



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0029280
(43) 공개일자 2021년03월15일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4025 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 31/4025 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7006180</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2019년07월31일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2021년02월26일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2019/044421</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2020/028532
국제공개일자 2020년02월06일</p> <p>(30) 우선권주장
62/713,823 2018년08월02일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210</p> <p>(72) 발명자
버틀러 브루스
미국 텍사스주 75039 어빙 워터뷰 드라이브 5715 왕 잉
미국 텍사스주 75205 달라스 에이피티. 117 드루 이드 엘렌 4501</p> <p>(74) 대리인
장훈</p> |
|--|---|

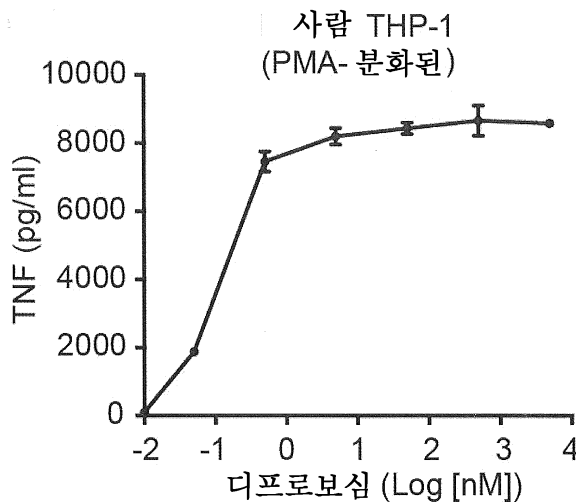
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **질환을 제거하기 위한 체크포인트-억제 항체와 상승작용하는 TLR1/2 작용제 디프로보심의 애쥬번트 효과**

(57) 요약

잠재적 사람 및 마우스 Toll-유사 수용체 (TLR)1/TLR2 작용제는 확인되고 최적화하된 디프로보심이고, 이는 사람 THP-1 세포에서 110 pM 및 일차 마우스 복막 마크로파지에서 1.3 nM의 EC₅₀을 나타내었다. 마우스에서, 디프로보심-보강된 오브알부민 면역접종은 항원-특이적 체액 및 CTL 반응을 촉진하고, 항-PD-L1 치료제와 상승작용하여 종양 성장을 억제하고, 장기간 항-종양 기억을 생성하고, 무린 흑색종 B16-OVA와 생착된 마우스의 생존을 치유 또는 연장시켰다. 디프로보심은 명반보다 더 높은 빈도의 종양 침윤성 백혈구를 유발하고, 이의 CD8 T 세포는 면역접종 플러스 항-PD-L1 치료제의 항종양 효과에 필수적이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 9/08 (2013.01)

A61P 31/04 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

명세서

청구범위

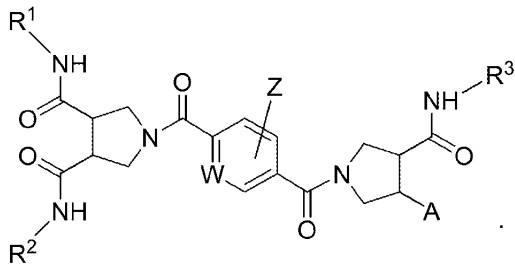
청구항 1

포유동물에서 질환에 걸린 세포의 성장을 억제하는 방법으로서, 상기 질환에 걸린 세포는, 상기 질환이 없는 동일한 유형의 세포에는 부재하거나, 상기 질환에 걸린 세포와 비교하여, 무-질환(disease-free) 세포에서 상당히 감소된 수로 존재하는 마커 분자를 나타내고, 상기 방법은:

- a) 상기 포유동물에게 (i) 애주번트(adjutant)-충분량의 디프로보심(Diprovocim) 화합물, (ii) T 세포-자극량의 면역 체크포인트(checkpoint) 억제제, 및 (iii) 면역량 (immunizing amount)의 상기 마커 분자 또는 이의 부분을 투여하는 단계;
- b) 상기 면역접종된(immunized) 포유동물을 상기 포유동물이 상기 면역접종에 대한 면역 반응을 일으키기 위해 충분한 시간 동안 유지시키는 단계를 포함하고;

여기서, 상기 디프로보심 화합물은 구조식 V의 구조에 상응하는, 방법:

화학식 V



상기 화학식 V에서,

-A는 -H (하이드라이도(hydrido)) 또는 -C(O)NH-R⁴이고;

R¹, R², R³ 및 R⁴는 동일하거나 상이하고, 2-(4-플루오로페닐)에틸, 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 또는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹이고, 단:

- 1) R¹, R², R³ 및 R⁴ (R¹⁻⁴) 중 적어도 2개 또는 R¹, R², 및 R³ (R¹⁻³) 중 적어도 2개는 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이거나, R¹⁻⁴ 각각은 2-(4-플루오로페닐)에틸 그룹이고,
- 2) R¹⁻⁴ 각각이 2-(4-플루오로페닐)에틸이 아닌 경우, 적어도 하나의 도시된 피롤리딘디카복스아미도 그룹은 (S,S) 배치를 갖고, C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹 이외의 도시된 R 치환체 각각은 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이고,
- 3) -A가 -C(O)NH-R⁴인 경우, R¹⁻⁴ 중 2개 이하는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹이고,
- 4) A가 하이드라이도인 경우, R¹⁻³ 중 하나는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹일 수 있고, 도시된 R³-함유 피롤리딘디카복스아미도 그룹은 R 또는 S 배치 중 어느 하나, 또는 둘 다의 배치의 혼합을 가질 수 있고;

-Z는 할로젠, -H, -NH₂, -OH, -OCH₃, -NO₂, -O(CH₂CH₂)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONH(CH₂CH₂)_nCH₂CH₂CO₂H, -NHCOCH₂O-(CH₂CH₂)_nCH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCHCO₂H(CH₂CO₂H), -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂)_nCH₂CH₂CO₂H,

$-OCH_2CONHCH_2CONHCH[(CH_2)_4NH_2]CO_2H$, $-OCH_2CONHCH_2CONHCH(CH_2OH)CO\{NHCH[(CH_2)_4NH_2]CO\}_mNHCH-[(CH_2)_4NH_2]CO_2H$ (서열번호: 3-8), $-OCH_2CONHCH_2CO\{NHCH[(CH_2)_4NH_2]CO\}_pNHCH[(CH_2)_4NH]CO_2H$ (서열번호: 9-13) 및 $-OCH_2CONHCH_2CO\{NHCH(CH_2OH)CO\}_qNHCH(CH_2OH)CO_2H$ (서열번호: 14-18) 중 하나 이상이고;

W는 질소 (N) 또는 CH이고;

"n"은 평균 값이 1 내지 약 8인 수이고;

"m"은 이의 값이 1 내지 약 6인 수이고; "p"는 이의 값이 1 내지 약 6인 수이고;

"q"는 이의 값이 1 내지 약 6인 수이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 디프로보심 화합물, 면역 체크포인트 억제제, 및 마커 분자가 면역접종 억제학적 조성물에 용해 또는 분산되어 투여되는, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 디프로보심 화합물, 면역 체크포인트 억제제, 및 마커 분자 또는 이의 부분이 별도의 면역접종 억제학적 조성물에 용해 또는 분산되어 투여되는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 디프로보심 화합물 및 마커 분자 또는 이의 부분이 동일한 면역접종 억제학적 조성물에 용해 또는 분산되어 투여되는, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 디프로보심 화합물, 면역 체크포인트 억제제, 및 마커 분자 마커 분자 또는 이의 부분이 동일한 면역접종 억제학적 조성물에 함께 용해 또는 분산되어 투여되는, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 면역접종 조성물이 수성 매질인, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제가 파라토프-함유 분자인, 방법.

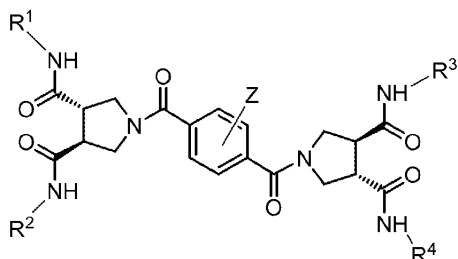
청구항 8

제1항에 있어서, 화학식 V에서 도시된 각각의 피롤리딘디닐디카복사아미도 그룹의 치환체는 (S,S) 배치를 갖는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, W가 CH이고, 상기 디프로보심 화합물이 구조식 Ia를 갖고, 여기서, R^{1-4} 및 Z 모이어티 (moieties)가 상기한 바와 같은, 방법.

화학식 Ia



청구항 10

제1항에 있어서, -Z는 -H인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, R¹⁻⁴ 각각이 (1S,2R) 배치를 갖는 트랜스-2-페닐사이클로프로필 그룹 또는 트랜스-2-(4-플루오로페닐)사이클로프로필 그룹인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 질환에 걸린 세포가 암성이거나 병원체-감염된, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 질환에 걸린 세포가 암성 고형 종양 세포인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 마커 분자가 CD96, CD20, DLL4, CD55, TIM-3, CXCR1, CD54, CD114, LGR5, CD105, CD56, CD13, CD271, CD34, CXCR4, CD26, CD117, CD10, CD146, Notch2, CD49f, CD24, ABCG2, PODXL-2, Cripto-1, CD326, CD90, CD133, SSEA1, TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA4, SSEA3, CD151, CD340 및 CD44 중 하나 이상인, 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 암성 고형 종양 세포가 골육종 세포, 카포시 육종 세포, 흑색종 세포, 전립샘 암 세포, 아교모세포종 세포, 소세포 폐 암종 세포, 유방 암 세포, 간 암 세포, 결장 암 세포, 난소 암 세포, 신장 암 세포, 위 암 세포, 신경모세포종 세포, 췌장 암 세포, 및 호지킨 림프종 중 하나 이상으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 질환에 걸린 세포가 병원체-감염된, 방법.

청구항 17

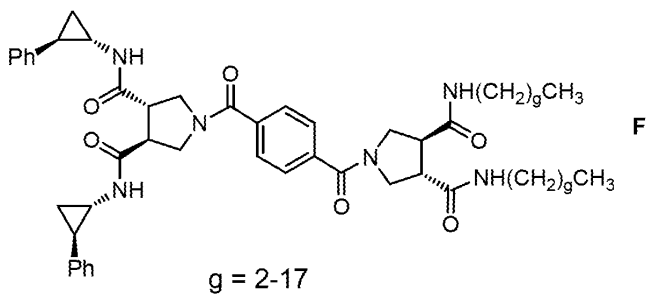
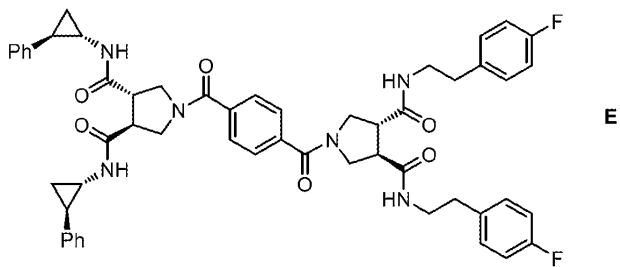
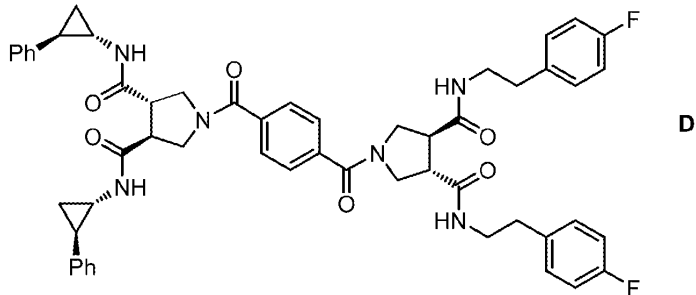
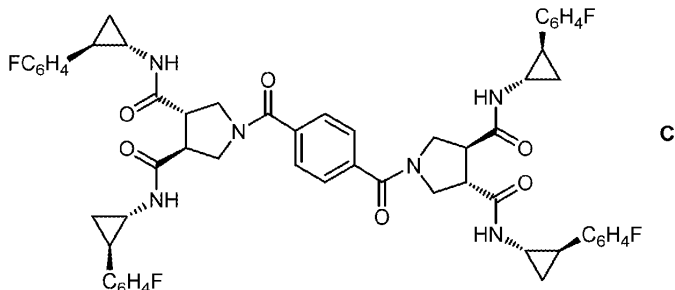
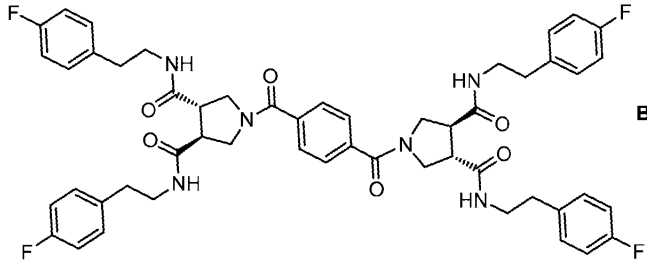
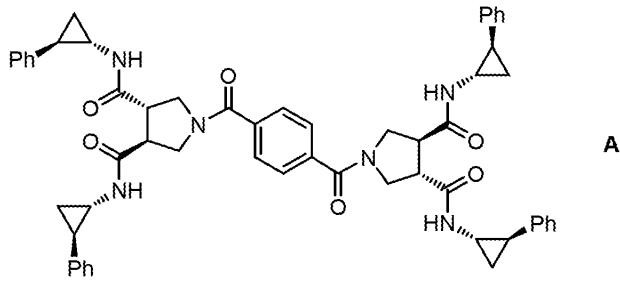
제16항에 있어서, 상기 감염 병원체가 바이러스, 박테리아, 진균, 및 단세포 기생충 중 하나 이상인, 방법.

청구항 18

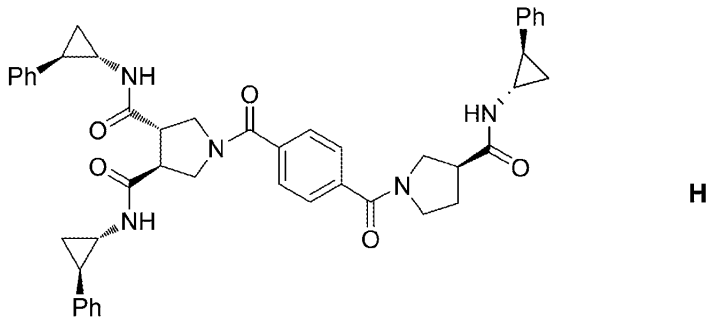
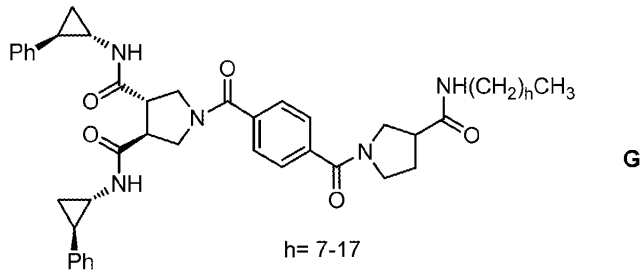
제17항에 있어서, 상기 마커 분자가 피. 팔시파룸(*P. falciparum*), 피. 비박스(*P. vivax*), 피. 베르게이(*P. bergeri*) 및 피. 요엘리(*P. yoelii*)의 포자소체 단백질; 인플루엔자 바이러스의 M2e 단백질, 적혈구응집소 단백질 또는 뉴라미니다제 단백질 중 하나 이상인, 방법.

청구항 19

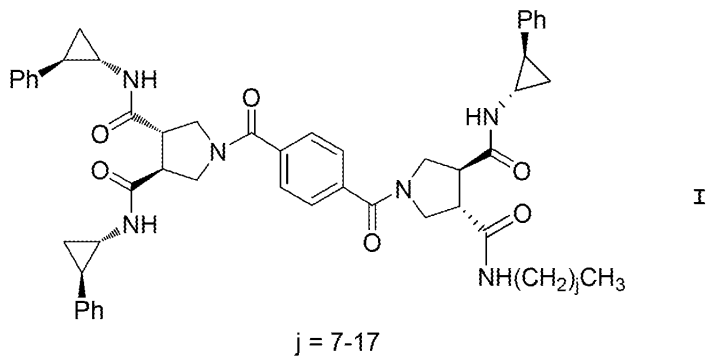
제1항에 있어서, 상기 디프로보심 화합물이 화학식 A, B, C, D, E, F, G, H 및 I 중 하나 이상으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 구조식을 갖는, 방법.



g = 2-17



및



발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 지원

[0002] 본 발명은 미국 국립보건원에 의해 수여된 AI125581하에 정부 지원으로 시행되었다. 정부는 본 발명에 대한 일부 권리를 갖는다.

배경 기술

[0003] 배경 기술

[0004] 수지상 세포 (DCs) 및 마크로파지를 포함하는 항원-제시 세포 (APCs)를 활성화시킴에 의해, 애주번트 (adjuvants)는 병원체 또는 암을 사멸시키는 세포독성 T 림프구 (CTLs)의 자연 기능을 촉발시키는 잠재력을 갖는다. TLR 작용제를 포함하는 다수의 애주번트는, APCs를 유발하여 항원을 제시하는 APCs 상 선천 면역 수용체에 관여하고, 사이토킨을 생성하고, 항원-특이적 CD8 T 세포에 대한 공동자극 신호 (1, 2)를 제공한다. 이들 신호에 반응하여, CD8 T 세포는 이들의 표적 항원을 발현하는 감염된 세포 또는 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 CTLs로 증식 및 분화한다. 추가로, 이러한 신호는 CD4 T 세포를 활성화하여, Th1 또는 Th2 T 조력 세포로 이들의 확대 및 분화를 유도한다 (3).

[0005] 개선된 애주번트 기술의 가장 중요한 표적 중 하나는 암 면역요법의 분야에 있고, 여기서, 적응 면역계는 암 관

린 항원 또는 신생-항원의 이들의 발현에 기초하여 암 세포를 사멸시키기 위해 이용된다 (4, 5). 암 면역요법의 효과는 종양-특이적 CTLs의 생성 및 활성화 (5, 6) 및 종양 세포의 사멸 및 장기간 지속되는 항-종양 기억 반응을 야기하는 이들의 생체내 활성 유지에 좌우된다 (5). 따라서, 면역 체크포인트(checkpoint) 억제제, 예를 들면, 항-PD-1, 항-PD-L1 및 항-CTLA-4는, CTL 활성화를 억제하는 경로 차단에서 이들의 작용을 통해 흑색종 및 다른 암의 치료에서 주목할 만한 임상적 성공을 성취하였다 (7, 8).

[0006] 그러나, 체크포인트 차단에 민감한 것으로 알려진 이들 종양 중에서도, 가능하게는 종양-반응성 CTLs의 불충분한 수치 또는 활성화, 또는 이들의 종양 침투 실패 때문에, 단지 약 20%의 반응율이 PD-1/PD-L1 항체 치료에 대해 보고되었다 (5, 9). 이들 결핍은 암 환경에 의해 유도된 면역억압에 의해 악화될 수 있다.

[0007] 추가로, T 세포 지원의 부족은, 적어도 부분적으로, 다양한 병원체 뿐만 아니라 암-관련 세포 표면 항원에 대하여 다수의 합성 백신에 의해 나타나는 활력의 부족에 원인이 되는 것으로 고려된다.

[0008] TLR 리간드가 적응 면역 반응 (10, 11) 신호전달에서 어댑터 단백질 (MyD88, TRIF, TRAM, MAL), 키나제, 및 유비퀴틴 리가제를 통해 NF-κB 및 IRFs를 활성화시켜 애주번트로서 작용하는 것이 오랜 동안 공지되어 왔다 (12-14). 이들 및 다른 전사 인자는 선천 면역 반응을 수행하는 수천개의 유전자의 발현을 유도한다 (15). 수개의 뉴클레오타이드-기반 애주번트, 예를 들면, TLR3 작용제 폴리 I:C (9), TLR9 작용제 CpG (16), 및 STING 작용제 cGAMP (6)가 암 치료를 위한 전-임상 모델에서 면역 체크포인트 억제제의 효능을 개선시키는 것으로 보고되었다.

[0009] 이들 접근은 체크포인트 억제제가 작용할 수 있는 종양-특이적 CTLs의 수를 증가시키는 것을 목적으로 한다. 그러나, 이들은 천연 TLR 리간드에 주로 의존하고, 이는 합성하기 어렵고, 일부 경우에, 상당히 독성인데, 그 이유는 아마도 이들이 생체내 널리 산재하고, 골수 세포를 무차별로 활성화시켜 사이토킨 발작을 일으키기 때문이다 (17). 우수한 약리학적 성질, 주요 애주번트 설계 원리를 학습할 수 있는 한정된 구조 및 분자 메커니즘을 갖는 작용제의 개발이 추구되었다.

[0010] 합성 화합물의 라이브러리를 선별하여, 잠재적 사람- 및 마우스-활성 TLR1/2 작용제, 디프로보심(Diprovocim)은, 어떠한 미생물 TLR 작용제와도 구조적 유사성이 없는 것으로 확인되었다. 하기한 바와 같이, 디프로보심은 예시적으로 B16-OVA 흑색종 모델에서 암 항원 및 면역 체크포인트 차단을 병용한 경우 마우스에서 강력한 애주번트 활성을 도출하고, 성공적으로 종양 성장을 억제하고, 생존을 연장한다.

발명의 내용

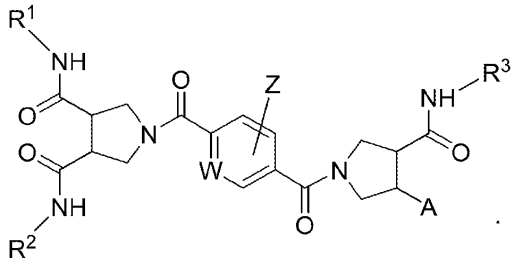
[0011] 발명의 간단한 요지

[0012] 애주번트는 적응 면역 반응을, 때때로 공지되지 않은 메커니즘을 통해 향상시키고, 암 항원에 대한 체액 및 세포 반응 둘 다를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 본원에 기재된 발명은 마우스 및 사람에서 선천 면역 수용체 TLR2/TLR1을 표적화하는 합성 화학적 애주번트 디프로보심의 상승적 면역학적 효과를 나타내는데, 질환에 걸린 세포 마커 면역원 분자 및 체크포인트 억제제와 함께 사용되는 경우 개별적인 성분 또는 이들 성분 중 어느 2개 이상의 사용과 비교하여 질환에 걸린 세포의 성장 억제시 상승적 효과를 제공한다.

[0013] 따라서, 본 발명은 포유동물에서 질환에 걸린 세포의 성장을 억제하는 방법을 고려한다. 이들 질환에 걸린 세포는, 상기 질환이 없는 동일한 유형의 세포에는 부재하거나, 상기 질환에 걸린 세포와 비교하여, 무-질환 세포에서 상당히 감소된 수로 존재하는 마커 분자를 발현한다. 고려되는 방법은: a) 질환에 걸린 포유동물에게 (i) 애주번트-충분량의 디프로보심 화합물, (ii) T 세포-자극량의 면역 체크포인트 억제제, 및 (iii) 면역량 (immunizing amount)의 질환 마커 분자를 투여하여 이를 필요로 하는 질환에 걸린 포유동물을 면역접종하는 단계를 포함한다. 면역접종된 포유동물은 b) 포유동물이 면역접종에 대한 면역 반응을 일으키고 질환에 걸린 세포의 성장을 억제하기 위해 충분한 시간 동안 유지된다.

[0014] 고려되는 디프로보심 화합물은 구조식 V의 구조에 상응한다:

[0015] 화학식 V



[0016]

[0017] 상기 화학식 V에서,

[0018] -A는 -H (하이드라이도(hydrido)) 또는 -C(O)NH-R⁴이고;

[0019] R¹, R², R³ 및 R⁴는 동일하거나 상이하고, 2-(4-플루오로페닐)에틸, 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 또는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹이고, 단:

[0020] 1) R¹, R², R³ 및 R⁴ (R¹⁻⁴) 중 적어도 2개 또는 R¹, R², 및 R³ (R¹⁻³) 중 적어도 2개는 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이거나, R¹⁻⁴ 각각은 2-(4-플루오로페닐)에틸 그룹이고,

[0021] 2) R¹⁻⁴ 각각이 2-(4-플루오로페닐)에틸이 아닌 경우, 적어도 하나의 도시된 피롤리딘디카복사미도 그룹은 (S,S) 배치를 갖고, C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹 이외의 도시된 R 치환체 각각은 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이고,

[0022] 3) -A가 -C(O)NH-R⁴인 경우, R¹⁻⁴ 중 2개 이하는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹이고,

[0023] 4) A가 하이드라이도인 경우, R¹⁻³ 중 하나는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹일 수 있고, 도시된 R³-함유 피롤리딘디카복사미도 그룹은 R 또는 S 배치 중 어느 하나, 또는 둘 다의 배치의 혼합을 가질 수 있고;

[0024] -Z는 할로젠, -H, -NH₂, -OH, -OCH₃, -NO₂, -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -NHCOCH₂O-(CH₂CH₂O)_nCH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCHCO₂H(CH₂CO₂H), -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH[(CH₂)₄NH₂]CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CH₂OH)CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_mNHCH-[(CH₂)₄NH₂]CO₂H (서열번호: 3-8), -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_pNHCH[(CH₂)₄NH]CO₂H (서열번호: 9-13) 및 -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH(CH₂OH)CO}_qNHCH(CH₂OH)CO₂H (서열번호: 14-18) 중 하나 이상이고;

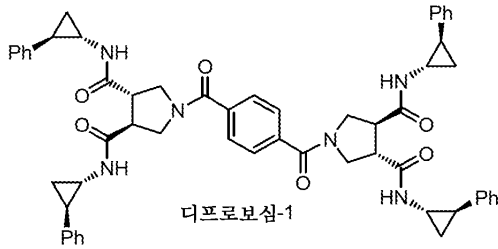
[0025] W는 질소 (N) 또는 CH이고;

[0026] "n"은 평균 값이 1 내지 약 8인 수이고;

[0027] "m"은 이의 값이 1 내지 약 6인 수이고; "p"는 이의 값이 1 내지 약 6인 수이고;

[0028] "q"는 이의 값이 1 내지 약 6인 수이다.

[0029] 디프로보심-1 (WO 2018/005812; 화합물 3)은 마우스에서, 특히 세포 면역 반응을 일으키는 강력한 애주버트 활성을 나타내었다:



[0030]

[0031]

유전자 조작된 종양-특이적 항원, 오브알부민에 대한 면역접종은, 디프로보심-1로 보강(adjuvanted)되는 경우, B16 흑색종의 성장을 억제하고, 항-PD-L1에 의한 면역 체크포인트 차단 존재하에 생존을 연장시켰다. 오브알부민 플러스 디프로보심 또는 오브알부민 플러스 항-PD-L1 억제제를 사용한 면역접종은, 약간의 이득을 나타내지만, 100%의 마우스가 3가지 성분을 사용한 면역접종에 반응하였다: 디프로보심, 면역원 및 체크포인트 억제제. 데이터는 디프로보심-1이 이러한 체크포인트 억제제에 반응할 수 있는 종양-특이적 CTLs의 수 및 활성을 증가시켜 항-PD-L1 치료제의 성공을 증가(boosts)시킬 수 있다고 제안한다.

[0032]

WO 2018/005812 및 문헌[참조: Morin et al., J Am Chem Soc, In Press (2018)]에 논의된 바와 같이, 디프로보심 부류의 수개의 구성원이 제조되었고, 이들의 활성을 검정하고, 디프로보심-1 내지 디프로보심-6과 같이 번호로 제공하였다. 사용된 검정에서 다소 더 적은 활성 값과 유사한, 유사한 활성 프로파일을 갖는 디프로보심 부류의 수개의 다른 화합물을, 또한 제조하고 검정하였다.

[0033]

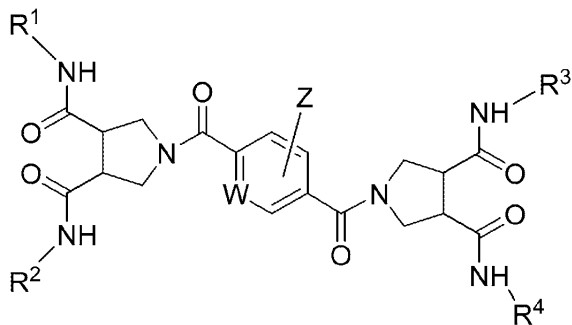
디프로보심-1은 전체 부류의 예시적인 구성원으로서 본원에서 사용되고, 용어 디프로보심이 추가로 하이픈 연결된 번호 없이 사용되는 경우 디프로보심 부류 구성원을 의미하기 위해 사용되는 것으로 이해된다. 따라서, 용어 "부류(family)" 또는 "하나(a)"는 "디프로보심 부류(Diprovocim family)" 또는 "하나의 디프로보심(a Diprovocim)"과 함께 사용되는 경우, 용어 "디프로보심"은 화학식 V로 정의된 디프로보심 부류의 구성원을 의미하기 위해 사용된다. 용어 "바람직한"과 함께 사용된 용어 "디프로보심"은 화학식 I의 화합물을 언급하고, 구절 "보다 바람직한" 또는 "보다 바람직하게는"는 화학식 Ia의 디프로보심 부류 화합물을 언급한다. "가장 바람직한" 디프로보심은 하기 언급된 A-I로 기재된 화합물 중 하나이다.

[0034]

디프로보심 부류 화합물의 바람직한 구성원은 하기 구조식 I의 구조에 상응하는 화합물이다.

[0035]

화학식 I



[0036]

상기 화학식 I에서,

[0037]

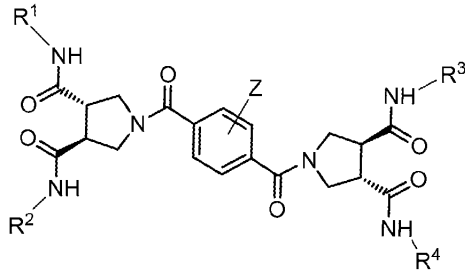
-A는 $-C(O)NH-R^4$ 이다. 도시된 R^{1-4} , W 및 Z 모이어티(moieties)는 상기한 바와 같다.

[0038]

디프로보심 부류 화합물의 더욱 보다 바람직한 구성원은 하기 구조식 Ia의 구조에 상응하는 화합물이다:

[0039]

[0040] 화학식 Ia



[0041]

[0042] 화학식 Ia의 현재 가장 바람직한 화합물의 구조식(여기서, R¹⁻⁴는 상기 정의된 바와 같고, -Z는 하이드라이도 (-H)이다)은 화학식 A, B, C, D, E, F, G, H, 및 I의 화합물로서 하기에 나타낸다.

[0043] 디프로보심은 항원성 질환-관련 마커 분자를 발현하는 숙주 포유동물 세포를 접촉하기 위한 애쥬번트-충분량으로 이용된다.

[0044] 펩타이드 서열과 같은 항원성 질환-관련 마커 화합물을 발현하는 숙주 포유동물 세포는 또한 면역 반응-자극 양의 체크포인트 억제제, 바람직하게는 항체 또는 파라토프-함유 항체 부분과 접촉된다.

도면의 간단한 설명

[0045] 본원 개시내용의 일부를 형성하는 도면에서,

도 1a 내지 도 1f는 디프로보심이 마우스 및 사람 세포에 의해 사이토킨 분비를 유도함을 나타내는 일련의 그래프를 제공한다. 도 1a-1d는 4 시간 동안 (도 1a, 도 1c-1d) 또는 24 시간 동안 (도 1b) 디프로보심-1로 처리 후 사람 THP-1 세포 (도 1a), 사람 PBMC (도 1b), 마우스 복막 마크로파지 (도 1c), 또는 마우스 BMDC (도 1d)의 상청액 중 TNF의 양을 나타낸다. 도 1e는 4 시간 동안 디프로보심으로 처리 후 마우스 BMDC의 상청액 중 IL-6의 양을 나타낸다. 도 1a-1e 각각에서, 3개의 독립적인 샘플의 평균을 플롯팅하였다; P 값을 일원(one-way) ANOVA로 결정하여 상이한 용량(doses)에 대한 반응을 비교하였다; 모든 연구에서 P < 0.0001. 도 1a 내지 도 1e의 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 2a 내지 도 2d는 디프로보심이 마우스 및 사람 TLR1/TLR2를 활성화시킴을 나타낸다. 도 2a는 4 시간 동안 디프로보심 (500 nM)으로 처리 (유전자형당 n = 3 마우스) 후 지시된 유전자형의 마우스 복막 마크로파지의 상청액 중 TNF의 양을 나타내는 그래프이다. 사이토킨 수준을 자극된 C57BL/6J 세포의 수준으로 정규화하였다. P 값을 스튜던트 t 시험으로 결정하고, 자극된 C57BL/6J 세포 및 돌연변이 유전자형의 자극된 세포의 반응 간의 유의한 차이(significance of differences)를 나타낸다; 4개의 별표는 통계학적으로 유의한 차이를 갖는 것을 나타낸다. 도 2b는 대조군 항체, 항-TLR1 (20 µg/ml), 또는 항-TLR2 (20 µg/ml)로 1 시간 동안 전처리되고, 이어서, 비히클 또는 디프로보심 (250 pM)으로 또다른 4 시간 동안 처리된 사람 THP-1 세포의 상청액 중 TNF의 양을 나타내는 그래프이다. P 값을 스튜던트 t 시험으로 결정하였다. 도 2a 및 도 2b에서 3개의 독립적인 샘플의 평균을 플롯팅한다. 도 2c 및 도 2d는 지시된 시간 동안 디프로보심 (THP-1 중 5 nM 및 마우스 복막 마크로파지 중 500 nM)으로 처리된 사람 THP-1 세포 (도 2c) 및 마우스 복막 마크로파지 (도 2d)의 용해물의 분석 결과를 나타내는 면역블롯이다. 모든 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 3a 내지 도 3g는 디프로보심이 항원-특이적 항체 및 CTL 반응을 향상시킨다는 것을 그래프 및 도식을 통해 나타낸다. 도 3a - 도 3c는 WT 또는 Tlr2^{-/-} C57BL/6J 마우스 (그룹당 4 마리 마우스)가 비히클, 디프로보심 (10 mg/kg), 또는 명반(alum) (2 mg/kg)과 혼합된 100 µg OVA로 i.m. 면역접종된 결과를 나타낸다. 14 일 후, OVA-특이적 IgG (도 3a), OVA-특이적 IgG1 (도 3b) 및 OVA-특이적 IgG2b (도 3c)의 혈청 역가를 ELISA로 측정하였다. 도 3d는 마우스에게 비히클 또는 디프로보심과 혼합된 OVA로 i.m. 면역접종하고 (그룹당 4 마리 마우스) 24 시간 후 마우스로부터 수집된 DC로 24 시간 공-배양 후 유세포분석기에 의한 OT-I CD8 T 세포 상 CD69 발현의 실험 설정의 도식(좌측) 및 검출 결과 (중심) 및 정량화 (우측)를 나타낸다.

도 3e 및 도 3f는 면역접종되지 않거나 또는 비히클 또는 디프로보심 (10 mg/kg)와 혼합된 100 µg OVA로 i.m. 면역접종된 마우스로부터의 결과를 나타낸다 (그룹당 4 마리 마우스). 면역접종 7일 후, 마우스에게 OVA 펩타이드 (a.a. 257-263)로 펄스되지 않거나(unpulsed) (대조군 세포) 또는 펄스된(pulsed) (표적 세포) Celltrace Violet-표지된 마우스 비장세포를 i.v. 주사하였다. 2일 후, 혈액을 수집하여 남아있는 살아있는 염료-표지된

세포를 측정하였다. 도 3e는 야생형 마우스에서 남아있는 표적 세포 (우측 피크) 및 대조군 세포 (좌측 피크)를 계수한 대표적인 유세포분석기 플롯을 나타낸다. 도 3f는 WT, Tlr1^{-/-} 또는 Tlr2^{-/-} 마우스 중 사멸한 표적 세포 백분율의 정량적 비교를 나타낸다. P 값을 스튜던트 t 시험으로 결정하였다. 모든 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 4a 내지 도 4j는 디프로보심-보강된 종양 백신접종 및 체크포인트 차단으로 종양-전 또는 종양-후 처리에 의해 B16-OVA 종양 성장의 억제를 나타낸다. 도 4a는 종양-전 및 종양-후 처리 프로토콜의 도식을 제공한다. C57BL/6J 마우스 (처리당 n=8 마우스)에게 0일째에 2x10⁵ B16-OVA 흑색종 세포로 s.c. 주사하였다. 종양-전 처리의 경우, 마우스에게 비히클 또는 디프로보심 (10 mg/kg) 또는 명반 (2 mg/kg)과 혼합된 OVA (100 µg)로 종양 주사 전 동일한 날에 i.m. 면역접종하였다. 마우스는 7일 후 추가 면역접종을 받았고, 여기서, i.p. 주사로 종양 접종 후 3, 6 및 9일째에 항-PD-L1 (200 µg)을 투여하였다. 종양-후 처리의 경우, 초기 면역접종은 종양 접종 후 3일째이고, 7일 후 추가 면역접종하였다. 항-PD-L1 (200 µg)을 i.p. 주사로 종양 접종 후 3, 6, 9, 12, 및 15일째에 투여하였다. 도 4b 내지 도 4f는 종양-전 치료 결과를 나타낸다. 종양 용적 (도 4b 및 도 4d) 및 마우스 생존율 (생존자/총 마우스) (도 4c 및 도 4e). 도 4f는 나이브(naive) 마우스 (n = 8) 또는 (도 4c)로부터의 35일째 종양-없는 생존자 (n = 8)에게 각각 B16-OVA 및 B16F10 종양 세포의 2x10⁵ 세포로 s.c. 주사로 접종하고, 종양 용적을 모니터링하였음을 나타낸다. 도 4g 내지 도 4j는 종양-전 (도 4g 및 도 4h) 대 종양-후 처리 (도 4i 및 도 4j)의 비교를 나타낸다. 종양 용적 (도 4g 및 도 4i) 및 마우스 생존율 (생존자/총 마우스) (도 4h 및 도 4j)을 나타낸다. 종양 용적 분석에 대한 P 값은 그래프에 나타낸 바와 같이 최종 시점에 적용되고, 스튜던트 t 시험으로 계산하였다. 생존 분석에 대한 P 값을 카플란-마이어 분석으로 계산하였다. 모든 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 5a 내지 도 5m은 디프로보심이 TILs 및 항-종양 CTL 반응을 향상시킴을 나타낸다. 도 5a는 도 5a 내지 도 5j에 대한 처리 프로토콜의 도식이고, 여기서, C57BL/6J 마우스 (처리당 n=6 마우스)에게 0일째에 2x10⁵ B16-OVA 흑색종 세포로 s.c. 주사하고, 3일 후 비히클 또는 디프로보심 (10 mg/kg) 또는 명반 (2 mg/kg)과 혼합된 OVA (100 µg)로 i.m. 면역접종하였다. 마우스는 종양 접종 후 10일째에 추가 면역접종을 받았고, 여기서, 항-PD-L1 (200 µg)을 i.p. 주사로 종양 접종 후 3, 6, 9, 및 12일째에 투여하였다. 종양을 14일째에 수거하여 종양-침윤성 백혈구 (TILs)를 분리하고 분석하였다. 도 5a 내지 도 5j는 총 종양 세포로부터 각 세포 유형의 빈도를 나타낸다. 도 5b는 TILs (CD45⁺)를 나타낸다. 도 5c는 CD4 T 세포 (CD4⁺CD3⁺CD45⁺)를 나타낸다. 도 5d는 활성화된 CD4 T 세포 (CD44^{high}CD4⁺CD3⁺CD45⁺)를 나타낸다. 도 5e는 CD8 T 세포 (CD8⁺CD3⁺CD45⁺)를 나타낸다. 도 5f는 활성화된 CD8 T 세포 (CD44^{high}CD8⁺CD3⁺CD45⁺)를 나타낸다. 도 5g는 OVA₍₂₅₇₋₂₆₄₎-H2Kb 사량체(tetramer)에 대해 특이적인 T-세포 수용체를 포함하는 OVA-특이적 CD8 T 세포를 나타낸다. 도 5h는 NK 세포 (NK1.1⁺CD3⁻CD45⁺)를 나타낸다. 도 5i는 DCs (CD11c⁺CD3⁻CD45⁺)를 나타낸다. 도 5j는 마크로파지 (F4/80⁺CD11b⁺CD45⁺)를 나타낸다.

도 5k는 도 5l 및 도 5m에 대한 처리 프로토콜의 도식이고, 여기서, C57BL/6J 마우스 (처리당 n=8 마우스)에게 0일에 2x10⁵ B16-OVA 흑색종 세포로 s.c. 주사하고, 3일 후 비히클 또는 디프로보심 (10 mg/kg)과 혼합된 OVA (100 µg)로 i.m. 면역접종하였다. 마우스는 종양 접종 후 10일에 추가 면역접종을 받았고, 여기서, 항-PD-L1 (200 µg)을 i.p. 주사로 종양 접종 후 3, 6, 9, 12, 및 15일째에 투여하였다. 0, 3, 6, 9, 12, 및 15일째에, 항-CD4 (300 µg), 항-CD8 (300 µg), 항-NK1.1 (300 µg), 또는 이들 3개의 항체의 혼합물을 i.p. 주사로 C57BL/6J 마우스에게 투여하였다. 종양 용적 (도 5l) 및 마우스 생존율 (생존자/총 마우스) (도 5m)을 나타낸다. 종양 용적 분석에 대한 P 값을 그래프에 나타낸 바와 같이 최종 시점에 적용하고, 스튜던트 t 시험으로 계산하였다. 생존 분석에 대한 P 값을 카플란-마이어 분석으로 계산하였다. 모든 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 6은 디프로보심-애슈버트 면역접종 플러스 체크포인트 억제의 항종양 효과를 매개하는 주요 세포 사건의 도식 모델을 나타낸다.

도 7은 디프로보심이 마우스 복막 마크로파지로 IFN-β 분비를 자극하지 않는다는 것을 나타낸다. 4 시간 동안 디프로보심 또는 LPS로 처리 후 마우스 복막 마크로파지의 상청액 중 IFN-β를 검정하였다. 3개의 독립적인 샘플의 평균을 플롯팅한다. P 값을 스튜던트 t 시험으로 결정하였다; 자극되지 않은 세포 (0 nM) 및 디프로보심-자극된 세포의 반응 간에 어떠한 유의한 차이도 발견되지 않았다. 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 8a 및 도 8b는 항-PD-L1 항체가 마우스에서 B16 종양 성장을 억제하지 않는다는 것을 나타낸다. C57BL/6J 마우스 (n=8)는 0일째에 2×10^5 B16-OVA 흑색종 세포로 s.c. 주사받았다. 항-PD-L1 (200 μ g) 또는 마우스 IgG2a 이소형 대조군 항체를 i.p. 주사에 의한 종양 접종 후 3, 6 및 9일째에 투여하였다. 도 8a는 시간에 대한 종양 용적의 그래프이고, 도 8b는 시간에 대한 마우스 생존율 (생존자/총 마우스)을 나타내는 그래프이다. 둘 다 플롯에서 대조군 값은 항-PD-L1 값에 대한 것보다 위에서 나타나고, 여기서, 2개의 값은 발산한다(diverge). 종양 용적 분석에 대한 P 값은 최종 시점에 적용되고, 스튜던트 t 시험으로 계산하였다; 처리 간에 어떠한 유의한 차이도 발견되지 않았다. 생존 분석에 대한 P 값은 카플란-마이어 분석으로 계산하였다; 처리 간에 어떠한 유의한 차이도 발견되지 않았다. 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

도 9a 및 도 9b는 사람 세포에서 TNF 생성의 활성화에서 디프로보심 Pam₃CSK₄보다 더욱 잠재적임을 나타낸다. 도 9a 및 도 9b는 디프로보심 또는 Pam₃CSK₄로 치료 후 4 시간 (도 9a) 또는 24 시간 (도 9b) 동안 사람 THP-1 세포 (도 9a) 및 사람 PBMC (도 9b)의 상청액으로부터 검정된 TNF 양을 나타낸다. 디프로보심에 대한 데이터 포인트는, 일반적으로 도 9a에서 Pam₃CSK₄에 대한 데이터 포인트의 좌측에 나타내고, 도 9b에서 선이 발산하는 Pam₃CSK₄에 대한 데이터 포인트 위로 나타낸다. 3개의 독립적인 샘플의 평균을 플롯팅한다. 결과는 2개의 독립적인 연구를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 정의

[0047] 항체: 면역학적으로 리간드 그룹에 결합된 폴리펩타이드. 본원에 사용된 항체는, 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 단편이다. Fab, Fab'; F(ab')₂ 및 FV로서 당해 기술 분야에 공지된 이러한 부분이 포함된다. 전형적으로, 항체는 약 6 내지 약 34 앙스트롬 (Å)의 크기 범위이고 약 10⁴ 내지 약 10¹⁰ M⁻¹ 범위이고 그리고 10¹³ M⁻¹ 만큼 높은 결합 상수를 갖는 리간드에 결합된다. 항체는 소분자, 예를 들면, 스테로이드 및 프로스타글란딘, 생물중합체, 예를 들면, 핵산, 단백질 및 폴리사카라이드, 및 합성 중합체, 예를 들면, 폴리프로필렌을 포함하는 광범위한 리간드에 결합할 수 있다.

[0048] "항체 결합 부위" 또는 "파라토프"는 "항원" 또는 "에피토프"를 갖는 (면역반응체)에 특이적으로 결합되는 중쇄 및 경쇄 가변 및 초가변 영역으로 이루어지는 항체 분자의 구조적 부분이다.

[0049] 용어 "항체"는 오염물로 인한 불리한 효과 없이 치료를 필요로 하는 질환에 걸린 포유동물로의 주사 (약제학적으로 허용되는)에 적합한 모노클로날 항체를 특히 포함하는 것을 의미한다. 이러한 모노클로날 항체는 본원에 논의된 면역접종된 동물 중, 예를 들면, 사람으로부터 수득될 수 있다. 또는, 항체는 하나의 동물 및 개질된 항체-생산 세포에서 유도되어 면역접종될 포유동물의 항체 단백질 서열을 생산할 수 있다. 다른 종의 포유동물이 면역접종을 위해 고려되지만, 사람이 특히 바람직한 면역접종 수용자이다. 결과적으로, 마우스에서 원래 유도된 고려되는 모노클로날 항체는, 예를 들면, 소위 "사람화" 항체, 또는 "키메라" 항체로서 사람 수용자에 보다 유용할 수 있다. 이들 용어는 문헌에 기술한 바와 같이 본원에 사용된다 [참조: International Nonproprietary Names (INN) for biological and biotechnological substances (a review), World Health Organization (2016), § 2.7].

[0050] 용어 "항원"은 항체 또는 수용체에 의해 결합된 실체(entity)를 지정하기 위해 그리고 또한 항체의 생성을 유도하는 실체를 지정하기 위해 역사적으로 사용되어 왔다. 더 많은 현재 사용은 실체가 항체 또는 수용체에 의해 결합된 항원의 의미로 제한되지만, 반면 용어 "면역원"은 항체 생성을 유도하거나 수용체에 결합하는 실체에 사용된다. 본원에 논의된 실체가 면역원성 및 항원성 둘 다인 경우, 이의 의도된 유용성에 따라 면역원 또는 항원 중 어느 하나로서 이를 언급한다.

[0051] 용어 "면역반응체"는 이의 다양한 형태로, 항원성 결정인자-함유 분자 (항원) 및 항체 결합 부위 함유 분자, 예를 들면, 전체 항체 분자 또는 파라토프-함유 이의 부분 사이의 특이적 결합을 언급하기 위해 본원에 사용된다.

[0052] "항원성 결정인자"는 항체 결합 부위 또는 T 세포 수용체에 의해 면역학적으로 결합된 항원의 구조적 부분이다. 상기 용어는 또한 "에피토프"와 상호교환하여 사용된다. 항체는 항원의 단일 에피토프 (모노클로날) 또는 다중 에피토프 (폴리클로날)에 결합할 수 있다. 단백질성 물질에서, 선형 에피토프의 길이는 보통 약 5 내지 약 7개

의 아미노 산 잔기인 것으로 언급된다.

- [0053] 관사 ("a" 및 "an")는 관사의 문법적 목적의 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)를 언급하기 위해 본원에 사용된다. 예의 방식으로, "하나의 요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0054] 용어 "하이드로카빌"는 비-방향족 그룹의 약칭 용어로서 본원에 사용되고, 직쇄 및 분지쇄 지방족 뿐만 아니라 단지 탄소 및 수소를 포함하는 지환족 그룹 또는 라디칼을 포함한다. 따라서, 알킬, 알케닐 및 알킬 그룹이 고려되는 반면, 방향족 탄화수소, 예를 들면, 페닐 및 나프틸 그룹은, 엄밀히 말하면 또한 하이드로카빌 그룹이고, 하기 논의된 아릴 그룹 또는 라디칼로서 본원에 언급된다.
- [0055] 특정 지방족 하이드로카빌 치환체 그룹이 의도되는 경우, 상기 그룹은 하기와 같이 언급된다; 즉, 메틸, 에틸, 부틸, 3급-부틸, 헥실, 헥세닐, 2-에틸헥실, 도데실 (C₁₂), 옥타데실 (C₁₈). 특히 바람직한 하이드로카빌 그룹은 알킬 그룹이다. 결과적으로, 일반적인 그러나 보다 바람직한 치환체는 본원에 열거된 치환체 그룹 중 어느 것에서 기술어 "하이드로카빌"을 "알킬"로 대체하여 언급할 수 있다.
- [0056] 장쇄 (예를 들면, C₁₈) 하이드로카빌 그룹이 고려되지만, 짧은 (C₁-C₄) 그룹의 예는 예시적으로 본원에 사용된다. 이러한 예시적인 알킬 라디칼은 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸 및 사이클로프로필을 포함한다. 적합한 알케닐 라디칼의 예는 에테닐 (비닐), 2-프로페닐, 3-프로페닐, 1,4-부타디에닐, 1-부테닐, 2-부테닐, 및 3-부테닐을 포함한다. 알킬 라디칼의 예는 에틸, 2-프로피닐, 1-프로피닐, 1-부티닐, 2-부티닐, 3-부티닐, 및 1-메틸-2-프로피닐을 포함한다.
- [0057] 숙련가가 이해할 수 있는 바와 같이, C₁ 알케닐 그룹과 같이 존재할 수 없는 치환체는, 2개 이상의 탄소 원자를 갖는 이러한 치환체가 의도되더라도, 용어 "하이드로카빌"에 포함되는 것으로 의도되지 않는다.
- [0058] 용어 "하이드로카빌"을 사용하는 경우 보통의 화학적 접미사 명명법을 따르고, 단, 말단 "일(y1)"을 제거하고 적절한 접미사를 추가하는 일반적인 실행은, 하나 이상의 치환체와 수득한 명칭의 가능한 유사성 때문에, 항상 따르는 것은 아니다. 따라서, 하이드로카빌 에테르는 "하이드로카복시" 그룹 보다는 "하이드로카빌옥시" 그룹으로서 언급되는데, 그 이유는 화학적 명명법의 일반적인 법칙에 따르는 경우 더 적합할 수 있기 때문이다. 예시적인 하이드로카빌옥시 그룹은 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, 알릴옥시, n-부톡시, 이소-부톡시, 2급-부톡시, 및 3급-부톡시 그룹을 포함한다.
- [0059] 리간드: 보통 정전기력 및/또는 수소 결합을 통해 특정 수용체 분자에 특이적으로 결합된 구조적 영역을 갖는 분자. 예시적인 리간드는 표피 성장 인자 분자이다.
- [0060] "마커 분자" (항원 또는 면역원)는 세포 표면 상에 발현될 수 있지만 세포 표면 상에 발현될 필요는 없고, 오히려 질환에 걸린 세포에서 어느 곳에서든 발현될 수 있다. 포유동물의 실질적으로 모든 네이티브(native) 세포 단백질이 세포에 의해 더 짧은 펩타이드로 프로세싱되고 I부류 MHC 분자에 의해 세포와 결합되는 이유이다. 이러한 네이티브 단백질은 전형적으로 유기체의 미숙 동안 프로세싱되고, 네이티브 단백질 부분에 의해 유도될 수 있는 T 세포 또는 다른 면역 세포는 숙성 전에 유기체에 의해 제거되고, "자가 단백질" 내성(tolerance)을 야기한다. 결과적으로, 특정 면역학적 질환의 경우를 제외하고는, 이의 세포가 돌연변이로부터 야기되는 암과 같은 질환에 의해 야기되는 유일한 이물 펩타이드 또는 신생항원성 펩타이드는 "이물"로서 인지되고, MHC-결합된 펩타이드에 대한 면역 반응을 유도한다.
- [0061] 추가로, 돌연변이에 관해, 때때로 돌연변이는 프레임-시프트(frame-shift) 돌연변이일 수 있고, 아미노 산의 비-천연 서열이 초래된다. 마커 분자는 또한 "종양 항원일 수 있고"; 즉, 배아 발달 동안 다른 세포에 의해 발현될 수 있지만, 예를 들면, 정상 세포에 의해서 보다는 종양에 의해 더 많이 특징적으로 발현되는 단백질이다. 또는 마커 분자는 종양유전자 생산물, 예를 들면, 종양 세포 내 재조합 사건에 의해 생성되는 비정상 융합 단백질일 수 있다. 마커 분자는 또한 바이러스 또는 박테리아와 같은 감염원의 생산물일 수 있다.
- [0062] 펩타이드/폴리펩타이드: 적어도 2개 아미노 산 잔기를 포함하는 올리고머 또는 중합체, 여기서, 인접한 잔기는 하나의 잔기의 알파-아미노 그룹 및 인접한 잔기의 알파-카복실 그룹 사이의 펩타이드 결합에 의해 링크된다. 폴리펩타이드의 일차 구조는 중합체의 하나의 말단에서 일차 아민 그룹 및 다른 말단에서 카복실산 그룹을 갖는다. 펩타이드 또는 폴리펩타이드는 본원에 도시되고, 보통 당해 기술 분야에서 좌측에서 우측으로 및 아미노-말단에서 카복시-말단으로의 방향으로 도시된다. 또한, 수성 용액 중 폴리펩타이드는 보통 용액의 pH에 좌우되어 하나 이상의 썬터이온성 형태로 존재한다. 용어 "펩타이드" 및 "폴리펩타이드"는 본원에 상호교환적으로 사용된다.

- [0063] 단백질: 약 100 초과와 아미노 산 잔기를 포함하는 단일 폴리펩타이드 또는 가교-결합된 폴리펩타이드의 세트. 단백질은 동일한 폴리펩타이드 쇠 내에서 또는 인접한 폴리펩타이드 사이에 예를 들면, 디설파이드 브릿지를 통한 화학적 가교결합을 가질 수 있다. 단백질이 글리코실화되는 경우, 당단백질로 칭명될 수 있다. 단백질이 펩타이드 링크, 아미노 산 잔기 서열, 디설파이드 브릿지 등에 의해 함께 링크된 하나 이상의 별개의 폴리펩타이드/단백질 하위단위를 포함하는 경우, 단백질은 종종 융합 단백질, 융합 폴리펩타이드, 키메라 융합 등으로 명명된다.
- [0064] 수용체: 또다른 분자 (리간드)에 (또는 이와) 특이적으로 결합된 구조적 영역을 갖는 생물학적 활성 단백질성 분자. 예시적인 수용체 분자는 세포내 또는 세포간 신호전달에 연루된 항체 결합 부위 또는 트랜스막 세포 단백질 분자, 예를 들면, EGFR, ERBB 및 또한 HER2 등으로 언급된 내피 성장 호르몬 수용체이다.
- [0065] 용어 "잔기"는 구절 아미노 산 잔기와 상호교환적으로 사용된다. 본원에 확인된 모든 아미노 산 잔기는 천연 또는 L-배치로 존재한다. 표준 폴리펩타이드 명명법 [참조: J. Biol. Chem., 243:3557-59 (1969)]과 일치하도록 하여, 아미노 산 잔기에 대한 약어는 하기 대응 표에 기재된 바와 같다.

대응 표		
1-문자	3-문자	아미노 산 명칭
Y	Tyr	L-티로신
G	Gly	글리신
F	Phe	L-페닐알라닌
M	Met	L-메티오닌
A	Ala	L-알라닌
S	Ser	L-세린
I	Ile	L-이소류신
L	Leu	L-류신
T	Thr	L-트레오닌
V	Val	L-발린
P	Pro	L-프롤린
K	Lys	L-리신
H	His	L-히스티딘
Q	Gln	L-글루타민
E	Glu	L-글루탐산
Z	Glx	L-글루탐산 또는 L-글루타민
W	Trp	L-트립토판
R	Arg	L-아르기닌
D	Asp	L-아스파르트산
N	Asn	L-아스파라긴
B	Asx	L-아스파르트산 또는 L-아스파라긴
C	Cys	L-시스테인

- [0066]
- [0067] 본 발명은 수개의 이득 및 이점을 갖는다.
- [0068] 본 발명의 핵심적인 이득은 병용(combination) 면역접종이 질환에 걸린 세포 성장 억제에서 상승적 결과를 제공한다는 것이다.
- [0069] 본 발명의 이점은 병용 면역접종이 바이러스- 및 박테리아-비함유 백신에서 종종 결핍되는 T 세포 조력을 제공

한다는 것이다.

[0070] 본 발명이 제공하는 또다른 이득은 당해 기술 분야의 숙련가가 1980년대 초반 이래로 궁극적으로 성공적이지 못했지만 현재 성공적으로 사용할 수 있는 질환-관련 면역원의 포물라를 발견하고, 연구하고, 발표하였다는 것이다.

[0071] 또한 추가의 본 발명의 이득 및 이점은 하기한 개시내용으로부터 숙련가에게 명백할 것이다.

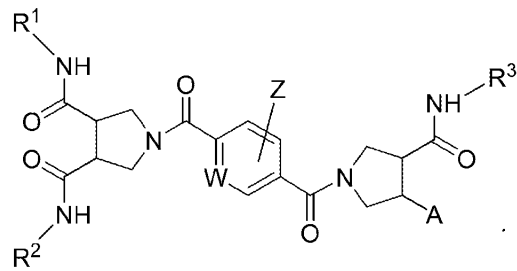
[0072] 바람직한 실시형태의 상세한 설명

[0073] 본 발명은 포유동물에서 질환에 걸린 세포의 성장을 억제하는 방법을 고려한다. 이들 질환에 걸린 세포는 상기 질환이 없는 동일한 유형의 세포에는 부재하거나, 상기 질환에 걸린 세포와 비교하여, 무-질환 세포에서 상당히 감소된 수로 존재하는 하나 이상의 마커 분자를 발현한다. 당해 기술 분야의 숙련가는 무-질환 세포에 존재하는 양보다 상당히 많은 양으로 질환에 걸린 세포에 존재하는 마커 분자를 논의하는 수많은 기사 및 리뷰 및 이들의 차이를 측정하는 방법을 게재하였다. 예를 들면, 문헌[참조: Kim et al., BMB Rep 50(6):285-298 (2017)] 및 본원의 인용문헌을 참조한다. 추가로, 광학 밀도 스캔 또는 방사성 검출 평균 및 다른 평균으로 수행된 정량적 웨스턴 블롯과 같은 기술이 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. "동일한 유형의" 세포는 질환에 걸린 세포와 동일한 기관 및 조직으로부터의 무-질환 세포이다.

[0074] 고려되는 방법은: a) 질환에 걸린 포유동물에게 (i) 애췌번트-충분량의 디프로보심 화합물, (ii) T 세포-자극량의 면역 체크포인트 억제제, 및 (iii) 면역량의 상기 마커 분자를 투여하여 질환에 걸린 포유동물을 면역접종하는 단계를 포함한다. 면역접종된 포유동물은 b) 포유동물이 면역접종에 대한 면역 반응을 일으키고 질환에 걸린 세포의 성장을 억제하기 위해 충분한 시간 동안 유지된다.

[0075] 고려되는 디프로보심 화합물은 구조식 V의 구조에 상응한다:

[0076] 화학식 V



[0077]

[0078] 상기 화학식 V에서,

[0079] -A는 -H (하이드라이드) 또는 -C(O)NH-R⁴이고;

[0080] R¹, R², R³ 및 R⁴는 동일하거나 상이하고, 2-(4-플루오로페닐)에틸, 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 또는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹이고, 단:

[0081] 1) R¹, R², R³ 및 R⁴ (R¹⁻⁴) 중 적어도 2개 또는 R¹, R², 및 R³ (R¹⁻³) 중 적어도 2개는 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이거나, R¹⁻⁴ 각각은 2-(4-플루오로페닐)에틸 그룹이고,

[0082] 2) R¹⁻⁴ 각각이 2-(4-플루오로페닐)에틸이 아닌 경우, 적어도 하나의 도시된 피롤리딘디카복사미도 그룹은 (S,S) 배치를 갖고, C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹 이외의 도시된 R 치환체 각각은 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로페닐)-사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이고,

[0083] 3) -A가 -C(O)NH-R⁴인 경우, R¹⁻⁴ 중 2개 이하는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹이고,

[0084] 4) A가 하이드라이드인 경우, R¹⁻³ 중 하나는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹일 수 있고, 도시된 R³-함유 피롤리딘디카복사미도 그룹은 R 또는 S 배치 중 어느 하나, 또는 둘 다의 배치의 혼합을 가질 수 있고;

[0085] -Z는 할로젠, -H, -NH₂, -OH, -OCH₃, -NO₂, -OCH₂CO₂H, -O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONH(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -NHCOCH₂O-(CH₂CH₂O)_nCH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCHCO₂H(CH₂CO₂H), -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CHOH)(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH[(CH₂)₄NH₂]CO₂H, -OCH₂CONHCH₂CONHCH(CH₂OH)CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_mNHCH-[(CH₂)₄NH₂]CO₂H (서열번호: 3-8), -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH[(CH₂)₄NH₂]CO}_pNHCH[(CH₂)₄NH]CO₂H (서열번호: 9-13) 및 -OCH₂CONHCH₂CO{NHCH(CH₂OH)CO}_qNHCH(CH₂OH)CO₂H (서열번호: 14-18) 중 하나 이상이고;

[0086] W는 질소 (N) 또는 CH이고;

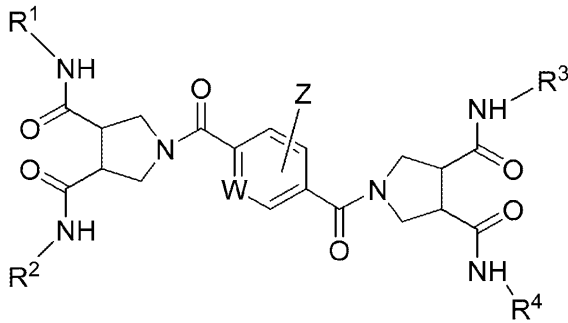
[0087] "n"은 평균 값이 1 내지 약 8인 수이고;

[0088] "m"은 이의 값이 1 내지 약 6인 수이고; "p"는 이의 값이 1 내지 약 6인 수이고;

[0089] "q"는 이의 값이 1 내지 약 6인 수이다.

[0090] 화학식 V의 디프로보심 부류 화합물의 바람직한 구성원은 하기 구조식 I의 구조에 상응하는 화합물이고, 여기서, -A = -C(O)NH-R⁴이고, 하기 도시된다:

[0091] 화학식 I



[0092]

[0093] R¹⁻⁴, W 및 Z 모이어티는 상기한 바와 같다.

[0094] 하나 이상의 바람직한 화학식 I의 화합물에서, 치환체 쌍 R¹ 및 R³ (R¹ 또는 R³ 중 어느 하나) 또는 쌍 R¹ 및 R² (R¹ 또는 R² 중 어느 하나)의 적어도 하나 구성원은 트랜스-2-페닐사이클로프로필 또는 트랜스-2-(4-플루오로페닐)사이클로프로필 그룹이다. 치환체 쌍 R¹ 및 R³ 또는 쌍 R¹ 및 R²의 적어도 하나 구성원은 (1S,2R) 배치의 트랜스-2-페닐사이클로프로필 또는 트랜스-2-(4-플루오로-페닐)사이클로프로필 그룹을 갖는 것이 또한 바람직하다.

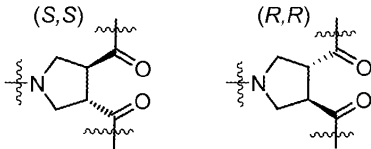
[0095] 보다 바람직하게는, R¹, R², R³ 및 R⁴ 중 적어도 3개의 치환체는 (1S,2R) 배치의 트랜스-2-페닐사이클로프로필 또는 트랜스-2-(4-플루오로페닐)사이클로프로필 그룹을 갖는다. 보다 바람직하게는, R¹, R², R³ 및 R⁴ 각각은 (1S,2R) 배치의 트랜스-2-페닐사이클로프로필 또는 트랜스-2-(4-플루오로페닐)사이클로프로필 그룹을 갖는다.

[0096] 또한 바람직하게는, 도시된 각각의 피롤리디닐디카복사미도 그룹은 (S,S) 배치를 갖고, 도시된 각각의 R¹⁻⁴ 치환체는 트랜스-2-페닐사이클로프로필, 트랜스-2-(4-플루오로-페닐)사이클로프로필 그룹 또는 이의 혼합물이고, 사이클로프로필 모이어티에 대한 결합은 (1S,2R) 배치를 갖는다.

[0097] 또다른 측면에서, 화학식 I의 화합물의 R¹⁻⁴ 중 2개 이하 또는 이의 하위-일반 화학식 중 하나는 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹일 수 있다. 하이드로카빌 그룹이 알킬 그룹이고, 4 내지 약 16개의 탄소 원자, 및 보다 바람직하게는 또한, 약 6 내지 약 10개의 탄소 원자의 길이를 갖는 것이 바람직하다. 직쇄 하이드로카빌 그룹은 또한 바람직하지만, 2개 이하의 메틸 및 에틸 그룹 치환체 또는 이들 둘 다가 카보사이클릭 환으로 존재할 수 있고, 또한 1개 또는 2개의 이중 또는 삼중 결합으로 존재할 수 있다. 특이적 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹은 용어 하이드로카빌의 사용의 논의에서 앞서 논의되어 있다.

[0098] 화학식 I에서 나타난 바와 같이, 각각의 분자는 적어도 하나, 및 바람직하게는 2개의, 3,4-피롤리딘디카복실 그룹을 포함한다. 카복실 그룹은 아민-말단화 R¹, R², R³ 및 R⁴ 치환체에 결합되어, 4개 (또는 3개)의 아미도 링 크를 형성한다. 따라서 2개의 피롤리딘디카복실 그룹은 또한 2개의 피롤리딘디카복스아미도 그룹으로 언급 될 수 있다.

[0099] 피롤리딘디카복실 그룹의 카복실 그룹에 결합된 치환체는 시스 또는 트랜스 형태로 존재할 수 있고, 즉, 2개의 치환체가 둘 다 도시된 환의 평면아래 또는 위에 돌출될 수 있거나 (시스), 하나의 치환체는 평면 위에, 다른 치환체는 아래에 돌출될 수 있다 (트랜스). 2개의 동일한 치환체를 갖는 시스-이치환된 피롤리딘디카복실 그룹은 대칭 배치를 갖고, 에난티오머 형태를 갖지 않는다. 이와 동일한 2개의 동일한 치환체를 갖는 트랜스-이치환된 피롤리딘디카복실 그룹은 비대칭 (키랄) 배치를 갖고, 에난티오머 형태를 갖는다. 2개의 키랄 배치는 (S,S) 및 (R,R)로서 언급되고, 하기에 나타낸다:

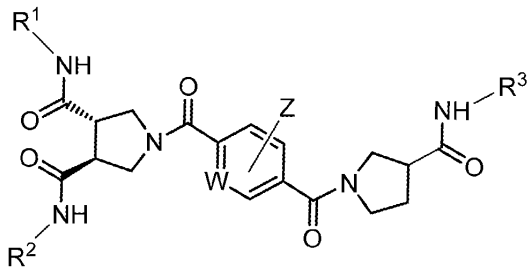


[0100]

[0101] 적어도 하나, 및 보다 바람직하게는 둘 다의 3,4-피롤리딘디카복실 그룹이 (S,S) 배치를 갖는 것이 바람직하다.

[0102] 반면, 화학식 V의 -A가 하이드라이도인 경우, R¹⁻³ 중 하나가 C₂-C₁₈ 하이드로카빌 그룹, 및 보다 바람직하게는, C₁₀-C₁₆ 하이드로카빌 그룹이다. 바람직한 화합물은 하기 화학식 Va의 구조에 상응한다:

[0103] 화학식 Va



[0104]

[0105] 상기 화학식 Va에서,

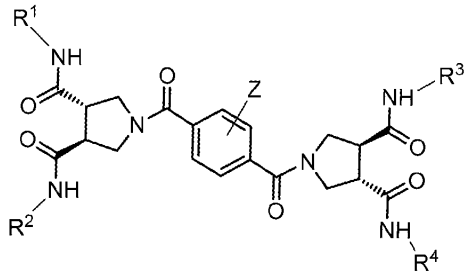
[0106] 도시된 R¹⁻³, W 및 Z 모이어티는 상기한 바와 같다

[0107] 도시된 -C(O)NH-R³ 그룹은 R 배치, S 배치 중 어느 하나로 존재할 수 있거나, 둘 다의 배치의 혼합으로서 존재 할 수 있다. S 배치를 갖는 화합물은 약간 더 활성이고, 따라서 보다 바람직하다.

[0108] 화학식 Va의 화합물에서, 여기서 R³ 그룹의 탄소 원자의 수는 바람직하게는 2 내지 18, 보다 바람직하게는 10 내지 16 탄소 원자이다. 이러한 하이드로카빌 그룹은 또한 보다 바람직하게는, 메틸 및 에틸 분지가 쇠 내에 이중 및/또는 삼중 결합으로서 허용될 수 있지만, 직쇄 치환체인 알킬 그룹이다. 사이클릭 하이드로카빌 치환체 화합물 및 카보사이클릭 환-함유 치환체는 또한 이용될 수 있다.

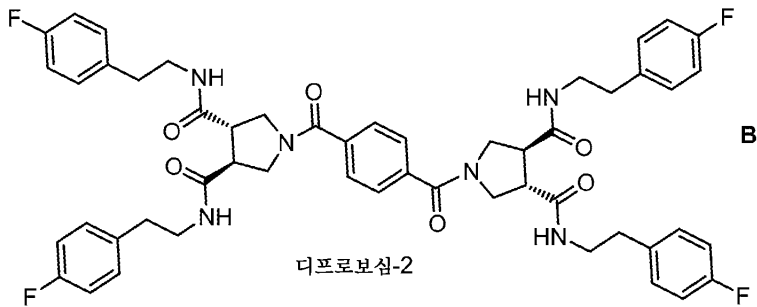
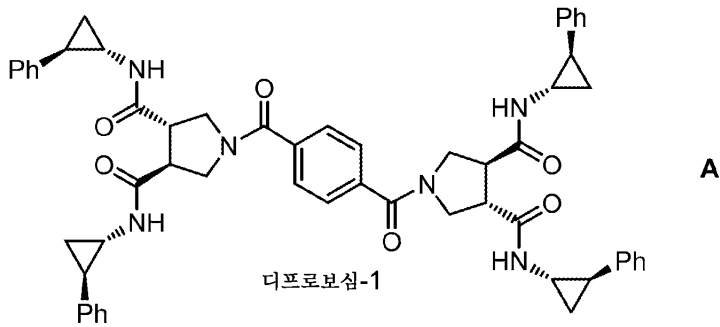
[0109] 또한 W가 CH인 것이 바람직하다. 하기에 나타낸 구조식 Ia는, 상기 수개의 바람직한 경우를 포함한다.

[0110] 화학식 Ia

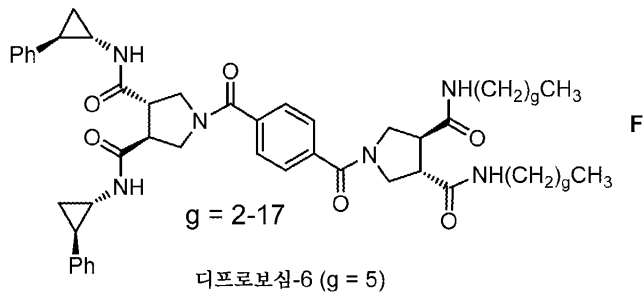
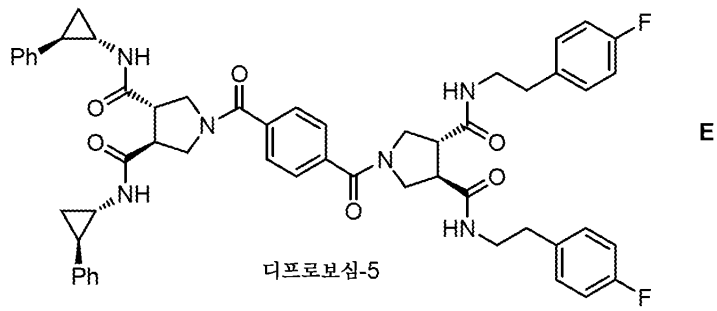
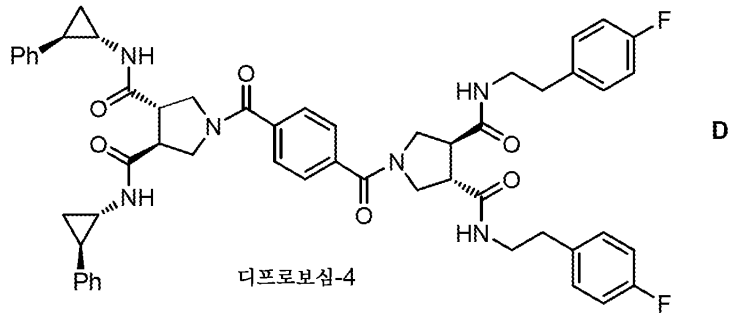
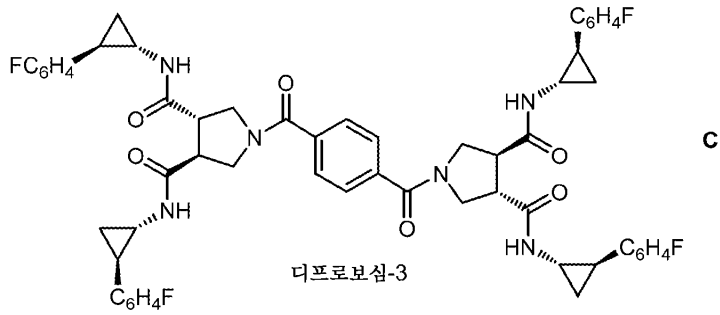


[0111]

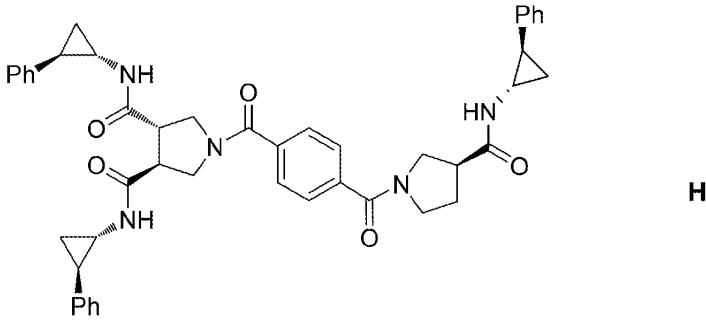
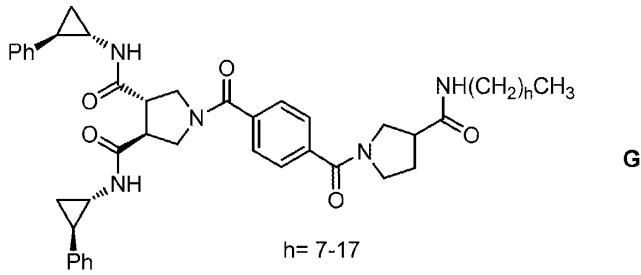
[0112] -Z가 하이드라이도 (-H)인 현재 가장 바람직한 화학식 Ia의 화합물의 구조식은 하기에 화학식 A, B, C, D, E, F, G, H, 및 I의 화합물로서 나타낸다. WO 2018005812로부터의 디프로보심 변호는 참조로서 포함된다.



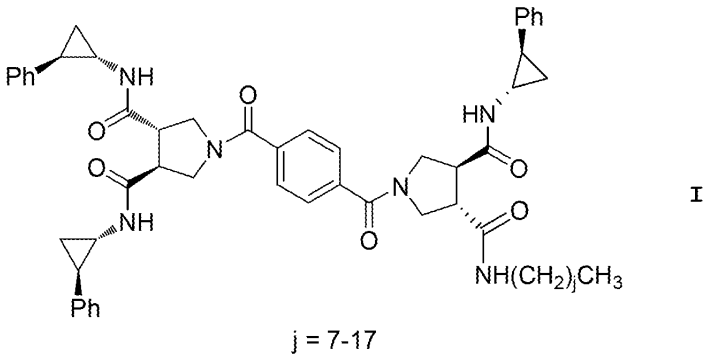
[0113]



[0114]



및



[0115]

[0116]

화학식 F의 화합물의 경우, 도시된 아마이드 그룹 둘 다에서 "g"는 바람직하게는 사람 THP-1 세포 및 마우스 마크로파지 둘 다에 대해 최대 활성의 경우에 동일한 수 (길이)의 5 내지 9개의 메틸렌 그룹이고, $g = 5$ 인 경우 둘 다의 세포 유형에 대해 가장 큰 활성 화합물을 제공한다. 화학식 G의 화합물의 경우, 도시된 아마이드 그룹에서 "h"는 1 내지 17, 바람직하게는 7 내지 17, 및 보다 바람직하게는 9 내지 15이다. 화학식 I의 화합물의 경우, 도시된 아마이드 그룹에서 "j"는 1 내지 17, 바람직하게는 3 내지 11, 및 보다 바람직하게는 5 내지 9이다.

[0117]

고려되는 면역 체크포인트 억제제는 전형적으로 온전한 항체 또는 항체의 파라토프-함유 부분이다. 이러한 고려되는 항체 또는 항체 파라토프-함유 부분은 바람직하게는 모노클로날 사람화, 키메라 또는 사람 항체이다. 예시적인 체크포인트 US FDA 승인된 체크포인트 억제제는 Keytruda[®] (항-PD-1), Yervoy[®] (항-CTLA-4), Tecentriq[®] (항-PD-L1), Opdivo[®] (항-PD-1)], 및 Imfinzi[®] (항-PD-L1)]를 포함한다. CTLA-4 자체는 단백질 B7-1 및 B7-2에 결합하여 T 세포 활성을 억제한다. 항-B7-1 및 항-B7-2 파라토프-함유 분자는 또한 CTLA-4/B7-1+B7-2 상호작용을 차단하기 위해 사용될 수 있고, 이에 의해 항체가 결합 쌍 PD-1 및 PD-L1 중 어느 하나에 작용하는 만큼의 체크포인트 억제제 활성을 제공한다.

[0118]

마커 분자는 하기에 상세하게 논의된다. 이들 물질은 전형적으로 단백질성이고, 전체 단백질 또는 단백질의 면역원성 부분일 수 있다.

[0119]

포유동물에서 질환에 걸린 세포의 성장을 억제하는 방법에 사용되는 경우, 애쥘버트-충분량의 디프로보심 화합물, T 세포-자극량의 면역 체크포인트 억제제, 및 면역량의 항원성 (면역원성) 질환-관련 마커 분자를 투여하여 숙주 포유동물 세포를 접촉한다. 이들 3개 성분을 함께 투여할 수 있지만, 체크포인트 억제제가, 보통 함께 투여될 수 있는 디프로보심 및 항원 (면역원)과 개별적으로 투여될 수 있는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 체크포인트 억제제는 정맥내 (IV) 투여되는 반면, 디프로보심 및 항원은 면역접종 약제학적 조성물로 근육내 (IM)

또는 피하 (SC)로 함께 투여된다.

- [0120] 이들 투여는 수분, 수시간, 수일 또는 수주의 기간 내에 수행될 수 있다. 다수의 체크포인트 억제제는 전형적으로 약 2 내지 약 4 주의 정도로 생체내 말단 반감기를 갖는 항체 또는 파라토프-함유 항체 부분이다. [참조, 제품 라벨, Keytruda[®] (항-PD-1), Yervoy[®] (항-CTLA-4), Tecentriq[®] (항-PD-L1), Opdivo[®] (항-PD-1)], 및 Imfinzi[®] (항-PD-L1)에 대한 12.3 섹션]. 따라서, 체크포인트 억제제는 디프로보심 및 면역원의 투여 전, 동시에 또는 수일 후 투여할 수 있다 .
- [0121] 각각의 성분을 치료 과정 동안 수회 투여할 수 있다. 다중 투여의 사용을 본원에 예시한다.
- [0122] 디프로보심 화합물을 애주번트-충분량으로 투여한다. 본원에 다른 곳에서 예시된 연구에서, 본원에 예시적으로 사용되는 디프로보심-1 (A)은, 근육내 경로에 의해 면역접종 약제학적 조성물로 면역원과 공동-주사되는 경우 마우스에서 약 0.25 내지 약 5 mg/kg (i.m.)에서 생체내 잠재적 TLR2-의존 애주번트 활성을 유발하는 강건한 생체내 애주번트 또는 TLR1/TLR2 작용제로서 작용하였다. 애주번트-충분량은 당해 기술 분야에 잘 공지된 기술에 의해 더 무거운 중량의 포유동물을 위해 용이하게 결정될 수 있다. 추가로, 디프로보심-1은 애주번트로서 사용되는 경우 LPS 투여의 특징인 명백한(overt) 독성을 나타내지 않았다.
- [0123] 체크포인트 억제제는 전형적으로 제품 라벨에 논의된 양으로 이용한다. 예시적인 투여량(dosage) 및 투여는 나열된 양으로 사용하는 경우 예시적인 질환에 걸린 세포로서 흑색종을 사용하여 다음을 포함한다: Keytruda[®]--흑색종: 3 주마다 2 mg/kg; Yervoy[®] -- 애주번트 흑색종: 4개 용량의 경우 3 주마다 90 분 동안 정맥내 투여된 10 mg/kg, 이어서, 3년 이하 동안 12 주마다 10 mg/kg 또는 문서화된 질환 재발 또는 허용되지 않는 독성까지; Tecentriq[®]--3 주마다 60 분 동안 정맥내 주입으로 1200 mg 투여함; 및 Opdivo[®]--절제불가능한 또는 전이 흑색종 2 주마다 240 mg.
- [0124] 면역량의 항원성 (면역원성) 질환-관련 마커 분자는 사용되는 마커의 면역원성에 좌우된다. B 세포 및 T 세포를 위한 펩타이드 면역원성의 선택은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있고, 본원에 포함되어 있지 않다. 다수의 이러한 유용한 펩타이드는 당해 기술 분야에 보고되었지만, 백신으로서 목적하는 만큼 성공적으로 제형화되지 않았는데, 이는 아마도 T 세포 조력 결핍 때문이다. 3-부분 면역접종 약제학적 조성물이 상기 결핍을 극복하는 것으로 고려된다.
- [0125] 다수의 소형 질환-관련 마커 분자, 예를 들면, 약 5 내지 약 20 잔기 길이를 갖는 펩타이드는 자체로 열악한 면역원성이고, 종종 담체 분자에 화학적으로 링크된 합텐으로서 가장 잘 사용된다. 예시적인 단백질성 담체 분자는 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin; KLH), B형 간염 표면 분자 (HBsAg), B형 간염 코어 (캡시드; HBcAg), 오브알부민, 소 혈청 알부민, 소 감마글로불린 및 사람 감마글로불린을 포함하고, 문헌에서 다수의 다른 분자가 사용된 것과 같이 합텐 담체로서 사용되었다.
- [0126] 고려되는 질환-관련 마커 분자는 질환에 걸린 세포 내 및/또는 상에 존재한다. 질환에 걸린 세포는 전형적으로 암성 또는 병원체-감염되어 있다.
- [0127] 고형 종양 세포 내 및/또는 상에 존재하는 면역원으로서 유용한 질환-관련 마커 분자 또는 이의 부분은, 하기 나열된 정상 조직 세포에서 거의 발현되지 않는 암 줄기 세포 (CSC) 마커를 포함한다. [참조: Kim et al., BMB Rep 50(6):285-298 (2017).]. 정상 (무-질환) 세포에는 거의 없고 질환에 걸린 세포에서 존재하는 예시적인 CSC 마커는 CD96, CD20, DLL4, CD55, TIM-3, CXCR1, CD54, CD114, LGR5, CD105, CD56, CD13, CD271, CD34, CXCR4, CD26, CD117, CD10, CD146, Notch2, CD49f, CD24, ABCG2, PODXL-2, Cripto-1, CD326, CD90, CD133, SSEA1, TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA4, SSEA3, CD151, CD340 및 CD44를 포함한다.
- [0128] 예시적인 질환-관련 마커 분자는 전형적으로 고형 종양 세포 내 및/또는 상에 존재한다. 예시적인 고형 종양은 골육종 세포, 카포시 육종 세포, 흑색종 세포, 전립샘 암 세포, 아교모세포종 세포, 소세포 폐 암종 세포, 유방암 세포, 간 암 세포, 결장 암 세포, 난소 암 세포, 신장 암 세포, 위 암 세포, 신경모세포종 세포, 췌장 암 세포, 및 호지킨 림프종 세포를 포함한다.
- [0129] 고려되는 질환-관련 마커 분자 또는 이의 부분은 또한 병원체-감염된 세포 내 및/또는 상에 존재할 수 있다. 예시적인 감염 병원체는 바이러스, 박테리아, 진균 및 단세포 기생충 중 하나 이상을 포함한다.
- [0130] 예시적인 바이러스는 인플루엔자, A, B, C 및 D형 간염 바이러스, 헤르페스 바이러스, 예를 들면, 대상 포진

(수두), 단순헤르페스 1형 및 2형 (HSV1 및 HSV2), 사람 유두종 바이러스 (HPV) 등을 포함한다. 예시적인 박테리아 병원체는 이. 콜리(*E. coli*), 이. 패칼리스(*E. faecalis*), 에스. 아우레우스(*S. aureus*) 등을 포함한다. 예시적인 단세포 기생충은 피. 팔시파룸(*P. falciparum*), 피. 비박스(*P. vivax*), 피. 베르게이(*P. bergeii*) 및 피. 요엘리(*P. yoelli*)의 말라리아 포자소체이다.

- [0131] 예시적인 단백질질성 면역원은 공개 출처에 인용된 하기 열거된 하기 질환-관련 마커 분자 펩타이드를 포함한다.
- [0132] 미국 특허 제6,942,866호

말라리아 B 세포 에피토프

피. 팔시파룸

(NANP) ₄	서열번호:
NANPNVDP(NANP) ₃ NVDP	서열번호:
NANPNVDP(NANP) ₃	서열번호:
(NANP) ₃ NVDPNANP	서열번호:
NANPNVDP(NANP) ₃ NVDPNANP	서열번호:
NPNVDP(NANP) ₃ NV	서열번호:
NPNVDP(NANP) ₃ NVDP	서열번호:
NPNVDP(NANP) ₃ NVDPNA	서열번호:
NVDP(NANP) ₃ NV	서열번호:
NVDP(NANP) ₃ NVDP	서열번호:
NVDP(NANP) ₃ NVDPNA	서열번호:
DP(NANP) ₃ NV	서열번호:
DP(NANP) ₃ NVDP	서열번호:
DP(NANP) ₃ NVDPNA	서열번호:

피. 비박스

DRAAGQPAGDRADGQPAG	서열번호:
ANGAGNQPANGAGDQPGA-	
NGADNQPANGADDQPG	서열번호:
ANGAGNQPANGAGDQPG	서열번호:
ANGADNQPANGADDQPG	서열번호:
ANGAGNQPANGADNQPANG	서열번호:
ANGADNQPANGADDQPG	서열번호:
APGANQEGGAAAPGANQEGGAA	서열번호:

피. 베르게이

(DP ₄ NPN) ₂	서열번호:
------------------------------------	-------

피. 요엘리

(QGPGAP) ₄	서열번호:
-----------------------	-------

[0133]

말라리아 만능 T 세포 에피토프

피. 팔시파룸

GIEYLNKIQNSLSTEWSPCSVT

서열번호:

피. 비박스

YLDKVRATVGTWTPCSVT

서열번호:

피. 요엘리

EFVKQISSQLTEEWSQCSVT

서열번호:

[0134]

[0135]

미국 특허 제8,017,127호

[0136]

인플루엔자 A M2 단백질 B 세포 에피토프

[0137]

미국 특허 제8,017,127호에 언급된 바와 같이, M2 단백질은 인플루엔자 A 균주에 의해 감염된 세포에 존재한다. M2 단백질의 N-말단 잔기 1-24는 감염된 세포의 막을 통해 확장된다. 상기 단백질의 이러한 세포의 부분은 M2e로서 언급된다. 결과적으로, 면역원성 마커로서 상기 단백질의 인플루엔자 A 세포의 M2e 부분의 사용은 인플루엔자 균주 모두로부터의 보호를 제공할 수 있다. 따라서, 인플루엔자 백신 선택의 매년 변화를 피할 수 있다.

서열 _____ 서열번호

SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD
SLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGCRSNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGCRANDSSD
SLLTEVETPIRNEWGARCNDSSD
MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
MSLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD
MGISLLTEVETPIRNEWGCRCND-
SSDELLGWLWGI
MSLLTEVETPIRNEWGARANDSSD
MSLLTEVETPIRNEWGCRANDSSD
MSLLTEVETPIRNEWGARCNDSSD
MSLLTEVETPIRNEWGCRSNDSSD
MSLLTEVETPIRNEWGSRNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD
SLL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSD
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD
SLL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSD
SLL-
TEVETPIRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD
SLL-
TEVETPIRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGARANDSSD
SLL-
TEVETPIRNEWGARANDSSD
SLL-
TEVETPIRNEWGCRCNDSSD
EVETPIRNEWGSRNDSSD
EVETPIRNEWGSRNDSSDEVET-
PIRNEWGSRNDSSD
EVETPIRNEWGSRNDSSDEVET-

[0138]

PIRNEWGSRCONDSSDEVE-
TPIRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGSRSDSSDSL-
TEVETPIRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPTRNEWGCRCNDSSD
SLLTEVETPTRNGWGCRCNDSSD
SLLTEVETPIRNEWECRCNGSSD
SLLTEVETPTKNEWECRCNDSSD
SLLTEVETPTRNGWECKCSDSSD
SLLTEVDLTRNGWGCRCSDSSD
SLLTEVETLTRNGWECKCRDSSD

인플루엔자 B 단백질

NNATFNVTNVNPISHIR

[0139]

[0140]

미국 특허 제4,599,231호

[0141]

B형 간염 바이러스 표면 항원

[0142]

B형 간염 바이러스 표면 항원 (HBsAg)은 B 세포 및 T 세포 폴리펩타이드 에피토프 둘 다를 제공한다. 미국 특허 제4,599,231에 개시된 다수의 각각의 에피토프 유형은, ayw 공여자 (P49) 및 adw 공여자 (P72 및 P73)로부터 DNA에 기초하여 상기 특허에 언급된 바와 같이, 이들의 펩타이드 명명법 및 N-말단으로부터 삽입된 서열 위치와 함께 하기 표에 제시되어 있다.

HPV 유형 16-관련 폴리펩타이드

서열 서열번호

MADPAGTNGEEGTGC

HEDEDKENDGDSLPTC

RPFKSNKSTCC

CCDWCIAAFGLTPSI

TYDSEWQRDQFLSQVKIPC

HKSAIVTLTYDSEWQRDQC

CINCQKPLCPEEKQRH

[0148]

[0149]

고려되는 면역접종 조성물은 또한 전형적으로 시험관내 검정과 같은 약제학적 용도를 의도하지 않는 조성물에 존재할 수 있는 것과 비교하여 약제학적으로 (또는 생리학적으로) 허용되는 희석제 또는 담체로서 총괄하여 언급되는, 약제학적으로 허용되는 염, 완충액 및 유사 부형제를 포함한다. 이들 조성물은 하기에 추가로 상세하게 논의한다.

[0150]

본원에 사용된 디프로보심 화합물은 단독 사용을 위해, 또는 약제학적으로 허용되는 염으로서 제공될 수 있다. 고려되는 화합물에 유용한 예시적인 염은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 다음을 포함한다: 설페이트, 하이드로클로라이드, 하이드로 브로마이드, 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 비설페이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 디글루코네이트, 사이클로펜탄 프로피오네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 글루코헵타노에이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 푸마레이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락테이트, 말레이트, 메탄설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 팔모에이트, 펙틴에이트, 피설페이트, 3-페닐-프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 석시네이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, 토실레이트, 메실레이트 및 운데카노에이트. 카복실레이트 그룹의 염은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 알루미늄, 암모늄, 및 다수의 치환된 암모늄 염을 포함한다.

[0151]

독자는 약제학적 화합물과 함께 약제학적으로 허용되는 염을 형성하는 통상 사용되는 약제학적으로 허용되는 산 및 염기의 목록에 대해 문헌을 참조한다 [참조: Berge, J. Pharm. Sci. 1977 68(1):1-19].

[0152]

일부 경우에, 염은 또한 본 발명의 화합물의 단리, 정제 또는 분해에서 조제로서 사용될 수 있다. 이러한 용도에서, 사용되는 산 또는 염기 또는 제조되는 염 염은 약제학적으로 허용될 필요가 없다.

[0153]

고려되는 면역접종 약제학적 조성물은 면역원성 마커와 함께 생리학적으로 (약제학적으로) 허용되는 담체에 용해 또는 분산된 애쥬번트-효과적인 양의 화학식 V의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 이러한 조성물은 세포 배양물 중 시험관내 포유동물 세포에 투여하여 이들 세포와 접촉시킬 수 있거나, 세포를 필요로 하는 살아있는, 숙주 포유동물에서 생체내 접촉시킬 수 있다. 본원 데이터로부터 알 수 있는 바와 같이, 켈토몰 내지 나노몰 양으로 존재하는 고려되는 디프로보심 화합물은 생체내 및 시험관내 검정 연구에서 애쥬번트 효과를 제공한다.

[0154]

백신 애쥬번트로서 사용되는 경우, 화학식 V의 화합물은 바람직하게는 선택된 마커 면역원과 함께 투여된다. 둘 다의 성분은 바람직하게는 상기 언급된 바와 같이 단일 면역접종 약제학적 조성물 중에 함께 존재한다. 그러나, 2개의 성분은 개별적으로 투여된 면역접종 약제학적 조성물에 존재할 수 있고, 이들 개별적인 조성물은 약 1 내지 약 2 시간 이하로 간격을 두고 투여할 수 있다. 2개의 개별적인 조성물이 투여되는 경우, 가능한 근접한 시간 내에 함께 투여되는 것이 바람직하다.

[0155]

또다른 실시형태에서, 이용되는 디프로보심 화합물 일부 또는 전부는 면역접종 마커 화합물에 화학적으로 결합될 수 있다. 상기 화학적 결합은 화학식 V로 나타난 Z 치환체를 사용하여 형성될 수 있고, 여기서, 카복실 그룹

을 포함하는 Z 치환체는 면역원성 펩타이드 마커 화합물의 아미노 그룹에 결합될 수 있다. 대안적으로, 면역원성 마커 화합물이 담체 분자에 결합된 합텐으로서 이용되는 경우, 디프로보심 화합물은 또한 동일한 담체 분자에 화학적으로 결합될 수 있다.

[0156] 고려되는 면역접종 약제학적 조성물은 전형적으로 이를 필요로 하는 대상자에게 한달 이내에 다수회, 예를 들면, 매일 또는 매주 생체내 투여되고, 수개월 내지 수년의 기간 동안 투여될 수 있다. 보다 일반적으로, 고려되는 조성물은 치료 과정 동안 다수 회 투여된다.

[0157] 고려되는 면역접종 약제학적 조성물은 바람직하게는 비경구 투여를 위해 개조될 수 있다. 따라서, 면역접종 약제학적 조성물은 바람직하게는 투여되는 경우 액체 형태로 존재하고, 가장 바람직하게는, 액체는 수성 액체이지만, 하기 논의된 바와 같은 다른 액체가 고려되고, 현재 가장 바람직한 조성물은 주사가 가능한 제제이다.

[0158] 따라서, 주사가 가능한 제제, 예를 들면, 멸균 주사가 가능한 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액은 적합한 분산 또는 습윤 제제 및 현탁 제제를 사용하여 공지된 기술에 따라서 제형화될 수 있다. 멸균 주사가 가능한 제제는 또한 비독성 비경구로 허용되는 희석제 또는 용매 중 멸균 주사가 가능한 용액 또는 현탁액, 예를 들면, 1,3-부탄디올 중 용액일 수 있다. 이용될 수 있는 허용되는 비히클 및 용매 중에는 물, 링거 용액, 및 등장성 나트륨 클로라이드 용액, 포스페이트-완충된 염수가 있다.

[0159] 다른 액체 약제학적 조성물은, 예를 들면, 비경구 투여를 위해 적합한 용액을 포함한다. 화학식 V의 화합물의 멸균 수용액 또는 화학식 V의 화합물의 물, 에탄올, 또는 프로필렌 글리콜 함유 용매 중 멸균 용액은 비경구 투여를 위한 적합한 액체 조성물의 예이다. 일부 측면에서, 고려되는 화학식 V의 화합물은 사용전 주사를 위한 적절한 액체 매질, 예를 들면, 나트륨 클로라이드에 용해되어야 하는 건조 분말로서 제공된다.

[0160] 추가로, 멸균, 고정유는 용매 또는 현탁 매질로서 종래 이용된다. 이러한 목적을 위해 임의의 무자극 고정유가 이용될 수 있고, 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함한다. 추가로, 지방 산, 예를 들면, 올레산은 주사가 가능한 조성물의 제제에서 사용을 발견한다. 디메틸 아세트아미드, 이온성 및 비-이온성 계면활성제(detergents)를 포함하는 계면활성제(surfactants), 폴리에틸렌 글리콜을 사용할 수 있다. 용매 및 습윤제, 예를 들면, 상기 논의된 것들의 혼합물이 또한 유용하다. 멸균 용액은 활성 성분을 목적하는 용매 시스템에 용해시키고 이어서 수득한 용액을 막 필터를 통해 통과시키거나, 대안적으로, 멸균 화합물을 사전 멸균된 용매 중에 멸균 상태하에 용해시켜 제조할 수 있다.

[0161] 치료를 필요로 하는, 적어도 하나의 화학식 V의 화합물 및 면역원성 마커 화합물을 포함하는 약제학적 조성물이 투여되는, 질환에 걸린 세포를 갖는 포유동물 (대상자)는, 영장류, 예를 들면, 사람, 유인원, 예를 들면, 침팬지 또는 고릴라, 원숭이, 예를 들면, 시노몰구스 원숭이 또는 짧은 꼬리 원숭이, 실험실 동물, 예를 들면, 래트, 마우스 또는 래빗, 반려 동물, 예를 들면, 개, 고양이, 말, 또는 소 또는 비육우와 같은 식용 동물, 양, 새끼양, 돼지, 염소, 라마 등일 수 있다.

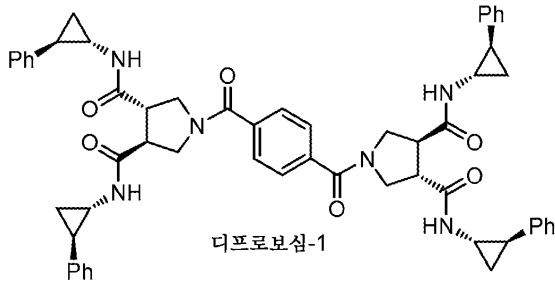
[0162] 바람직하게는, 약제학적 조성물은 단일 투여량 형태(unit dosage form)로 존재한다. 이러한 형태에서, 조성물은 적절한 양의 디프로보심 및 면역원을 포함하는 단위 용량으로 나누어진다. 단일 투여량 형태는 패키징 제제일 수 있고, 패키지는 별개의 양의 제제를, 예를 들면, 바이알 또는 앰플에 포함한다.

[0163] **결과**

[0164] **디프로보심은 사람 및 마우스 세포 둘 다에서 사이토킨 생성을 유발한다**

[0165] 대략적으로 100,000 구성원을 포함하는 화학적 라이브러리로부터, 한 부류의 화합물이 PMA-분화된 사람 THP-1 골수 세포에서 TNF 생합성을 활성화시킬 수 있는 양측 대칭으로 확인되었다. 개시되지 않은 화합물 하위라이브러리로부터 발생한 상기 부류의 초기 구성원은 세포 표면 수용체 이량체화를 촉진하기 위해 설계되었다 (18).

[0166] 하기 디프로보심-1은, 광범위한 구조-활성 상관관계 (SAR) 연구 후 이러한 부류로부터 개발되었다.



[0167]

[0168] THP-1 세포 (EC₅₀ 110 pM) 및 사람 PBMC (EC₅₀ 875 pM)에 의한 (도 1a 및 도 1b), 및 마우스 복막 마크로파지 (EC₅₀ 1.3 nM) 및 골수-유발된 수지상 세포 (BMDC) (EC₅₀ 6.7 nM)에 의한 (도 1c 및 도 1d) 용량-의존성 TNF 생성을 유도한다. TNF에 추가하여, 디프로보심-1은 마우스 BMDC에 의한 IL-6 생성을 유도하였다 (도 1e). 그러나, 디프로보심-1은 마우스 복막 마크로파지의 I형 IFN 생성을 자극하는데 실패하였다 (도 7). 연구된 다른 번호매김된 디프로보심 및 구조식 I으로 정의된 것은 또한 이러한 활성을 공유한다.

[0169] 디프로보심은 TLR1/TLR2를 표적화하고, 다운스트림 MAPK 및 NF-κB 신호전달 경로를 활성화시킨다

[0170] 디프로보심의 분자 표적을 결정하기 위해, 효과를 야생형 C57BL/6J 마우스 및 다양한 TLR 신호전달 성분이 결핍된 C57BL/6J 마우스로부터의 복막 마크로파지 상에서 분석하였다. 디프로보심에 의한 TNF의 유도는 TLR1- 또는 TLR2-결핍 마크로파지에서 완전히 부재하지만, TLR-6 결핍 마크로파지에서는 그렇지 않다 (도 2a). 디프로보심 활성화는 또한 극적으로 MyD88-, TIRAP-, 및 IRAK4-결핍 세포로부터의 마크로파지에서 감소하였다 (도 2a). 이들 데이터는 디프로보심이 마우스 TLR1/TLR2 이형이량체(heterodimer)를 표적화함을 제시한다.

[0171] TLR1 또는 TLR2 항체는 THP-1 세포에 미치는 디프로보심의 효과를 상당히 감소시키고, 이는 사람 TLR1/TLR2가 또한 디프로보심 분자의 표적임을 나타낸다 (도 2b). 디프로보심은 IKKα, IKKβ, p38, JNK, 및 ERK의 인산화, 뿐만 아니라 IκBα의 분해를 THP-1 세포 및 마우스 복막 마크로파지에서 유도하고, 이는 디프로보심이 MAPK 및 정준(canonical) NF-κB 신호전달을 포함하는 일반적인 TLR1/TLR2 신호전달을 활성화시킴을 나타낸다 (도 2c 및 도 2d).

[0172] 디프로보심은 생체내 애뉴먼트 활성을 나타낸다

[0173] 오브알부민 (OVA) 플러스 명반 또는 디프로보심 중 어느 하나를 사용한 야생형 마우스의 근육내 면역접종은 유사한 수준의 혈청 OVA-특이적 IgG를 유도하는데, 이는 OVA 플러스 비히클로의 면역접종으로 유도된 수준과 비교하여 상당히 상승되었다 (도 3a-도 3c). OVA+명반으로의 면역접종이 Th2-관련 Ig 하위부류 IgG1을 주로 유도하는 반면, OVA+디프로보심은 IgG1 및 Th1-관련 IgG2b 둘 다를 유도하였다 (도 3b 및 도 3c).

[0174] OVA+디프로보심으로의 마우스의 면역접종 후 24 시간에 배출 림프절 및 비장으로부터 정제된 수지상 세포 (DCs)는 이들로 공-배양된 OT-I CD8 T 세포를 활성화시키고, 이는 OT-I 세포 상 CD69 상향조절에 의해 입증되었다 (도 3d). 대조적으로, OVA+비히클로 면역접종된 마우스로부터의 DCs는 OT-I CD8 T 세포 상 CD69 발현을 유도하는데 실패하였다 (도 3d). 이러한 발견은 디프로보심이 DCs에 의한 항원 교차-제시 및 생체내 CD8 T 세포의 교차-프라이밍을 활성화시킴을 뒷받침한다.

[0175] 디프로보심에 의해 자극된 교차-프라이밍이 생체내 CD8+ T 세포에 의해 사멸 능력의 발달을 야기하는지를 추가로 조사하기 위해, CTL 사멸 검정을 수행하였다. 형광성 마커-표지된 및 OVA 펩타이드 (잔기, 257-263)-펄스된 표적 세포를 OVA+디프로보심으로 면역접종된 마우스로 i.v. 주사하고, 살아있는 표적 세포의 수를 2일 후 유세포분석기로 측정하였다. 약 70%의 표적 세포는, OVA+비히클로 면역접종된 마우스에서 약 10%인 것에 비교하여, OVA+디프로보심으로 면역접종된 마우스에서 제거되었다 (도 3e). 이들 데이터는 디프로보심이, TLR1- 및/또는 TLR2-결핍 마우스에서 폐기된, 항원-특이적 항체 생성 및 CTL 사멸에서 애뉴먼트 활성을 나타낸다는 것을 증명한다 (도 3 a-c, f 및 g).

[0176] 결합된 체크포인트 차단 및 디프로보심으로 보강된 항-암 백신에 의한 B16 종양 성장의 완전 억제

[0177] 디프로보심의 애뉴먼트 활성을 B16 흑색종 발현 OVA (B16-OVA)에 대하여 야생형 마우스의 예방적 면역접종에서 조사하였다 (도 4a). 마우스에게 동일한 날에 그러나 B16-OVA 세포로 접종 전에 디프로보심의 존재 또는 부재하

의 OVA를 갖는 종양 세포 주사 부위 원위에서 i.m. 주사하였다. 종양 성장 속도 및 생존 시간은 비히클 단독, 디프로보심 단독, 또는 OVA 단독으로 면역접종된 마우스와 유사하였다 (도 4b 및 도 4c). OVA 단독에 비해, 디프로보심+OVA로의 면역접종은 보통정도로(modestly) 그러나 상당히 종양 성장 속도를 느리게 하지만 생존을 연장시키는데 실패하였다; 유사한 효과가 항-PD-L1 치료제와 병용한 OVA 면역접종에서 관찰되었다 (도 4b 및 도 4c).

[0178] 두드러지게, 그것만으로 효과가 없지만 (도 8a 및 도 8b) 항-PD-L1 치료제가 디프로보심+OVA 면역접종에 추가되는 경우, 관찰 8 주 동안 종양 성장의 완전 억제 및 100% 생존하였다 (도 4b 및 도 4c). 이러한 극적인 항종양 효과는, 항-PD-L1 치료제와 병용한 디프로보심 단독이 종양 성장 또는 마우스 생존에 효과를 나타내지 않기 때문에, OVA 면역접종에 좌우되었다 (도 4d 및 도 4e); 이러한 발견은 B16 흑색종의 열악한 면역원성과 일치한다 (19-21).

[0179] 생존하는 마우스가 암 항원에 대해 지시된 특이적 및 장기간 기억을 가지고 있는지를 결정하기 위해, 도 4c로부터의 5-주 생존자에게 B16-OVA 세포 및 B16 세포 결핍 OVA로 재-접종하였다 (B16). 임의의 추가 요법의 부재하에, B16-OVA 종양 성장의 완전 실패를 관찰한 반면, B16 종양은 신속하게 성장하였다 (도 4f). B16 및 B16-OVA 종양 세포 둘 다는 나이브 C57BL/6J 마우스에서 유사한 속도로 성장하였다 (도 4f).

[0180] 종합해 보면, 이들 데이터는, 암 백신에서 애쥬번트로서 사용되는 경우, 디프로보심은 항원-특이적 항종양 면역을 촉진시키고, 이는 마우스에서 T 세포 체크포인트 차단과 병용되는 경우 매우 향상된다는 것을 나타낸다. 애쥬번트로서 디프로보심을 사용한 면역접종은 종양 성장의 재발로부터 숙주를 보호하는 항원-특이적 기억 반응을 생성한다.

[0181] 디프로보심의 항종양 효과를 이미 확립된 B16-OVA 종양을 사용하는 마우스의 치료학적 면역접종에서 조사하였다. C57BL/6J 마우스에게 종양 접종 일에 또는 3일 후에 디프로보심의 존재 또는 부재하의 OVA로 면역접종하고, 7일 후 추가 면역접종을 하였다 (도 4a). 일부 마우스에서, 명반은 디프로보심으로 대체되어 이들 2개의 애쥬번트 사이의 직접 비교를 가능하게 하였다. 모든 조건에 대해서, 항-PD-L1 치료제를 종양 접종 후 3일에 개시하고, 이후에 12일 동안 3일마다 반복하였다.

[0182] 종양 접종 일에 OVA 단독으로 면역접종된 마우스는 평균 24일 생존하고, 100%의 마우스 (8/8)가 종양 접종 후 38일까지 사망하였다. 예상된 바와 같이, 종양 접종 일에 투여된 디프로보심+OVA는 종양 성장을 완전히 억제하고, 100%의 마우스 (8/8)를 관찰 54일 동안 생존가능하게 하였다 (도 4g 및 도 4h). 명반이 동일한 연구에서 디프로보심 대신에 사용되는 경우, 종양 성장은 부분적으로 억제되고, 평균 생존 시간은 37일이고, 마우스의 25% (2/8)가 54일 후 생존하였다 (도 4g 및 도 4h).

[0183] 면역접종이 종양 접종 후 3일까지 연기된 경우, 디프로보심+OVA는 OVA 단독과 비교하여 종양 성장을 여전히 상당히 억제하고, 평균 생존을 연장시켰다 (41일 대 22일) (도 4i 및 도 4j). 대조적으로, 명반+OVA는 종양 성장을 억제하였지만, 평균 생존 시간 (30일)을 단지 약간 증가시켰다; 명반+OVA에 대한 생존 곡선은 OVA 단독에 대한 곡선과 유의하게 상이하지 않았다 ($P = 0.082$) (도 4i 및 도 4j). 종양-전 및 후 처리에서, 종양 성장, 생존율, 및 생존 시간에 미치는 디프로보심의 효과는 명반보다 우수하였다.

[0184] **디프로보심은 항종양 CTL 반응을 향상시킨다**

[0185] 병용된 항-PD-L1 치료제 및 디프로보심-보강된 면역접종이 종양을 제거하는 세포 메커니즘을 조사하였다. 디프로보심+OVA 또는 명반+OVA로 면역접종된 마우스의 종양-침윤성 백혈구 (TILs)를 종양 접종 후 3일에 분석하였다 (도 5a). 종양을 접종 후 14일에 수집하고, 단일-세포 현탁액은 염색된 항체이고, 유세포분석기로 분석하여 총 백혈구, CD4 및 CD8 T 세포, NK 세포, DCs, 및 마크로파지를 검출하였다. 백혈구를 또한 OVA 펩타이드에 결합된 H 2K^b MHC-부류 I 사량체 (잔기 257-264)에 대한 항체, 뿐만 아니라 CD8에 대한 항체로 염색하여 종양-특이적 CD8 T 세포를 확인하였다.

[0186] 디프로보심을 포함하는 OVA 면역접종은 비히클+OVA와 비교하여 종양에서 백혈구의 빈도를 상당히 증가시켰다 (도 5b). 이들 TILs의 추가 분석은, 디프로보심이 활성화된 CD4 및 CD8 T 세포 (CD44^{high}) 및 OVA-특이적 CD8 T 세포를 포함하는 CD4 및 CD8 T 세포의 빈도, 뿐만 아니라 NK 세포의 빈도를 증가시켰음을 나타낸다 (도 5c - 도 5h).

[0187] 명반+OVA 면역접종은 증가하는 TILs의 경향 (도 5b)을 나타내고, 이는 총 및 CD44^{high} CD8 T 세포에 대해 통계학적 유의성에 도달하였다 (도 5e 및 도 5f). 그러나, 증가 크기는 디프로보심+OVA에 의해 유발된 것과 비교하여

감소하였다. OVA-특이적 CD8 T 세포는 종양 접종 후 14일에 명반+OVA 면역접종 (도 5g)에 의해 증가하지 않았다; 비히클+OVA와 비교하여 어떠한 총 및 CD4^{high} CD4 T 세포 (도 5c 및 도 5d)도, NK 세포도 증가하지 않았다 (도 5h).

[0188] 종양-내 DCs 및 마크로파지의 빈도는 비히클+OVA, 디프로보심+OVA, 및 명반+OVA (도 5i 및 도 5j)로 면역접종된 마우스와 유사하였다. 전반적으로, 이들 데이터는, CD4 및 CD8 T 세포, 활성화된 CD4 및 CD8 T 세포, OVA-특이적 CD8 T 세포, 및 NK 세포의 종양-내 빈도는, 면역접종된 마우스에서 디프로보심 및 명반의 항종양 효과와 상호관련되지만, DCs 또는 마크로파지는 그렇지 않은 것으로 나타난다.

[0189] 디프로보심+OVA 플러스 항-PD-L1의 항종양 효과에 필수적인 면역 세포 집단(들)을 결정하기 위해, 마우스의 CD8 T 세포, CD4 T 세포, NK 세포, 또는 모든 3개 세포 집단을 세포 유형-특이적 항체를 사용하여 고갈시켰다. 고갈 항체를 B16-OVA 종양 접종 일 (0일째)에 그리고 이후에 15일 동안 3일마다 i.p. 투여하였다 (도 5k). 종양 성장 및 마우스 생존에 미치는 디프로보심+OVA의 효과는, 마우스의 CD8 T 세포 또는 모든 3개 세포 유형을 함께 (CD4 T, CD8 T, NK 세포) 고갈시킨 경우, 폐기되었다 (도 5l 및 도 5m). 대조적으로, CD4 T 세포 또는 NK 세포의 고갈이 디프로보심+OVA의 항-종양 활성화에 미치는 효과는 거의 없었다 (도 5l 및 도 5m).

[0190] 놀랍게도, 디프로보심+OVA 플러스 항-PD-L1로 처리된 마우스에서 종양 성장에 미치는 CD8 T 세포 고갈 대 CD4+CD8+NK 세포 고갈의 효과 사이에 약간의, 통계학적으로 유의한 차이를 주목하고, 여기서, 종양 성장은 모든 3개 세포 유형이 고갈된 마우스에서 더 컸다. 그러나, 이러한 차이는 생존율 또는 시간의 차이로 해석되지 않았다. 이러한 발견은, 디프로보심+OVA 플러스 항-PD-L1의 항-종양 효과 중재시 CD4 T 세포, NK 세포, 또는 이들 둘 다의 사소한 역할을 뒷받침한다. 이들 데이터는, CD8 T 세포가 마우스에서 치료학적 디프로보심+OVA 면역접종 및 체크포인트 억제에 의해 종양 근절에 필수적임을 증명한다.

[0191] **논의**

[0192] 종양 신생항원에 표적화된 암 백신은 체크포인트 억제제에 반응할 수 있는 종양-특이적 CTLs의 수치 및 활성화를 상승시켜 암 치료를 위한 면역 체크포인트 억제의 성공을 증가(boost)시킬 수 있다고 고려된다. 그러나, 면역접종에 대한 T 세포 반응의 유형 및 크기는 백신 애주번트에 중대하게(critically) 좌우되고; 현재 단지 소수의 애주번트가 사람에게서 사용하기 위해 승인되어 있다.

[0193] 여기서, 사람 및 마우스 TLR1/TLR2 이형이량체를 체결하고 활성화시키는 신규하고 잠재적인 애주번트, 디프로보심의 작용이, 기재된다. 디프로보심은 TLR1/TLR2를 활성화시키는 다른 보고된 합성 화학적 리간드와도, 또한 천연 리간드와도 구조적 유사성을 갖지 않는다 (22-26). 디프로보심은 사람 TLR1/TLR2를 활성화시키는데 널리 공지된 리간드인 Pam₃CSK₄보다 잠재적이고 효과적이다 (도 9a 및 도 9b).

[0194] 마우스에서, 디프로보심은 강력한 TLR1- 및 TLR2-의존 체액 및 CTL 반응을 공-투여된 항원에 유도한다. 체크포인트 억제와 병용되는 경우, 디프로보심-보강된 면역접종은 급속하게 치명적인 종양의 항원-특이적 근절을 야기하고, 종양 재성장을 예방할 수 있는 기억 반응을 유도한다. 종양의 치유는 체크포인트 억제 단독이 치명적 결과를 예방하는데 불충분하다는 사실에도 불구하고 관찰되며 (도 8a 및 도 8b), 이는 이러한 병용 면역요법의 전체의 뒷받침한다.

[0195] 이러한 데이터는 디프로보심-보강된 면역접종 플러스 체크포인트 억제의 항종양 효과를 매개하는 하기 주요한 기계론적 사건을 뒷받침한다 (도 6). 디프로보심은 APCs 상 TLR1/TLR2에 결합하고, 이를 활성화시켜 염증-유발 사이토킨을 생성하고, MHC I 및 MHC II를 통한 프로세싱 및 제시를 위해 투여된 종양-특이적 항원을 흡수한다 (take up). APCs에 의한 항원 제시, 공동자극성 분자 발현, 및 사이토킨 분비는 항원-특이적 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 증식 및 활성화를 유도하고, 이는 종양 세포에 대한 세포용해 활성을 발달시킨다. NK 세포는 또한 염증-유발 사이토킨에 의해 활성화되고, 종양 부위를 침윤시킨다. 항-PD-L1의 첨가는 종양 미세환경에서 주요 면역억제 메카니즘 활성을 억제하고, TCR/CD28 결합에 대한 반응에서 억제되지 않은 T 세포 활성화 및 증식을 허용하고 (27-29), 추가로 CD8 T 세포에 의해 매개된 종양 세포 용해를 촉진한다.

[0196] 다수의 보고서는 TLR2 신호전달의 종양형성-유발 및 항-종양형성 효과 둘 다를 기록하고, 이는 연구하는 세포 유형 또는 암의 유형에 좌우될 수 있다. 예를 들면, TLR2 신호전달은 IL-10과 같은 면역 억제 사이토킨의 유도를 통한 종양 성장, 및 억제인자 세포 및 종양 관련 마크로파지로부터 유도된 글수의 활성화 통해 뒷받침된다 (30-32). 대조적으로, TLR2 신호전달은 또한 DC 활성화 및 교차-제시를 자극하고 (33), Treg 기능을 하향조절하여 (34-36) 종양 회귀를 촉진한다.

- [0197] 디프로보심에 대해, 전신 TLR2 활성화의 전반적 결과는, 면역 체크포인트 억제와 병용된 OVA 면역접종의 맥락에서, 종양-침윤성 항원-특이적 CD8 T 세포에 의해 매개된 종양 세포 용해 및 종양 성장 억제이다.
- [0198] 애췌번트의 치료학적 지수는 아마도 APC에 대한 항원의 공동(conjoint) 표적화, 및 APC의 활성화의 효능에 좌우된다. 디프로보심 및 TLR2 사이의 상호작용의 방식은 X-선 결정학에 의해 연구되었고, 이러한 수용체의 하위단위와 이의 접촉은 다른 곳에서 보고될 것이다. 디프로보심-TLR1/2 복합물의 구조는 면역원성 펩타이드에 도입하기 위한 디프로보심 변형을 위한 기회를 암시하고, 모든 활성 디프로보심 분자가 항원과 동반되는 것을 보장하여 치료학적 지수의 최적화를 가능하게 한다. 디프로보심은 합성하기에 용이하고, 신속하게 개조되어 종양-연관 항원 및 신생항원을 도입할 수 있다. 이러한 특징은 임상 개발에 대한 매력적인 후보자가 되게 한다.
- [0199] **물질 및 방법**
- [0200] **마우스**
- [0201] C57BL/6J, *Tlr2*^{-/-}, *Myd88*^{-/-} 및 OT-I 마우스를 The Jackson Laboratory로부터 구입하였다. *Ly96*^{-/-} (*MD-2*^{-/-}) 마우스를 RIKEN BRC로부터 구입하였다. *Tlr4*^{lps3/lps3}, *Tlr6*^{int/int}, *Tlr7*^{rsq1/rsq1}, *Tirap*^{tor/tor}, *Ticam1*^{Lps2/Lps2}, *Ticam1*^{Lps2/Lps2}/*Irak4*^{otiose/otiose} 마우스를 순수한 C57BL/6J 배경 상에서 ENU 돌연변이생성에 의해 생성하고, <http://mutagenetix.utsouthwestern.edu>에 개시되어 있다.
- [0202] *Tlr1*^{-/-} 마우스를 CRISPR/Cas 9 유전자 표적화에 의해 생성하였다. 암컷 C57BL/6J 마우스를 6.5 U 임신 말 혈청 고나도트로핀 (PMSG; Millipore)의 주사, 이어서, 48 시간 후 6.5 U 사람 융모막 고나도트로핀 (hCG; Sigma-Aldrich)의 주사로 과배란시켰다. 과배란 마우스를 후속적으로 C57BL/6J 수컷 마우스와 밤새 교미시켰다. 다음 날에, 수정란을 난관으로부터 수집하고, 시험관내-전사된 Cas9 mRNA (50 ng/μl) 및 Tlr1 소 염기-쌍형성 가이드 RNA (50 ng/μl; 5'-CAAACCGATCGTAGTGCTGA-3'; 서열번호: XX)를 배아의 세포질 또는 핵 내로 주사하였다. 주사된 배아를 M16 배지 (Sigma-Aldrich)에서 37°C에서 5% CO₂에서 배양시켰다. 돌연변이 마우스의 생성을 위해, 2-세포기 배아를 가짜-임신(pseudo-pregnant) Hsd:ICR (CD-1) 암컷 마우스 (Harlan Laboratories)의 난관의 팽대 (난관당 10-20 배아)로 옮겼다.
- [0203] 마우스를 사용한 모든 실험 절차는 유니버시티 오브 텍사스 사우스웨스턴 메디칼 센터 (University of Texas Southwestern Medical Center)의 동물 관리 및 사용 위원회 (IACUC; the Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인받았고, 기관 승인된 프로토콜 및 동물 관리 및 사용에 대한 가이드라인에 따라 수행하였다. 모든 마우스를 기관 승인된 프로토콜에 따라서 유니버시티 오브 텍사스 사우스웨스턴 메디칼 센터에서 관리하였다.
- [0204] **복막 마크로파지, BMDC, 사람 PBMC 및 세포 배양의 단리**
- [0205] 티오글리콜레이트-유발된 마크로파지를 2 ml BBL 티오글리콜레이트 배지, 브로어 변형(brewer modified) (4% wt/vol; BD Biosciences)의 i.p. 주사 후 4일에 5 ml 포스페이트 완충된 염수 (PBS)로 복막 세척하여 회수하였다. 복막 마크로파지를 DMEM 세포 배양 배지 [10% vol/vol FBS (Gemini Bio Products), 1% vol/vol 페니실린 및 스트렙토마이신 (Life Technologies)을 포함하는 DMEM]에서 37°C 및 95% 공기/5% CO₂에서 배양하였다.
- [0206] 무린 BMDCs의 경우, 골수 세포를 페트리 접시에서 10 ng/ml의 무린 GM-CSF (R&D Systems)를 포함하는 10 ml DMEM 세포 배양 배지 중에서 배양하였다. 배양 3일째에, 이를 신선한 GM-CSF 배지로 교체하였다. 느슨하게 접촉된 세포를 신선한 페트리 접시로 옮기고, 추가로 4 d 동안 배양하였다. 사람 PBMC를 Stemcell Technologies에서 구입하였다. THP-1 (ATCC) 세포를 100 nM PMA (Sigma)로 RPMI 세포 배양 배지 [10% vol/vol FBS (Gemini Bio Products), 1% 페니실린 및 스트렙토마이신 (Life Technologies)을 포함하는 RPMI]에서 24 시간 동안 처리하여 분화시켰다. 이후에, 세포를 PBS로 세척하고, 연구에 사용하기 전에 신선한 RPMI 세포 배양 배지에서 24 시간 동안 배양하였다.
- [0207] **사이토킨 생성의 측정**
- [0208] 세포를 96-웰 플레이트 상에 웰당 1x10⁵ 세포로 시딩하고, 디프로보심 (DMSO 중 용해됨, 최종 DMSO 농도 (< 0.2%))를 모든 실험에서 유지하였다)으로 4 h 동안 자극하였다. 상청액 중 마우스 TNF, IL-6, 또는 IFN-β, 또는 사람 TNF를 ELISA 키트로 제조사의 지시 (eBioscience 및 PBL Assay Science)에 따라서 측정하였다. 20 μg/ml 항-TLR1, 항-TLR2 또는 이소형 대조군 항체 (eBioscience)로 1 시간 동안 전처리하였다. 달리 지시하지 않는

한, 마우스 세포는 야생형 C57BL/6J 마우스로부터의 세포였다.

[0209] 웨스턴 블롯팅

[0210] 마우스 복막 마크로파지 또는 사람 THP-1 세포 (웰당 1×10^6)를 마우스 세포의 경우 500 nM 또는 사람 세포의 경우 5 nM에서 지시된 시간 동안 디프로보심을 사용하여 12-웰 플레이트에서 자극하고, 샘플 완충액 (Sigma)에 직접적으로 용해하였다. 세포 용해물을 SDS-PAGE로 분리하고, 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 막을 하기 항체로 탐침하였다: 포스포-IKK α (Ser176)/IKK β (Ser177), I κ B α , 포스포-p38 (Thr180/Tyr182), 포스포-JNK (Thr183/Tyr185), 포스포-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology) 및 β -액틴 (Sigma).

[0211] 면역접종 및 항체 반응의 측정

[0212] $\geq 98\%$ 순도 최저치를 갖는 EndoFit 오브알부민 (OVA) (SDS-PAGE) 및 내독소 수준 < 1 EU/mg을 Invivogen에서 구입하였다. 마우스 (그룹당 4 마리 마우스)를 비히클 (DMSO:Tween 80:염수=1:1:8)와, 10 mg/kg 디프로보심과, 또는 2 mg/kg 명반 (Alhydrogel 애쥬번트 2%, Invivogen)과 혼합된 100 μ g OVA로 i.m. 면역접종하였다. 14일 후, OVA-특이적 IgG, IgG1, 또는 IgG2b (SouthernBiotech)의 혈청 역가를 ELISA로 측정하였다.

[0213] 생체내 CTL 사멸 검정

[0214] C57BL/6J 수컷 마우스를 100 μ g OVA 플러스 10 mg/kg 디프로보심 (그룹당 n=4 마리 마우스)으로 i.m. 주사하였다. 1주 후, 나이브 C57BL/6J 마우스를 사멸시키고, 비장세포를 수집하였다. 비장세포의 반은 펠스되지 않은 채로 남아있고, 나머지 반은 OVA257-263 펩타이드로 2 시간 동안 완전 배지 [10% vol/vol FBS, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI]에서 37 $^{\circ}$ C에서 펠스되었다. 펠스되지 않은 세포 및 펩타이드-펠스된 세포를 각각 0.5 μ M ("저") 또는 5 μ M ("고") CellTrace Violet (Invitrogen)로 무-혈청 배지 중에 20 분 동안 표지하였다. 동일한 수(2×10^6)의 CellTrace Violet^{high} (OVA 펠스됨) 및 CellTrace Violet^{low} (펠스되지 않음) 세포를 함께 혼합하고, 면역접종된 마우스로 정맥내 주사하였다. 48 시간 후, 처리된 마우스로부터 혈액을 수집하고, 유세포분석기 분석으로 처리하였다. 남아있는 살아있는 CellTrace Violet^{high} 및 CellTrace Violet^{low} 세포의 수를 측정하고, 사멸된 OVA 펩타이드-펠스된 표적 세포의 백분율을 계산하기 위해 사용하였다. 특이적 사멸을 다음과 같이 정의하였다:

[0215] 비율 = CellTrace Violet^{low} 세포 / CellTrace Violet^{high} 세포.

[0216] 표적 세포 용해의 백분율 = [1 - 면역접종되지 않은 비/면역접종된 비] x 100.

[0217] 종양 접종, 면역접종, 및 종양 측정

[0218] B16-OVA 세포 (닭 오브알부민을 안정하게 발현하는 B16F10 흑색종 세포)를 10% vol/vol FBS를 포함하는 DMEM에서 성장시켰다. 100 μ L PBS 중 총 2×10^5 B16-OVA 세포를 8-12 주령 수컷 C57BL/6J 마우스의 우측 옆구리에 s.c. 주사하여 종양을 확립시켰다 (그룹당 n=8마리 마우스). 전처리를 위해, OVA (100 μ g) 존재 또는 부재하의 10 mg/kg 디프로보심-1 또는 2 mg/kg 명반을 종양 접종으로 동일한 날에 마우스에게 i.m. 주사하였다 (0일째). 마우스는 첫번째 면역접종 후 7일에 추가 면역접종(booster shot)을 받았다. 3, 6 및 9일째에, 일부 그룹에게 100 μ l 염수 중 200 μ g 체크포인트 억제제 (항-mPD-L1, BioXcell)로 i.p. 주사하였다.

[0219] 후-처리를 위해, OVA (100 μ g)를 갖는 10 mg/kg 디프로보심-1 또는 2 mg/kg 명반을 종양 접종 후 3일에 마우스에게 i.m. 주사하였다. 마우스는 첫번째 면역접종 후 7일에 추가 면역접종을 받았다. 종양 접종 후 3, 6, 9, 12 및 15일에, 마우스를 또한 100 μ l 염수 중 200 μ g 항-mPD-L1로 i.p. 주사하였다.

[0220] CD4 T 세포, CD8 T 세포, 및/또는 NK 세포의 고갈의 경우, 300 μ g 항-mCD4 (BioXcell), 300 μ g 항-mCD8 (BioXcell), 300 μ g 항-mNK1.1 (BioXcell), 또는 3개의 항체를 200 μ l 염수 중에 함께 종양 접종 후 0, 3, 6, 9, 12, 및 15일에 마우스에게 i.p. 주사하였다. OVA(100 μ g)를 갖는 10 mg/kg 디프로보심 또는 비히클을 종양 접종 후 3일에 마우스에게 i.m. 주사하였다. 마우스는 첫번째 면역접종 후 7일에 추가 면역접종을 받았다. 종양 접종 후 3, 6, 9, 12 및 15일에, 마우스를 또한 100 μ l 염수 중 200 μ g 항-mPD-L1로 i.p. 주사하였다.

[0221] 종양을 디지털 캘리퍼 (Fisher)로 측정하고, 종양 크기를 하기 식을 사용하여 계산하였다: 용적=0.5 x 길이 x 너비². 종양 길이 및 너비가 2 cm에 도달하면 마우스를 희생시켰다.

[0222] **종양-침윤성 백혈구 분리 및 염색**

[0223] 100 μ L PBS 중 총 2×10^5 B16-OVA 세포를 각 마우스의 옆구리에 s.c. 주사하여 종양을 확립하였다 (처리당 n=6 마우스). OVA(100 μ g) 존재하의 10 mg/kg 디프로보심-1 또는 2 mg/kg 명반을 종양 접종 후 3일에 마우스에게 i.m. 주사하였다. 마우스는 첫번째 면역접종 후 7일에 추가 면역접종을 받았다. 종양 접종 후 3, 6, 9, 및 12일에, 마우스에게 또한 200 μ g 항-mPD-L1로 i.p. 주사하였다.

[0224] 종양 접종 후 14일에, 종양을 수거하고, 분쇄하고, 40- μ m 스트레이너(strainer)를 통해 여과하여 단일-세포 현탁액을 획득하였다. 적혈구를 RBC 용해 완충액 (Sigma)으로 용해시켰다. 펠릿화 후, 세포를, 항-마우스 CD45.2-PE 또는 CD45.2-APC (BioLegend), 항-마우스 CD3-FITC (BD Biosciences), 항-마우스 CD4-BV786 (BD Biosciences), 항-마우스 CD8-BV510 (BioLegend), 항-마우스 CD44-PE-CF594 (BioLegend), APC-접합된 H-2Kb/OVA (SIINFEKL; 서열번호: XX) 사랑체 (Baylor College of Medicine), 항-마우스 F4/80-PE (Tonbo Bioscience), 항-마우스 CD11b-BV605 (BioLegend), 항-CD11c-BV711 (BD Biosciences), 항-NK1.1-BV650 (BD Biosciences)를 포함하는 항체의 혼합물로 45 분 동안 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 염색된 세포를 LSRII 장치 (BD Biosciences)로 분석하고, 유세포분석기 데이터를 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0225] **CD8 T 세포의 교차-프라이밍의 측정**

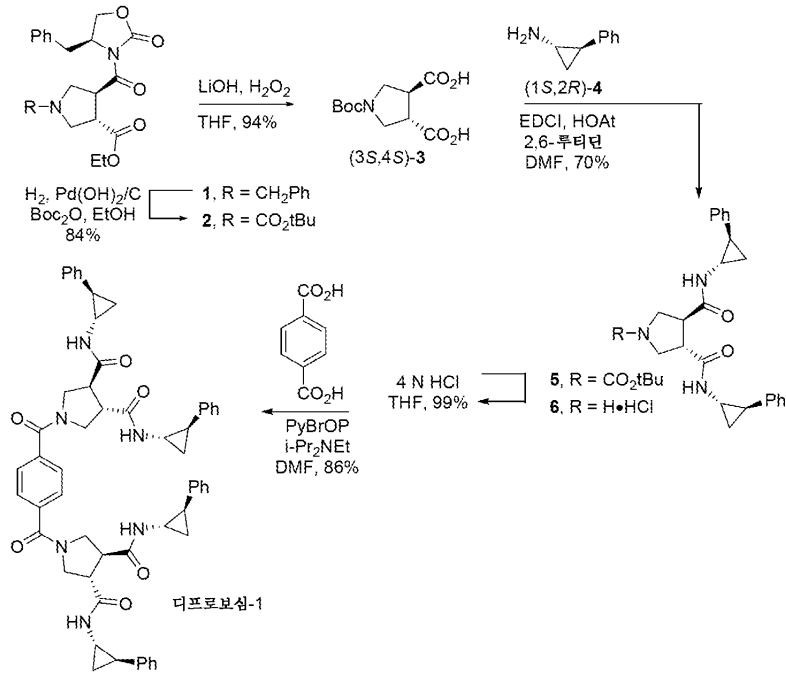
[0226] C57BL/6J 수컷 마우스를 비히클 또는 10 mg/kg 디프로보심과 혼합된 100 μ g OVA로 i.m. 주사하였다 (처리당 n=4 마리 마우스). 24 시간 후, 배출 림프절 및 비장로부터 DCs를 마우스 Pan 수지상 세포 단리 키트(Mouse Pan Dendritic Cell Isolation Kit) (Miltenyi Biotech)에 의해 정제하였다. OT-I 유전자삽입 마우스로부터 CD8 T 세포를 마우스 CD8+ T 세포 단리 키트 (Miltenyi Biotech)에 의해 정제하였다. 3×10^5 DCs를 10% vol/vol FBS 및 1% vol/vol 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 RPMI 배지에서 24 시간 동안 3×10^5 OT-I CD8 T 세포와 함께 공-배양하였다. 이어서, 세포를 수집하고, 항-마우스 CD3-FITC, 항-마우스 CD8-BV510, 및 항-마우스 CD69-PE-CF594 (BioLegend)로 45 분 동안 염색하였다. 이어서, 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 염색된 세포를 LSRII 장치로 분석하고, 유세포분석기 데이터를 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0227] **통계학적 분석**

[0228] 데이터는 오차 막대를 도시하는 모든 그래프에서 평균 \pm SEM를 나타낸다. 실험 그룹 간의 통계학적 유의한 차이는 GraphPad Prism 7 및 지시된 통계학적 시험을 사용하여 측정하였다. 2개의 독립표본(unpaired) 실험 그룹 간의 차이의 비교를 위해, 독립표본 스튜던트 t 시험을 사용하고, 양측-검정 P 값을 보고하였다. P 값을 * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$ 로 나타낸다. $P \leq 0.05$ 는 통계학적으로 유의한 것으로 고려되었다.

[0229] **방법**

[0230] 디프로보심-1의 합성



[0231]

[0232] 디프로보심 분자 및 중간체의 합성을 나타내고, 2018년 1월 4일에 공개된 WO 2018/005812 1A에 상세하게 논의되어 있다. 예시적인 합성은 또한 하기에 제시되어 있다.

[0233] (3S,4S)-1-3급-부틸 3-에틸 4-((S)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-카보닐)피롤리딘-1,3-디카복실레이트 (2). (3S,4S)-에틸 1-벤질-4-((S)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-카보닐)피롤리딘-3-카복실레이트¹ (¹ Bao 등, 미국 특허 제6,489,354 B1호에 따라서 단일 입체이성체로 제조됨.) (1, 3.43 g, 7.86 mmol) 및 Boc₂O (1.80 g, 8.25 mmol, 1.05 equiv)를 에탄올 (EtOH, 50 mL) 중 실온에서 용해시켰다. Pd(OH)₂/C (500 mg)를 첨가하고, 반응 혼합물을 질소 (N₂)로 15 분 동안 살포하였다.

[0234] 수소 (H₂) 충전 밸브 및 진공 공급원이 장착된 3-웨이 플라싱 어댑터(3-way flushing adapter)를, 부착하였다. 반응 혼합물 위 헤드스페이스(headspace)를 용매가 비등하기 시작할 때까지 배출시키고, 이어서, H₂로 다시 충전시켰다. 이러한 진공/충전 프로세스를 10-15 회 반복하여 헤드스페이스에서 H₂를 최대화하였다. 18 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 6 cm Celite 플러그를 통해 여과하고, EtOH 분취액 (3 × 15 mL)으로 완전히 세정하고, 농축하였다. 심광 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 25% EtOAc/헥산)하여 2.93 g (84%)의 2를 맑은, 점성 오일로서 제공하였다.

[0235] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.40 - 7.19 (m, 5H), 4.69 (dd, J = 9.0, 4.5 Hz, 1H), 4.52 (q, J = 7.7 Hz, 1H), 4.29 - 4.14 (m, 4H), 3.95 - 3.75 (m, 2H), 3.60 (m, 2H), 3.52 - 3.27 (m, 2H), 2.86 - 2.71 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.28 (t, J = 7.5 Hz, 3H). HRMS (ESI-TOF) m/z C₂₃H₃₁N₂O₇ [M+H]⁺에 대한 계산치 447.2126, 실측치 447.2126.

[0236] (3S,4S)-1-(3급-부톡시카보닐)피롤리딘-3,4-디카복실산 (3)² (² 문헌을 참조하여 변형된 절차: Ma et al., *Tetrahedron Asymm.* **8**, 883-887 (1997)). (3S,4S)-1-3급-부틸 3-에틸 4-((S)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-카보닐)피롤리딘-1,3-디카복실레이트 ((3S,4S)-2, 2.06 g, 4.63 mmol)를 무수 테트라하이드로퓨란 (THF, 20 mL)에 용해시키고, 0°C로 냉각하였다. 과산화수소 (2.10 mL, ca. 18.5 mmol, 4.0 equiv, 30% w/v)를 교반된 반응 용액에 적가하였다. 3-5 분 후, LiOH-H₂O (500 mg, 11.9 mmol)를 첨가하였다. 2 시간 후, 추가 LiOH (470 mg, 11.2 mmol)를 H₂O (10 mL) 및 THF (15 mL)와 함께 첨가하였다.

- [0237] 수성 THF 반응 혼합물을 3 시간 교반하고, 실온으로 가온시켰다. 포화 수성 Na_2SO_3 (10 mL)를 첨가하고, THF를 N_2 스트림하에 제거하였다. 수득한 혼합물을 H_2O (200 mL)에 붓고, 메틸렌 클로라이드 (CH_2Cl_2 , 2×100 mL)로 추출하여 옥사졸리디논을 제거하였다.
- [0238] 수성 상을 수성 1 N HCl을 첨가하여 pH 2로 산성화시켰다 (ca. 75 mL). 수성 상을 에틸 아세테이트 (EtOAc, 3×125 mL)로 추출하고, 유기 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과시키고, 농축하여 1.13 g (94%)의 (S,S)-3을 백색 고체로서 제공하였다.
- [0239] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 3.59 - 3.48 (m, 2H), 3.41 - 3.31 (m, 2H), 3.30 - 3.18 (m, 2H), 1.39 (s, 9H).
- [0240] (3S,4S)-3급-부틸 3,4-비스(((1S,2R)-2-페닐사이클로프로필)카바모일)피롤리딘-1-카복실레이트 (5). (3S,4S)-1-(3급-부톡시카보닐)피롤리딘-3,4-디카복실산 ((S,S)-3, 775 mg, 2.99 mmol), (1S,2R)-트랜스-2-페닐사이클로프로필아민 ((1S,2R)-4, 816 mg, 6.13 mmol, 2.05 equiv, 제조원: D-L Chiral Chemicals), 및 1-하이드록시-7-아자벤조트리아졸 (HOAt, 895 mg, 6.58 mmol, 2.20 equiv)을 무수 디메틸포름아미드 (DMF, 15 mL)에 N_2 분위기 하에 용해시켰다. 2,6-루티딘 (1.75 mL, 14.9 mmol, 5.00 equiv)을 서서히 첨가하였다. 시약을 용해시킬 때 (약 15 분), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 하이드로클로라이드 (EDCI · HCl, 1.43 g, 7.47 mmol, 2.50 equiv)를 하나의 분획으로 첨가하고, 반응 혼합물을 18 시간 동안 교반하고, 이후에 수성 1 N HCl (150 mL) 및 EtOAc (100 mL)에 부었다.
- [0241] 수성 상을 EtOAc (2×75 mL)로 추출하고, 합한 유기 상을 수성 1 N HCl (75 mL), 포화 수성 NaHCO_3 (75 mL), 및 포화 수성 NaCl (50 mL)로 순차적으로 세척하였다. 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축하였다. 섬광 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , 50% EtOAc/헥산)하여 1.02 g (70%)의 5를 제공하였다.
- [0242] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.33 - 7.24 (m, 5H), 7.23 - 7.09 (m, 5H), 6.61 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 3.85 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.60 (t, J = 10.5 Hz, 1H), 3.42 (t, J = 10.4 Hz, 1H), 3.27 (q, J = 10.0, 9.3 Hz, 1H), 3.12 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 2.88 (m, 2H), 2.05 (ddt, J = 9.8, 6.4, 3.4 Hz, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.24 (q, J = 6.6 Hz, 2H), 1.13 (dt, J = 10.1, 5.3 Hz, 2H). HRMS (ESI-TOF) m/z $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 대한 계산치 490.2700, 실측치 490.2705.
- [0243] (3S,4S)- N^3, N^4 -비스(((1S,2R)-2-페닐-사이클로프로필)피롤리딘-3,4-디카복사미드 하이드로클로라이드 (6). (3S,4S)-3급-부틸 3,4-비스(((1S,2R)-2-페닐사이클로프로필)카바모일)-피롤리딘-1-카복실레이트 (5, 998 mg, 2.04 mmol)를 무수 THF (2 mL) 중 실온에서 현탁시켰다. 4 N HCl (8 mL, 디옥산 중 4.0 M 용액)을 격렬하게 교반된 반응 용액에 적가하였다. 실온에서 3 시간 교반 후, 그 동안 일부 생성물이 반응 혼합물로부터 침전되고, 용매를 N_2 스트림으로 16 시간 동안 제거하였다. 잔여 고체를 무수 THF 중에 현탁시키고, 진공하에 재농축시켜 (3×5 mL), 디옥산 및 과량의 HCl을 완전히 제거하도록 하였다. 이러한 과정을 무수 Et_2O (3×5 mL)로 반복하여 870 mg (99%)의 6을 무정형 백색 고체로서 제공하였다.
- [0244] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.35 (s, 2H), 8.76 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 7.26 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 7.20 - 7.06 (m, 6H), 3.76 - 3.62 (m, 1H), 3.55 - 3.42 (m, 1H), 3.26 (t, J = 8.2 Hz, 2H), 3.21 - 3.11 (m, 2H), 2.90 - 2.78 (m, 2H), 1.99 (ddd, J = 9.6, 6.3, 3.4 Hz, 2H), 1.26 - 1.13 (m, 4H). HRMS (ESI-TOF) m/z $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 에 대한 계산치 390.2176, 실측치 390.2178.
- [0245] 디프로보심-1: (3S,3'S,4S,4'S)-1,1'-테레프탈로일비스(N^3, N^4 -비스(((1S,2R)-2-페닐사이클로-프로필)피롤리딘-3,4-디카복사미드). (3S,4S)- N^3, N^4 -비스(((1S,2R)-2-페닐사이클로프로필)-피롤리딘-3,4-디카복사미드 하이드로클로라이드 (6, 500 mg, 1.17 mmol, 2.20 equiv) 및 테레프탈산 (벤젠-1,4-디카복실산, 89 mg, 0.53 mmol, 1.00 equiv)을 무수 DMF (6 mL) 중 실온에서 용해시켰다. i- Pr_2NEt (0.280 mL, 1.60 mmol, 3.00 equiv)를 첨가하고, 이어서, 브로모-트리스-피롤리디노포스포늄 헥사플루오로포스페이트 (PyBrOP, 497 mg, 1.07 mmol, 2.00

equiv)를 5 분 후 첨가하고, 혼합물을 23°C에서 18 시간 동안 교반하였다. 18 시간 후, 반응 혼합물을 EtOAc (300 mL)로 희석하고, 수성 0.5 N HCl (2 × 150 mL)로 세척하였다. 수성 상을 EtOAc (1 × 50 mL)로 추출하였다.

[0246] 합한 유기 상을 포화 수성 NaHCO₃ (100 mL) 및 포화 수성 NaCl (75 mL)로 세척하였다. 유기 상을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 경사여과하고, 농축하였다. 섬광 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 5-8% MeOH/CH₂Cl₂)로 디프로보심-1을 제공하였다. 디프로보심-1을 추가로 냉 (0°C) 1:1 Et₂O/EtOAc (3 × 5 mL)로 분쇄하여 정제하고, 액체 상을 경사

여과하여 421 mg (86%)의 순수한 디프로보심을 제공할 수 있다. $[\alpha]_D^{26} +57$ (c 0.33, EtOH). IR (neat) ν_{max} 3259, 1633, 1539, 1426, 1386, 1073, 695 cm⁻¹.

[0247] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.42 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 8.29 (d, J = 4.3 Hz, 2H), 7.56 (s, 4H), 7.27 - 7.21 (m, 8H), 7.19 - 7.09 (m, 8H), 7.09 - 7.03 (m, 4H), 3.80 (dd, J = 12.0, 8.6 Hz, 2H), 3.71 - 3.58 (m, 2H), 3.51 (ddd, J = 15.6, 11.2, 8.2 Hz, 4H), 3.19 (q, J = 8.4 Hz, 2H), 3.10 (q, J = 8.1 Hz, 2H), 2.90 - 2.80 (m, 2H), 2.80 - 2.73 (m, 2H), 1.97 (ddd, J = 9.6, 6.4, 3.4 Hz, 2H), 1.86 (ddd, J = 9.5, 6.3, 3.4 Hz, 2H), 1.21 - 1.13 (m, 4H), 1.13 - 1.05 (m, 4H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 171.65, 170.93, 167.46, 141.28, 141.19, 137.71, 128.17, 128.14, 127.09, 125.83, 125.79, 125.60, 51.48, 48.74, 46.95, 45.83, 45.07, 32.54, 32.45, 25.87, 23.90, 23.81, 15.33, 15.24. HRMS (ESI-TOF) m/z C₅₆H₅₇N₆O₆ [M+H]⁺에 대한 계산치 909.4334, 실측치 909.4334.

[0248] 인용문헌

1. Hou B, Reizis B & DeFranco AL (2008) Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms. *Immunity* 29(2): 272-282.
2. MacLeod H & Wetzler LM (2007) T cell activation by TLRs: A role for TLRs in the adaptive immune response. *Sci STKE* 2007(402): pe48.
3. Coffman RL, Sher A & Seder RA (2010) Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. *Immunity* 33(4): 492-503.
4. Haanen JBAG (2017) Converting cold into hot tumors by combining immunotherapies. *Cell* 170(6): 1055-1056.
5. Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA & Ribas A (2017) Primary, adaptive, and acquired resistance to cancer immunotherapy. *Cell* 168(4): 707-723.
6. Wang H, et al (2017) cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114(7): 1637-1642.

[0249]

7. Zou W, Wolchok JD & Chen L (2016) PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci Transl Med* 8(328): 328rv4.

8. Topalian SL, Drake CG & Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27(4): 450-461.

9. Takeda Y, et al (2017) A TLR3-specific adjuvant relieves innate resistance to PD-L1 blockade without cytokine toxicity in tumor vaccine immunotherapy. *Cell Rep* 19(9): 1874-1887.

10. Shah RR, Hassett KJ & Brito LA (2017) Overview of vaccine adjuvants: Introduction, history, and current status. *Methods Mol Biol* 1494: 1-13.

11. Reed SG, Orr MT & Fox CB (2013) Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* 19(12): 1597-1608.

12. Kawai T & Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 11(5): 373-384.

13. Kawasaki T & Kawai T (2014) Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5: 461.

14. Beutler BA (2009) TLRs and innate immunity. *Blood* 113(7): 1399-1407.

15. Lim KH & Staudt LM (2013) Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(1): a011247.

16. Wang S, et al (2016) Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(46): E7240-E7249.

[0250]

17. Dowling JK & Mansell A (2016) Toll-like receptors: The swiss army knife of immunity and vaccine development. *Clin Transl Immunology* 5(5): e85.

18. Goldberg J, et al (2002) Erythropoietin mimetics derived from solution phase combinatorial libraries. *J Am Chem Soc* 124(4): 544-555.

19. Ueha S, et al (2015) Robust antitumor effects of combined anti-CD4-depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice. *Cancer Immunol Res* 3(6): 631-640.

20. Lechner MG, et al (2013) Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother* 36(9): 477-489.

21. Chen L, et al (1994) Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 179(2): 523-532.

22. Murgueitio MS, et al (2017) Enhanced immunostimulatory activity of in silico discovered agonists of toll-like receptor 2 (TLR2). *Biochim Biophys Acta* 1861(11 Pt A): 2680-2689.

23. Guo X, et al (2017) The novel toll-like receptor 2 agonist SUP3 enhances antigen presentation and T cell activation by dendritic cells. *Front Immunol* 8: 158.

24. Guan Y, Omueti-Ayoade K, Mutha SK, Hergenrother PJ & Tapping RI (2010) Identification of novel synthetic toll-like receptor 2 agonists by high throughput screening. *J Biol Chem* 285(31): 23755-23762.

25. Cheng K, et al (2015) Specific activation of the TLR1-TLR2 heterodimer by small-

[0251]

molecule agonists. *Sci Adv* 1(3):
10.1126/sciadv.1400139.

26. Jin MS, et al (2007) Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130(6): 1071-1082.

27. Freeman GJ, et al (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192(7): 1027-1034.

28. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N & Honjo T (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11(2): 141-151.

29. Dong H, Zhu G, Tamada K & Chen L (1999) B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5(12): 1365-1369.

30. Tang M, et al (2015) Toll-like receptor 2 activation promotes tumor dendritic cell dysfunction by regulating IL-6 and IL-10 receptor signaling. *Cell Rep* 13(12): 2851-2864.

31. Yamazaki S, et al (2011) TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. *PLoS One* 6(4): e18833.

32. Shime H, et al (2017) Toll-like receptor 2 ligand and interferon-gamma suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* 7(1): e1373231.

33. Shen KY, et al (2014) Molecular mechanisms of TLR2-mediated antigen cross-

[0252]

presentation in dendritic cells. *J Immunol* 192(9): 4233-4241.

34. Nyirenda MH, et al (2011) TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J Immunol* 187(5): 2278-2290.

35. Zhang Y, et al (2011) TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J Immunol* 186(4): 1963-1969.

36. Amiset L, et al (2012) TLR2 ligation protects effector T cells from regulatory T-cell mediated suppression and repolarizes T helper responses following MVA-based cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 1(8): 1271-1280.

[0253]

[0254]

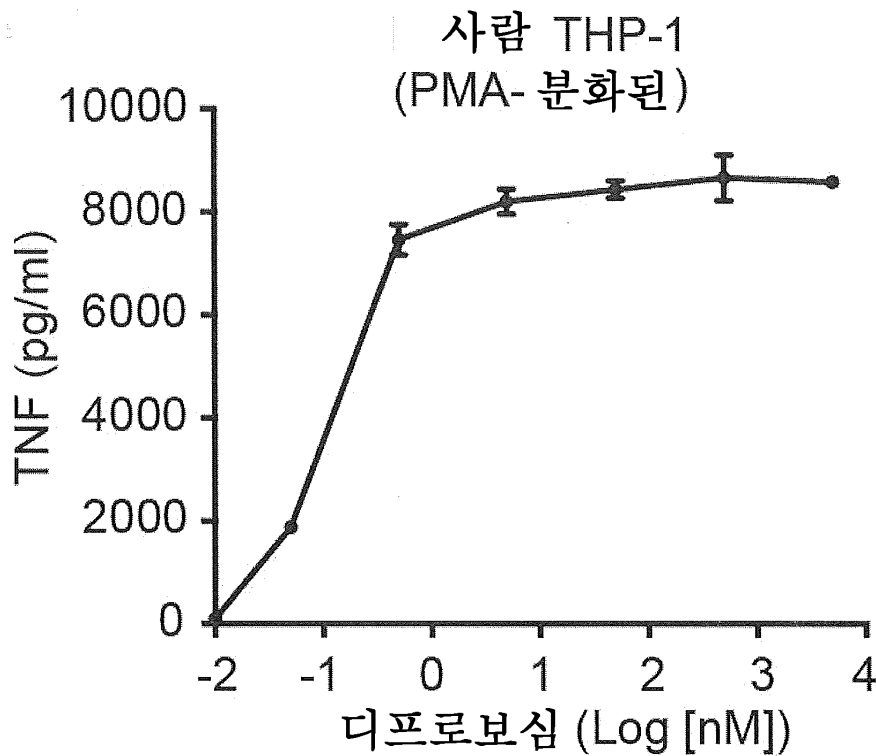
[0255]

본원에 인용된 특허, 특허 출원 및 간행물 각각은 참조로서 포함된다.

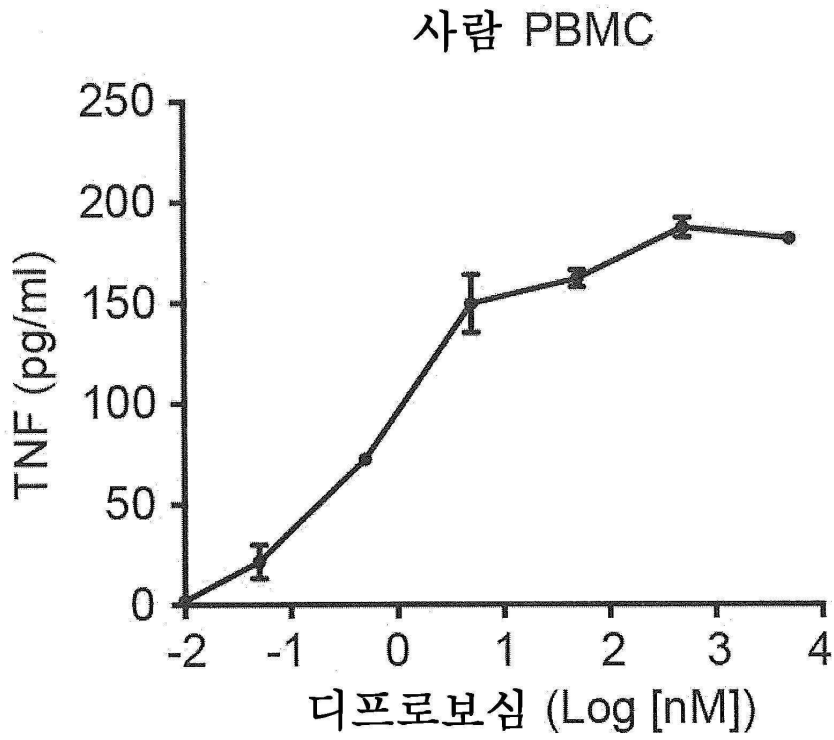
상기한 상세한 설명 및 실시예는 예시하는 것을 의도하고, 제한하는 것을 의도하지 않는다. 본 발명의 취지 및 범위 내에 또한 다른 변형이 가능하고, 당해 기술 분야의 숙련자에게 자체로 용이하게 제시될 것이다.

도면

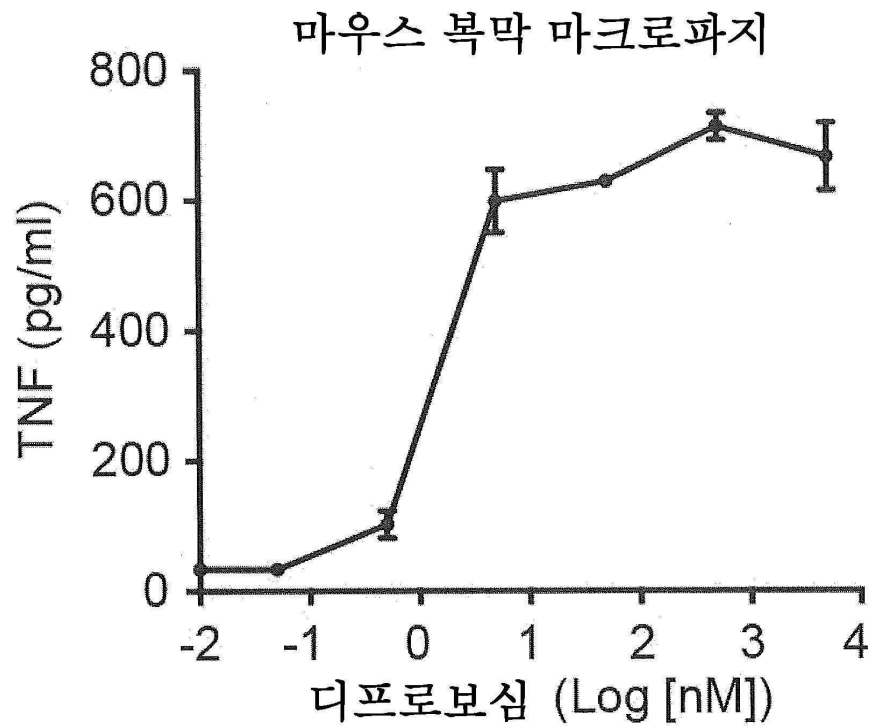
도면1a



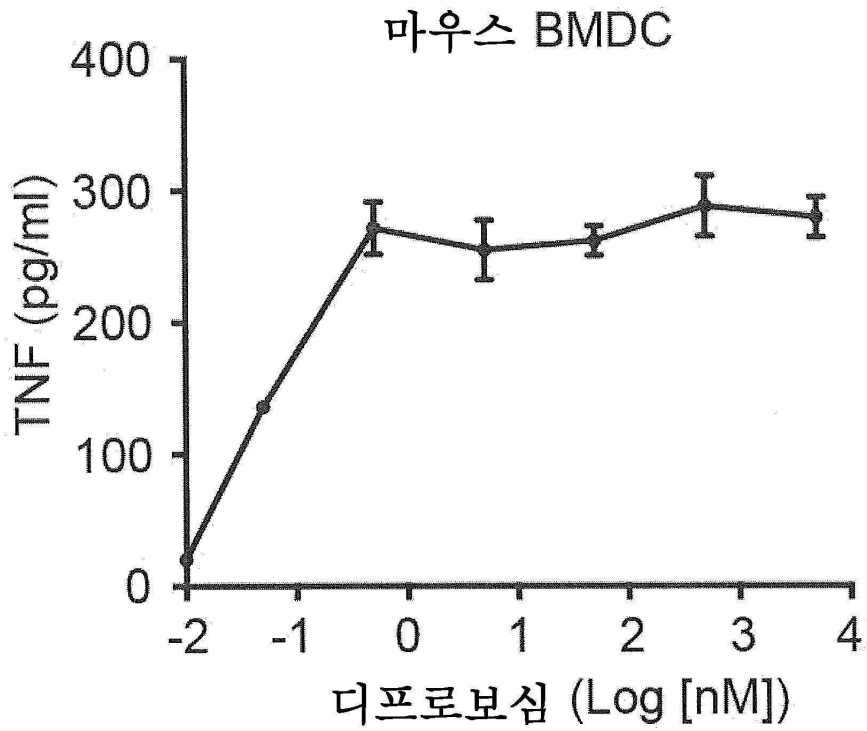
도면1b



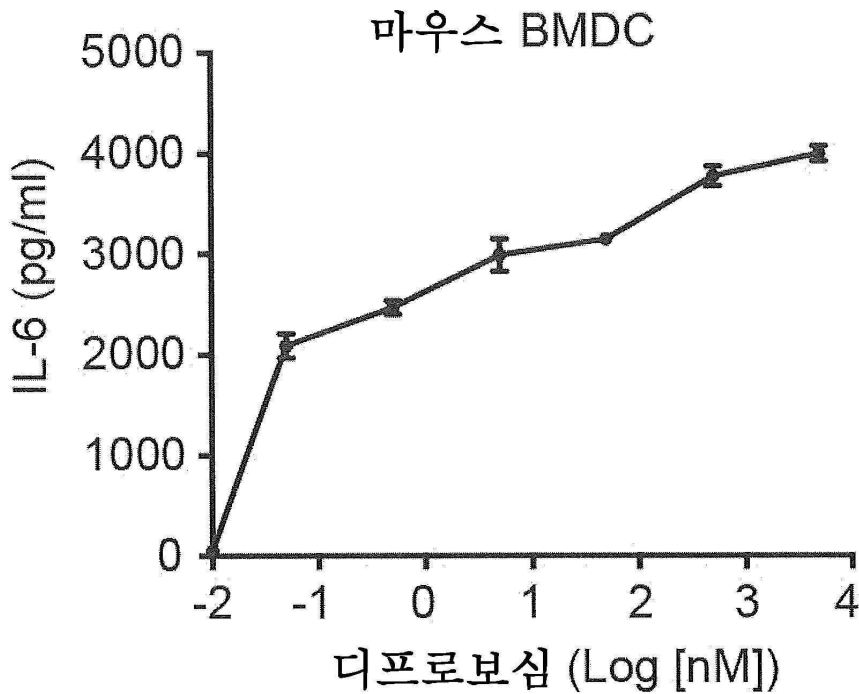
도면1c



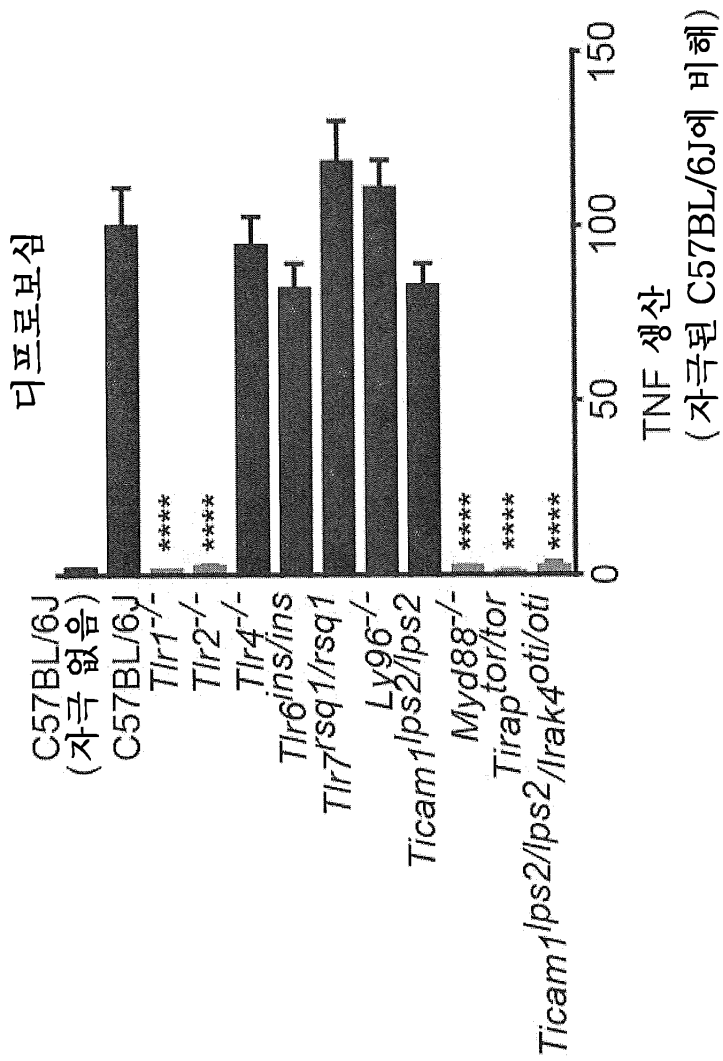
도면1d



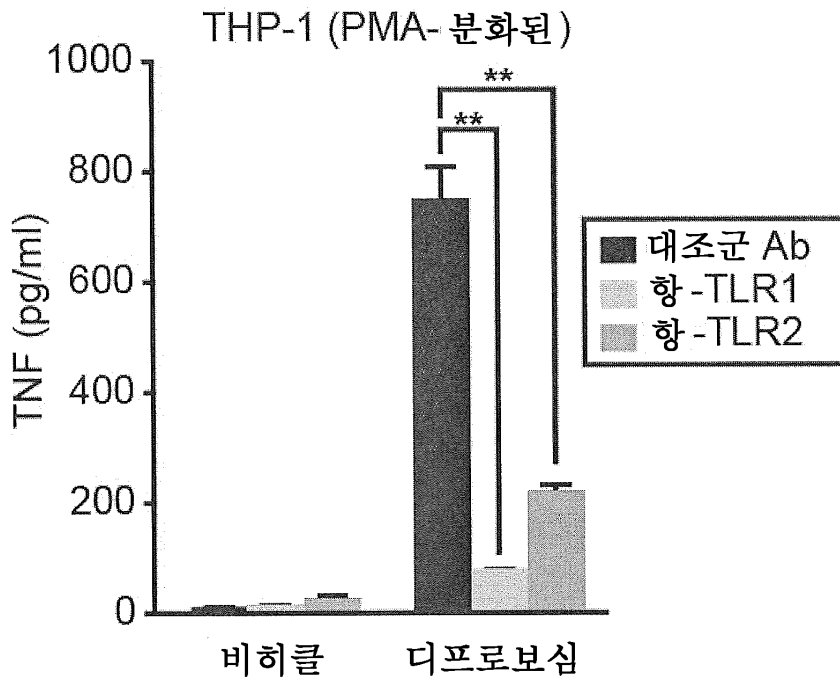
도면1e



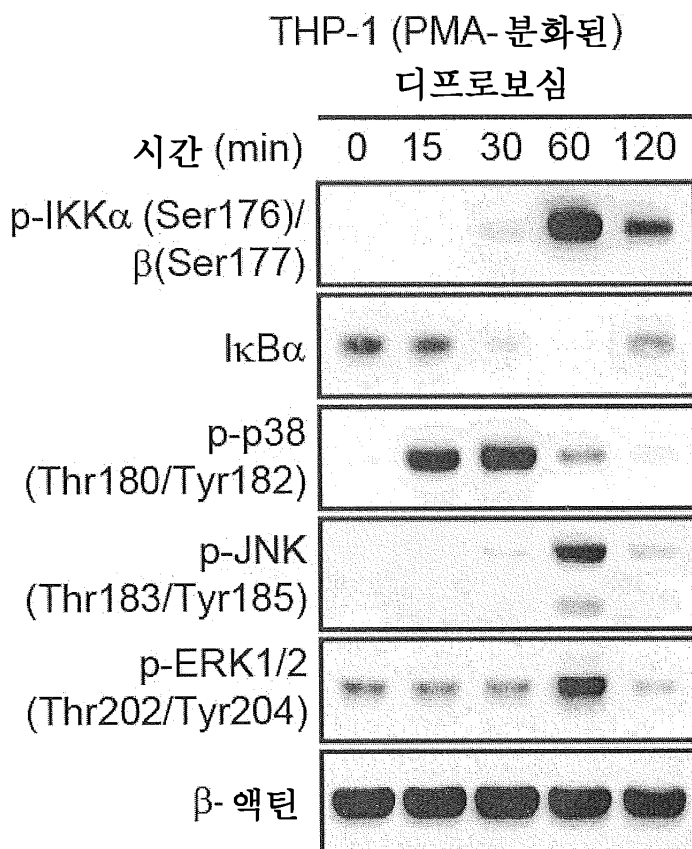
도면2a



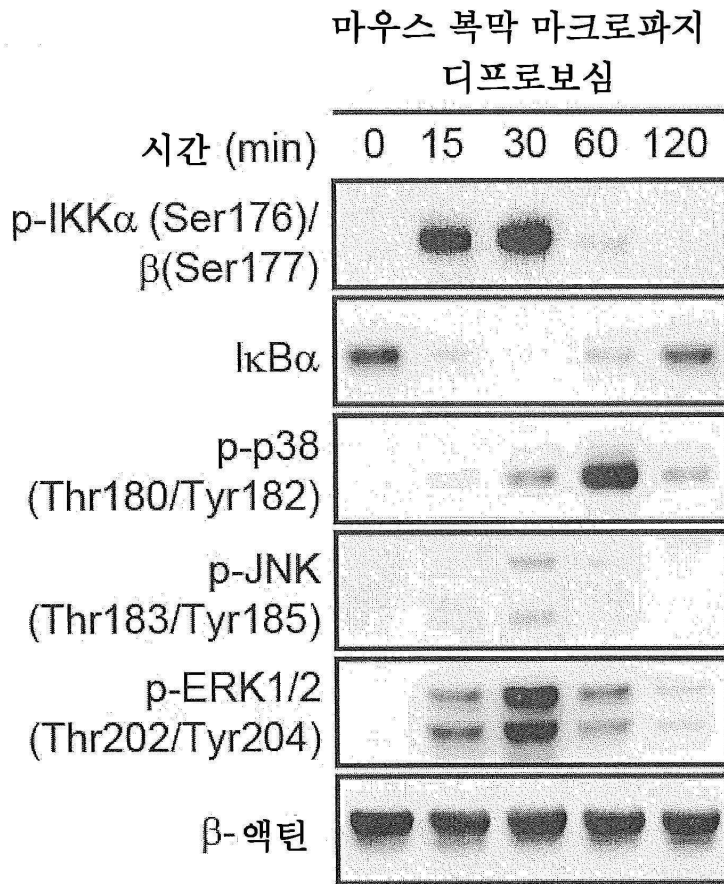
도면2b



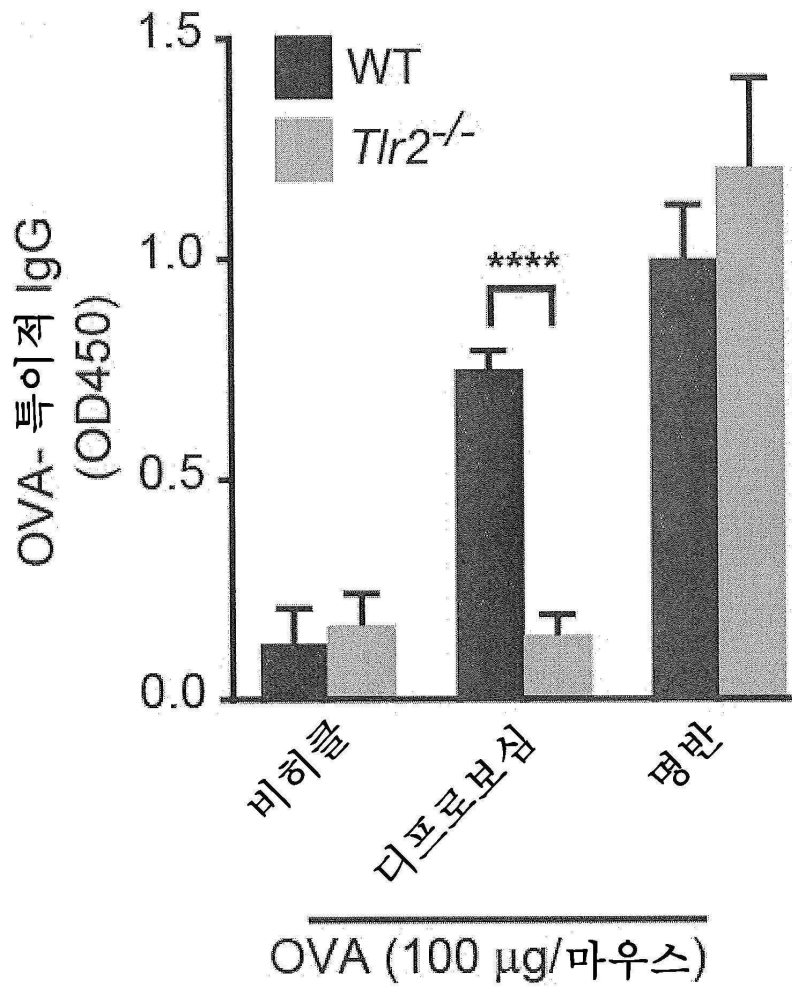
도면2c



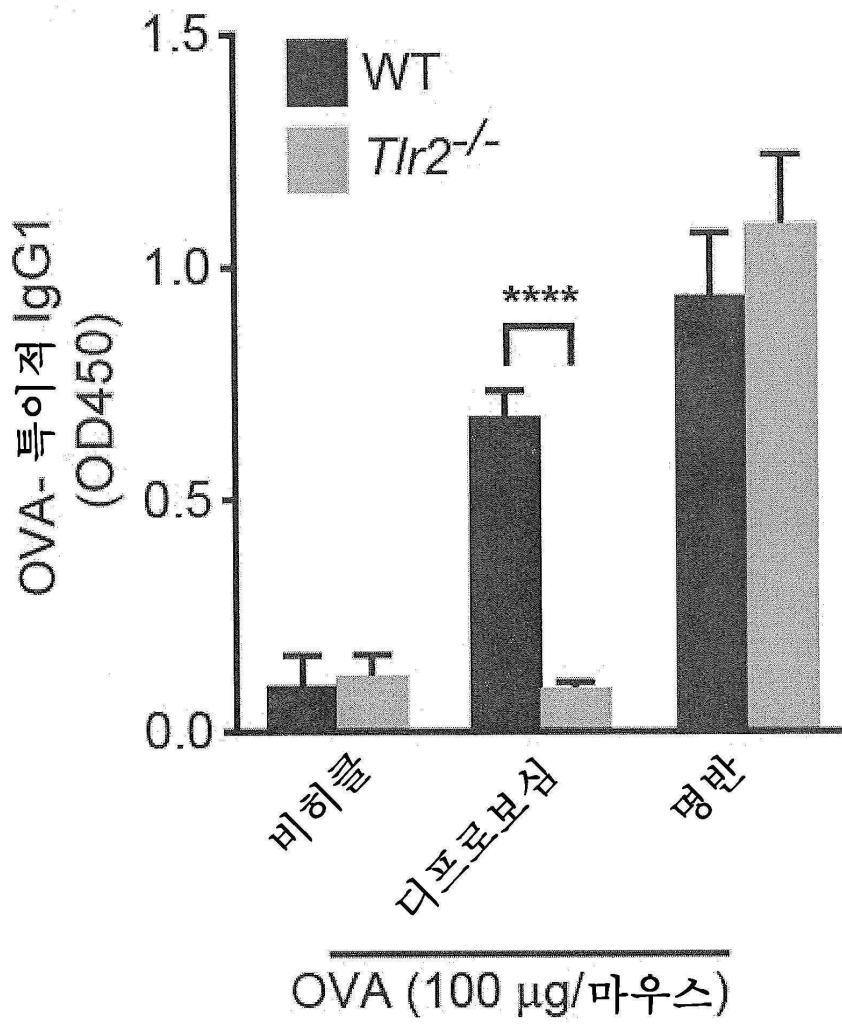
도면2d



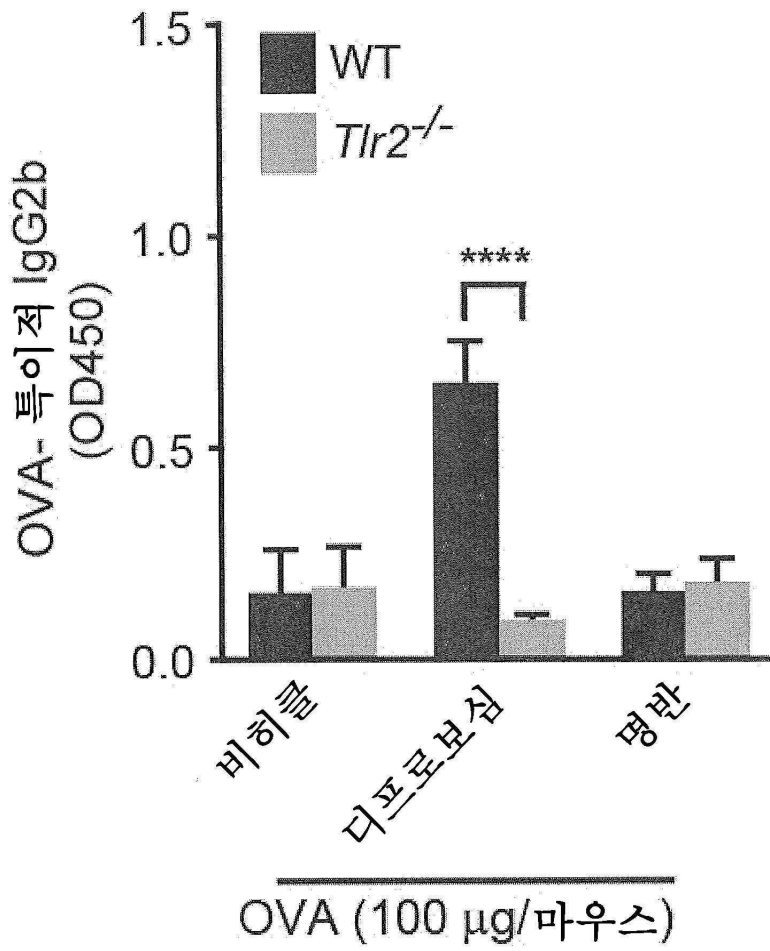
도면3a



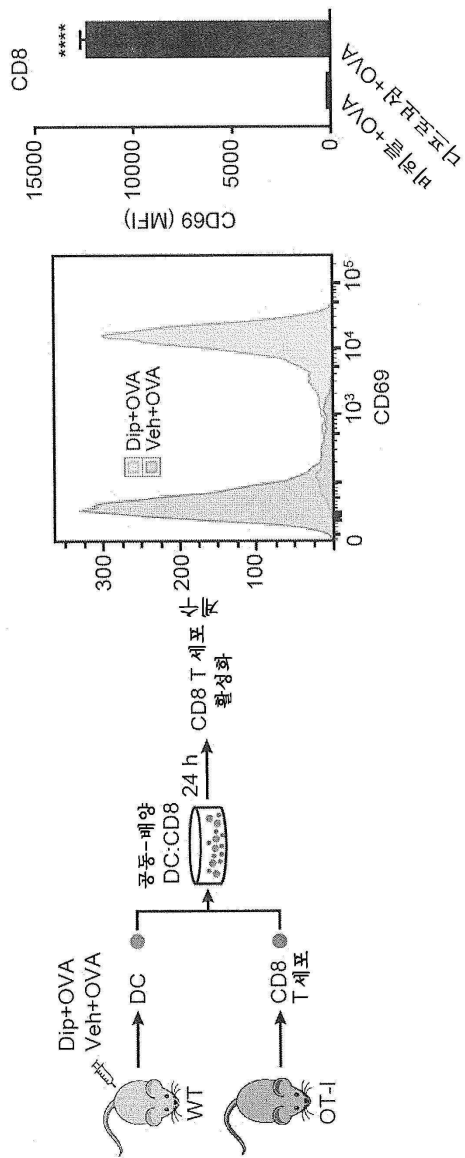
도면3b



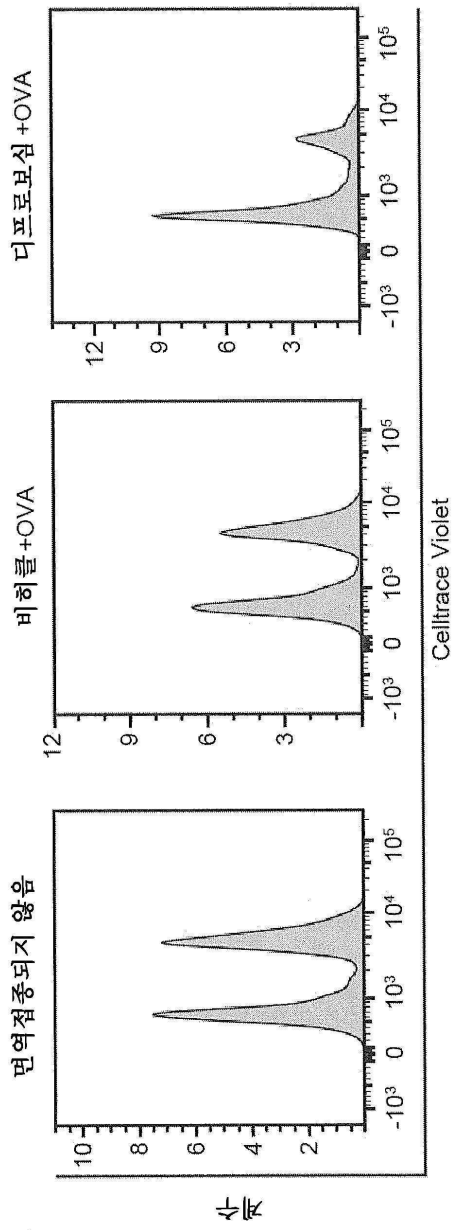
도면3c



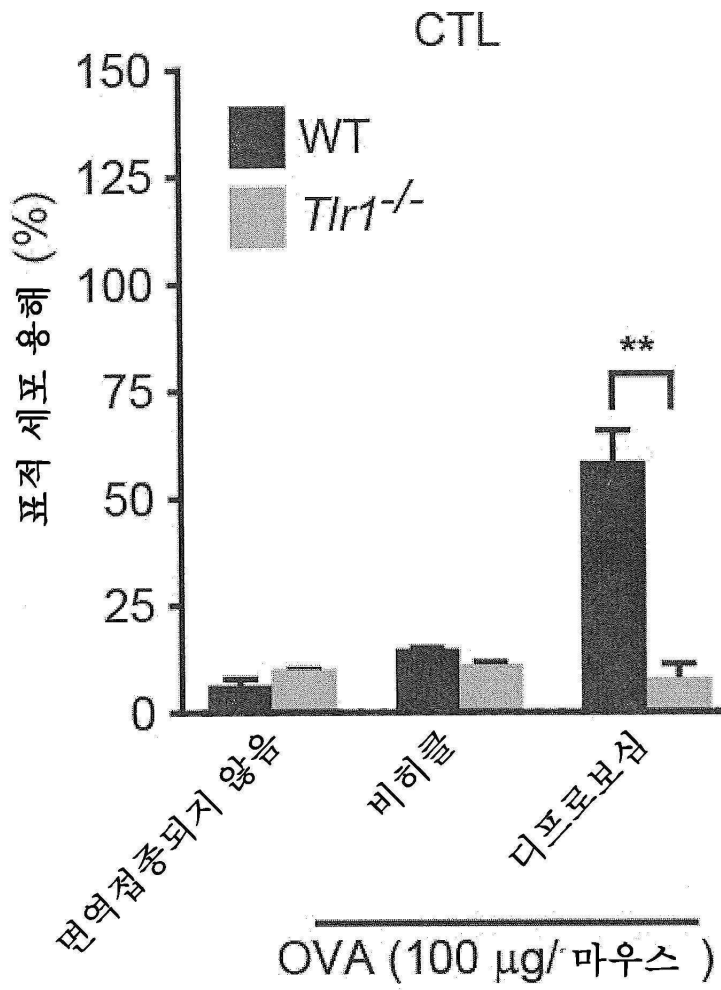
도면3d



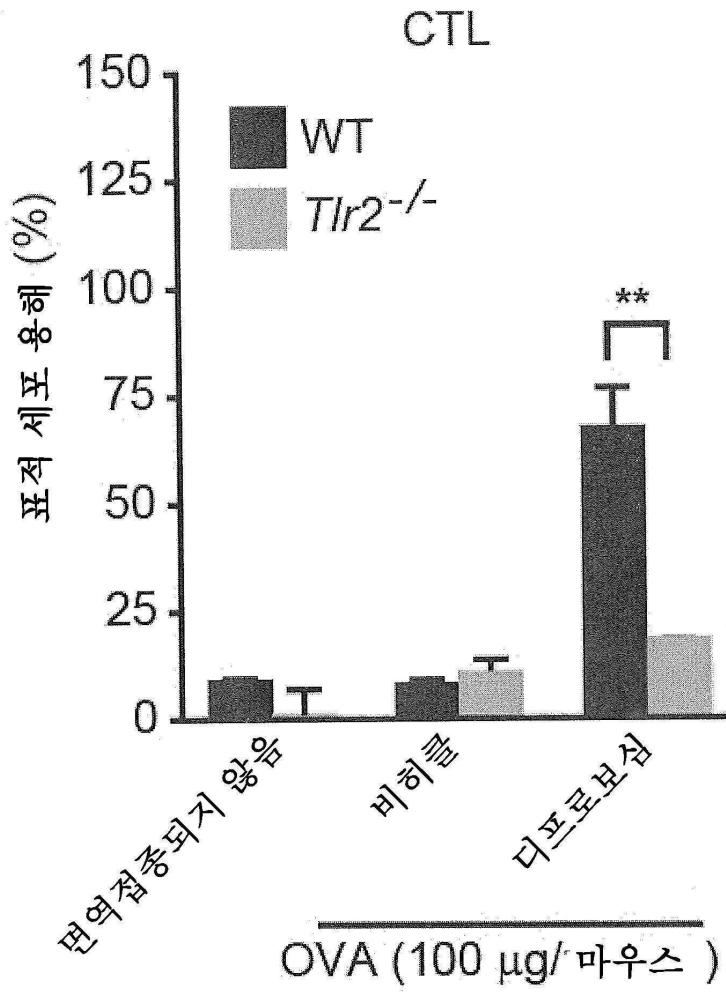
도면3e



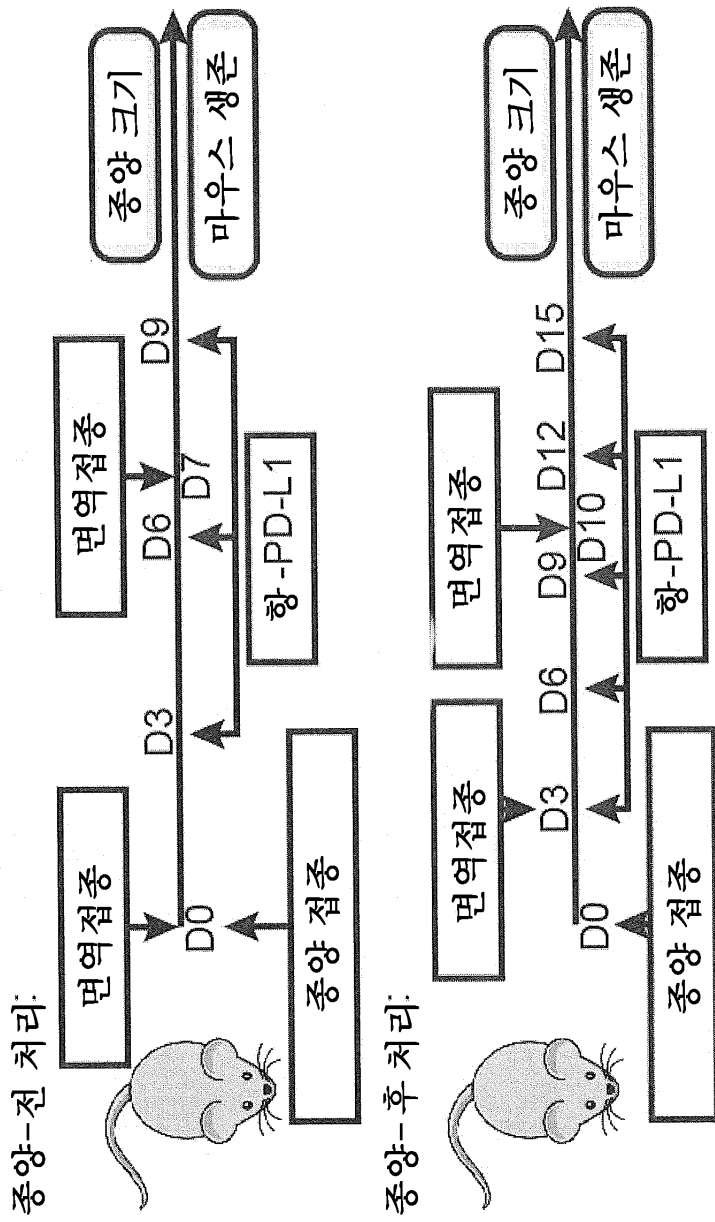
도면3f



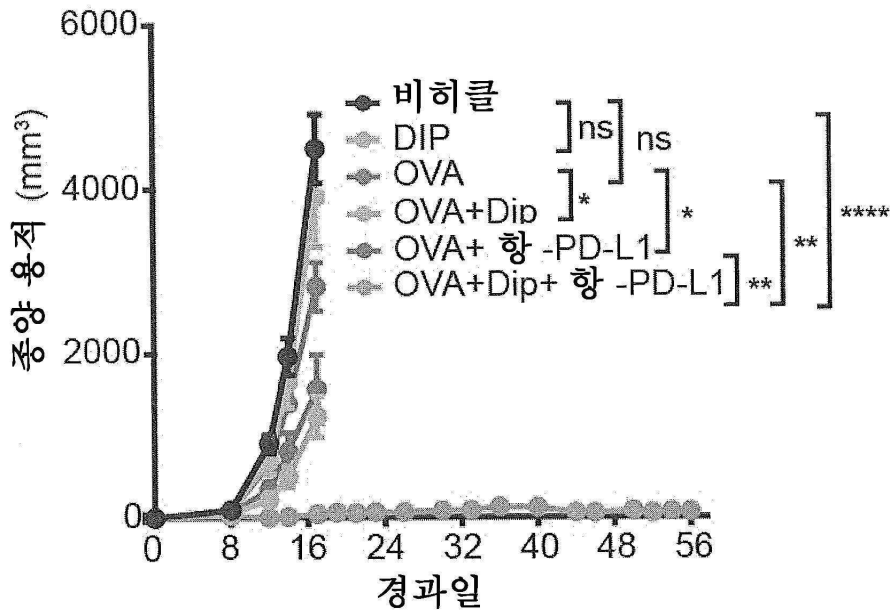
도면3g



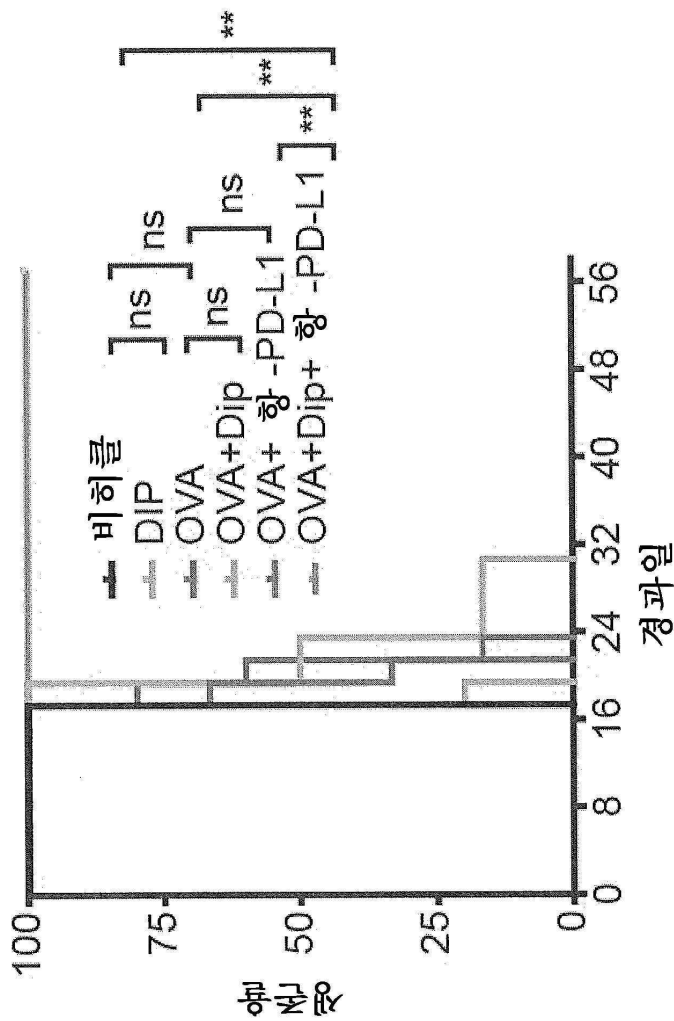
도면4a



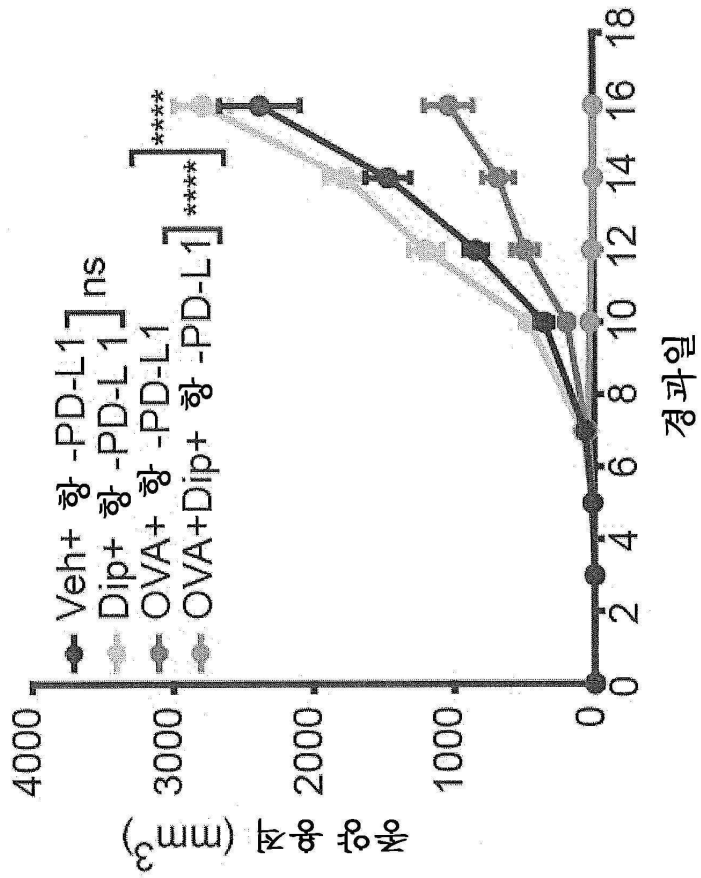
도면4b



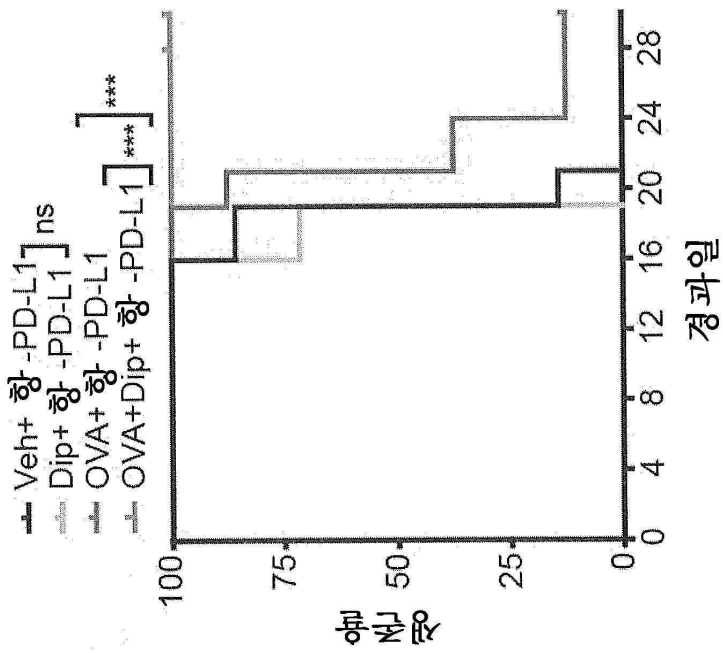
도면4c



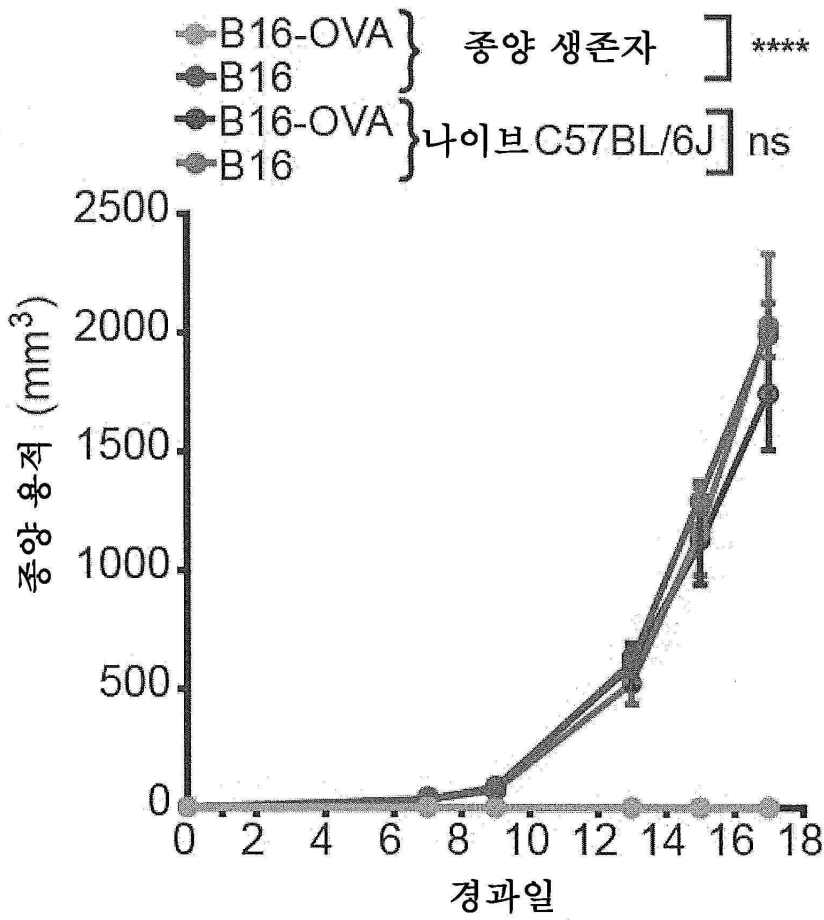
도면4d



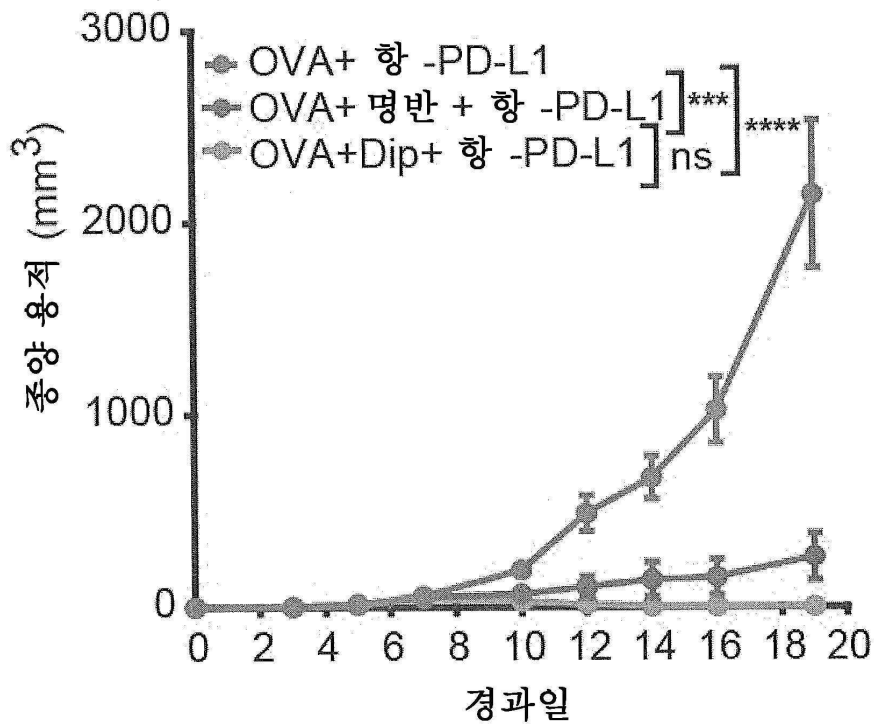
도면4e



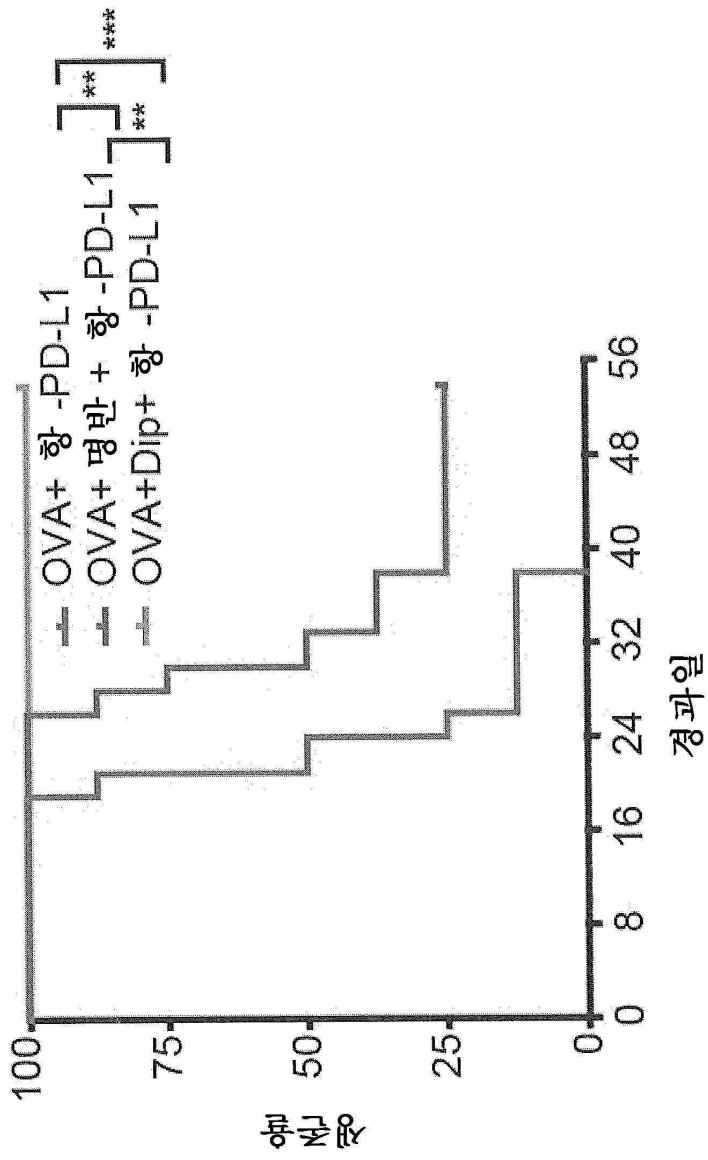
도면4f



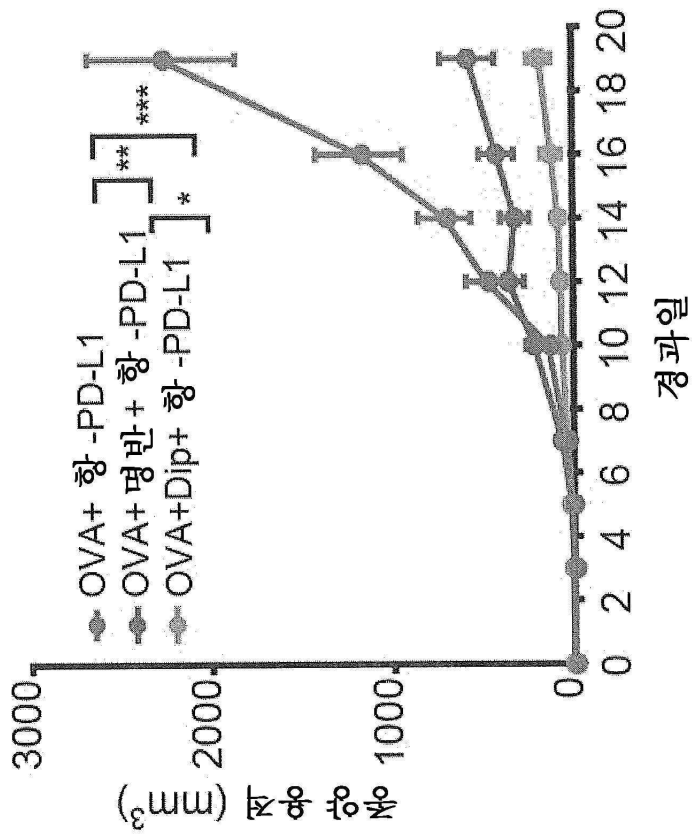
도면4g



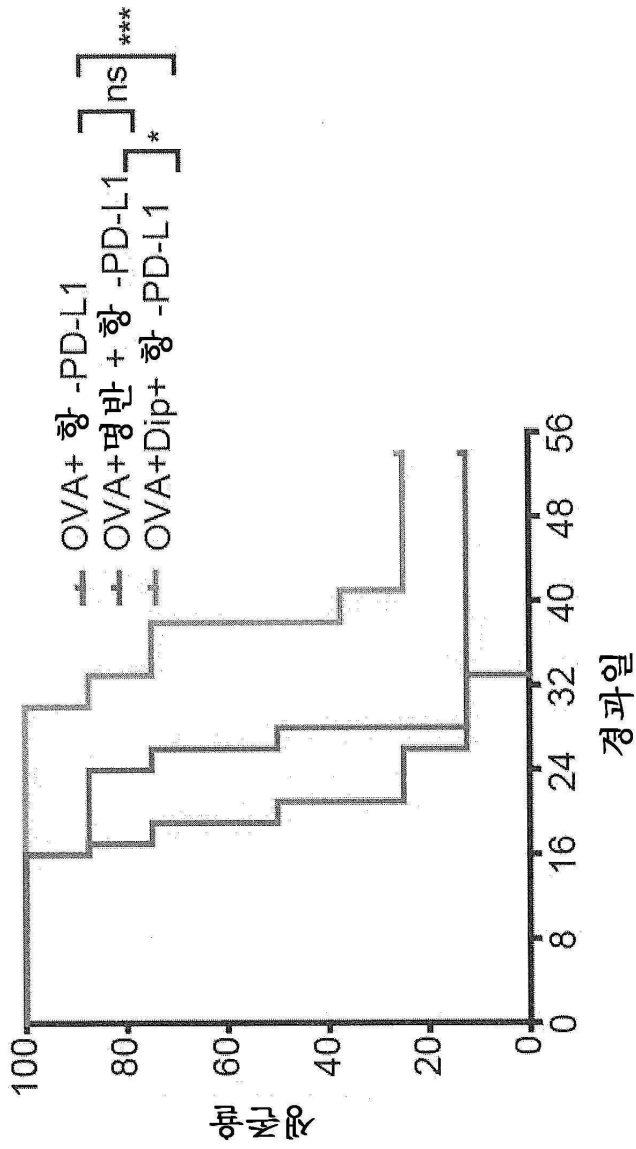
도면4h



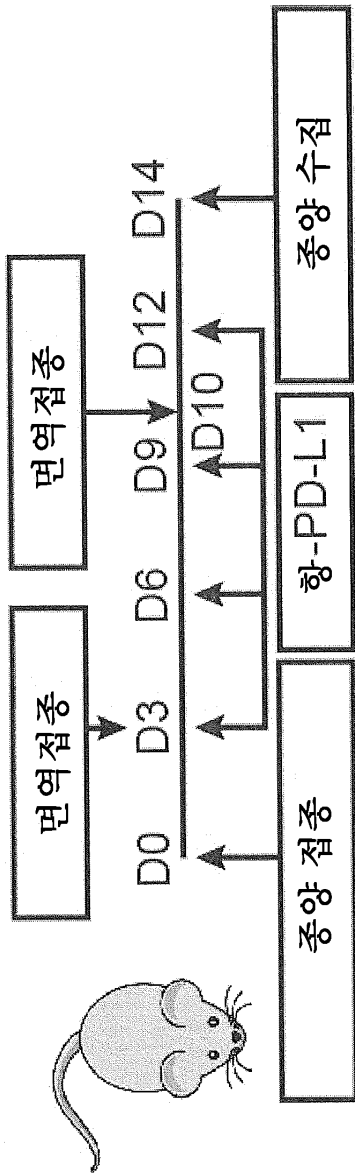
도면4i



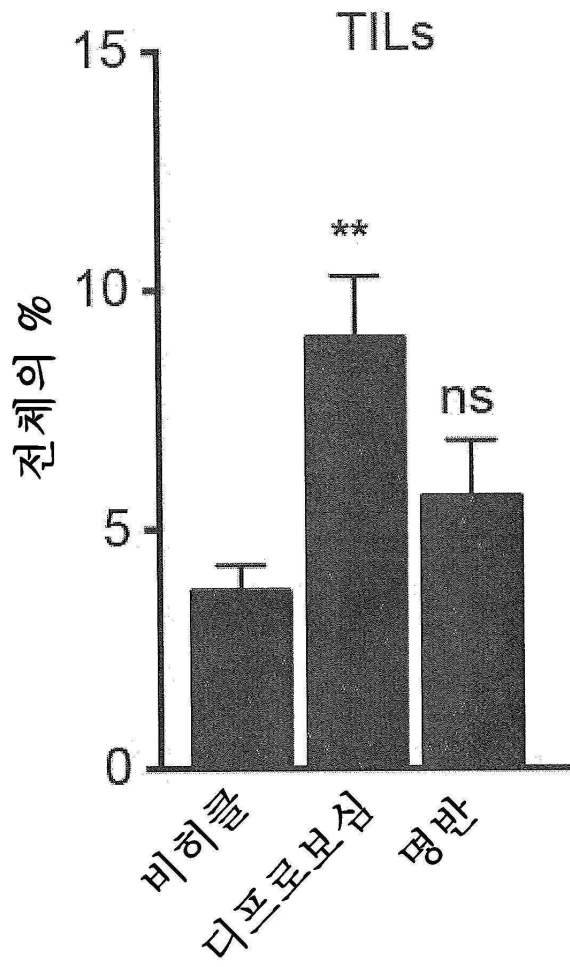
도면4j



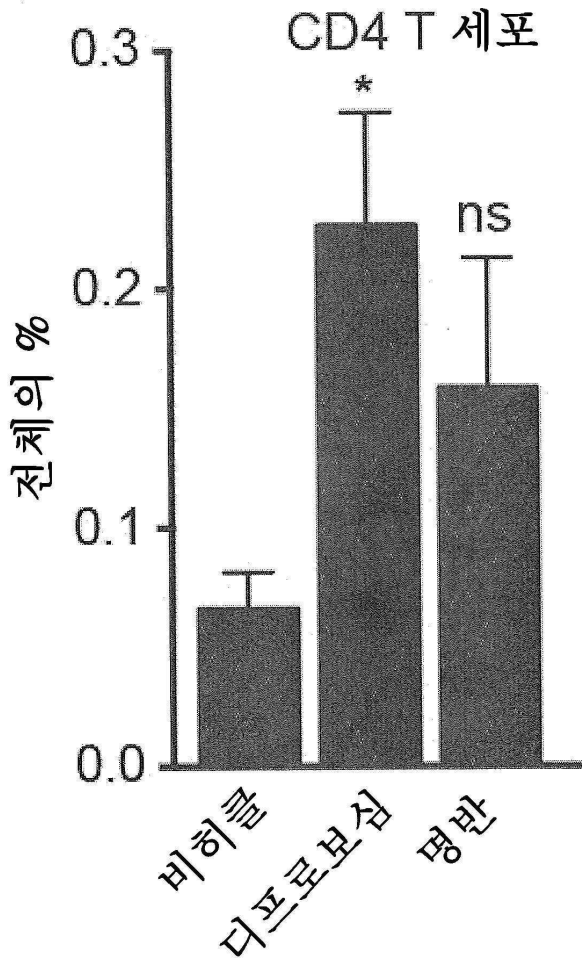
도면5a



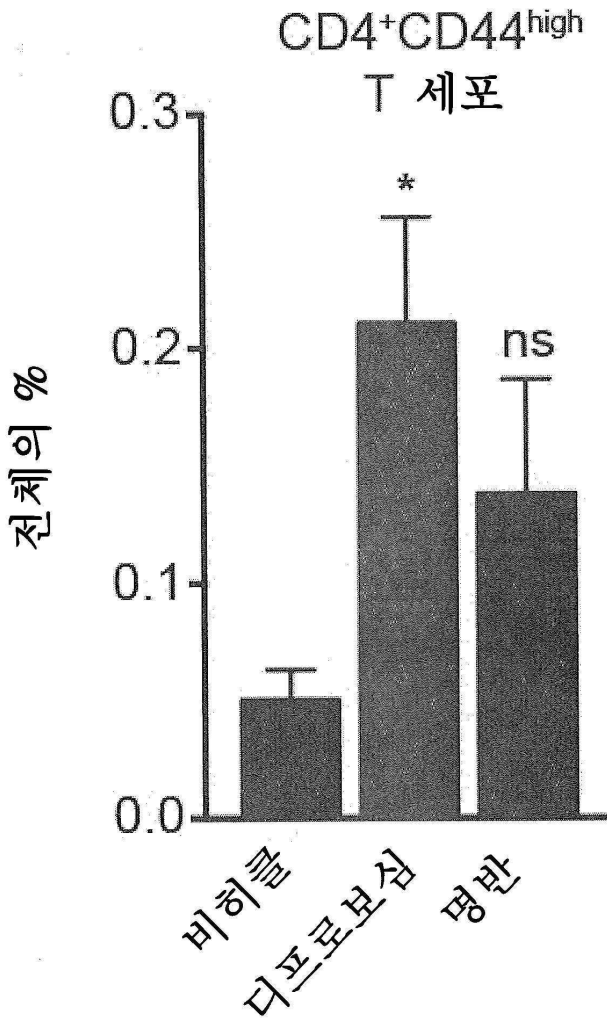
도면5b



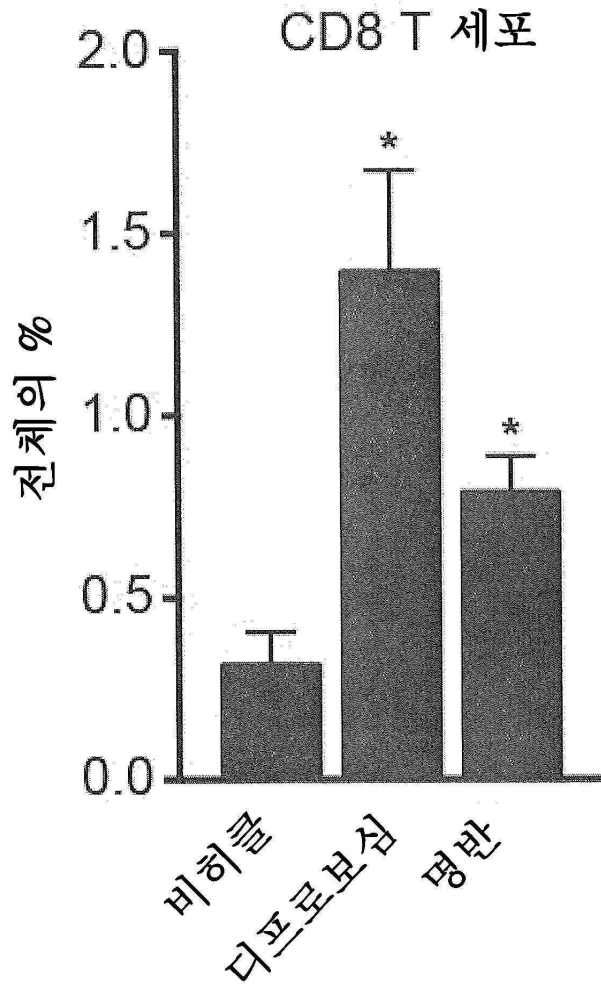
도면5c



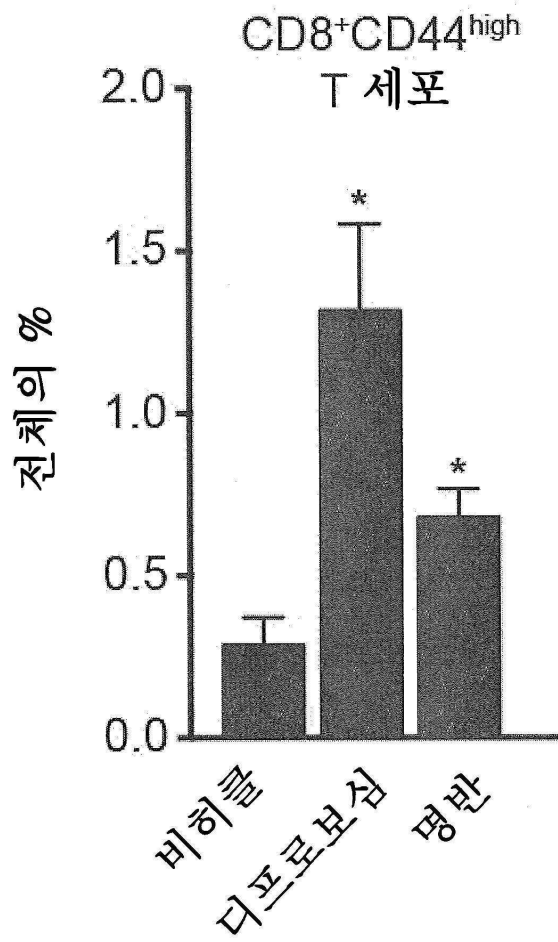
도면5d



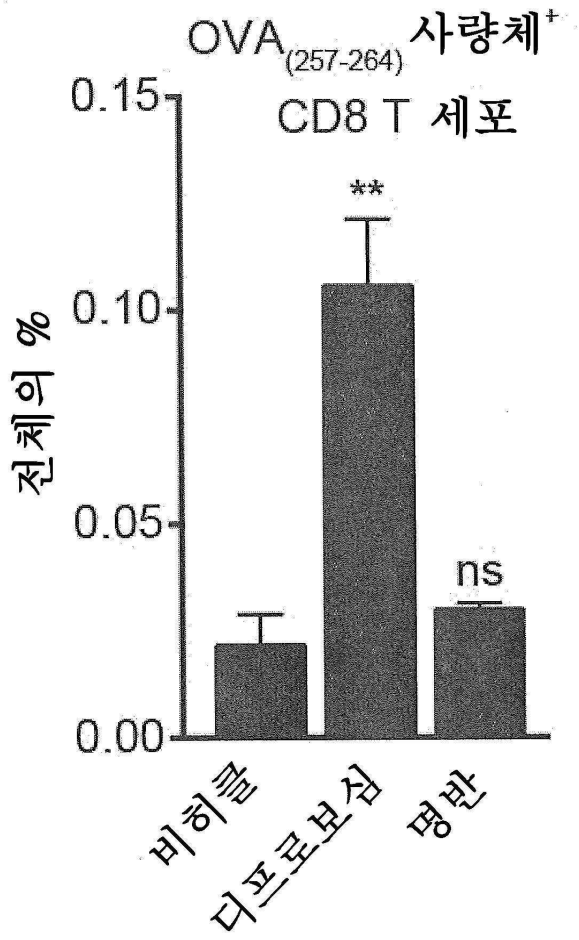
도면5e



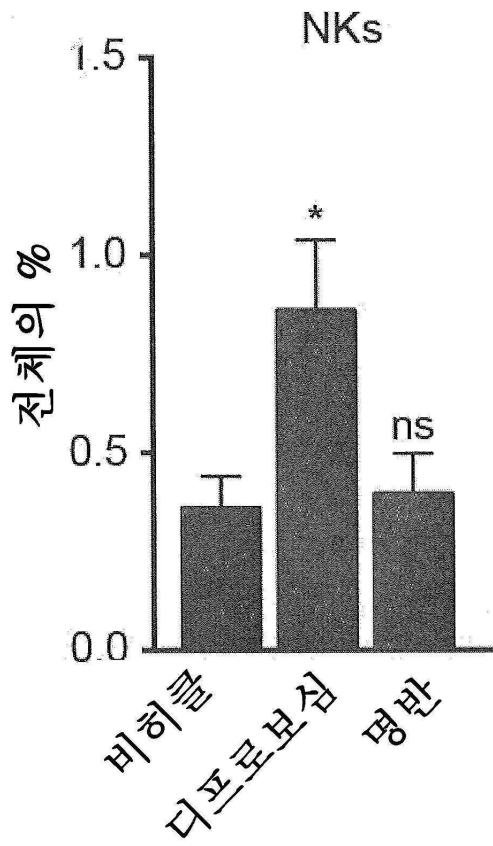
도면5f



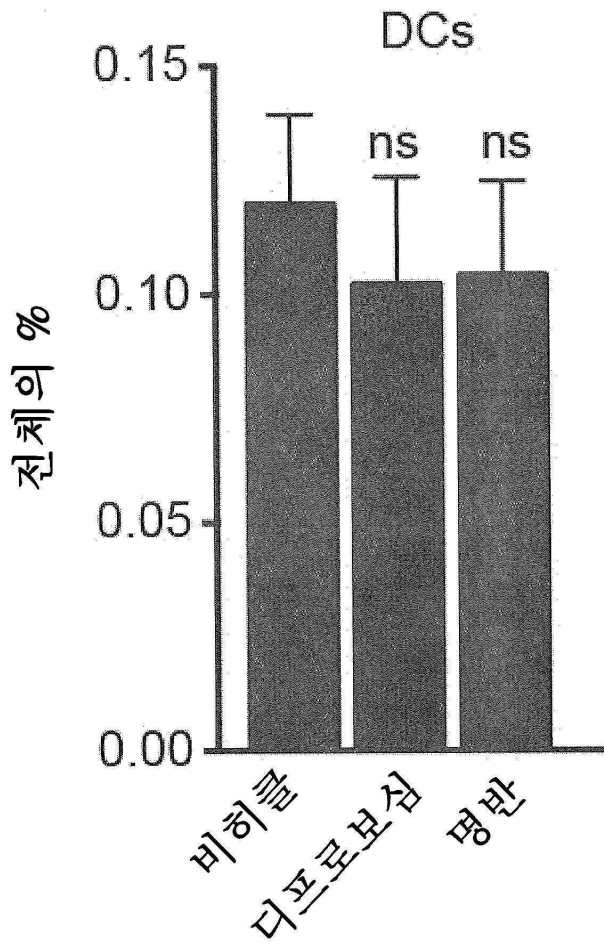
도면5g



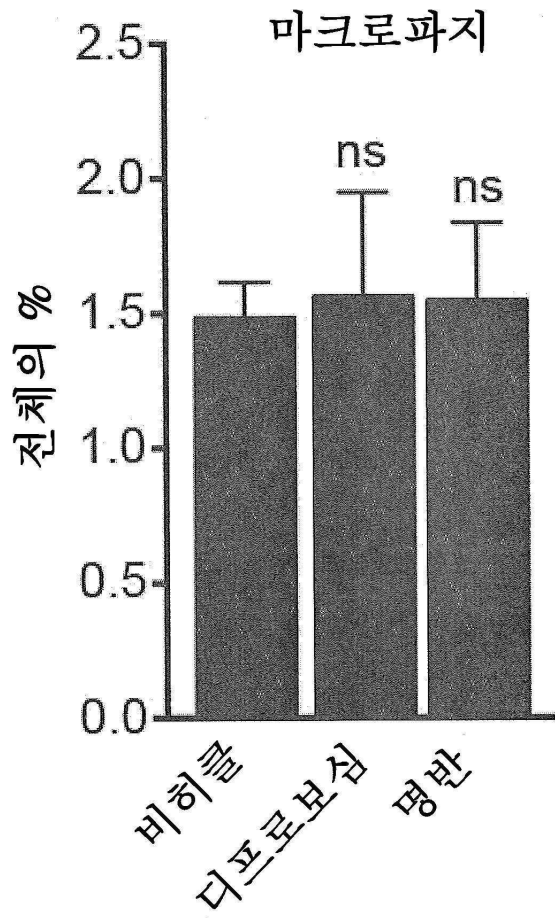
도면5h



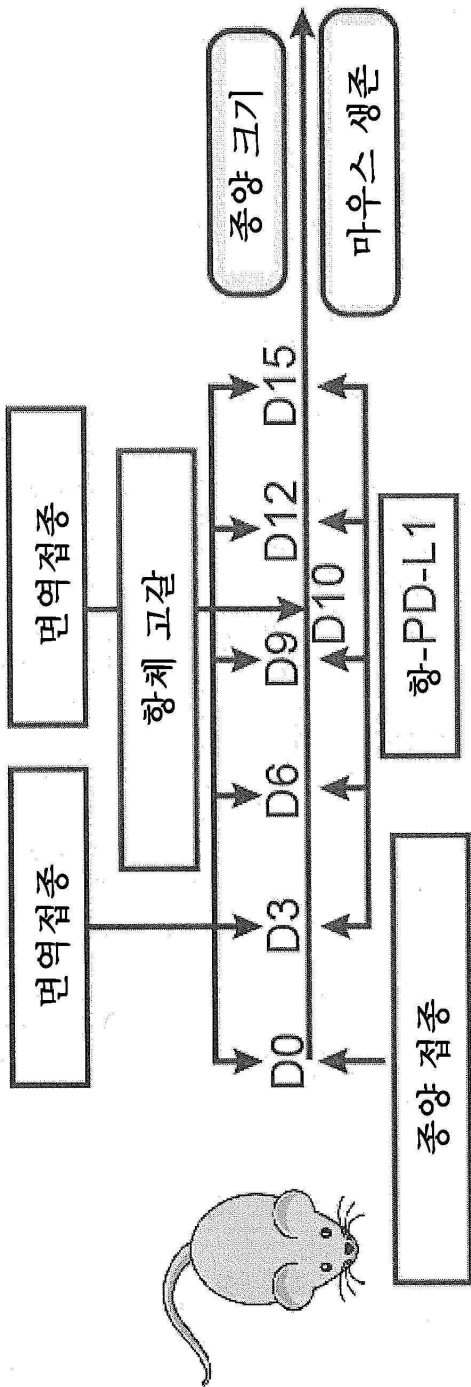
도면5i



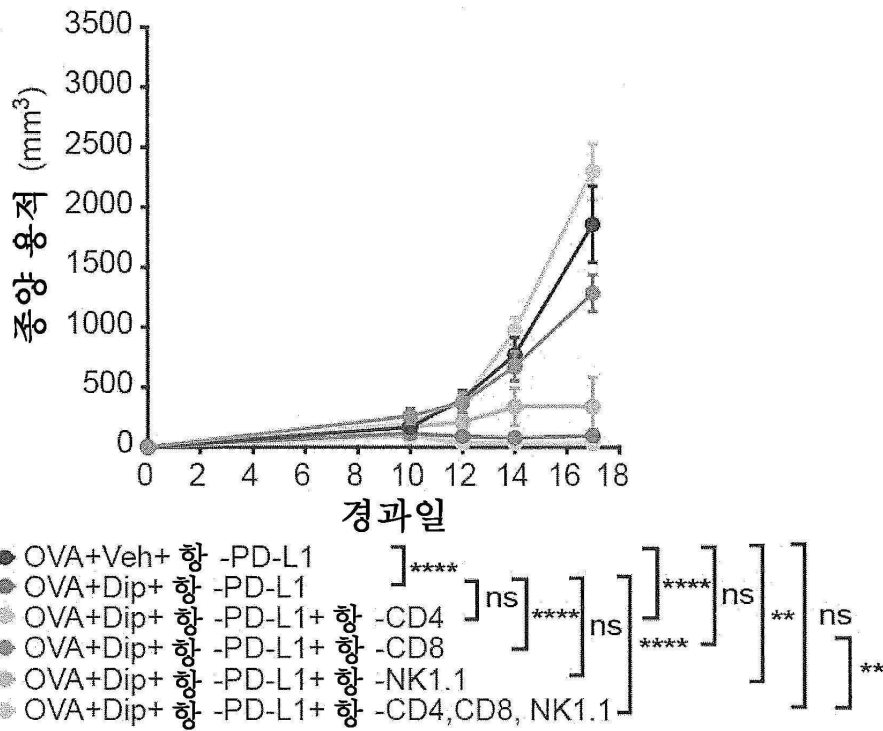
도면5j



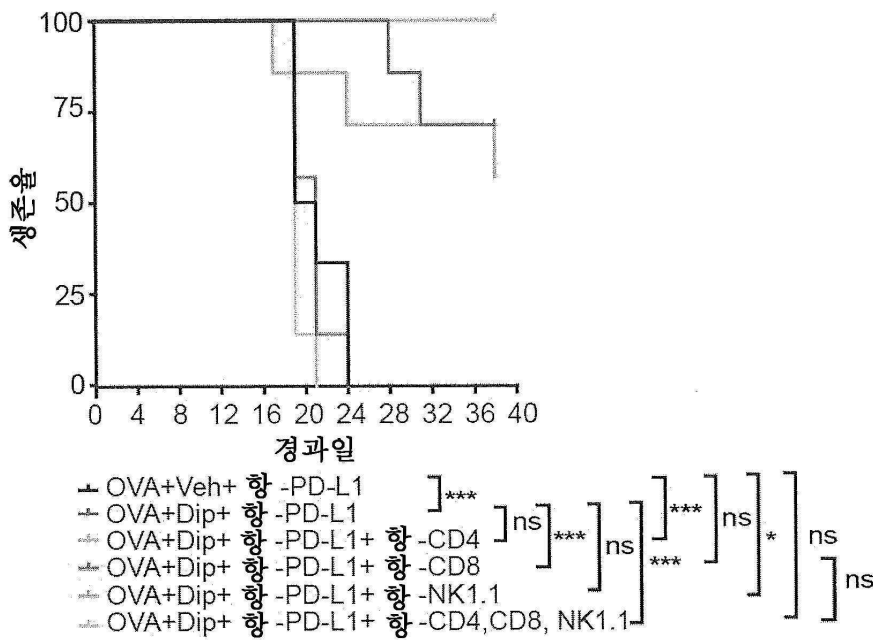
도면5k



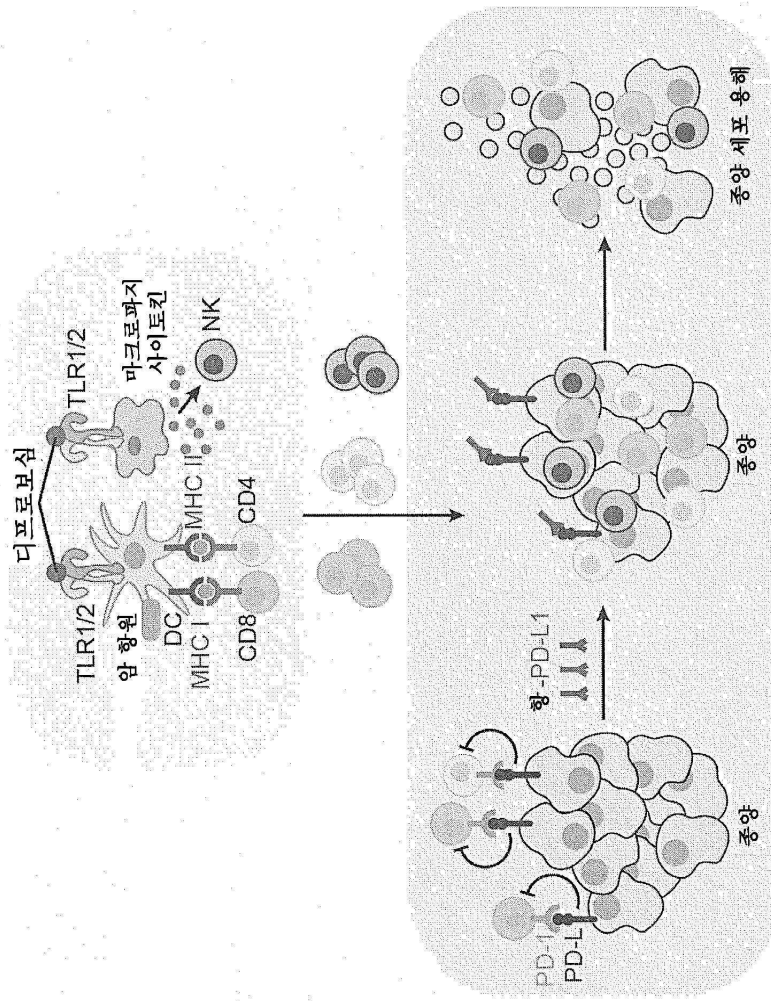
도면5l



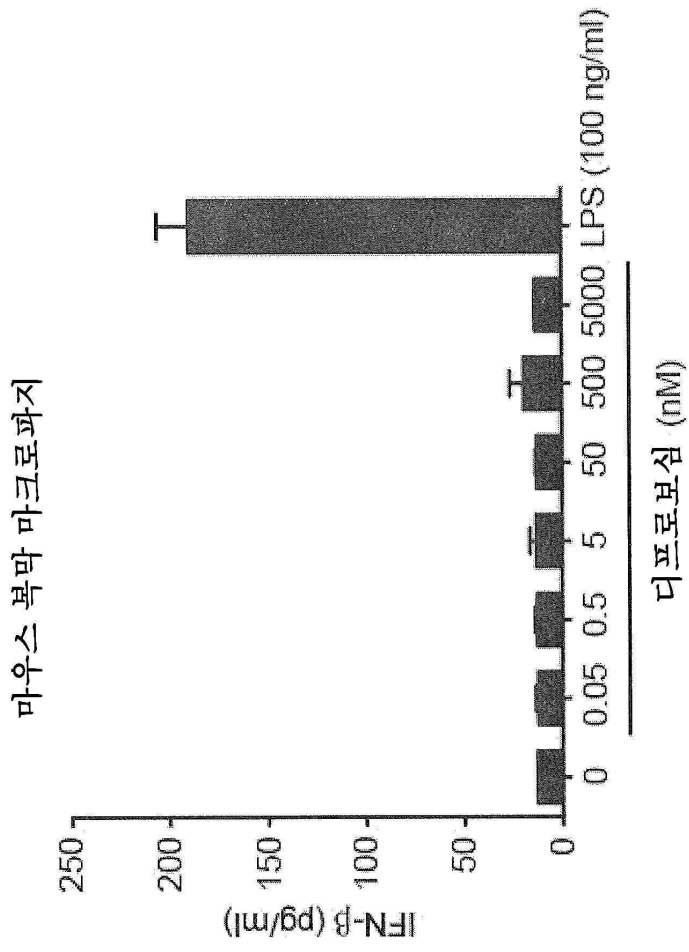
도면5m



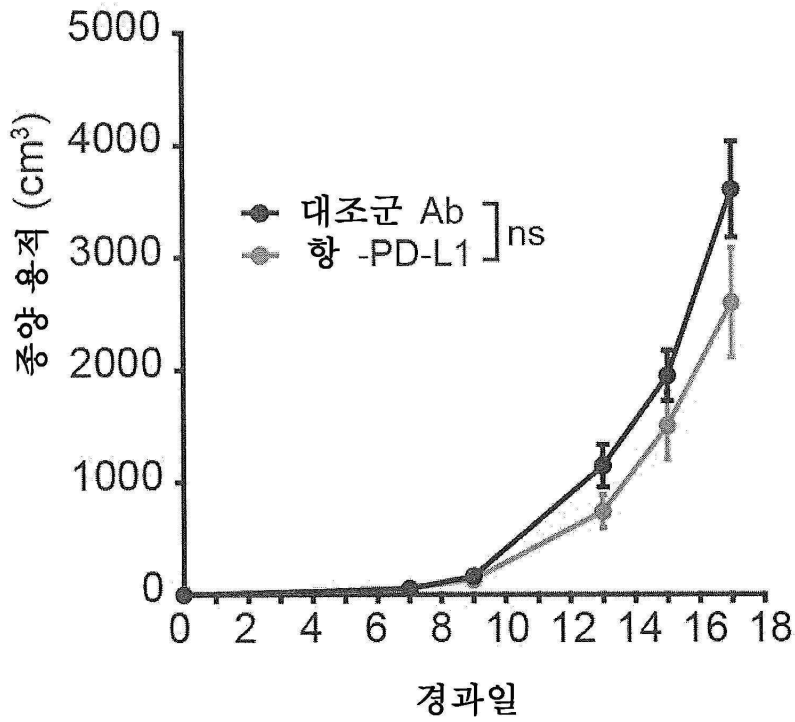
도면6



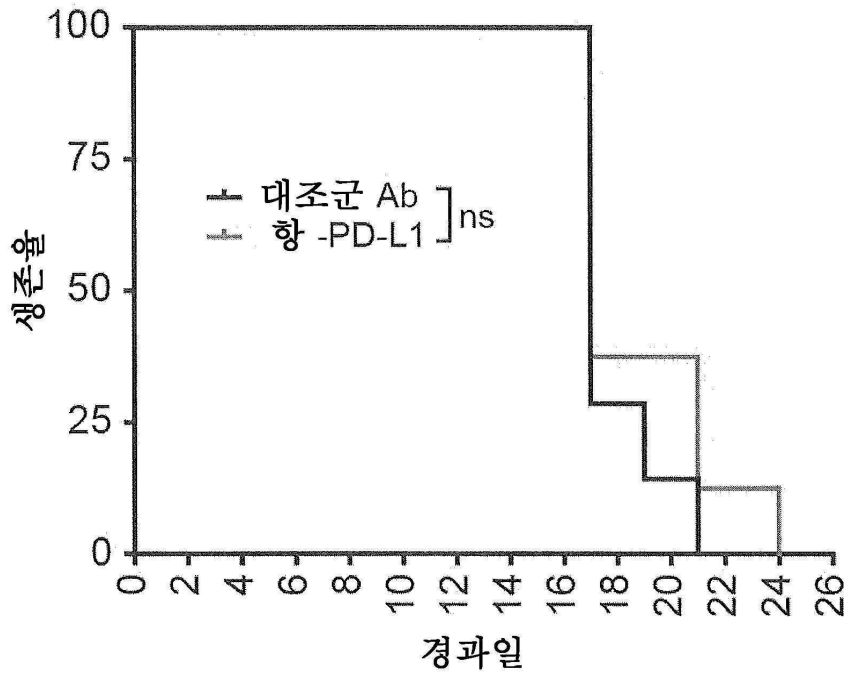
도면7



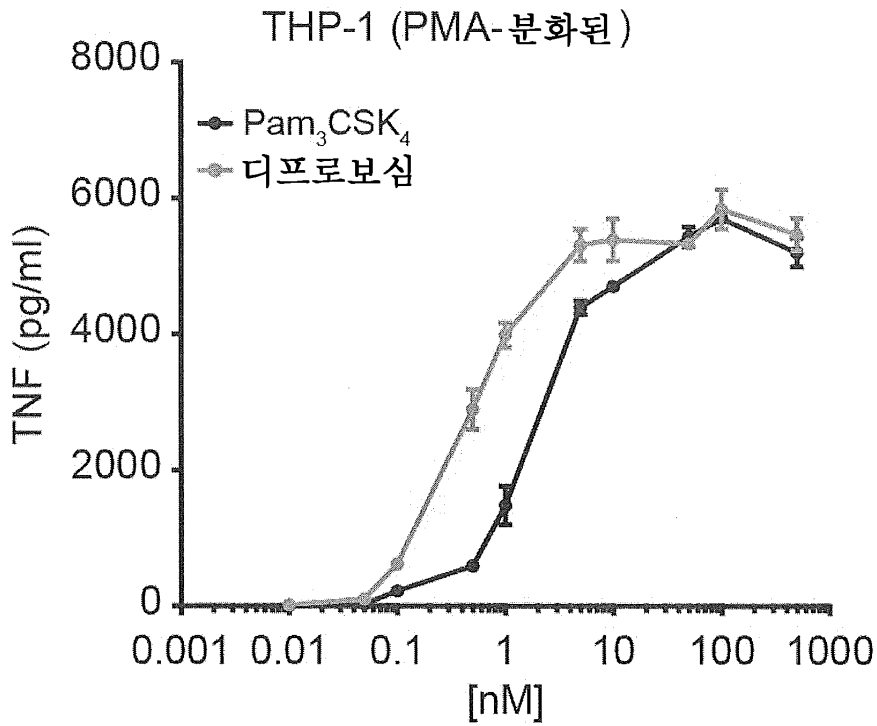
도면8a



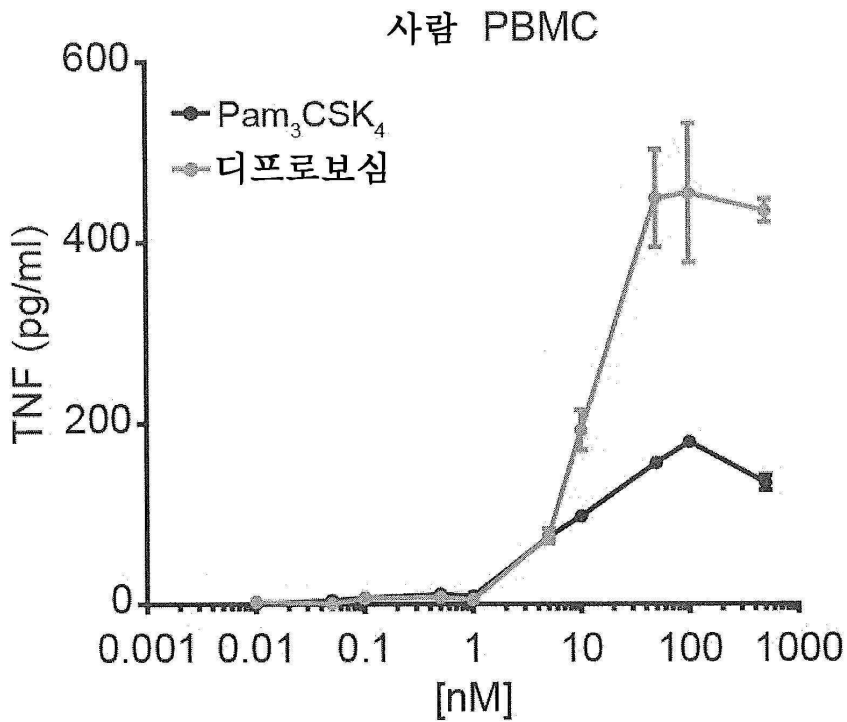
도면8b



도면9a



도면9b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> ADJUVANT EFFECT OF THE TLR1/2 AGONIST DIPROVOCIM SYNERGIZES WITH
CHECKPOINT-INHIBITING ANTIBODIES TO ELIMINATE DISEASE

<130> 0540397-4

<160> 77

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 1

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

<210> 2

<211> 24

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 2

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro

20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 3

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro

20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 4

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro

1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro

20

<210> 5

<211> 28

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 5

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro

20

25

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 6

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

1 5 10 15

Asn Pro Asn Val

20

<210> 7

<211> 22

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 7

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

1 5 10 15

Asn Pro Asn Val Asp Pro

20

<

210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 8

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala

1 5 10 15

Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala

20

<210> 9

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 9

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

Asn Val

<210

> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 10

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

Asn Val Asp Pro

20

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 11

Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

1 5 10 15

Asn Val Asp Pro Asn Ala

20

<

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 12

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val

1 5 10 15

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 13

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val

1 5 10 15

Asp Pro

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 14

Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val

1 5 10 15

Asp Pro Asn Ala

20

<210> 15

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 15

Asp Arg Ala Ala Gly Gln Pro Ala Gly Asp Arg Ala Asp Gly Gln Pro
 1 5 10 15

Ala Gly

<210> 16

<211> 36

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 16

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Gly Asp Gln

1 5 10 15

Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp

 20 25 30

Asp Gln Pro Gly

 35

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 17

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Gly Asp Gln

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 18

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 18

Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gln

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 19

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 19

Ala Asn Gly Ala Gly Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 20

Ala Asn Gly Ala Asp Asn Gln Pro Gly Ala Asn Gly Ala Asp Asp Gln

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 21

Ala Pro Gly Ala Asn Gln Glu Gly Gly Ala Ala Ala Pro Gly Ala Asn

1 5 10 15

Gln Glu Gly Gly Ala Ala

20

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Plasmodium berghei

<400> 22

Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn Asp Pro Pro Pro Pro Asn Pro Asn

1 5 10 15

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> Plasmodium yoelii

<400> 23

Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro Gln Gly Pro Gly

1 5 10 15

Ala Pro Gln Gly Pro Gly Ala Pro

20

<210> 24

<211> 22

<212> PRT

<213> Plasmodium falciparum

<400> 24

Gly Ile Glu Tyr Leu Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp

1 5 10 15

Ser Pro Cys Ser Val Thr

20

<210> 25

<211> 19

<212> PRT

<213> Plasmodium vivax

<400> 25

Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Thr Val Gly Thr Glu Trp Thr Pro Cys

1 5 10 15

Ser Val Thr

<210> 26

<211> 20

<212> PRT

<213> Plasmodium yoelii

<400> 26

Glu Phe Val Lys Gln Ile Ser Ser Gln Leu Thr Glu Glu Trp Ser Gln

1 5 10 15

Cys Ser Val Thr

20

<210

> 27

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 27

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys

1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 28

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 28

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys

1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 29

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 29

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala

1 5 10 15

Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 30

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 30

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser

1 5 10 15

Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 31

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 31

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser

1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 32

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 32

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys

1 5 10 15

Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 33

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 33

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys

1 5 10 15

Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 34

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 34

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala

1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 35

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 35

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 36

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 36

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 37

<211> 35

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 37

Met Gly Ile Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu

1 5 10 15

Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Leu Leu Gly Trp Leu

 20 25 30

Trp Gly Ile

 35

<210> 38

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 38

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Ala Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp

 20

<210> 39

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 39

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Cys Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp

 20

<210> 40

<211> 24

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 40

Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

1 5 10 15

Ala Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

 20

<210> 41
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <400> 41
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly
 1 5 10 15
 Cys Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp
 20

<210> 42
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <400> 42
 Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly

 1 5 10 15
 Ser Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 20

<210> 43
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus
 <400> 43
 Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser
 1 5 10 15
 Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
 20 25 30
 Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp

 35 40 45
 <210> 44
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Influenza A virus

<400> 44

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser
 1 5 10 15
 Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
 20 25 30
 Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu
 35 40 45

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys
 50 55 60
 Asn Asp Ser Ser Asp

65

<210> 45

<211> 46

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 45

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala
 1 5 10 15
 Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
 20 25 30

Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 35 40 45

<210> 46

<211> 69

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 46

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala
 1 5 10 15
 Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
 20 25 30

Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ala Arg Ala Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu

35 40 45
 Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys
 50 55 60

Asn Asp Ser Ser Asp

65

<210> 47

<211> 19

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 47

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Cys Asn Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Asp

<210> 48

<211> 38

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 48

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Cys Asn Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg
 20 25 30

Cys Asn Asp Ser Ser Asp

35

<210> 49

<211> 57

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 49

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Cys Asn Asp
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg

20 25 30
 Cys Asn Asp Ser Ser Asp Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp
 35 40 45

Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 50 55

<210> 50

<211> 92

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 50

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser
 1 5 10 15

Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
 20 25 30

Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu
 35 40 45

Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser
 50 55 60

Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg
 65 70 75 80

Asn Glu Trp Gly Cys Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp
 85 90

<210> 51

<211> 115

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 51

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser
 1 5 10 15

Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro
 20 25 30

Ile Arg Asn Glu Trp Gly Ser Arg Ser Asn Asp Ser Ser Asp Ser Leu

<213> Influenza A virus

<400> 54

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu Cys

1 5 10 15

Arg Cys Asn Gly Ser Ser Asp

20

<210> 55

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 55

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Lys Asn Glu Trp Glu Cys

1 5 10 15

Arg Cys Asn Asp Ser Ser Asp

20

<210> 56

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 56

Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Gly Trp Glu Cys

1 5 10 15

Lys Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> Influenza A virus

<400> 57

Ser Leu Leu Thr Glu Val Asp Thr Leu Thr Arg Asn Gly Trp Gly Cys

1 5 10 15

Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp

20

<210> 62

<211> 28

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 62

Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr

1 5 10 15

Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys

 20 25

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 63

Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys

1 5 10

<210> 64

<211> 31

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 64

Cys Pro Leu Ile Pro Gly Ser Thr Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys

1 5 10 15

Thr Cys Thr Thr Pro Ala Gln Gly Asn Ser Met Phe Pro Ser Cys

 20 25 30

<210> 65

<211> 34

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 65

Cys Leu Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr

1 5 10 15

Ser Cys Pro Pro Thr Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg

20 25 30

Phe Ile

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 66

Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Thr Thr Val Cys Leu Gly Gln Asn

1 5 10 15

<210> 67

<211> 6

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 67

Val Cys Leu Gly Gln Asn

1 5

<210> 68

<211> 19

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 68

Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val

1 5 10 15

Cys Pro Leu

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 69

Met Ala Asp Pro Ala Gly Thr Asn Gly Glu Glu Gly Thr Gly Cys

1 5 10 15

<210> 70

<211> 16

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 70

His Glu Asp Glu Asp Lys Glu Asn Asp Gly Asp Ser Leu Pro Thr Cys

1 5 10 15

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 71

Arg Pro Phe Lys Ser Asn Lys Ser Thr Cys Cys

1 5 10

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 72

Cys Cys Asp Trp Cys Ile Ala Ala Phe Gly Leu Thr Pro Ser Ile

1 5 10 15

<210> 73

<211> 19

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 73

Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg Asp Gln Phe Leu Ser Gln Val Lys

1 5 10 15

Ile Pro Cys

<210> 74

<211> 19

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 74

His Lys Ser Ala Ile Val Thr Leu Thr Tyr Asp Ser Glu Trp Gln Arg

1 5 10 15

Asp Gln Cys

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

<213> Human papillomavirus type 16

<400> 75

Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Cys Pro Glu Glu Lys Gln Arg His

1 5 10 15

<210> 76

<211> 20

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Tlr1 small base-pairing guide DNA

<400> 76

caaaccgauc guagugcuga

20

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 77

Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu

1 5