를 갖는 세포를 표적화한다.

[0127] 중요하게는, 각각 백신에서 활성화되고, 훈련된 수지상 세포는 수백의 T 세포 및 기타 면역 세포를 동원하는 큰 승수 효과(multiplier effect)를 갖는다. 그 결과, 소 용량의 이러한 수지상 세포는 크고 지속된 면역 반응을 동원할 수 있다.

[0128] 한 양태에서, 수지상 세포 조성물은 제1 치료로서 또는 제2 체크포인트 억제제 치료를 위한 프라이머(primer)로서 사용될 수 있다. 상기 체크포인트 억제제(들)의 투여 전 수지상 세포 조성물을 투여함으로써, 면역계(구체적으로는 T-세포)를 활성화시키고 이는 체크포인트 억제제에 대한 반응을 향상시킨다.

- [0129] 한 양태에서, 상기 체크포인트 억제제를 우선 투여하여 면역 반응의 개시를 '차단해제(unblock)'하고 나서 암 백신 요법으로 이어진다. 예를 들면, 체크포인트 억제제가 피험자에게 투여된 후 수지상 세포 조성물이 투여된다.
- [0130] 특정 양태에서, 수지상 세포 및 수용 피험자는 동일한 MHC(HLA) 하플로타입(haplotype)을 갖는다. 피험자의 HLA 하플로타입을 결정하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 관련 양태에서, 부분적으로 성숙한 수지상 세포는 수용 피험자에 대해 동종이형이다. 동종이형 세포는 통상적으로 적어도 하나의 MHC 대립유전자에 대해 매칭된다(예를 들면, 적어도 하나이지만 모든 MHC 대립유전자가 아닌 MHC 대립유전자를 공유함). 덜 통상적인 양태에서, 수지상 세포 및 수용 피험자는 서로에 대해 모두 동종이형이지만, 모두는 공통적으로 적어도 하나의 MHC 대립유전자를 갖는다.
- [0131] 투여는 치료제, 예를 들면, IL-7 또는 IL-15와 같은 인터류킨 또는 수지상 백신과 같은 백신의 투여 전, 투여와 동시에 또는 투여 후 하나 이상의 사이클 또는 용량의 체크포인트 억제제의 투여를 포함하거나 이와 반대의 투여를 포함한다. 당업자는 피험자의 암 및 이들의 면역 상태(예를 들면, T-세포, B 세포 또는 NK 세포 활성 및/또는 수)에 따라 피험자별로 치료 요법이 피험자에게 적절한지를 결정할 수 있다.
- [0132] 체크 포인트 억제제 및 치료제의 배합물은 몇몇 피험자에서 암을 치료하는데 더욱 효과적일 수 있고/있으며 면역 세포(T-세포, B 세포, NK 세포 및/또는 기타 세포)의 활성 및/또는 수를 개시하거나 가능하게 하거나 증가시키거나 향상시키거나 연장시킬 수 있거나 종양에 의한 의학적으로 유리한 반응(이의 퇴행, 피사 또는 제거 포함)을 전달할 수 있다.
- [0133] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 자가 또는 동종이형(예를 들면, 세포주 유래) 종양 항원이 결합된 자가 또는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시하거나 가능하게 하도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0134] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 자가 또는 동종이형(예를 들면, 세포주 유래) 종양 항원이 결합된 자가 또는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시키도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0135] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 자가 종양 항원에 특이적인 자가 또는 동종이형 T 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시키도록 유도하거나 향상시킨 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0136] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 생체내 항원 결합을 위한 종양으로 직접적으로 또는 종양 주위에 투여되는 자가 또는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시하거나 가능하게 하도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0137] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 생체내 항원 결합을 위한 종양으로 직접적으로 또는 종양 주위에 투여되는 자가 또는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시키도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0138] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 자가 종양 항원이 결합된 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시하도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0139] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 자가 종양 항원이 결합된 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시키도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0140] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 생체내 항원 결합을 위한 종양으로 직접적으로 또는 종양 주위에 투여되는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시하도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0141] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 생체내 항원 결합을 위한 종양으로 직접적으로 또는 종양 주위에 투여되는 동종이형 수지상 세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시키도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0142] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 생체 외에서 확장되고/되거나 활성화된 자가 항종양 T 세포를 사용하여 항종양 면역 반응을 개시시키도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.
- [0143] 특정 측면에서, 면역 반응은 체크포인트 억제제의 투여 전에 생체 외에서 확장되고/되거나 활성화된 항종양 T-

세포를 사용하여 기존의 항종양 면역 반응을 향상시키도록 유도한 후 체크포인트 억제제(들)를 투여한다.

[0144] 본 발명의 특정 양태에서, 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 체크포인트 억제제의 투여 전에 연대순으로 투여된다. 특정 양태에서, 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 체크포인트 억제제가 투여되기 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 1개월 또는 이들의 임의의 조합 전에 투여된다.

[0145] 본 발명의 특정 양태에서, 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 체크포인트 억제제와 동시에 연대순으로 투여된다.

[0146] 본 발명의 특정 양태에서, 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법은 체크포인트 억제제의 투여 후 연대순으로 투여된다. 특정 양태에서, 체크포인트 억제제는 치료적 암 백신 또는 입양 T 세포 요법이 투여되기 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 1개월 또는 이들의 임의의 조합 전에 투여된다.

[0147] 상기 기재된 측면들 모두에서, 항종양 반응 또는 면역 반응을 유도하거나 개시하거나 향상시키는 방법은 우선 체크포인트 억제제를 투여한 후 항종양 반응 또는 면역 반응을 유도하거나 개시하거나 향상시키는 제2 제제를 이후 시점에 투여하여 달성될 수 있다.

[0148] 또 다른 양태에서, 본 발명은 체크포인트 억제제의 효과를 향상시키거나 연장하거나, 피험자가 체크포인트 억제제에 반응하게 하거나, 체크포인트 억제제의 독성을 감소시키는 것을 필요로 하는 피험자에게 치료제를 체크포인트 억제제와 함께 투여함을 포함하는, 체크포인트 억제제의 효과를 향상시키거나 연장하거나, 피험자가 체크포인트 억제제에 반응하게 하거나, 체크포인트 억제제의 독성을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 피험자는 암을 갖는다. 한 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 생물학적 치료제 또는 소분자이다. 또 다른 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 단클론 항체, 사람화된 항체, 전장 사람 항체, 융합 단백질 또는 이들의 조합이다. 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질을 억제한다. 일 측면에서, 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK 1, CHK2, A2aR, B-7 패밀리 리간드 또는 이들의 조합일 수 있는 체크포인트 단백질의 리간드와 상호작용한다. 추가의 측면에서, 상기 치료제는 면역자극제, T 세포 성장 인자, 인터류킨, 항체 및 백신 또는 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 추가의 측면에서, 상기 인터류킨은 IL-7 또는 IL-15이다. 구체적인 측면에서, 상기 인터류킨은 글리코실화된 IL-7이다. 한 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포 백신이다.

[0149] 추가의 측면에서, 상기 체크포인트 억제제 및 상기 치료제는 동시에 또는 어느 순서든 순차적으로 투여된다. 추가의 측면에서, 상기 치료제는 상기 체크포인트 억제제의 투여 전에 투여된다. 구체적인 측면에서, 상기 치료제는 백신이고 상기 체크포인트 억제제는 PD-1 억제제이다. 추가의 측면에서, 상기 백신은 수지상 세포 백신이다.

[0150] 또 다른 측면에서, 상기 암은 비뇨생식기암(예를 들면, 전립선암, 신장 세포암, 방광암), 부인과암(예를 들면, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암), 폐암, 위장암(예를 들면, 비-전이성 또는 전이성 결장직장암, 췌장암, 위암, 식도암, 간세포암, 담관세포암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포암), 악성 교모세포종, 악성 중피종, 비-전이성 또는 전이성 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 악성 흑색종, 메르켈 세포 암종 또는 골 및 연조직 육종 및 혈액 신생물, 예를 들면, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수 이형성 증후군 및 급성 림프모구 백혈병을 포함하는, 임의의 고형 종양 또는 액상 암이다. 바람직한 양태에서, 상기 질환은 비-소세포 폐암(NSCLC), 유방암(예를 들면, 호르몬 무반응성 전이성 유방암), 두경부암(예를 들면, 두경부 편평세포암), 전이성 결장직장암, 호르몬 민감성 또는 호르몬 무반응성 전립선암, 결장직장암, 난소암, 간세포암, 신장 세포암, 연조직 육종 또는 소세포 폐암이다.

[0151] 추가의 측면에서, 상기 방법은 추가로 병용 요법으로의 치료 전, 치료와 동시에 또는 치료 후 피험자에게 화학요법제, 표적화된 요법 또는 방사선을 투여함을 포함한다. 추가의 측면에서, 상기 종양은 치료제 및 체크포인트 억제제의 투여 전 절제될 수 있다. 추가의 양태에서, 본 발명은 체크포인트 억제제를 생물학적 치료제와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 한 측면에서, 상기 생물학적 치료제는 백신이다.

- [0152] 구체적인 양태에서, 면역 반응은 암세포 백신을 사용하여 유도되거나 개시되거나 향상된다. 구체적으로, 상기 암 백신은 수지상 세포 백신일 수 있다. 구체적인 양태에서, 면역 반응은 항종양 T-세포를 사용하여 유도되거나 개시되거나 향상될 수 있다. 구체적인 양태에서, 면역 반응은 세포독성 T-세포의 유도를 통해 유도되거나 개시되거나 향상될 수 있다.
- [0153] 구체적인 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 구체적으로, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 고형 종양의 크기를 감소시키거나 암의 암세포 수를 감소시키는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 암세포 성장률을 늦추는데 사용될 수 있다. 본원에 기재된 방법 및 조성물은 암세포 성장률을 중지시키는데 사용될 수 있다.
- [0154] 본원에 개시된 치료제, 체크포인트 억제제, 생물학적 치료제 또는 약제학적 조성물은, 예를 들면, 경구로 또는 비경구로, 예를 들면, 정맥내로, 근육내로, 피하로, 안와내로, 관절낭내로, 복강내로, 직장내로, 수조내로, 종양내로, 혈관내로, 피내로 또는 예를 들면, 각각 피부 패치 또는 경피 이온이동법을 사용한 피부를 통한 수동 또는 촉진된 흡수에 의한 것을 포함하는 다양한 경로에 의해 개체에게 투여될 수 있다. 치료제, 체크포인트 억제제, 생물학적 치료제 또는 약제학적 조성물은 또한 병적 상태의 부위, 예를 들면, 종양에 공급되는 혈관에 정맥내로 또는 동맥내로 투여될 수 있다.
- [0155] 본 발명의 방법을 실시하는데 투여되는 제제의 총량은 비교적 짧은 기간에 걸쳐 볼루스로서 또는 주입에 의해 단일 용량으로 피험자에게 투여될 수 있거나 다수의 용량이 장기간에 걸쳐 투여되는 분할된 치료 프로토콜을 사용하여 투여될 수 있다. 당업자는 피험자에서 병적 상태를 치료하는 조성물의 양이 피험자의 연령 및 일반적인 건강 뿐만 아니라 투여 경로 및 투여되는 치료의 수를 포함하는 다수의 인자에 의존적이라는 것을 알 것이다. 이러한 인자들을 고려하여, 숙련가는 필요한 경우 특정 용량으로 조정할 것이다. 일반적으로, 조성물의 제형 및 투여 경로 및 빈도는 I상 및 II상 임상시험을 사용하여 초기에 결정된다.
- [0156] 특정 양태에서, 체크포인트 억제제는 0.01mg/kg, 0.05mg/kg, 0.1mg/kg, 0.2mg/kg, 0.3mg/kg, 0.5mg/kg, 0.7mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, 3mg/kg, 4mg/kg, 5mg/kg, 6mg/kg, 7mg/kg, 8mg/kg, 9mg/kg, 10mg/kg 또는 이들의 임의의 조합 용량으로 투여된다. 특정 양태에서 상기 체크포인트 억제제는 주당 1회, 주당 2회, 주당 3회, 2주당 1회 또는 매달 1회 투여된다. 특정 양태에서, 상기 체크포인트 억제제는 단일 용량으로, 2회 용량으로, 3회 용량으로, 4회 용량으로, 5회 용량으로 또는 6회 이상 용량으로 투여된다.
- [0157] 특정 양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 키트의 형태로 패키징된다. 특정 양태에서, 방법을 수행하고 조성물을 사용하는 지침서가 키트에 포함된다.
- [0158] 다른 양태에서, 상기 기재된 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조 물품이 제공된다. 제조 물품은 용기 및 라벨을 포함한다. 적합한 용기는, 예를 들면, 병, 바이알, 시린지 및 시험관을 포함한다. 용기는 다양한 재료, 예를 들면, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 용기는 병태를 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고 멸균한 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들면, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 관통되는 스토퍼(stopper)를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 중 활성제는 항체이다. 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨은 상기 조성물이 선택된 병태를 치료하는데 사용된다는 것을 지시한다. 제조 물품은 추가로 약제학적으로-허용되는 완충제, 예를 들면, 포스페이트-완충된 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 제조 물품은 추가로 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘, 시린지 및 사용 지침을 갖는 패키지 삽입물을 포함하는, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 기타 재료를 포함할 수 있다.
- [0159] 도면 및 실시예에 나타난 바와 같이, 신경아교종 미세환경에서 PD-1/PD-L1 음성 공동-자극 측이 특성화되고, 증가된 종양-침윤 조절 세포 집단(Tregs, iAPCs)은 용해물-펄싱된 수지상 세포 백신화와 관련된다는 것을 알게 되었다. 보강제 항-PD-1 Ab에 의한 이러한 기전의 차단은 세포독성 T 세포 활성화 및 종양으로의 트래피킹(trafficking)을 초래하고 비-억제성 종양 환경을 촉진한다. 조합적 DC 백신화 및 항-PD-1 Ab 요법은 뮤린 신경아교종 모델에서 유의미한 장기간 생존을 촉진시킨다. 이를 기전은 도표로 표시되었고 생체내의 면역 기능을 비-침입적으로 특성화하는 MR 및 신규 PET 이미지화 프로브를 사용하여 관련된 실제적인 임상 이미지화를 제공한다.
- [0160] 구체적으로, 도면은, 확립된 두개내 신경아교종을 지닌 마우스에서, 종양 용해물-펄싱된 DC 백신화가 임의의 임상적 이점은 없지만 여전히 활성화된 T 림프구의 유의미한 침윤을 초래함을 보여준다. 추가로, 억제성 골수 세포 집단은 두개내 GL261 신경아교종 내에 축적되고 이 집단은 DC 백신화 후 유의미하게 증가한다. 종양 용해물-펄싱된 DC 백신화와 함께 PD-1 차단 항체의 보조적 치료는 두개내 GL261 신경아교종 내의 억제성 골수 세포의

향상된 축적을 방지한다. 이것은 활성화된 T 림프구의 종양내 축적의 유의미한 증가, 급격한 생존 연장 및 종양에 대한 면역 메모리의 생성을 초래한다. 추가로, DC에 종양 용매물의 밤새 펄싱은 이들 세포를 활성화시키고 PD-L1의 발현을 감소시키며, 이는 억제성 골수 세포가 DC 및 대식세포의 골수-유도된 전구체 집단이기 때문에 활성화 및/또는 성숙이 억제성 면역 기능을 감소시킬 것임을 시사한다.

[0161] 당업자는, 본 개시내용을 고려하여, 다수의 변화 또는 변경이 개시된 구체적인 양태들에서 이루어질 수 있으며 본 발명의 진의 및 범위를 벗어나지 않으면서 동일하거나 유사한 결과를 여전히 얻을 수 있음을 이해해야 한다. 본 발명은 본원에 기재된 구체적인 양태들에 의한 범위로 제한되지 않아야 하며(이는 본 발명의 측면의 예시로서만 의도됨) 기능적으로 동등한 방법 및 성분도 본 발명의 범위 내에 있다. 실제로, 본원에 나타나고 기재된 것들 이외에, 본 발명의 다양한 변형이 앞선 기재내용으로부터 당업자에게 분명할 것이다.

[0162] 하기 실시예는 본 발명의 양태를 추가로 예시하도록 제공되지만, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 이것이 전형적으로 사용될 수 있는 것들일지라도, 당업자에게 공지된 다른 절차, 방법 또는 기술이 대안적으로 사용될 수 있다.

실시예 1

[0164] 신경아교종 미세환경은 DC 백신화에 의해 촉진된 항종양 면역 반응을 무효화한다.

[0165] GL261 뮤린 신경아교종으로 두개내로 이식된 C57BL/6 마우스에서 종양에 대한 내인성 면역 반응이 제한될 수 있다(도 1a). 마우스에 GL261 뮤린 신경아교종을 두개내로 이식한 후 종양 이식후 3일 및 13일째에 PBS(1x) 또는 용해물-펄싱된 DC 백신을 피하로 투여했다. 16일째에, 제2 처리 72시간 후, 마우스를 안락사시키고 비장, 림프 및 뇌 반구를 프로세싱을 위해 수거했다. 용해물-펄싱된 수지상 세포로의 백신화는 CD3+ 림프구의 유의미한 종양 침윤을 촉진시키고, 이의 대다수는 활성화된 CD8+ CD25+ 림프구이다. 이들 세포 집단의 전체적인 생리적 효과를 결정하기 위해, 2 그룹의 GL261 신경아교종-보유 마우스(대조군 및 DC 백신-처리됨)를 유지시키고 생존을 모니터링했다. DC 백신화가 거대 두개내 종양에 주어질 때 2 그룹 사이의 생존 이익은 나타나지 않았다(도 1c).

실시예 2

[0167] PD-1/PD-L1 T 세포-신경아교종 상호작용은 항-염증성 종양 미세환경을 촉진시킨다.

[0168] PD-1/PD-L1 종양-T 세포 상호작용의 효과를 평가하기 위해, Pme1-1 TCR 유전자 이식 마우스로부터 gp-100-특이적 T 세포를 항-PD-1 mAb의 존재 하에 GL261-gp100 뮤린 신경아교종 세포와 공동-배양했다. 24시간 후 수집된 상청액을 프로세싱하고 마우스 32-plex 사이토카인/케모카인 루미넥스(cytokine/chemokine Luminex) 검정으로 분석했다. 전염증성 사이토카인 IFN γ 및 TNF α는 유의미한 증가를 나타냈지만, 항-염증성 신호전달(IL-10 및 IL-4)은 PD-1 억제에 의해 감소했다. 세포독성은 T 세포에 의한 종양 사멸의 실시간, 임피던스-기반 판독을 제공하는 xCELLigence 시스템을 사용하여 평가했다. PD-1의 억제는 사실상 10시간 시점에서 더 큰 퍼센트의 종양 세포 사멸을 지지했다.

실시예 3

[0170] 신경아교종-보유 마우스에서 PD-1/PD-L1 음성 공동-자극 축의 억제는 항종양 반응을 촉진시킨다.

[0171] 백신화 처리에 의해 촉진된 항종양 반응은 종양 미세환경에서 PD-1/PD-L1 신호전달에 의해 완화된다는 것이 가정되었다. DC 백신-처리된 마우스로부터 수거된 종양에 존재하는 PD-L1을 발현시키는 유의미한 억제성 골수 집단(Ly6C+)이 존재했으며, 이는 대조군 마우스에서는 존재하지 않았다. 이 집단을 평가하기 위해, 대조군 및 DC-백신 처리에 대해 2개의 추가 요법들을 시험했다: 항-PD-1 mAb-처리 및 항-PD-1 mAb-처리된 그룹을 사용한 병용 DC 백신. 이식후 16일째(제2 처리 후 72시간)에 프로세싱을 위해 비장, 림프 및 뇌 반구를 수거했다. DC 백신/항-PD-1 처리된 마우스에서 유의미하게 활성화된 세포독성 TIL 및 림프절이 관찰되었다. 억제성 골수 집단이 DC 백신/항-PD-1 처리된 마우스에서 지속되더라도, DC 백신 처리 단독과 비교하여 유의미하게 감소되었다. 항-PD-1 마우스에서, 억제성 골수 집단은 유의미하게 검출되지 않았다. 치료 이익을 평가하기 위해, 마우스는 이식되고, 처리되고 생존에 대해 모니터링되었다. 병용 DC 백신/항-PD-1 처리는 다른 그룹에 비해 유의미한 생존 이익을 나타냈다.

[0172] 억제성 골수 집단은 Ly6C 소모 Ab 또는 임상적으로-관련된 CSF1r 억제 약물 PLX3397을 사용하여 소모되었다. GL261-보유 마우스에서 이들 세포의 소모는 DC 백신/항-PD-1로 처리된 마우스에서 관찰된 생존 이익을 완전히 회복시켰다. 이식후 16일째(제2 처리 후 72시간)에 프로세싱을 위해 비장, 림프 및 뇌 반구를 수거했다. 종양

미세환경에서 이들 Ly6C+ PD-L1+ 세포의 부재가 확인되었고 CD3+ CD8+ CD25+ 활성화된 림프구의 유의미한 종양-침윤 집단이 관찰되었다. DC 백신/항-PD-1로 처리된 마우스에서 CD8+ 세포의 소모는 상기 처리와 관련된 모든 치료 이익을 없애버렸다(도 4c). 조직 수거에 의해 전신적으로 그리고 종양 부위에서 모두 활성화된 림프구의 부재를 확인했다.

[0173] 실시예 4

PET 및 MR 이미지화 기법의 신규 사용은 DC 백신/항-PD-1 요법의 비-침습성 평가를 가능하게 한다

DC 백신/항-PD-1 요법의 치료 진행은 MRI(자기 공명 영상) 및 PET(양전자 방출 단층촬영) 이미지화 기술을 사용하여 모니터링될 수 있음이 가정되었다. GL261로 두개내로 이식된 마우스를 4개의 처리 그룹(비처리, DC 백신, 항-PD-1 mAb 및 DC 백신/항-PD-1)으로 분리하고 종양에 트래피킹된 활성화된 림프구를 이미지화하도록 [18F]-L-FAC 또는 [18F]-D-FAC PET 프로브로 이미지화했다. 이식 후 21일째에, 마우스를 브루커 7T MR 스캐너(UCLA)를 사용하여 이미지화하여 대비전 및 대비후 T1-가중된 이미지, T2 맵 및 역동 대비-증강(dynamic contrast-enhancing: DCE) 및 역동 자화율 대조(dynamic susceptibility contrast: DSC) 관류 데이터를 얻었다. 이미지화 후, 마우스를 안락사시키고 절편법 및 IHC를 위해 뇌 조직을 수거했다. PET 및 대비후 T1-가중된 MR 데이터를 공동-기록(co-resister)하여 양성 PET 프로브 신호에 대한 양성 MR 종양 대비를 도표로 나타냈다. DC 백신-처리된 그룹 및 DC 백신/항-PD-1 처리된 그룹은 다른 처리 그룹과 비교하여 감소된 종양 부담(tumor burden) 및 증가된 면역 침윤을 나타냈다. 양성 PET 및 MR 신호는 각각 상응하는 해부 뇌 조직 단면에 대한 CD3+ 및 Ki-67+ IHC 염색과 관련되었다.

[0176] 실시예 5

[0177] 재료 및 방법

세포주. 뮤린 신경아교종 세포주, GL261 및 GL261-gp100을 완전 DMEM(Mediatech, Inc. Herndon, VA)(10% FBS(Gemini Bio-Products, West Sacramento, CA), 1%(v/v) 페니실린 및 스트렙토마이신(Mediatech Cellgro, Manassas, VA)으로 보충됨)에 유지시키고 37°C에서 5% CO₂의 가습 대기에서 배양했다.

Pmel-1 T 세포의 시험관내 활성화. 비장 및 림프절을 Pmel-1 TCR 유전자 이식 마우스(n=2)로부터 수거하고, 2% FBS로 보충된 XVIVO-15(Lonza, Walkersville, MD) 중에서 사람 IL-2(100IU/mL, NCI 전임상 리포지토리, 개발 치료제 프로그램(Preclinical Repository, Developmental Therapeutics Program)) 및 hgp10025-33 웹타이드(1ug/mL, NH2-KVPRNQDWL-OH, Biosynthesis, Inc., Lewisville, TX)와 함께 배양했다. 72시간 후, 세포를 PBS 1x로 세척하고 1 x 10⁶세포/mL의 농도로 IL-2 및 hgp10025-33 웹타이드에서 배양했다.

PD-1의 시험관내 억제. 세포를 1uM 항-PD-1 Ab(BioXCel, West Lebanon, NH)로 보충된 상기 기재된 적절한 배지에서 배양했다. 배양 동안, 배지를 24시간마다 새롭게 제조된 항-PD-1 Ab를 갖는 배지로 대체했다.

사이토카인/케모카인 루미네스 검정. Pmel T 세포 및 GL261-gp100 세포를 1uM 항-PD-1 Ab로 보충된 완전 DMEM 배지에서 10:1의 작동인자:표적(E:T) 비율로 공동배양했다. 24시간 후 상청액을 수집하고 액체 질소에서 급속 냉동시켰다. 마우스 32-plex 사이토카인/케모카인 루미네스 검정에 의한 분석을 리드 일레인 박사(Dr. Elaine Reed, UCLA)와 공동작업으로 수행했다.

xCELLigence 실시간 세포독성 검정. 종양 세포의 세포독성 사멸을 xCELLigence 실시간 세포 분석기 시스템(Acea Biotechnology, San Diego, CA)으로 평가했다. 표적 GL261-gp100 세포를 배지 150 μL에서 플레이팅했다(10⁵ 세포/웰). 웰 바닥으로 종양 세포를 밤새 부착한 후, 작동인자 세포(Pmel T 세포)를 10:1의 E:T 비율로 첨가했다. 대조군의 경우, 최대 세포 방출은 종양만을 함유하는 추가의 웰에 1% 트리톤 X-100의 첨가에 의해 수득되었다. 세포 지수(cell index: CI) 값(상대적인 세포 임피던스)을 24시간에 걸쳐 수집했다. 작동인자 세포 플레이팅 직전 값들을 최대 CI 값으로 정규화했다. 임의의 시점에서의 정규화된 CI(nCI) 대 초기 작동인자 세포 플레이팅의 nCI의 비율을 계산하여 퍼센트 종양 용해를 도표로 나타냈다(23).

GL261 용해물 제조. GL261 신경아교종 세포를 완전 DMEM 배지에서 배양하고 확장시켰다. 이어서 세포를 수거하고 몇몇 동결-용융 사이클을 통과시킨 후 혼탁액을 여과했다. 용해물 농도를 브래드포드 단백질 검정을 사용하여 정량했다.

콜수-유래 DC 및 백신화. 뮤린 콜수 전구 세포로부터의 DC의 제조는 이전에 공개된 대로 제조되었다(참조: Prins et al., Cancer Research 63:8487 (2003)). 간략하게, 콜수 세포를 완전 RPMI(Mediatech, Inc.

Herndon, VA)(10% FBS, 1%(v/v) 페니실린 및 스트렙토마이신으로 보충됨) 중에서 37°C에서 5% CO₂의 가습 대기에서 밤새 배양했다. 다음날, 비부착 세포를 수집하고 뮤린 인터류킨-4(IL-4, 400IU/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN) 및 뮤린 과립구-대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF, 100ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN)와 함께 플레이팅했다. 4일째에, 부착 세포에 동일한 사이토카인을 갖는 신선한 배지를 재공급했다. 7일째에, DC를 수거하고 완전 RPMI 중에서 1 x 10⁶ 세포/ml로 재현탁시키고 GL261 용해물(250 μg/mL)로 펼성했다. 8일째에, DC를 수집하고 PBS 1x 중에서 2 x 10⁶ 세포/mL로 재현탁시키고 마우스당 세포 혼탁액 0.2ml로 주사용으로 바로 제조했다. 주사는 등쪽 4 부위에서 피하로(s.c.) 주어졌다.

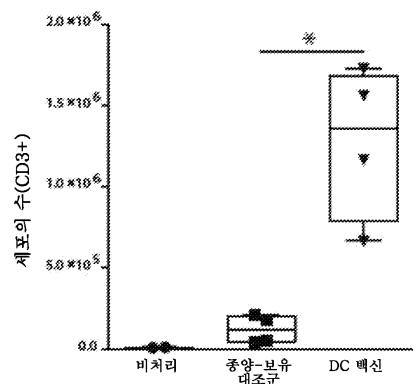
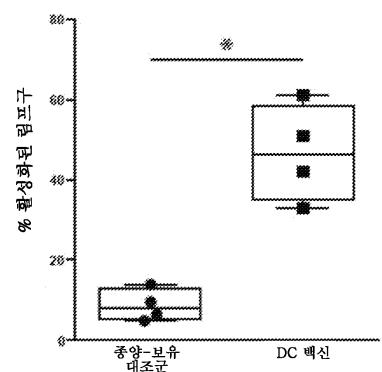
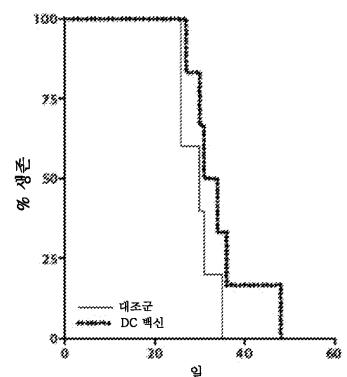
[0185] 두개내 신경아교종 이식물. 6 내지 10주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 기관 사육 콜로니(institutional breeding colonies)로부터 입수했다. 모든 마우스를 UCLA의 실험 방사선 종양학 학부의 AALAC-승인된 동물 수용시설에서 한정된-플로라(defined-flora) 병원체가 없는 조건 하에 사육하고 유지시켰다. 마우스를 UCLA 동물 관리 방침 및 승인된 동물 프로토콜에 따라서 다루었다. 마우스를 케타민/자일라진의 복강내(i.p.) 주사로 마취시켰다. 제모하고 포비돈-도말린 두피를 절개한 후, 정위 장치(stereotactic apparatus)에 고정된 마우스의 머리를 치과 드릴을 사용하여 브레그마에서 2.5mm 측면 두개골에 천두공을 만들었다. GL261 신경아교종 세포(2 μl PBS 중 2 x 10⁴)를 26-게이지 바늘이 장착된 멀균 해밀턴 시린지로 정위적으로 주사했다. 두개내 주사는 경질막 아래 3.5mm의 깊이에 2분에 걸쳐 계속되었다. 세포의 완전한 주입 후에 시린지를 추가 몇 분 동안 뇌에서 유지시킨 후 서서히 빼내 연수막 공간 내로의 세포의 누출을 방지했다. 두개내 종양 이식 후, NSG 마우스를 치료 그룹(n은 6 내지 16임)으로 무작위로 배정했다.

[0186] 생체내 항-PD-1 mAb 처리. 적절한 처리일에 항-PD-1 mAb를 250mg/kg(대략 250 μg/마우스)로 i.p. 투여했다.

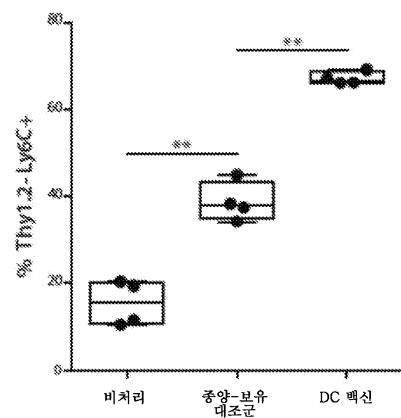
[0187] 조직 수거, 면역조직화학 및 유세포측정. 21일째에 마우스로부터 비장, 램프절 및 종양을 수거했다. 절편법 및 면역조직화학을 필요로 하는 경우에, 조직을 아연 고정액(1x, BD Biosciences, San Jose, CA)에 24시간 동안 두고 이후 파라핀 액스에 포매되기 전에 70% 에탄올로 옮겼다. 비장 및 램프절을 70μm 세포 스트레이너(strainer)를 통과시켜 단일-세포 혼탁액을 생성했다. 저장성 용해(hypotonic lysis) 후 램프구를 수득하고 트리판 블루 배제(trypan blue exclusion)를 사용하여 계수했다. 종양 침윤 램프구(TIL)의 수를 측정하기 위해, 종양-보유 반구를 조심스럽게 칭량하고 이후 외과용 메스로 잘게 썰었다. 이어서 조직을 로테이터 상에서 DNase와 함께 콜라제나제에 24시간 동안 두고, 이후 30%:70% 퍼콜(Percoll) 구배를 사용하여 램프구를 단리했다. 종양 내의 작은 단핵 세포를 트리판 블루 배제를 사용하여 계수했다. 대략 1x10⁶ 램프구가 염색에 사용되었다. 종양-보유 반구당 CD8+ 세포의 총수를 측정함으로써 TIL을 계산했다. CD3, CD4, CD8, CD25, FoxP3, Ly6C, PD-1 및 PD-L1에 대한 형광색소 접합된 항체를 바이오레전드(Biolegend)로부터 입수했다. 모든 FACS 분석은 LSRII(BD Biosciences)를 사용하여 수행되었다. 동형 특이적 대조 항체를 토대로 판문을 설정했다(데이터는 도시되지 않음). FlowJo 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했다.

[0188] 생체내 PET 및 MR 이미지화. 마우스를 O₂/N₂ 유동 하에 1 내지 3% 이소플루란으로 진정시키고 호흡을 모니터링 했다. 마우스를 TP500 워터 펌프(Gaymar Solid State)를 사용하여 순환되는 37°C로 가열된 물로 따뜻하게 했다. PET 프로브의 꼬리-정맥 투어를 스캔 1시간 전 수행했다. PET 스캐닝. 스캔 동안 적절한 시점에 조영제(contrast agent)를 투여하도록 꼬리-정맥 카테터삽입을 수행했다. 모든 이미지는 주문 제작된 2.2-cm RF 베드케이지 코일(birdcage coil)을 갖춘 7T 부르커 바이오스펙 시스템(Bruker Biospec system)에서 입수되었다. 본 발명자들은 고속 저각 영상 획득(fast low-angle shot: FLASH)을 사용한 2차원 대비전 T1-가중된 이미지; 정량적 T2 맵(10ms의 간격으로 10 내지 160ms 범위의 TE로 16 에코), 78μm² 평면내 해상도 및 1mm 절편 두께의 계산을 위한 다중절편 다중-에코(multislice multi-echo: MSME) 스판-에코 T2-가중된 스캔; 2 내지 20°의 플립각(flip angle)을 사용하여 대비전 T1 맵의 계산을 위한 다중 플립각 3D FLASH T1-가중된 이미지; 및 고해상도 3D 대비후 T1-가중된 이미지를 수집했다.

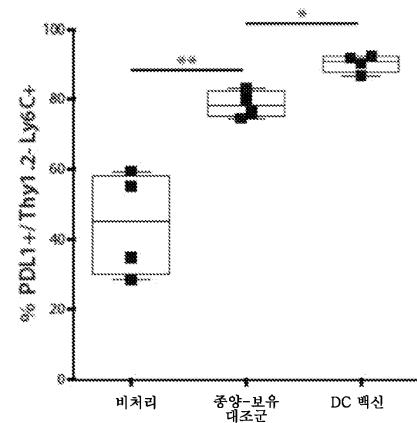
[0189] 본 발명이 상기 실시예를 참조하여 기재되더라도, 변형 및 변화가 본 발명의 진의 및 범위 내에 포함됨이 이해될 것이다. 따라서, 본 발명은 하기 청구범위로만 한정된다.

도면**도면1a****도면1b****도면1c**

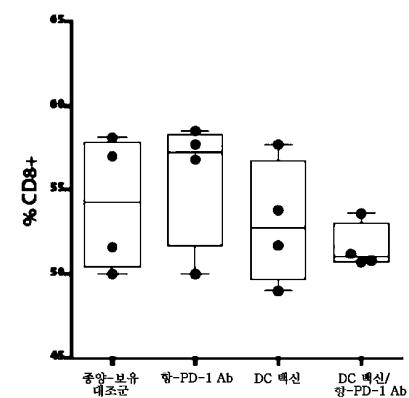
도면2a



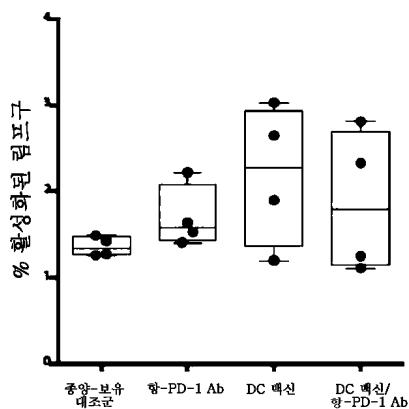
도면2b



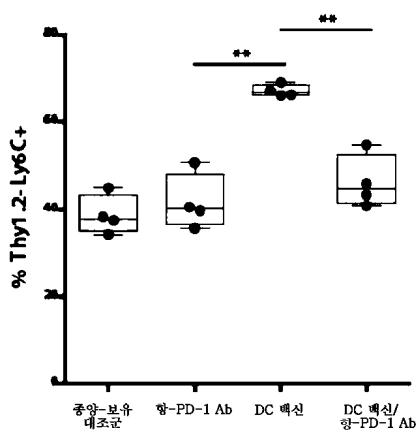
도면3a



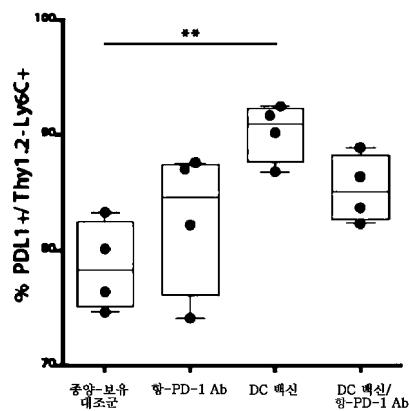
도면3b



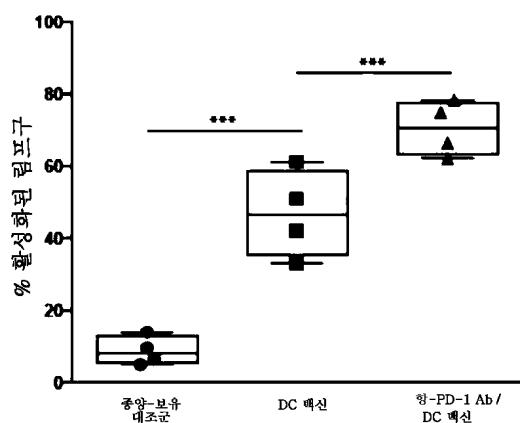
도면3c



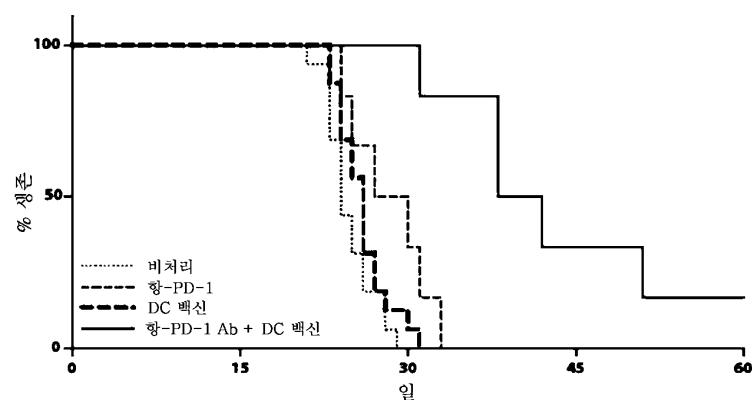
도면3d



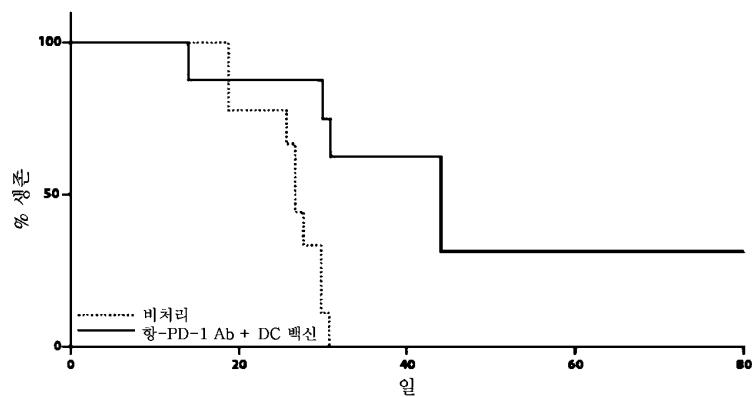
도면3e



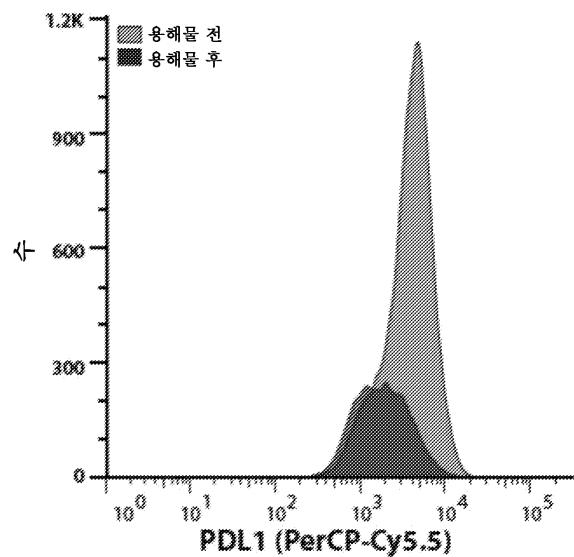
도면3f



도면3g



도면4a



도면4b

