



등록특허 10-2727195



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월06일
(11) 등록번호 10-2727195
(24) 등록일자 2024년11월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 41/00 (2020.01) *A61K 33/24* (2019.01)
A61K 38/19 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61N 5/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 41/0038 (2013.01)
A61K 33/24 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7037576
- (22) 출원일자(국제) 2016년05월27일
심사청구일자 2021년04월02일
- (85) 번역문제출일자 2017년12월28일
- (65) 공개번호 10-2018-0012823
- (43) 공개일자 2018년02월06일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2016/061989
- (87) 국제공개번호 WO 2016/189125
국제공개일자 2016년12월01일

- (30) 우선권주장
EP15305810.2 2015년05월28일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (56) 선행기술조사문헌
KR1020110028616 A*
M. R. Graf et al., Cancer Immunol Immunother, 2002, 51, 179-189.*
R. E. Vatner et al., Frontiers in Oncolog, 2014, 4, 325.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 8 항

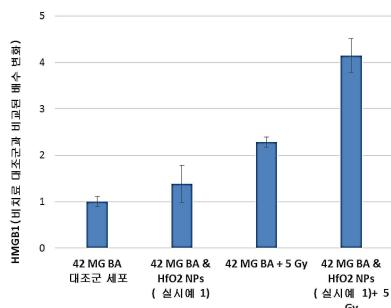
심사관 : 이소영

(54) 발명의 명칭 치료 백신으로서 사용되기 위한 나노입자

(57) 요약

본 발명은 인간 건강 분야에 관한 것이며, 더욱 특히 암을 앓고 있는 대상체, 특히 전이성 암, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서 방사선요법의 맥락하에 치료 백신으로서 사용되기 위한 나노입자에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 38/19 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 9/0009 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
A61N 2005/1098 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하는 대상체에서, 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체에서, 또는 방사선요법에 의해 통상적으로는 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체에서, 암을 치료하기 위해 사용되는 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 포함하는 백신 조성물로서, 이때 치료는 이온화 방사선량 범위가 1.8 내지 30 Gray (Gy) 인, 적어도 하나의 방사선조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법에 대상체를 노출시키는 것을 포함하고, 상기 백신 조성물은 종양내 (IT) 경로를 통해 투여되고, 각각의 나노입자는 적어도 7 g/cm^3 ³ 의 밀도를 갖고, 하프늄 산화물, 또는 하프늄 산화물로 적어도 부분 피복된 금으로부터 선택되는 물질로 이루어지고, 각각의 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체에서 pH 6.5 내지 7.5 에서의 나노입자 안정성을 허용하는 생체적합성 코팅으로 피복된, 백신 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 이온화 방사선량 범위가 1.8 내지 20 Gray (Gy) 인, 백신 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 암이 전이성 암인 경우, 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 하나의, 최대한으로 2 개의, 전이성 암의 종양 부위에, 적어도 하나의 방사선조사 단계가 생체 내 적용되는, 백신 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 암이 전이성 암인 경우, 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 대상체의 암 샘플에, 적어도 하나의 방사선조사 단계가 생체 외 적용되고, 생체 외 치명적으로 방사선조사된 암 세포 및 암 샘플로부터의 연관된 세포 상정액의 적어도 일부가, 대상체에서의 임의의 선택적인 차후의 생체 내 암 치료 이전에, 상기 대상체에 적어도 부분적으로 재투여되는, 백신 조성물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 이온화 방사선량은 분할 치료 당 1.8, 2, 2.4, 2.5, 3, 3.2, 3.6, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 10, 15 및 20 Gy 로부터 선택되는, 백신 조성물.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 전이성 암이 (i) 결합조직에 영향을 미치고, 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 악성 섬유조직구종으로부터 선택되고, (ii) 내피 또는 중피 조직에 영향을 미치고, 혈관육종, 맥관육종, 림프관육종 및 중피종으로부터 선택되고, (iii) 근육 조직에 영향을 미치고, 평활근육종 및 횡문근육종으로부터 선택되고, (iv) 상피 조직에 영향을 미치고, 선암종, 편평 세포 암종 및 표피모양 암종으로부터 선택되고, (v) 신경 조직에 영향을 미치고, 다형성 아교모세포종, 신경아교종, 신경모세포종, 속질모세포종, 수막종, 신경섬유육종 및 신경초종으로부터 선택되고, (vi) APUD 계에 영향을 미치고, 갑상선 암종, 췌장 암종, 위 암종 및 장 암종으로부터 선택되거나; 또는 전이성 암이 흑색종인, 백신 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 전이성 암이 하기로부터 선택된 암이거나 또는 이로부터 유래되는, 백신 조성물: 피부암, 중추 신경계 암, 두경부암, 폐암, 신장암, 유방암, 위창자암 (GIST), 전립선암, 간암, 결장암, 직장암, 항문암, 식도암, 남성 비뇨생식암, 부인과암, 부신 및 후복막 암, 뼈 및 연조직의 육종, 소아과 암, 신경모세포종, 중추 신경계 암 및 유임 육종.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 담체 또는 비히클을 추가로 포함하는, 백신 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인간 건강 분야에 관련된 것이며, 보다 특히, 암, 특히 전이성 암 또는 액체 암 (liquid cancer) 을 앓고 있는 대상체에서 방사선요법과 관련하여, 그 자체로서, 또는 조성물에 포함된 치료 백신으로서 사용하기 위한 나노입자에 관한 것이다. 본원에 그 용도가 기재되어 있는 나노입자는 적어도 7 g/cm^3 의 밀도 및 적어도 25 의 원자 번호 (Z) 를 갖는 물질로 이루어진다. 각각의 나노입자는 생리적 유체에서 pH 6.5 내지 7.5 에서의 그 안정성을 허용하는 생체적합성 코팅으로 피복되어 있다 (covered). 방사선조사시, 이들 나노입자는 특히 전이성 암을 앓고 있 대상체에서, 바람직하게는 전이성 암을 앓고 있고 완화적 (palliative) 방사선요법을 수행하고 있는 대상체에서, (완치적; curative) 방사선요법을 포기한 적 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체에서, 방사선요법으로 (통상적으로는) 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체에서, 및 액체 암을 앓고 있는 대상체에서, 방사선요법 단독으로 수득된 암 세포 파괴와 비교할 때 대상체 자신의 면역계의 최적화된 자극 덕택으로 암 세포의 파괴를 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 덕택으로, 방사선요법과 관련해서, 바람직하게는 분할 (fractionated) 방사선요법과 관련해서 대상체에 투여되는 방사선 조사선량은 주위의 건강한 조직에 악 영향을 미치지 않으면서 암 세포 파괴 측면에서 상당히 더 유효하다. 본 기술은 부가적으로 새로운 조성물 및 키트뿐 아니라 그 용도를 개시한다.

배경 기술

[0002]

암은 2012 년에 820 만명의 사망을 차지하는 전세계의 주요 사망 원인이다. 매년 암 발생 건수는 2012 년에 1400 만에서 앞으로 20 년 이내에 2200 만으로 증가할 것으로 예상된다 (WHO). 암은 국소적으로 성장할 수 있고/있거나 램프계 또는 혈행 경로를 통해 전신으로 퍼질 수 있다.

[0003]

수술, 방사선요법, 및 의약품, 특히 화학요법 약물이 암 치료에 있어서 매우 중요하며, 이들 각각은 치료될 암 유형에 따라 질병을 품을 위험이 있는 모든 부위를 다루기 위해 단독으로 또는 조합되어 사용될 수 있다. 악성종양 (malignancy) 의 완치를 위해, 이것은 국소 및 전신 수준 모두에서 제어되어야 한다.

[0004]

최근 일부 악성종양의 검출 및 치료에서의 발전에도 불구하고, 전이는 흔하게 여전히 발생하며 대략 암 사망의 80 ~ 90% 를 차지한다. 대부분의 환자의 암에서 전이성 질환에 대한 표준 치료는 전신 세포독성 화학요법 및 호르몬 박탈이다 (Dhara M. MacDermed et al. Journal of Surgical Oncology 2008). 전이성 암 환자의 치료를 위한 신규한 치료요법의 개발이 절실히 필요하다.

[0005]

일부 특정 종양/암은 선택된 장기로 퍼지는 친화력을 갖는다. 가장 흔한 전이 부위는 폐 (예, 원발성 암이 육종인 경우), 간 (예, 원발성 암이 위창자 암인 경우), 뼈 (예, 원발성 암이 유방 또는 전립선 암인 경우) 및 뇌 (예, 원발성 암이 폐암, 신장암 또는 흑색종인 경우) 이다.

[0006]

방사선요법은 의약품보다 먼저 두 번째로 많이 사용되는 암 치료법으로, 최근 진단받은 모든 암 환자의 절반 정도가 그들의 질병의 진행 중 어느 시점에서 방사선요법을 받는다. 방사선 치료요법은 암 세포를 파괴 또는 손상시키기 위해, 고에너지 입자 또는 파장, 예컨대 X-선, 감마선, 전자빔 또는 양성자를 이용한다.

[0007]

국소적인 이온화 방사선의 치료적 사용이 암 세포를 효과적으로 제거하는 목표를 달성하기 위해 고안된 전략에 의해 대체로 안내되어 왔다. 유일한 치료 양식으로서의 방사선요법은 방광암 및 후두암의 맥락에서와 같이 장기 기능 보존의 가능성을 제공할 수 있다. 보조 치료요법으로서, 방사선요법이 수술 전에 제공될 때, 이는 절제술을 용이하게 할 수 있거나, 유방-보존 덩어리절제술 후 치료와 같이 수술 후에 제공될 때에는 미세한 잔류 질병을 치료할 수 있다. 새로운 발전은 소수전이성 (oligometastatic) 질환 부위를 제거하기 위한 정위체 방사선요법 (stereotactic body radiotherapy; SBRT) 의 이용이다. SBRT 는 암을 고 방사선량 (전형적으로는 5 Gy 내지 25 Gy) 의 단일 또는 몇 차례의 분할로 집중 (focal) 치료 가능하게 할 수 있다. 소수 전이성 상태의 존재는 "순수히 국소화된 병변과 광범위하게 전이된 병변의 중간"에 기초한다. 전형적으로, 1 내지 5, 예를 들어 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 전이 또는 전이 병변이 SBRT 로 고려된다 (Dhara M. MacDermed

et al. Journal of Surgical Oncology 2008; Ralph R. Weichselbaum Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011).

[0008] 그러나, 원거리 (멀리 떨어져 있는) 전이가 많이 된 전이성 악성종양 (통상적으로 5 초과, 바람직하게는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 초과의 전이)은 예후가 좋지 않다 (Ralph R. Weichselbaum Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011).

[0009] 광범위한 전신성 질환 환자 ("다전이성 (polymetastatic)" 환자로서 또한 동정되는 전이가 많이 보이는 환자)는 통상적으로 종양전문의에 의해 방사선요법과 같은 혼 국부적 치료에 의해 치유가능한 것으로 여겨지지 않는다. 반면에, 완화적 방사선요법은 완치적 치료법으로서 제공되는 방사선요법과는 구별되는 증상 완화에 사용된다 (Sonam Sharma et al. Seminars in Oncology 2014). 완화적 방사선요법은 기대 수명이 짧은 환자의 경우에서도 국소 진행성 또는 전이성 종양의 많은 증상에 대한 효험이 있는 치료법이다 (Sonam Sharma et al. Seminars in Oncology 2014). 여기서, 방사선요법은 통증, 신경 증상, (담즙 또는 요로관 폐쇄와 같은) 폐쇄 증상의 완화, 및 출혈 또는 궤양성 병변의 완화를 위한 효과적인 치료법일 수 있다. 완화적 방사선요법은 또한 발병할 가능성이 있고 증상이 나타날 수 있는 부분에서 국소 종양 제어의 유지를 돋는데 사용될 수 있다. 완화적 방사선요법에서 전형적인 방사선 조사선량 (dose) 분할 계획은 다음과 같다:

- 1 x 8 Gy, 5-6 x 4 Gy, 10 x 3 Gy (단순 골 전이에 대해, 및 2 일 내지 2주 동안);

- 5 x 4 Gy; 10 x 3 Gy, 15 x 2.5 Gy (전뇌 (whole brain) 방사선요법에 대해, 및 1 내지 3 주 동안);

- 2 x 7.5-8.5 Gy, 10 x 3 Gy, 15 x 2.5 Gy (위대정맥 증후군, 기도 폐쇄를 유발하는 폐에서의 진행암에 대해, 및 1 내지 3 주 동안);

- 1 x 8-10 Gy, 5 x 4 Gy, 10 x 3 Gy, 15-30 x 2-3 Gy (출혈, 폐쇄 증상, 통증을 유발하는 내장 전이에 대해, 및 1 일 내지 6 주 동안);

[0014] - 1- 5 x 6-24 Gy (장기-예후가 기대되고 및/또는 전이가 적은 양호한 수행 상태의 환자에게서 일반적으로 예약된 정위방사선요법에 대해, 1 내지 5 일 동안) (Sonam Sharma et al. Seminars in Oncology 2014, Table 3).

[0015] 게다가, 임상적 치료 방사선량으로의 국소 방사선은 선천적 및 후천적 면역계의 일부 활성화를 유도한다는 증거가 있다. 방사선은 종양을 제자리 (*in situ*) 백신으로 잠재적으로 전환시키는 면역원성 세포사 (ICD)을 유도하는 것으로 밝혀진 바 있으며, 이는 특히 수상돌기 세포에 의해 임종 세포의 섭취, 종양-유래 항원의 T 세포로의 교차-제시, 및 항-종양 T 세포의 활성화 (세포독성 CD8+ T 세포의 활성화 포함)를 촉진시키는 3 개의 분자 신호: 종양 세포 표면 상 칼레티콜린 (calreticulin; CRT)의 노출, 고속이동군 단백질 B1 (high-mobility group protein B1; HMGB1)의 방출, 및 ATP의 방출을 특징으로 한다 (Oliver Kepp et al. Oncoimmunology 2014).

[0016] 또한, 방사선에 대한 종양 반응에는 DNA 손상이 포함되고, 종양-유래 DNA의 감지는 INF 생성을 유발할 수 있고, 면역원성 종양에 대한 항-종양 T-세포 반응을 생성할 수 있다는 점이 공지되어 있다 (예를 들어, Theresa L. Whiteside et al. 2016 참조).

[0017] 방사선은 종양 미세환경의 복합 개질제로서, 그것만으로, 면역 억제성 경로를 불리하게 활성화할 수 있기 때문에 치료학적으로 유의미한 항-종양 면역 반응을 유도하기에는 좀처럼 충분하지 않다. ICD를 겪고 있는 종양 세포의 비율 및 방사선 후 종양 미세환경의 개조는 가변적이다. 이 균형의 결과가 임종 암 세포를 유효한 제자리 백신으로 전환시키는 방사선의 능력을 궁극적으로 결정한다 (Sandra Demaria and Silvia C. Formenti, 2012).

[0018] 면역치료제와 방사선의 조합은 면역 반응을 자극하는 것으로 보고되어 있다. 사이토카인 [인터류킨-2 (IL2) 및 인터페론-알파 (IFN α)] 이 수십년 동안 치료적 접근법으로 사용되어 왔다. 오늘날, 종양 면역 회피를 극복하기 위한 수많은 전략이 평가 중에 있다. 임상 평가 중에 있는 면역치료 접근법의 예에는 하기가 포함된다: (1) T-세포 활성화 경로에 대한 T-세포 체크포인트 저해제 또는 아고니스트, (2) 신규한 사이토카인, 예컨대 IL12 및 IL15, (3) 치료 백신, (4) 면역억제 세포의 제거, 및 (5) 면역 세포 기능을 증강시키기 위해 고안된 다른 약제 및 접근법 (Scott J. Antonia et al. 2014; Theresa L. Whiteside et al. 2016).

[0019] 그러나, 효과적인 치료 백신을 생산하는 것은 여전히 어렵고 도전적이다. 유효하기 위해서는, 암 치료 백신은 두 가지 목표를 달성해야 한다. 첫째, 그것들은 정확한 표적 세포 (예, 암 세포)에 대항하는 특이적 면역 반응을 자극해야 한다. 두번째로, 면역 반응은 이들 세포가 숙주 면역계에 의한 공격, 전형적으로는 B 세포 및 자연 살해 T 세포에 의한 공격으로부터 자신을 보호하기 위해 사용하는 장벽을 극복하기에 충분히 강력

해야 한다.

발명의 내용

[0020] 본 발명의 개요

본 발명자들은 암을 앓고 있고 방사선요법에 노출된 대상체에서 치료 백신으로서 그 자체 또는 조성물 (전형적으로는 치료 조성물, 특히 백신 조성물)에 포함된 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체 (aggregate)의 유리한 용도를 현재 기술하고 있다. 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체뿐 아니라 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 포함하는 조성물이 전형적으로 암 치료에 사용된다. 그러한 나노입자와 방사선요법의 조합은 현저하게 숙주의 항암 면역 반응을 강화시키고, 특히 적어도 하나의 방사선조사 단계 (여기서, 이온화 방사선량 범위는 1.8 내지 30 Gray (Gy), 바람직하게 1.8 내지 20 Gray (Gy), 전형적으로 2 내지 15 Gray (Gy) 임)를 포함하는 분할 방사선요법의 맥락에서 통괄 치료 (global treatment)를 최적화한다. 본 발명은 특히 기술에 의해 허용된 압스코팔 효과 (abscopal effect)로 인해 암이 광범위한 전신성 질환 (상기 본원에서 정의된 바와 같음)으로 진전될 때의 전이성 암에 대해, 및 액체 암에 대해 특히 효율적이며, 완전하고 영구적인 항-종양 활성을 지지한다. 압스코팔 효과는 전이성 암 치료에서 관찰되는 현상으로, 여기서 특정 종양 부위의 국소화된 방사선조사가 방사선조사된 볼륨에서 떨어진 부위에서도 반응을 야기한다. 방사선요법은 항암 면역 반응을 이끌어 내기 위해 약 면역원성 종양-관련 항원에 대한 내성을 역전시키는 것을 도울 수 있다. 그러나, 압스코팔 효과는 방사선요법이 단독으로 이용되는 경우 드문 임상적 사건으로 여전히 남아 있다. Kobe Reynders 등은 1973년과 2013년 사이에 방사선요법 후 압스코팔 효과의 23건의 임상 사례를 보고했다 (Kobe Reynders et al. Cancer Treatment Review 2015).

[0022] 본 발명의 덕택으로, 국소 방사선조사는 단독의 방사선요법과 비교할 때 지속적인 항-종양 반응의 발달을 이끌어 낼 수 있어서, 국소 및 전신 종양 모두의 제어를 강화시킨다.

[0023] 본원에서 본 발명자들이 처음으로 제공한 실시예는, 치료 백신으로서 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 이용할 때, 임종 암 세포 [방사선민감 세포주 (예, 인간 직장결장 HCT 116 암 세포주) 및 방사선저항 세포주 (예, 인간 아교모세포종 42 MG BA 세포주 또는 인간 췌장 PANC-1 암세포주)]를 비롯한 본원에서 테스트된 암 세포주]에 의해 유도되는 손상 관련 분자 패턴 (damage associated molecular pattern; DAMP)의 시험관 내 (in vitro) 증폭을 입증하였다.

[0024] 최대 관심사로, 본 발명의 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체로 치료되고 시험관내 방사선조사된 취파 (murine) 직장결장 CT-26 암세포를 면역적격성 (immunocompetent) 마우스에 백신접종 (vaccination) 하면, 단독의 방사선요법과 비교할 때, 그 동물은 7일 후 건강한/살아있는 CT-26 암세포로 캘린지될 때 종양이 형성되는 것이 현저히 방지된다. 이러한 결과로부터 놀랍게도, 본 발명의 나노입자의 방사선요법과의 조합이 면역 반응을 증폭시키고 임종 암 세포를 암 세포에 대항하는 효율적인 백신으로 변환시킨다는 것이 입증된다.

[0025] 바람직한 양태에서, 본원에서 기재된 본 발명의 생성물 (나노입자 및/또는 나노입자의 응집체, 및 그러한 나노입자 및 나노입자의 응집체를 포함하는 조성물)은 바람직하게 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하고 있는 대상체, (완치적) 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체, 방사선요법으로 (통상적으로) 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체, 및 액체 암을 앓고 있는 대상체로부터 선택되는 대상체에서 바람직하게 사용되며, 바람직하게는 전이성 암을 앓고 있고, 완화적 방사선요법을 수행하고 있는 대상체, (완치적) 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체 및 액체 암을 앓고 있는 대상체로부터 선택되는 대상체에서 사용된다.

[0026] 전이성 암을 앓고 있는 대상체는 전형적으로 광범위한 전신성 질환으로 통상 진전된 원거리 다수의 전이를 가진 암을 앓고 있는 본원에서 정의된 바와 같은 대상체이다. 다수의 원거리 전이를 가진 대상체는 "다전이성" 대상체 또는 환자로서 동정된다.

[0027] 따라서, 본원에서는 암, 전형적으로는 전이성 암 [전이성 암은 본원에서 전형적으로 많은/다수의 원거리 전이를 포함하는 것으로서 정의되며, 전형적으로는 광범위한 전신성 질환과 연관되는 것으로 간주됨], (종래) 방사선요법에 의해 치료되지 않는 암, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서, 적어도 하나의 방사선조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법의 맥락에서 (이때 이온화 방사선량은 1.8 내지 30 Gray (Gy), 바람직하게 1.8 내지 20 Gray (Gy), 전형적으로 2 내지 15 Gray (Gy) 범위임), 치료 백신으로서 사용되기 위한 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체, 또는 사용되기 위한 (전형적으로는 암 치료에 사용되기 위한) 치료 조성물, 전형적으로는 백신 조성물을 제조하기 위해 사용되는 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체가 기재되어 있으며, 여기서 각각의 나노입자는

밀도는 적어도 7 g/cm^3 이고, 원자 번호 (Z) 는 적어도 25 인 물질로 이루어지고, 각각의 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체 내 pH 6.5 내지 7.5 사이의 나노입자 안정성을 허용하는 생체적합성 코팅으로 피복되어 있다.

[0028] 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체는 바람직하게는 대상체/환자의 선택된 집단 (population) 에서, 전형적으로는 전이성 암을 앓고 완화적 방사선요법을 수행한 대상체에서, (완치적) 방사선요법을 포기한바 있는 전이성 암을 앓는 대상체에서, 방사선요법에 의해 (통상) 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체에서, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서 암을 치료하는데 통상 사용된다.

[0029] 또한 본원에서는, 방사선요법의 맥락에서, 바람직하게는 분할 방사선요법의 맥락에서, 암, 전형적으로는 전이성 암 (특히, 암이 광범위한 전신성 질환으로 진전된 전이성 암), 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서, 암을 치료하는데 통상 사용되는 백신 조성물이 개시된다.

[0030] 전형적인 조성물은 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하는 대상체, (완치적) 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체에서, 방사선요법으로 (통상) 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서 암 치료에 사용되기 위한 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 포함하는 백신 조성물이며, 여기서 치료는 적어도 하나의 방사선조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법에 대상체를 노출시키는 것을 포함하며, 여기서 이온화 방사선량 범위는 1.8 내지 30 Gray (Gy), 바람직하게 1.8 내지 20 Gray (Gy) 이고, 각각의 나노입자는 밀도가 7 g/cm^3 이상이고, 원자 번호 (Z) 가 적어도 25 인 물질로 이루어지며, 각각의 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체에서 pH 6.5 내지 7.5 사이의 나노입자 안정성을 허용하는 생체적합성 코팅으로 피복되어 있다.

[0031] 백신 조성물은 본원에서 기재된 바와 같은 나노입자 또는 나노입자의 응집체를, 바람직하게는 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클과 함께 포함한다. 특정 백신 조성물은 적어도 하나의 면역치료제 및 임의로는 암 치료용 치료제를 추가로 포함한다.

[0032] 또한 대상체에서, 바람직하게는 대상체/환자의 선택된 집단에서, 전형적으로는 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하는 대상체에서, (완치적) 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체에서, 방사선요법으로 (통상) 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체에서, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서, 암을 치료하기 위한 본원에서 기술된 바와 같은 나노입자 또는 나노입자의 응집체 또는 치료 조성물의 용도가 기재되어 있으며, 또한 필요로 하는 대상체에 본원에서 정의된 바와 같은 나노입자 또는 나노입자의 응집체 또는 치료 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서의 암 치료의 상응하는 방법이 본원에 기재되어 있다.

[0033] 추가적으로 본원에서는, (i) 본원에 기술된 바와 같은 나노입자 또는 나노입자의 응집체, 또는 이러한 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 조성물을, 바람직하게는 (ii) 적어도 하나의 면역치료제 및/또는 암 치료용 치료제와 함께 포함하는 키트, 전형적으로는 백신 키트가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1: 실시예 1 의 HfO_2 나노입자 (NP) 혼탁액으로 치료되거나 그렇지 않고, 방사선요법 (단일 분획으로 전달된 5 Gy) 에 노출되거나 그렇지 않은 세포로부터의 농축된 세포 상청액에 방출된 HMGB1 을 비치료 (untreated) 대조군과 비교되는 배수 변화 (fold-change) 로서 보고하였다.

도 2: 실시예 1 의 HfO_2 나노입자 (NP) 혼탁액으로 치료되거나 그렇지 않고, 방사선요법 (단일 분획으로 전달된 10 Gy) 에 노출되거나 그렇지 않은 세포로부터의 농축된 세포 상청액에 방출된 HMGB1 을 비치료 대조군과 비교되는 배수 변화로서 보고하였다.

도 3: 실시예 1 의 HfO_2 나노입자 (NP) 혼탁액으로 치료되거나 그렇지 않고, 단일 분획으로 전달된 방사선요법에 노출되거나 그렇지 않은 세포로부터의 농축된 세포 상청액에 방출된 HMGB1 을 비치료 대조군과 비교되는 배수 변화로서 보고하였다. A) 암 세포주는 HCT 116 인간 직장결장 세포주이고, 방사선 조사선량 (irradiation dose) 은 4 Gy 및 6 Gy 에 상응함; B) 암 세포주는 42 MG BA 인간 아교모세포종 세포주이고, 방사선 조사선량은 10 Gy 및 15 Gy 에 상응함; C) 암 세포주는 PANC-1 인간 췌장 세포주이고, 방사선 조사선량은 8 Gy 에 상응함.

시험관 내 (단일 분할로 전달된) 방사선량을 암 세포의 방사선민감성에 맞게 적응시키는 것은 익히 공지되어 있

다. 방사선민감 암 세포주, 예컨대 HCT 116 세포주는, 42 MG BA 및 PANC-1 세포주와 같은 더 많은 방사선 저항성 암세포주와 비교시 더 낮은 방사선량을 받을 수 있다. 시험관 내에서 관찰된 DAMP 의 증가된 생성으로 생체 내 면역 반응 증진이 예상된다.

도 4: 실시예 1 의 HfO_2 나노입자 (NP) 혼탁액으로 치료되거나 그렇지 않고, 방사선요법 (단일 분할로 전달된 6 Gy) 에 노출되거나 그렇지 않은 HCT 116 암 세포로부터 ATP 분비를 비치료 대조군과 비교되는 배수-변화로서 보고하였다.

도 5: 그룹 1 (대조군), 그룹 2 (방사선조사군: 단일 분할로 전달된 6 Gy) 및 그룹 3 (방사선조사: 단일 분할로 전달된 6 Gy 에 노출된 실시예 1 의 HfO_2 NP) 의 세 그룹에 대해 주사 스케줄을 제시하는 면역적격성 마우스의 쥐과 직장결장 CT26 세포주로 수행된 백신접종 검정 프로토콜의 예시.

도 6: 그룹 1 (대조군), 그룹 2 (RTx, 6 Gy) 및 그룹 3 (HfO_2 NP 실시예 1 + RTx, 6 Gy) 의 종양 미함유 마우스의 백분율이 백신접종 후 경과일의 함수로서 제시되는 백신접종 검정 프로토콜.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 방사선요법

나노입자 및/또는 나노입자의 응집체뿐 아니라, 이러한 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 포함하는 임의의 조성물이 암, 특히 전이성 암, 바람직하게는 암이 광범위한 전신성 질환으로 진전된 전이성 암, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서, 방사선요법의 맥락에서, 즉 나노입자가 투여된 바 있고, 이어서 방사선요법에 노출된 대상체에서, 치료 조성물 또는 백신 (조성물)로서 사용되기 위해 본원에서 기재되어 있다. 다시 말해, 치료 백신으로서 사용가능하기 위해, 나노입자는 이온화 방사선에 노출되어야 하며, 이는 이들이 방사선요법과 조합되어 사용된다는 점을 의미한다.

광범위한 전신성 질환으로 진전된 암은 전형적으로 많은 원거리 전이, 전형적으로는 5 개 초파, 바람직하게는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 개 초파의 전이가 있으며, 대부분의 경우에서 예후가 좋지 않다 (Ralph R. Weichselbaum Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011 참조). 이러한 암을 앓고 있는 대상체는 상기 암과 연관된 전이성 병변/부위 외에, 별개의 원발성 암/종양과 연관된 원발성 및/또는 전이성 암 병변인 다른 암 세포 부위/병변을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 본원에 기재된 특정 조성물은 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하는 대상체에서, 방사선요법을 포기한 바 있는 (전형적으로는 (통괄) 완치적 치료로서 포기한 바 있음) 전이성 암을 앓고 있는 대상체에서, (통상/고전적으로) 방사선요법에 의해 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체에서, 또는 액체 암을 앓고 있는 대상체에서, 암을 치료하기 위해 사용되는 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 포함하는 백신 조성물이며, 여기서 치료는 대상체에 적어도 하나의 방사선조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법을 노출시키는 것을 포함하고, 이때 이온화 방사선량은 1.8 내지 30 Gray (Gy), 바람직하게 1.8 내지 20 Gray (Gy) 범위이고, 각각의 나노입자는 밀도가 7 g/cm^3 이상이고, 원자 번호 (Z) 가 25 이상인 물질로 이루어지며, 각각의 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체에서 pH 6.5 내지 7.5 사이의 나노입자 안정성을 허용하는 생체적합성 코팅으로 꾸며져 있다.

[0039] 본 발명의 맥락에서, 대상체 또는 환자는 포유동물이다. 특정 구현예에서, 포유동물은 연령 또는 성별과 상관 없이 인간이다. 대상체는 암을 앓고 있다.

[0040] 본 발명으로부터 이익을 얻을 수 있는 바람직한 대상체는 전형적으로 고체 암 또는 액체 암을 앓고 있다.

[0041] 특정 양태에서, 대상체는 방사선요법이 고전적 치료이거나 또는 특정 대상체에 가장 적합한 치료인 경우, 또는 방사선요법이 지시될 수 있는 경우, 고전적으로 방사선요법에 의해 치료된 암을 앓고 있다.

[0042] 또 다른 특정 및 바람직한 양태에서, 본 발명으로부터 이익을 얻을 대상체는, 전형적으로 대상체가 완화적 치료 중이거나 방사선요법이 포기되어져 있을 때, 방사선요법이 더이상 (완치적) 치료 옵션으로서 고려되지 않거나, 또는 치료 옵션으로서 고려되지 않는 (즉, 고려된 대상체를 위한 통상적인 치료 또는 가능한 완치적 치료로 고려되지 않거나, 또는 1 또는 몇 개, 전형적으로는 5 개 미만의 암 세포 부위/병변 (상기 병변은 대상체에 존재하는 수 많은 암 세포 부위/병변 중에서 전이성 또는 원발성 암 병변임)에 대해서만 사용됨) 암을 앓고 있는 대상체이다. 완화적 치료 중인 경우, 대상체는 여전히 방사선요법에 노출되나, 상기 방사선요법은 더이상

완치적 방사선요법으로서 고려될 수 없다.

[0043] 이 문맥에서, 대상체는 바람직하게 많은/다수의 및 원거리 전이 (즉, 광범위한 전이)를 갖는, 전형적으로는 앞서 설명한 바와 같이 5 초파, 바람직하게는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 개 초파의 전이를 갖는 전이성 암을 앓고 있는 대상체이다.

[0044] 다시 말해, 본 발명의 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체는 이온화 방사선에 노출시, 종양학자가 완치적 치료로서 방사선요법을 고려하지 않는 환자 집단에 해결책을 제공할 것이다.

[0045] 본 발명은 이제 완치적 암 치료 옵션을 이러한 특정 대상체에 제공한다.

[0046] 본 발명으로부터 유익할 수 있는 암을 앓고 있는 전형적인 대상체는, 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하고 있는 대상체, (완치적) 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체, (통상/고전적으로) 방사선요법에 의해 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체, 및 액체 암을 앓고 있는 대상체로부터 선택된다. 바람직하게, 대상체는 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 수행하고 있는 대상체, (완치적) 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체, 및 액체 암을 앓고 있는 대상체로부터 선택된다.

[0047] 당업계에서 및 본 발명의 맥락에서, 용어 "완치적 치료" 또는 "완치적 치료요법"이라는 용어는, 치료받을 대상체에, 그/그녀에게서 발병되는 암(들) [원발성 종양(들)뿐 아니라 상응하는 전이성 병변(들)] 치료를 위한 치료 해결책을 제공하는, 즉 통괄적으로 상기 대상체를 치료하기 위한, 치료 또는 치료요법, 특히 "방사선요법"을 지칭하는 것이다.

[0048] 당업자들에 의해 익히 공지된 바와 같이, 완화적 방사선요법은 증상 완화를 위해 사용되며, 방사선요법, 즉 완치적 치료로서 전달된 방사선요법 (또한 본원에서는 "완치적 방사선요법"으로서 동정됨) 과는 구별된다. 실제로, 완화적 방사선요법은, 짧은 기대 수명을 갖는 환자에게 조차도 국소적으로 진전되거나 전이성인 종양에 의해 유도된 많은 증상들을 치료하는데 있어서 효험이 있는 치료로서 당업자에 의해 고려된다.

[0049] 전형적으로, 전이성 암은 (i) 결합조직에 영향을 미치고, 바람직하게는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 척삭종, 악성 섬유조직구종으로부터 선택되고, (ii) 내피 또는 중피 조직에 영향을 미치고, 바람직하게는 혈관육종, 맥관육종, 림프관육종 및 중피종으로부터 선택되고, (iii) 근육 조직에 영향을 미치고, 바람직하게 평활근육종 및 횡문근육종으로부터 선택되고, (iv) 상피 조직에 영향을 미치고, 바람직하게는 선암종, 편평 세포 암종 및 표피모양 암종으로부터 선택되고, (v) 신경 조직에 영향을 미치고, 바람직하게 다형성 아교모세포종, 신경아교종, 신경모세포종, 속질모세포종, 수막종, 신경섬유육종 및 신경초종으로부터 선택되고, (vi) APUD 계에 영향을 미치고, 바람직하게 갑상선 암종, 췌장 암종, 위 암종 및 장 암종으로부터 선택된다. 또 다른 바람직한 구현예에서, 전이성 암은 흑색종이다.

[0050] 전이성 암은 예를 들어 하기로부터 선택된 암일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있다: 피부암, 중추 신경계 암, 두경부암, 폐암, 신장암, 유방암, 위창자암 (GIST), 전립선암, 간암, 결장암, 직장암, 항문암, 식도암, 남성 비뇨생식암, 부인과암, 부신 및 후복막 암, 뼈 및 연조직의 육종, 소아과 암, 신경모세포종, 중추 신경계 암 및 유잉 (Ewing) 육종.

[0051] 전형적으로, 액체 암은 혈액 또는 림프계 세포 조직에 영향을 미친다. 이것은 전형적으로 백혈병, 골수종 및 림프종으로부터 선택된다.

[0052] 대상체는 종양이 있을 수 있다. 본 개시에서 달리 명시되지 않는 한, 종양은 악성 종양이다.

[0053] 또 다른 구현예에서, 대상체는 방사선요법이 종양학자에 의해 지시되는 액체 암 (예, 림프종)을 앓고 있다.

[0054] 바람직하게, 대상체가 노출되어지는 방사선요법은 분할 방사선요법, 유리하게는 적어도 하나의 방사선조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법 (또한 본원에서는 "분할 치료"로서 동정됨), 전형적으로는 여러 방사선 조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법이며, 이때 이온화 방사선량의 범위는 방사선조사 단계 당 1.8 내지 30 Gray (Gy), 바람직하게 1.8 내지 20 Gray (Gy), 바람직하게 1.8 내지 15 Gray (Gy)이다.

[0055] 분할 방사선요법의 맥락에서, 이온화 방사선의 전체 방사선량은 몇일의 기간에 걸쳐 몇 차례의 더 작은 방사선량으로 나뉘어진다. 이것은 암에 대한 방사선의 효과를 극대화하고, 건강한 세포에 대한 부정적인 부작용은 최소화한다. 전형적인 분할 계획은 현재 연구가 촉진 분할의 이점을 고려하고 있지만 (하루 2 회의 전달 및 /또는 주말의 전달), 총 방사선량을 6 주의 기간에 걸쳐 30 단위/매 주 전달되는 분할로 나뉜다.

[0056] 용어 "이온화 방사선"은 원자 또는 분자를 이온화할 수 있는 고-에너지 입자 또는 과동을 지칭한다. 이온화

능력은 개개의 입자 또는 파동의 에너지에 달려 있으며, 그 수에는 좌우되지 않는다. 가장 통상적인 상황에서, 개개의 입자 또는 파동의 에너지가 충분하지 않으면, 입자 또는 파동이 대량으로 범람하여 이온화를 유발하지 않을 것이다. 전형적인 이온화 방사선은 그 에너지가 1.8 KeV 이상인 방사선이다.

[0057] 바람직한 구현예에서, 방사선조사 단계 당 이온화 방사선량은 분할 치료 당 1.8, 2, 2.2, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 및 30 Gy로부터 선택된다.

이온화 방사선량은 바람직하게 분할 치료 당 1.8, 2, 2.4, 2.5, 3, 3.2, 3.6, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25 및 30 Gy로부터 선택되고, 보다 더 바람직하게는 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25 및 30 Gy로부터 선택된다.

[0058] 바람직한 분할 방사선요법은 2 Gy 의 25 분할 (fraction) (총: 50 Gy), 2 Gy 의 30 분할 (총: 60 Gy), 2 Gy 의 35 분할 (총: 70 Gy), 2 Gy 의 40 분할 (총: 80 Gy), 3 Gy 의 5 분할 (총: 15 Gy), 3 Gy 의 10 분할 (총: 30 Gy), 3 Gy 의 15 분할 (총: 45 Gy), 3 Gy 의 20 분할 (총: 60 Gy), 3 Gy 의 25 분할 (총: 75 Gy), 4 Gy 의 3 분할 (총: 12 Gy), 4 Gy 의 5 분할 (총: 20 Gy), 4 Gy 의 8 분할 (총: 32 Gy), 4 Gy 의 10 분할 (총: 40 Gy), 4 Gy 의 15 분할 (총: 60 Gy), 4 Gy 의 20 분할 (총: 80 Gy), 5 Gy 의 2 분할 (총: 10 Gy), 5 Gy 의 3 분할 (총: 15 Gy), 5 Gy 의 4 분할 (총: 20 Gy), 5 Gy 의 5 분할 (총: 25 Gy), 5 Gy 의 6 분할 (총: 30 Gy), 5 Gy 의 8 분할 (총: 40 Gy), 5 Gy 의 10 분할 (총: 50 Gy), 6 Gy 의 1 분할 (총: 6 Gy), 6 Gy 의 2 분할 (총: 12 Gy), 6 Gy 의 3 분할 (총: 18 Gy), 6 Gy 의 4 분할 (총: 24 Gy), 6 Gy 의 5 분할 (총: 30 Gy), 6 Gy 의 6 분할 (총: 36 Gy), 6 Gy 의 10 분할 (총: 60 Gy), 7 Gy 의 1 분할 (총: 7 Gy), 7 Gy 의 2 분할 (총: 14 Gy), 7 Gy 의 3 분할 (총: 21 Gy), 7 Gy 의 4 분할 (총: 28 Gy), 7 Gy 의 5 분할 (총: 35 Gy), 8 Gy 의 1 분할 (총: 8 Gy), 8 Gy 의 2 분할 (총: 16 Gy), 8 Gy 의 3 분할 (총: 24 Gy), 8 Gy 의 4 분할 (총: 32 Gy), 8 Gy 의 5 분할 (총: 40 Gy), 9 Gy 의 1 분할 (총: 9 Gy), 9 Gy 의 2 분할 (총: 18 Gy), 9 Gy 의 3 분할 (총: 27 Gy), 9 Gy 의 4 분할 (총: 36 Gy), 9 Gy 의 5 분할 (총: 45 Gy), 10 Gy 의 1 분할 (총: 10 Gy), 10 Gy 의 2 분할 (총: 20 Gy), 10 Gy 의 3 분할 (총: 30 Gy), 10 Gy 의 4 분할 (총: 40 Gy), 15 Gy 의 1 분할 (총: 15 Gy), 15 Gy 의 2 분할 (총: 30 Gy), 15 Gy 의 3 분할 (총: 45 Gy), 15 Gy 의 4 분할 (총: 60 Gy), 20 Gy 의 1 분할 (총: 20 Gy), 20 Gy 의 2 분할 (총: 40 Gy), 20 Gy 의 3 분할 (총: 60 Gy), 25 Gy 의 1 분할 (총: 25 Gy), 25 Gy 의 2 분할 (총: 50 Gy), 25 Gy 의 3 분할 (총: 75 Gy), 30 Gy 의 1 분할 (총: 30 Gy), 및 30 Gy 의 2 분할 (총: 60 Gy)로부터 선택될 수 있다.

[0059] 특히 바람직한 양태에서, 대상체는 전이성 암을 앓고 있고, 완화적 방사선요법을 수행하는 대상체, 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓고 있는 대상체 또는 방사선요법으로써 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체이고, 분할 방사선요법은 6 Gy 의 1 분할 (총: 6 Gy), 6 Gy 의 2 분할 (총: 12 Gy), 6 Gy 의 3 분할 (총: 18 Gy), 6 Gy 의 4 분할 (총: 24 Gy), 6 Gy 의 5 분할 (총: 30 Gy), 7 Gy 의 1 분할 (총: 7 Gy), 7 Gy 의 2 분할 (총: 14 Gy), 7 Gy 의 3 분할 (총: 21 Gy), 7 Gy 의 4 분할 (총: 28 Gy), 8 Gy 의 1 분할 (총: 8 Gy), 8 Gy 의 2 분할 (총: 16 Gy), 8 Gy 의 3 분할 (총: 24 Gy), 8 Gy 의 4 분할 (총: 32 Gy), 9 Gy 의 1 분할 (총: 9 Gy), 2 Gy 의 2 분할 (총: 18 Gy), 9 Gy 의 3 분할 (총: 27 Gy), 10 Gy 의 1 분할 (총: 10 Gy), 10 Gy 의 2 분할 (총: 20 Gy), 10 Gy 의 3 분할 (총: 30 Gy), 15 Gy 의 1 분할 (총: 15 Gy), 15 Gy 의 2 분할 (총: 30 Gy), 20 Gy 의 1 분할 (총: 20 Gy), 20 Gy 의 2 분할 (총: 40 Gy), 25 Gy 의 1 분할 (총: 25 Gy) 및 30 Gy 의 1 분할 (총: 30 Gy)로부터 선택된다.

[0060] 나노입자

[0061] 본 발명의 맥락에서 사용된 나노입자는 유리하게 밀도가 7 g/cm^3 이상이고 원자 번호 (Z) 가 25 이상인 물질로 이루어진다. 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체에서 pH 6.5 내지 7.5 사이에서의 나노입자 안정성을 허용하는 생체적 합성 코팅으로 피복되어 있다.

[0062] 본 발명의 취지에서, 용어 "나노입자"란 전형적으로 1 nm 내지 500 nm 범위의 나노미터 크기를 갖는 생성물, 특히 합성 생성물을 지칭한다.

[0063] 용어 "나노입자의 응집체"는 강력하게, 전형적으로 공유 결합적으로 서로 결합된 나노입자의 집합체를 지칭한다.

[0064] 투과 전자 현미경 (TEM) 이 나노입자의 크기를 측정하는데 사용될 수 있다. 또한, 동적 광 산란 (DLS) 가 용액 중의 나노입자의 유체역학적 직경을 측정하는데 사용될 수 있다. 이들 두 방법은 크기 측정을 비교하

고 그 크기를 확인하는데 차례대로 추가로 사용될 수 있다. 바람직한 방법은 DLS 이다 (Ref. International Standard ISO22412 Particle Size Analysis- Dynamic Light Scattering, International Organisation for Standardisation (ISO) 2008). 본원에서 정의된 바와 같은 나노입자의 최대 치수 (largest dimension) 는 전형적으로 약 4 nm 내지 약 250 nm, 바람직하게 약 4 nm 또는 10 nm 내지 약 100 nm 또는 약 200 nm, 보다 훨씬 바람직하게는 약 20 nm 내지 약 150 nm 이다.

[0065] 입자의 형상이 이의 "생체적합성"에 영향을 미칠 수 있으므로, 꽤 균일한 형상을 가진 입자가 바람직하다. 약동학적 이유로, 형상이 본질적으로 구형, 원형 또는 타원형인 나노입자가 그에 따라 바람직하다. 이러한 형상은 또한 나노입자와 세포의 상호작용 또는 세포에 의한 나노입자 흡수에 유리하다. 구형 또는 원형의 형상이 특히 바람직하다.

[0066] 전형적으로, 최대 치수는 원형 또는 구형의 나노입자의 직경이거나 또는 타원형 또는 계란형 형상의 나노입자의 최대 길이이다.

[0067] 조성물에 존재하는 나노입자의 무기 물질은 바람직하게 7 이상의 이론적 (벌크) 밀도를 가지며, 이는 상기 특성을 보이는 임의 물질로부터 선택될 수 있으며, 문헌 [Physical Constants of Inorganic Compounds appearing on page 4-43 in Handbook of Chemistry and Physics (David R. Lide Editor-In-Chief, 88th Edition 2007-2008)] 으로부터의 표에서 확인된다.

[0068] 나노입자를 구성하는 무기 물질은 바람직하게는 적어도 25, 바람직하게는 적어도 40 또는 41, 보다 바람직하게 적어도 50 또는 51, 보다 바람직하게 적어도 60, 61, 62 또는 심지어 63의 유효 원자 번호 (Z_{eff}) 를 갖는 물질이다.

[0069] 유효 원자 번호는, 원자 번호와 유사하지만 원자들보다는 화합물 (예를 들면, 물) 및 상이한 물질들 (예를 들면, 조직 및 뼈) 의 혼합물에 대해 사용되는 용어이다. 유효 원자 번호는, 화합물 또는 물질의 혼합물에 대한 평균 원자 번호로 계산한다. 이는 Z_{eff} 로 약술된다.

[0070] 유효 원자 번호는 화합물 속의 각각의 원자의 분수 비 (fraction portion) 를 취하여 이를 원자의 원자 번호로 곱하여 계산한다. 유효 원자 번호, Z_{eff} 에 대한 수학식은 다음과 같다:

$$Z_{eff} = \sqrt[2.94]{f_1 \times (Z_1)^{2.94} + f_2 \times (Z_2)^{2.94} + f_3 \times (Z_3)^{2.94} + \dots}$$

[0071] 여기서,

[0073] f_n 은 각각의 원소와 관련된 전자의 총수의 분수이고,

[0074] Z_n 은 각각의 원소의 원자 번호이다.

[0075] 원자 번호 (또는 양성자 수로 공지됨) 는 원자의 핵 속에서 발견된 양성자의 수이다. 이는 기호 Z 로 전통적으로 나타내어진다. 원자 번호는 화학 원소를 유일하게 정의한다. 중성 전하의 원자에서, 원자 번호는 전자의 수와 동일하다.

[0076] 예는 2 개의 수소 원자 ($Z=1$) 및 하나의 산소 원자 ($Z=8$) 로 이루어진 물 (H_2O) 이다. 전자의 총수는 $1+1+8 = 10$ 이다. 2개의 수소에 상응하는 전자의 분수는 $2/10$ 이고, 유일한 산소에 상응하는 전자의 분수는 $(8/10)$ 이다. 따라서, 물의 Z_{eff} 는 다음과 같다:

$$Z_{eff} = \sqrt[2.94]{0.2 \times 1^{2.94} + 0.8 \times 8^{2.94}} = 7.42$$

[0078] Z_{eff} 는 나노입자의 도입되는 방사선 흡수능에 관여한다.

[0079] 나노입자를 구성하는 무기 물질은 일반적으로 산화물, 금속, 황화물 및 이들의 임의 혼합물에서 선택된다.

[0080] 나노입자를 구성하는 무기 물질이 산화물인 경우, 이 산화물은 유리하게 하기로부터 선택된다: 세륨 (IV) 산화물 (CeO_2), 네오디뮴 (III) 산화물 (Nd_2O_3), 사마륨 (III) 산화물 (Sm_2O_3), 유로퓸 (III) 산화물 (Eu_2O_3), 가돌리늄 (III) 산화물 (Gd_2O_3), 테르븀 (III) 산화물 (Tb_2O_3), 디스프로슘 (III) 산화물 (Dy_2O_3), 홀뮴 산화물

(Ho₂O₃), 에르븀 산화물 (Er₂O₃), 틸륨 (III) 산화물 (Tm₂O₃), 이테르븀 산화물 (Yb₂O₃), 루테튬 산화물 (Lu₂O₃), 하프늄 (IV) 산화물 (HfO₂), 탄탈륨 (V) 산화물 (Ta₂O₅), 레늄 (IV) 산화물 (ReO₂), 비스무스 (III) 산화물 (Bi₂O₃). 본 발명의 맥락에서, 무기 산화물의 혼합물이 본 발명의 나노입자를 제조하는데 또한 사용될 수 있다.

[0081] 나노입자를 구성하는 무기 물질이 금속인 경우, 이 금속은 유리하게 하기로부터 선택된다: 금 (Au), 은 (Ag), 백금 (Pt), 팔라듐 (Pd), 주석 (Sn), 탄탈륨 (Ta), 이테르븀 (Yb), 지르코늄 (Zr), 하프늄 (Hf), 테르븀 (Tb), 틸륨 (Tm), 세륨 (Ce), 디스프로슘 (Dy), 에르븀 (Er), 유로퓸 (Eu), 홀뮴 (Ho), 철 (Fe), 란타늄 (La), 네오디뮴 (Nd), 프라세오디뮴 (Pr), 루테튬 (Lu). 본 발명의 맥락에서, 금속 혼합물이 또한 가능하다. 본 발명의 맥락에서, 무기 산화물과 금속의 혼합물도 또한 본 발명의 나노입자 제조에 사용될 수 있다.

[0082] 나노입자를 구성하는 무기 물질이 황화물인 경우, 이 황화물은 바람직하게 은 황화물 (Ag₂S)이다.

[0083] 바람직한 구현예에서, 관심 조성물을 제조하기 위해 본 발명의 맥락에서 사용된 나노입자는 스텔스 (stealth) 특성을 보이는 제제로부터 선택되는 생체적합성 물질로 코팅될 수 있다. 실제로, 본 발명의 나노입자가 정맥내 (IV) 경로를 통해 대상체에 투여되는 경우, 스텔스 특성을 보이는 제제로부터 선택된 물질을 갖는 생체적합성 코팅은 특히 나노입자의 생분포를 최적화한다. 상기 코팅은 소위 나노입자의 "스텔스 특성"을 담당한다.

[0084] 스텔스 특성을 보이는 제제는 입체기 (steric group)를 나타내는 제제일 수 있다. 이러한 기는 예를 들어 하기로부터 선택될 수 있다: 폴리에틸렌 글리콜 (PEG); 폴리에틸렌옥시드; 폴리비닐알코올; 폴리아크릴레이트; 폴리아크릴아미드 (폴리(N-이소프로필아크릴아미드)); 폴리카르브아미드; 생중합체; 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트란, 자일란 및 셀룰로오스; 콜라겐; 폴리술포베타인과 같은 쌍성이온성 화합물; 등.

[0085] 또 다른 바람직한 구현예에서, 나노입자는 생물학적 표적과의 상호작용을 허용하는 제제로부터 선택된 생체적합성 물질로 코팅될 수 있다. 이러한 제제는 전형적으로 나노입자의 표면에 양성 또는 음성 전하를 가져올 수 있다. 이러한 전하는, 이의 농도가 0.2 내지 10g/L에서 변하는 나노입자 혼탁액에서 전형적으로 수행된, 제타 (Zeta) 전위 측정으로 측정할 수 있으며, 상기 나노입자는, pH가 6 내지 8인 수성 매질 속에 혼탁된다.

[0086] 나노입자 표면에서 양성 전하를 형성하는 제제는 예를 들면, 아미노프로필트리에톡시실란 또는 폴리리신일 수 있다. 나노입자의 표면에서 음성 전하를 형성하는 제제는 예를 들어 포스페이트 (예를 들어 폴리포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 등), 카르복실레이트 (예를 들어 시트레이트 또는 디카르복실산, 특히 숙신산) 또는 슬레이트일 수 있다.

[0087] 나노입자 또는 응집체의 완전한 생체적합성 코팅은 특히 정맥내 (IV) 문맥에서, 임의 인지 요소 (대식세포, 음소년 등)와 입자 표면의 상호 작용을 피하는데 있어서 유리할 수 있다. "완전한 코팅"은 입자의 표면 위에 적어도 완벽한 단층을 생성할 수 있는 생체적합성 분자의 매우 높은 조밀도 (compactness)의 존재를 내포한다.

[0088] 생체적합성 코팅은 유체에서, 예컨대 생리적 유체 (혈액, 혈장, 혈청 등) 또는 임의의 등장성 매질 또는 약학적 투여에 요구되는 생리적 매질에서 특히 나노입자 안정성을 허용한다.

[0089] 안정성은 건조 오븐을 이용하여 건식 추출물 정량화로써 확인될 수 있으며, 전형적으로 0.22 또는 0.45 μm 필터 상 여과 전후의 나노입자 혼탁물 상에서 측정될 수 있다.

[0090] 유리하게도, 코팅은 생체 내 입자의 완전성을 보존하거나, 그의 생체적합성을 보증 또는 개선시키고, 그의 선택적 작용성 (예를 들면, 스페이서 분자, 생체적합성 중합체, 표적화제, 단백질 등을 사용하여)을 촉진한다.

[0091] 본 발명에 따른 특정 나노입자는 표적 세포에 존재하는 인지 요소와의 상호작용을 허용하는 표적화제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 표적화제는 나노입자가 표적 부위에 축적되면 전형적으로 작용한다. 표적화제는 인간 또는 동물 체내에서 존재하는 분자에 대한 친화성을 나타내는 임의의 생물학적 또는 화학적 구조일 수 있다. 예를 들어, 이것은 웨티드, 올리고웨티드 또는 폴리웨티드, 단백질, 핵산 (DNA, RNA, SiRNA, tRNA, miRNA, 등), 호르몬, 비타민, 효소, 병리학적 세포에 의해 발현된 분자의 리간드, 특히 종양 항원, 호르몬 수용체, 사이토카인 수용체 또는 성장 인자 수용체의 리간드일 수 있다. 이러한 표적화제는 예를 들어 LHRH, EGF, 플레이트, 항-B-FN 항체, E-셀렉틴/P-셀렉틴, 항-IL-2R α 항체, GHRH 등으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0092] 조성물

본 발명자들은 또한 본원에서 방사선요법, 전형적으로 본원에 정의된 바와 같은 분할 방사선요법의 맥락 상 본원에 정의된 바와 같은 암, 바람직하게는 전이성 암 또는 액체 암을 앓는 대상체에서 사용되는, 치료 조성물, 전형적으로 백신 조성물로서, 이때 조성물이 (i) 나노입자 또는 나노입자의 응집체 (각 나노입자는 7 g/cm^3 이상의 밀도 및 25 이상의 원자 번호 (Z)를 갖는 물질로 이루어지고, 각 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체 중에서 pH 6.5 내지 7.5에서 나노입자 안정성을 가능하게 하는 생체적합성 코팅으로 피복됨)를 바람직하게는 (ii) 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클과 함께 포함하는 조성물을 기재하고 있다.

특정 구현예에서, 백신 조성물은 본원에서 전이성 암을 앓고 있고 완화적 방사선요법을 받는 대상체, (완치적) 방사선요법이 포기된 전이성 암을 앓는 대상체, 방사선요법에 의해 치료되지 않는 암을 앓는 대상체, 또는 액체 암을 앓는 대상체에서 암의 치료를 위해 사용되는 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체를 포함하는 것으로서, 이때 치료가, 이온화 방사선량이 1.8 내지 30 Gray (Gy), 바람직하게는 1.8 내지 20 Gray (Gy) 범위인 하나 이상의 방사선조사 단계를 포함하는 분할 방사선요법에 대상체를 노출시키는 것을 포함하고, 각 나노입자가 7 g/cm^3 이상의 밀도 및 25 이상의 원자 번호 (Z)를 갖는 물질로 이루어지고, 각 나노입자 또는 나노입자의 응집체가 생리적 유체 중에서 pH 6.5 내지 7.5에서 나노입자 안정성을 가능하게 하는 생체적합성 코팅으로 피복된 것으로 기재되어 있다. 조성물은 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체 외에 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클을 포함할 수 있다.

약학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클은, 예를 들어 염분성, 등장성, 살균, 완충 용액, 비-수성 비히클 용액 등과 같은 당업자를 위한 임의의 종래의 지지체일 수 있다. 전형적인 담체는 NaCl, PBS 및/또는 글루코오스를 포함하는 등장성 매질 또는 생리적 매질이다. 담체는, 예를 들어 글루코오스 (5%) 또는 텍스트로오스 (5%) 및/또는 NaCl (0.9 %)을 포함할 수 있다.

조성물은 또한 안정화제, 감미제, 계면활성제, 중합체 등을 포함할 수 있다.

조성물은 고체, 액체 (현탁액 중의 입자), 에어로졸, 젤, 페이스트 등의 형태일 수 있다. 바람직한 조성물은 액체 또는 젤 형태이다. 특히 바람직한 조성물은 액체 형태이다.

이것은 당업자에 의해 공지된 약학 제형의 기법을 사용함으로써, 예를 들어 앰플, 시린지, 에어로졸, 보틀, 바이알, 정제, 캡슐로서 제형화될 수 있다.

일반적으로, 액체 또는 젤 형태의 조성물은 약 0.05 g/L 내지 약 450 g/L의 나노입자 또는 나노입자의 응집체, 약 0.05 g/L 내지 약 250 g/L의 나노입자, 바람직하게는 적어도 약 10 g/L, 11 g/L, 12 g/L, 13 g/L, 14 g/L, 15 g/L, 16 g/L, 17 g/L, 18 g/L, 19 g/L, 20 g/L, 21 g/L, 22 g/L, 23 g/L, 24 g/L, 25 g/L, 26 g/L, 27 g/L, 28 g/L, 29 g/L, 30 g/L, 31 g/L, 32 g/L, 33 g/L, 34 g/L, 35 g/L, 36 g/L, 37 g/L, 38 g/L, 39 g/L, 40 g/L, 41 g/L, 42 g/L, 43 g/L, 44 g/L, 45 g/L, 46 g/L, 47 g/L, 48 g/L, 49 g/L, 50 g/L, 51 g/L, 52 g/L, 53 g/L, 54 g/L, 55 g/L, 56 g/L, 57 g/L, 58 g/L, 59 g/L, 60 g/L, 61 g/L, 62 g/L, 63 g/L, 64 g/L, 65 g/L, 66 g/L, 67 g/L, 68 g/L, 69 g/L, 70 g/L, 71 g/L, 72 g/L, 73 g/L, 74 g/L, 75 g/L, 76 g/L, 77 g/L, 78 g/L, 79 g/L, 80 g/L, 85 g/L, 90 g/L, 95 g/L, 100 g/L, 150 g/L, 200 g/L, 250 g/L, 300 g/L, 350 g/L, 또는 400 g/L의 나노입자를 포함한다.

조성물 중 나노입자의 농도는 건식 추출물에 의해 측정될 수 있다. 건조 오븐에서 나노입자를 포함하는 현탁액의 건조 단계 후 건식 추출물이 이상적으로 측정된다.

특정 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 면역치료제 및 임의로는 부가적인 암 치료용 치료제를 추가 포함한다.

용어 "면역치료제"는 여기서 전형적으로 임의의 분자, 약물, 세포 또는 세포-기체 백신, 종양세포붕괴성 바이러스, DNA-기체 백신, 펩티드-기체 백신, 톨-유사 수용체 아고니스트, 세포 유래의 소포 뿐만 아니라 이의 임의의 조합 (대상체의 면역계를 부스팅시킬 수 있는 것으로, 당업자에 의해 그 자체로 인지됨)으로 지칭된다.

분자 또는 약물은, 예를 들어 단일클론 항체, 사이토카인, 및 이의 조합으로부터 선택될 수 있다.

약물은 전형적으로 1-메틸-D-트립토판과 같은 인돌레아민 2,3-디옥시게나아제 (IDO) 저해제일 수 있다.

바람직한 구현예에서, 단일클론 항체는 PD-1 및 이의 리간드 간의 상호작용 또는 CTLA-4 분자를 저해한다. 단일클론 항체는 유리하게는 항-CTLA-4, 항-PD-1, 항-PD-L1, 항-PD-L2로부터 선택된다. 단일클론 항체는,

예를 들어 입필리무맙 (ipilimumab), 트레멜리무맙 (tremelimumab), 니볼루맙 (nivolumab), 프렘볼리주맙 (prembrolizumab), 피딜리주맙 (pidilizumab) 및 람브롤리주맙 (lambrolizumab) 으로부터 선택될 수 있다.

[0106] 또 다른 바람직한 구현예에서, 단일클론 항체는 CD27 신호전달, CD137 신호전달, OX-40 신호전달, GITR 신호전달 및/또는 MHCII 신호전달을 향상시키고 및/또는 CD40 을 활성화시킨다. 단일클론 항체는, 예를 들어 다세투주맙 (dacetuzumab), 루카투무맙 (Lucatumumab), 및 우렐루맙 (urelumab) 으로부터 선택될 수 있다.

[0107] 추가 구현예에서, 단일클론 항체는 TGF- β 신호전달 또는 KIR 신호전달을 저해한다. 단일클론 항체는, 예를 들어 프레솔리무맙 (fresolimumab) 및 리릴루맙 (lirilumab) 으로부터 선택될 수 있다.

[0108] 사이토카인은 유리하게는 과립구-대식세포 집락 자극 인자 (GM-CSF), fms-관련 티로신 키나아제 3 리간드 (FLT3L), IFN- α , IFN- α 2b, IFN- γ , IL2, IL-7, IL-10 및 IL-15 로부터 선택될 수 있다.

[0109] 또 다른 바람직한 구현예에서, 면역치료제는 면역사이토카인, 예를 들어 면역사이토카인 L19-IL2 (Nicolle H. Rekers Radiotherapy and Oncology 2015) 이다.

[0110] 면역치료제로서 사용되는 바와 같은 세포는 전형적으로 종양 항원, 바람직하게는 수지상 세포 또는 T-세포와 같이 치료되어야 하는 암의 특이적 종양 항원에 대해 제시되거나 또는 감수화되는 면역 세포; 면역원성 분자를 분비하는 세포; 또는 면역원성 세포사를 겪는 죽은 종양 세포 또는 임종 종양 세포, 즉 ICD 전형적인 양으로 ATP 를 생성하고 및/또는 HMGB1 을 생성하고 및/또는 CRT 를 발현하는 세포, 예를 들어 방사선요법에 노출된 임종의 또는 죽은-종양 세포이다. 세포는 자가 세포 또는 동종이형 세포일 수 있다. 세포는 바람직하게는 치료되어야 하는 대상체로부터 단리된 자가 세포이다. 죽은- 또는 임종의-종양 세포는 종양 성숙 세포 또는 종양 줄기 세포일 수 있다.

[0111] 톨-유사 수용체 아고니스트는 유리하게는 TLR 2/4 아고니스트, TRL 7 아고니스트, TRL 7/8 아고니스트 및 TRL 9 아고니스트로부터 선택된다. 톨-유사 수용체 아고니스트는, 예를 들어 이미퀴모드 (imiquimod), 바실루스 칼메테-구에린 (bacillus Calmette-Guerin) 및 모노포스포릴 지질 A 로부터 선택될 수 있다.

[0112] 바람직한 면역치료제의 조합은, 예를 들어 사이토카인, 단일클론 항체, 톨-유사 수용체 아고니스트 및 웨티드-기재 백신으로부터 선택될 수 있다.

[0113] 용어 "암 치료용 치료제" 는 여기서 전형적으로 생물학적 화합물, 소분자 표적화 치료물, 또는 세포독성 화합물과 같은, 암의 종래적 치료에 사용되는 제제를 지칭한다.

[0114] 생물학적 화합물은, 예를 들어 항체, 바람직하게는 단일클론 항체 ("mAb"), 예컨대 알렌투주맙 (Alemtuzumab), 브렌투시맙 베도틴 (Brentuximab Vedotin), 카투막소마 (Catumaxoma), 데노수맙 (Denosumab), 겜투주맙 오조가미신 (Gemtuzumab ozogamicin), 이브리투모맙 티وخ세탄 (Ibritumomab tiuxetan), 페르투주맙 (Pertuzumab), 오파투무맙 (Ofatumumab), 베바시주맙 (bevacizumab), 리툭시맙 (rituximab), 트라스투주맙 (trastuzumab), 세톡시맙 (cetuximab), 파나티무맙 (panatimumab) 또는 토시투모맙 (tositumomab) 이다.

[0115] 소분자 표적화 치료물은 일반적으로 악성 세포 내에서 돌연변이된, 과발현 또는 그렇지 않으면 결정적인 (critical) 단백질 (암 치료의 맥락 상 잠재적인 표적) 에서 효소 도메인을 저해한다. 일부 치료제는 세포 분할을 표적화하는 것 (예를 들어, 오로라-키나아제 저해제 또는 시클린-의존적-키나아제 저해제), 뿐만 아니라 기타 생물학적 메커니즘, 예컨대 단백질 턴오버 및 염색질 개질을 표적화하는 것 (예를 들어, 히스톤-데아세틸라아제 저해제) 을 포함한다. 소분자 표적화 치료물은, 예를 들어 이마티닙 (imatinib), 라파마이신 (rapamycin), 게피티닙 (gefitinib), 에를로티닙 (erlotinib), 소라페닙 (sorafenib), 수니티닙 (sunitinib), 닐로티닙 (nilotinib), 테사티닙 (dasatinib), 라파티닙 (lapatinib), 보르테조닙 (bortezomib) 및 아토르바스타틴 (atorvastatin) 등으로부터 선택될 수 있다.

[0116] 세포독성 화합물은, 예를 들어 DNA-개질제, 예컨대 안트라시클린 (예컨대, 텍사메타손 (dexamethasone), 다우노루비신 (daunorubicin), 이다루비신 (idarubicin) 또는 메토트렉세이트 (methotrexate)) 또는 세포분열저지제 (방추체 저해제 (spindle poison), 예컨대 빙크리스틴 (vincristine) 또는 빈블라스틴 (vinblastine)); 탁산 (taxane), 예컨대 도세탁셀 (docetaxel), 라로탁셀 (larotaxel), 카바지탁셀 (cabazitaxel), 파클리탁셀 (paclitaxel) (PG-파클리탁셀 및 DHA-파클리탁셀), 오르타탁셀 (ortataxel), 테세탁셀 (tesetaxel) 또는 탁소프렉신 (taxoprexin); 겜시타빈 (gemcitabine); 에토포시드 (etoposide); 미토마이신 (mitomycin) C; 알킬화제 (예를 들어, 멜팔란 (melphalan) 또는 테모졸로미드 (temozolomide)); 백금 기재 성분, 예컨대 옥살리플라틴 (oxaliplatin) 또는 카르보플라틴 (carboplatin); TLR (톨-유사 수용체)-3 리간드; 및 프로드러그로부터 선택

될 수 있다.

[0117] 프로드러그 (예를 들어, 카페시타빈 (capecitabine) 또는 이리노테칸 (irinotecan)) 는 생체내에서 이의 활성 형태로 대사작용되어 이의 기대되는 치료 효과를 생성한다.

[0118] 기타 전형적인 세포독성 화합물은 전형적으로 본원에 기재된 바와 같거나 또는 숙련된 종양학자에 의해 공지된 바와 같은 화학치료제로부터 선택된다.

[0119] 하나 이상의 면역치료제를 가능하게는 하나 이상의 암 치료용 치료제와의 조합으로 포함하는 본원에 기재된 백신 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 나노입자 또는 나노입자의 응집체와 동시에 또는 별개로 치료되어야 하는 대상체에 투여될 수 있다.

[0120] 키트

[0121] 본 발명자들은 또한 본원에서 (i) 7 g/cm^3 이상의 밀도 및 25 이상의 원자 번호 (Z) 를 갖는 물질로 이루어진 나노입자 또는 나노입자의 응집체 (각 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 생리적 유체 중에서 pH 6.5 내지 7.5 에서 나노입자 안정성을 가능하게 하는 생체적합성 코팅으로 피복됨), 또는 본원에 기재된 바와 같은 백신 조성물을, 바람직하게는 (ii) 본원에 기재된 바와 같은, 하나 이상의 면역치료제 및/또는 암 치료용 치료제 및 임의로는 (iii) 방사선요법의 맥락 상 백신접종을 수행하기 위한 지시사항을 제공하는 전단지와 함께 포함하는 백신 키트를 기재하고 있다.

[0122] 프로토콜

[0123] 본원에 기재된 바와 같은 나노입자 또는 나노입자의 응집체, 또는 이러한 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 조성물을 유리하게는 방사선요법, 전형적으로 분할 방사선요법을 적용하기 전에 암 세포와 접촉시킨다. 나노입자와 암 세포 간의 접촉은 생검 또는 혈액 샘플링 후 생체 외에서 (*in vivo*) 수행될 수 있거나, 또는 종양, 종양 베드 (수술에 의한 종양 절제 후) 또는 종양 전이률(들) 내에 직접 또는 전신적으로 치료되어야 하는 대상체에 투여를 통해 생체 내에서 (*in vivo*) 수행될 수 있다.

[0124] 생체내 투여 시에, 본 발명의 나노입자는 상이한 가능한 경로, 예컨대 국소 [종양내 (IT), 동맥내 (IA)], 피하, 정맥내 (IV), 피내, 기도 (흡입), 복강내, 근육내, 관절내, 척추강내, 안구내 또는 경구 경로 (입으로) 를 사용해, 바람직하게는 IT, IV 또는 IA 를 사용해 대상체에 투여될 수 있다.

[0125] 나노입자의 반복 주사 또는 투여가 적절한 경우에 수행될 수 있다.

[0126] 특정 구현예에서, 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 유리하게는 하나 이상의 면역치료제와 함께 치료되어야 하는 대상체에 투여된다. 나노입자 또는 나노입자의 응집체, 또는 이러한 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 조성물, 및 하나 이상의 면역치료제는 동시에 또는 별개로 대상체에 투여될 수 있다.

[0127] 특정 구현예에서, 암이 전이성 암이고 및/또는 (통상적으로) 방사선요법에 의해 치료되지 않는 암인 경우, 하나 이상의 방사선조사 단계를 전형적으로 생체내에서 하나, 최대 2 개의, 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 전이성 암의 종양 부위에 적용한다. 백신으로서 사용되는 나노입자 또는 나노입자의 응집체 덕분에, 방사선요법의 항암 효과는 대상체의 면역계의 효율적인 가동화로 인해 방사선조사된 영역 또는 부위 밖에서도 관찰될 수 있다.

[0128] 전형적으로, 본 발명자들은 본원에서 임종 암 세포로부터 방출되는 HMGB1 의 현저한 증가가, 방사선 단독과 비교 시, 단일 방사선량을 사용함으로 방사선 감수성 HCT 116 (인간 결장직장암 세포주) 및 방사선 저항성 42 MG BA (인간 아교모세포종 세포주) 및 PANC-1 (인간 췌장암 세포주) 모두에서 이온화 방사선에 노출된 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 이용할 때 관찰된다는 것을 제시한다. 게다가, 임종 암 세포로부터의 ATP 분비의 현저한 증가가 HCT 116 암 세포주에서, 방사선 단독과 비교 시, 이온화 방사선에 노출된 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 이용할 때 관찰된다.

[0129] 이들 DAMP 는 암 세포의 면역원성 세포사의 지표이고, 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체는 방사선 치료법에 노출 시 이의 분비 및 방출을 증폭시킬 수 있다.

[0130] 추가로, 면역적격성 마우스에서 수행되는 백신접종 검정의 결과는, 동물을 먼저 방사선 조사된 암 세포로 백신 접종한 다음 7 일 후에 생존 가능한 암 세포로 챌린징하는 경우에 종양의 환영 (apparition) 을 막는, 동물의 면역계를 효율적으로 가동화시키기 위한 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체의 능력을 보여준다: 나노입자 및 6 Gy 로 치료된 암 세포로 백신접종된 그룹에서는 66% 의 동물에게서 종양이 없지만, 6 Gy 단독으로 방

사전 조사된 암 세포로 백신접종된 경우에는 단지 33% 의 동물 만이 종양이 없음.

[0131] 이를 데이터는 백신으로서 이를 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 사용함으로써 대상체의 면역계의 효율적인 활동화로 인해 방사선조사된 영역 또는 부위 밖에서도 방사선요법의 항암 효과를 발생시킨다는 것을 강력하게 지지한다.

[0132] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체, 또는 이러한 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 본 발명의 조성물은 폐 (예, 원발성 암이, 예를 들어 육종, 방광암, 유방암, 결장암, 신장암 또는 전립선암인 경우), 간 (예, 원발성 암이, 예를 들어 위장암, 유방암, 결장암, 폐암 또는 피부암인 경우), 뼈 (예, 원발성 암이, 예를 들어 유방암, 전립선암 또는 폐암인 경우) 및/또는 뇌 (예, 원발성 암이, 예를 들어 폐암, 신장암, 흑색종 또는 유방암인 경우)에 존재하는 전이성 암 세포의 변경 또는 파괴를 가능하게 한다.

[0133] 또 다른 특정 구현예에서, 하나 이상의 방사선조사 단계를 생체외에서 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 대상체의 암 샘플에 적용하고, 생체외에서 치명적으로 방사선 조사된 암 세포를 암 샘플로부터의 연관 세포 상청액의 적어도 일부와 함께 대상체에 적어도 부분 재투여한 후, 상기 대상체에서 임의의 선택적인 차후의 생체내 암 치료를 실시한다.

[0134] 방사선 조사된 암 샘플로부터의 세포 상청액은 전형적으로 면역원성 분자, 예컨대 HMGB1, ATP, 열 충격 단백질 (HSP) 패밀리의 각종 샤프론, 특히 열 충격 70 kDa 단백질 (HSP70) 및 열 충격 90 kDa 단백질 (HSP90), 면역자극 사이토카인, 예컨대 인터페론 α (IFN α), 스핑고미엘린 대사물질, 세포외 매트릭스의 분해로부터의 생성물 등을 포함한다. 본 발명의 맥락 상, 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 방사선 조사된 암 샘플로부터의 세포 상청액에서 면역원성 분자의 향상된 방출은, 나노입자 또는 나노입자의 응집체의 부재 하에 방사선 조사된 암 샘플과 비교 시 (실시예 4 참조) 항암 치료를 추가로 증폭시킬 수 있다.

[0135] 치료되어야 하는 대상체에의 재투여는 전형적으로 피하 또는 피내 주사를 통해 수행된다.

[0136] 암이 액체 암인 경우, 적어도 하나의 방사선조사 단계를 전형적으로 생체외에서 나노입자 또는 나노입자의 응집체를 포함하는 대상체의 액체 암 샘플에 적용하고, 방사선 조사된 액체 암 샘플을 대상체에 적어도 부분 재투여한 후, 상기 대상체에서 임의의 선택적인 차후의 암의 생체내 치료를 실시한다.

[0137] 치료되어야 하는 대상체에의 재투여를 피하 또는 피내 주사를 통해 수행할 수 있다. 이는 또한 동맥내 (IA), 정맥내 (IV) 또는 복강내 (IP) 주사를 통해 수행될 수 있다.

[0138] 액체 암 샘플은 전형적으로 치료되어야 하는 대상체의 전혈 용량 (whole blood volume) 또는 혈액 샘플이다. 대상체의 전혈 용량이 방사선조사되는 경우, 방사선조사를 체외 순환 프로토콜 동안 생체 외 수행할 수 있으며, 이때 방사선 조사된 전혈 용량이 대상체에 완전히 재투여된다.

[0139] 흥미롭게도, Y. Suzuki 등 (2012) 은, 종양 항원-특이적 T-세포 반응이 화학방사선요법 후 식도 편평상피 세포 암종 (ESCC) 을 앓는 환자의 38% 에서 관찰되었고, 이를 반응이 이들 환자의 혈청에서 HMGB1 농도의 상승과 공존한다는 것을 보고하였다. 종양 미세환경 내에서 HMGB1 은 수술전 화학방사선요법으로 ESCC 를 앓는 환자에서 유의하게 상향조절되지만, 화학방사선요법을 받지 않은 이들에게서는 그러하지 않는데, HMGB1 의 정도가 환자 생존과 양의 상관관계에 있다는 것이다.

[0140] 바람직한 구현예에서, 생체외에서 치명적으로 방사선 조사된 암 세포 또는 방사선 조사된 액체 암 샘플은, 본원에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 부가적인 면역치료제 및/또는 암 치료용 치료제와 함께 대상체에 적어도 부분 재투여된다.

[0141] 생체외에서 치명적으로 방사선 조사된 암 세포 또는 방사선 조사된 액체 암 샘플 및 적어도 하나의 부가적인 면역치료제 및/또는 적어도 암 치료용 치료제는 동시에 또는 별개로 대상체에 투여될 수 있다.

[0142] 본 발명의 기타 양태 및 이점은 하기 실시예에서 자명해질 것이며, 이는 예시의 목적으로 제시되는 것으로서 제한하고자 하는 것은 아니다.

0143] 실험 섹션

0144] 실시예 1: 관능기화된 하프늄 산화물 (HfO_2) 나노입자 합성 및 특성화

테트라메틸암모늄 히드록시드 (TMAOH) 용액을 40 g 의 $HfCl_4$ 용액에 첨가한다. TMAOH 용액의 첨가를 최종 혼탁액의 pH 가 7 내지 13 의 pH 에 도달할 때까지 수행한다. 백색 침전물을 수득한다.

- [0146] 침전물을 오토클레이브에 추가 이동시키고, 120°C 내지 300°C 의 온도에서 가열하여, 결정화를 수행한다. 냉각 후에, 혼탁액을 탈이온수로 세정한다.
- [0147] 해교 (peptization) 단계를 나노입자 또는 나노입자 응집체의 안정한 혼탁액의 수득을 위해 수행한다.
- [0148] 이후, 나트륨 헥사메타포스페이트의 혼탁액을 해교된 용액에 첨가하고 (나트륨 헥사메타포스페이트의 첨가량은 LD50/5 미만임), 혼탁액의 pH 를 6.5 내지 7.5 의 pH 로 조정한다.
- [0149] 시험관 내 실험을 위해, 멀균 단계를 이 단계에서, 예를 들어 0.22 μm 필터를 사용해 수행한다.
- [0150] 생체내 실험을 위해, 글루코오스 5% 를 사용하는 제형화 단계를 멀균 단계의 전 또는 후에 수행할 수 있다.
- [0151] 하기 표는 이렇게 수득한 생체적합성 나노입자 또는 나노입자 응집체의 혼탁액의 주된 특성을 나타낸다.

밀도	형태	비표면적 (SS) (m^2/g)	평균 유체역학적 직경 (Φ) (nm)
8.3	구형	20 < SS < 60	15 < Φ < 200

[0152]

실시예 2: 금 나노입자 합성 및 상이한 크기의 금 나노입자의 이화학적 특성화

- [0154] 금 나노입자를, 수용액 중에서 나트륨 시트레이트로 금 클로라이드를 환원시킴으로써 수득한다. 프로토콜을 G. Frens Nature Physical Science 241 (1973) 21로부터 조정하였다.
- [0155] 전형적인 실험에서, HAuCl_4 용액을 가열 비등시킨다. 이어서, 나트륨 시트레이트 용액을 첨가한다. 수득한 용액을 추가적인 5 분 동안 비등 하에 유지한다.
- [0156] 시트레이트 대 금 전구체 비를 신중하게 개질함으로써 나노입자 크기를 15 에서 105 nm 이하로 조정한다 (참조, 표 1).
- [0157] 이후, 제조한 금 나노입자 혼탁액을 30 kDa 셀룰로오스 막을 갖는 한외여과기 (Amicon 교반 세포 모델 8400 (Millipore)) 를 사용해 농축시킨다.
- [0158] 수득한 혼탁액을 종국에서는 라미나 (laminar) 후드 하에 0.22 μm 컷오프 막 필터 (PES 막 (Millipore)) 를 통해 여과하고, 4°C 에서 저장한다.
- [0159] 입자 크기를 200 개 초과의 입자를 계수함으로써 (크기 측정을 위해서 가장 긴 나노입자 치수를 취함) 투과 전자 현미경 (TEM) 을 사용해 측정한다.

[0160]

표 1:

샘플	입자 크기 (nm)	합성	
		시트레이트	HAuCl_4
금-15	$15 \pm 2 (1\sigma)$	20 mL 30 mM	500 mL 0.25 mM
금-30	$32 \pm 10 (1\sigma)$	7.5 mL 40 mM	500 mL 0.25 mM
금-60	$60 \pm 10 (1\sigma)$	2 mL 85 mM	500 mL 0.25 mM
금-80	$80 \pm 10 (1\sigma)$	1.2 mL 43 mM	200 mL 0.30 mM
금-105	$105 \pm 25 (1\sigma)$	1.2 mL 39 mM	200 mL 0.33 mM

[0161]

실시예 3: 하프늄 산화물 물질로 적어도 부분 피복된 금 물질을 포함하는 나노입자 혼탁액.

- [0163] 테트라메틸암모늄 히드록시드 (TMAOH) 용액을 하프늄 클로라이드 (HfCl_4) 용액에 첨가한다. TMAOH 용액의 첨가를 최종 혼탁액의 pH 가 7 내지 13 의 pH 에 도달할 때까지 수행한다. 백색 침전물을 수득한다.
- [0164] 실시예 2로부터의 금 입자 혼탁액을 격렬한 혼합 하에 백색 침전물에 서서히 첨가한다.
- [0165] 수득한 침전물을 오토클레이브에 추가 이동시키고, 100°C 내지 300°C 의 온도에서 가열한다. 냉각 후에, 혼탁액을 물로 세정한다.
- [0166] 해교 단계를 하프늄 산화물 물질에 적어도 부분 내장된 금 물질을 포함하는 나노입자의 안정한 혼탁액의 수득을

위해 수행한다.

[0167] 이후, 나트륨 헥사메타포스페이트의 혼탁액을 해교된 용액에 첨가하고, 혼탁액의 pH 를 6 내지 8 의 pH 로 조정 한다.

실시예 4: 임종 암 세포로부터의 HMGB1 방출.

[0169] 임종 암 세포로부터의 HMGB1 방출을 42 MG BA 인간 아교모세포종 세포주를 사용해 연구하였다. 세포주 42-MG-BA 를 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH German Collection of Microorganism and Cell Cultures (Braunschweig, Germany) 로부터 구입하였다.

[0170] 세포를 1.5×10^6 내지 2×10^6 세포/플라스크 범위 내로 T25 플라스크에서 분산시켰다. 세포가 플레이트에 부착 되었을 때, 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액을 400 μM 인 농도로 세포에 밤새 (12 h-15 h) 첨가한 후, 방사선량을 전달하였다. 세포를 항생물질 (Penistrepto) 과 함께 배양하였다.

[0171] 5 Gy 또는 10 Gy 의 단일 X-선 조사선량을 X-선 발생기 (200 kV, 15 mA, 0.2 mm 구리 여과) 를 사용해 1.26 Gy min^{-1} 의 선량 속도로 전달하였다.

[0172] 세포를 96 시간 동안 37°C 에서 5% CO₂ 습한 분위기 하에 배양하였다. 96 시간 후에, 세포 상청액을 수합하고, 센트리콘 (centricon) 을 사용해 농축시켰다.

[0173] HMGB1 을 인간 HMGB1 에 특이적인 효소결합면역흡착 검정 (ELISA) 키트를 사용해 농축된 세포 상청액 중에서 정량화하였다.

[0174] 도 1 은 임종 암 세포로부터 방출되는 HMGB1 을 나타낸다. 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액으로 치료 또는 치료되지 않은 및 방사선요법 (1 분할로 5 Gy 가 전달됨) 에 노출 또는 노출되지 않은 세포로부터의 농축된 세포 상청액 중에서 방출되는 HMGB1 을 비치료 대조군 (즉, 방사선 조사하지 않은 42 MG BA 세포주) 과 비교되는 배수-변화로서 보고한다.

[0175] 도 2 는 임종 암 세포로부터 방출되는 HMGB1 을 나타낸다. 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액으로 치료 또는 치료되지 않은 및 방사선요법 (1 분할로 10 Gy 가 전달됨) 에 노출 또는 노출되지 않은 세포로부터의 농축된 세포 상청액 중에서 방출되는 HMGB1 을, 비치료 대조군 (즉, 방사선 조사하지 않은 42 MG BA 세포주) 과 비교되는 배수-변화로서 보고한다.

결론

[0177] 임종 암 세포로부터 방출되는 HMGB1 의 현저한 증가는, 방사선 단독과의 비교 시, 5 Gy 또는 10 Gy 의 단일 조사선량에 노출시키는 경우 실시예 1로부터의 하프늄 산화물 나노입자로 치료되는 세포로부터의 농축된 세포 상청액 중에서 관찰된다. 이들 결과는 방사선요법의 맥락 상, 치료 백신으로서 이들 나노입자 또는 나노입자의 응집체의 사용에 대한 합리성을 지지한다.

실시예 5: 온 세포주에 대한 임종 암 세포로부터의 HMGB1 의 방출

[0179] 임종 암 세포로부터의 HMGB1 방출을 HCT 116 인간 결장직장 세포주, 42 MG BA 인간 아교모세포종 세포주 및 PANC-1 인간 췌장 세포주를 사용해 연구하였다. 세포주를 "American Type Culture Collection" (ATCC) (HCT 116, Catalog No. CCL-247 및 PANC-1, Catalog No. CRL-1469) 또는 "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen" (DSMZ) (42 MG BA, Catalog No. ACC 431) 로부터 구입하였다.

[0180] 세포를 1.10^6 세포/플라스크로 T25 플라스크에서 분산시켰다. 세포가 플레이트에 부착되었을 때, 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액을 800 μM (HCT 116 의 경우) 또는 400 μM (PANC-1 및 42 MG 의 경우) 인 농도로 세포에 밤새 (12h-15h) 첨가한 후, 방사선량을 전달하였다. 세포를 항생물질 (1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함한 매질) 과 함께 배양하였다.

[0181] X-선 조사선량을 X-선 발생기 (320kV, X-RAD 320) 를 사용해 1 Gy min^{-1} 의 선량 속도로 전달하였다. 각 세포주에 대한 방사선량이 표 3 에 제시되어 있다.

[0182] 표 3: 각 세포주에 대한 조사선량

세포주	HCT 116	42 MG BA	PANC-1
조사선량	4 Gy 6 Gy	10 Gy 15 Gy	8 Gy

[0183] [0184] HCT 116 세포주: 세포를 72 시간 37°C에서 5% CO₂ 습한 분위기 하에 배양하였다. 72시간 후에, 세포 상청액을 수합하였다.[0185] 42 MG BA 및 PANC-1 세포주: 세포를 96 시간 37°C에서 5% CO₂ 습한 분위기 하에 배양하였다. 96시간 후에, 세포 상청액을 수합하고, 센트리콘을 사용해 농축시켰다.

[0186] HMGB1을 인간 HMGB1에 특이적인 효소결합면역흡착 검정 (ELISA) 키트 (예컨대, "HMGB1 ELISA Kit" (IBL international, Catalog No. ST51011))를 사용해 세포 상청액 중에서 정량화하였다.

[0187] 도 3은 임종 암 세포로부터 방출되는 HMGB1을 나타낸다. 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액으로 치료 또는 치료되지 않은 및 방사선요법 (1분할로 전달됨)에 노출 또는 노출되지 않은 세포로부터의 세포 상청액 중에서 방출되는 HMGB1을, 비치료 대조군과 비교되는 배수-변화로서 보고한다.

[0188] 도 3a는 임종 HCT 116 암 세포로부터 방출되는 HMGB1을 나타낸다. 방사선 조사선량은 4 Gy 및 6 Gy였다. 실험은 3회 (in triplicate) 수행되고 풀링된 (pooled) 2개의 독립적 실험의 평균이다.

[0189] 도 3b는 임종 42 MG BA 암 세포로부터 방출되는 HMGB1을 나타낸다. 방사선 조사선량은 10 Gy 및 15 Gy였다. 실험은 3회 수행되고 풀링된 2개의 독립적 실험의 평균이다.

[0190] 도 3c는 임종 PANC-1 암 세포로부터 방출되는 HMGB1을 나타낸다. 방사선 조사선량은 8 Gy였다. 실험은 3회 수행되고 풀링된 2개의 독립적 실험의 평균이다.

[0191] 결론

[0192] 임종 암 세포로부터 방출되는 HMGB1의 현저한 증가는, 방사선 단독과 비교 시, 단일의 방사선 조사선량에 노출시키는 경우 실시예 1로부터의 하프늄 산화물 나노입자로 치료된 세포로부터의 상청액 중에서 관찰된다. 이를 결과는 온갖 종류의 암에 대해서 방사선요법의 맥락 상 치료 백신으로서 이들 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체의 사용에 대한 합리성을 지지한다.

[0193] 실시예 6: 임종 암 세포로부터의 ATP 분비

[0194] 임종 암 세포로부터의 ATP 분비를 HCT 116 인간 결장직장암 세포주를 사용해 연구하였다. 세포주 HCT 116은 "American Type Culture Collection" (ATCC) (HCT 116, Catalog No. CCL-247)으로부터 구입하였다.

[0195] 세포를 2×10^6 세포/플라스틱인 농도로 T25 플라스틱에서 분산시켰다. 세포가 플레이트에 부착되었을 때, 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자를 800 μM인 농도로 세포에 밤새 (12h-15h) 첨가한 후, 방사선량을 전달하였다. 세포를 항생물질 (1% 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 매질)과 함께 배양하였다.[0196] 6 Gy의 단일 X-선 조사선량을 X-선 발생기 (320kV, X-RAD 320)를 사용해 $1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 선량 속도로 전달하였다.[0197] 세포를 9시간 동안 37°C에서 5% CO₂ 습한 분위기 하에 배양하였다. 9시간 후에, 세포 상청액을 수합하였다.

[0198] ATP 분비를 ATP 측정용 생체발광 검출 키트 (예컨대, "ENLITEN® ATP Assay System" (Promega, Catalog. No. FF2000))를 사용해 세포 상청액 중에서 정량화하였다.

[0199] 도 4는 HCT 116 임종 암 세포로부터의 ATP 분비를 나타낸다. 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액으로 치료 또는 치료되지 않은 및 방사선요법 (1분할로 6 Gy가 전달됨)에 노출 또는 노출되지 않은 세포로부터의 세포 상청액 중에서 ATP 분비를 비치료 대조군 (즉, 방사선 조사하지 않은 HCT 116 세포주)과 비교되는 배수-변화로서 보고한다. 실험은 3회 수행되고 풀링된 3개의 독립적 실험의 평균이다.

[0200]

결론

[0201]

임종 암 세포로부터의 ATP 분비의 현저한 증가는, 방사선 단독과 비교 시, 단일 조사선량에 노출시키는 경우 실시예 1로부터의 하프늄 산화물 나노입자로 치료된 세포로부터의 상청액 중에서 관찰된다. 이들 결과는 방사선요법의 맥락 상 치료 백신으로서 이를 나노입자 또는 나노입자의 응집체의 사용에 대한 합리성을 지지한다.

[0202]

실시예 7: 백신접종 검정

[0203]

논문 제목 "Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death" (Oliver Kepp et al. OncoImmunology 2014) 에서 제시된 바와 같이, 진정한 ICD 를 유도하기 위한 특정 자극의 능력의 평가를 위한 최적 표준 (gold standard) 접근법은 백신접종 검정에 의존한다. 이러한 설정에서, 선택된 쥐과 암 세포를 면역원성 세포사 (ICD) 의 인듀서 (inducer) 에 시험관 내 노출시키고, 결국 면역적격성 동질유전자적 마우스 (이상적으로, 그룹 당 5-10 마리) 의 한쪽 옆구리 (백신접종 부위) 내에 피하 (s.c.) 주사하였다. 1 주 후에, 마우스를 동일 유형의 살아있는 암 세포로 챌린징하는데, 이는 반대쪽 측면 옆구리 (챌린지 부위) 내에 s.c. 접종한 것이다. 종양 발생 및 성장을 1-2 개월 기간에 걸쳐 두 주사 부위 모두에서 정기적으로 모니터링한다. 백신접종 부위에서 신생물 병변의 발생은, 연구 하에 있는 자극이 적응 면역성 (adaptive immunity) 의 유발과 양립 가능한 정도로 세포사 (시험 조건 하에서) 를 유도할 수 없다는 것을 나타낸다. 역으로, 백신접종 부위에서 종양이 없다면, 진정한 ICD 를 촉진시키기 위한 검사 하에 있는 자극의 능력은 챌린지 부위에서 발생되는 신생물 병변의 수와 반비례 관계에 있다.

[0204]

여기서, 쥐과 CT 26 결장직장암 세포를 백신접종 검정을 위해 선택하였다. 세포주를 "American Type Culture Collection" (ATCC) (CT26, Catalog No. CRL2638) 로부터 구입하였다.

[0205]

세포를 10×10^6 세포/플라스크로 T300 플라스크에서 분산시켰다. 세포가 플레이트에 부착되었을 때, 실시예 1로부터의 HfO₂ 나노입자 혼탁액을 400 μM 인 농도로 세포에 밤새 (12h-15h) 첨가한 후, 방사선량을 전달하였다. 세포를 항생물질 (1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함한 매질) 과 함께 배양하였다.

[0206]

X-선 조사선량을 X-선 발생기 (320kV, X-RAD 320) 를 사용해 $1 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 선량 속도로 전달하였다. 단일 분할 6 Gy 를 실시예 1로부터의 HfO₂ NP 로 치료된 또는 치료되지 않은 세포에 전달하였다.

[0207]

세포를 48 시간 동안 37°C 에서 5% CO₂ 습한 분위기 하에 배양하였다. 48 시간 후에, 세포를 수합하고, 트립신화 전에 PBS 로 세정하고, $1 \cdot 10^6$ 생존 가능한 세포를 면역적격성 Balb/c 마우스의 좌측 옆구리에 피하 주사하였다. 대조군의 경우에는, 100 μL 의 PBS 를 마우스의 좌측 옆구리에 피하 주사하였다.

[0208]

7 일 후에, 마우스를 비치료된 살아있는 CT 26 세포로 챌린징하였다: $3 \cdot 10^5$ 세포를 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사하였다 (도 5). 종양 발생 및 성장을 47 일에 걸쳐 두 주사 부위 모두에서 1 주 당 2 회 모니터링하였다 (도 6).

[0209]

결론

[0210]

백신접종 47 일 후에, 실시예 1로부터의 HfO₂ NP 로 치료되고 6 Gy 방사선조사된 그룹에서 66% 의 마우스가 종양이 없는 반면, 방사선 조사 6 Gy 단독으로 치료된 마우스에서는 33% 였다. 무종양 마우스의 현저한 증가는, 방사선 단독과 비교 시, 실시예 1로부터의 하프늄 산화물 나노입자로 치료되고 단일 조사선량에 노출된 세포를 사용해 백신접종을 수행하는 경우 관찰된다. 이들 결과는 방사선요법의 맥락 상 치료 백신으로서 이를 나노입자 및/또는 나노입자의 응집체의 사용에 대한 합리성을 지지한다.

[0211]

이들 데이터는, 방사선요법 단독과 비교 시, 대상체의 면역계의 효율적인 가동화를 확립시키기 위해 방사선요법에 노출시키는 경우에서 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체의 능력을 입증시켰다.

[0212]

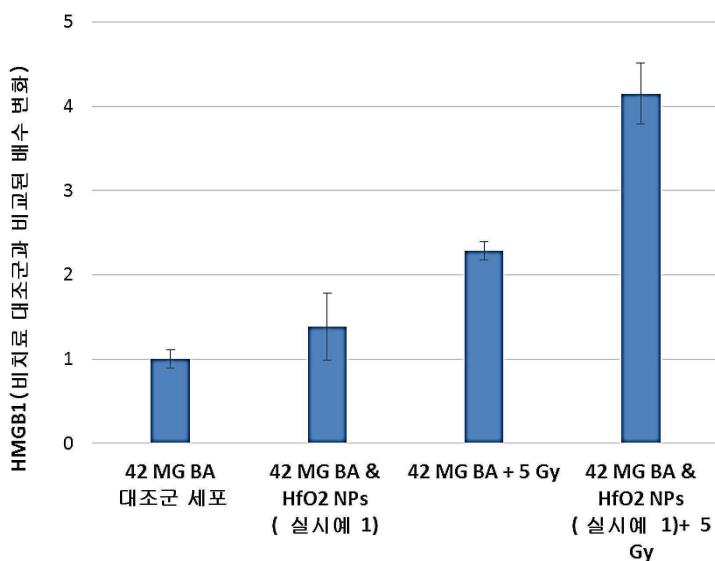
방사선요법에 노출시키는 경우 본 발명의 나노입자 또는 나노입자의 응집체의 사용으로 촉진되는 이러한 효율적인 면역 반응은, 선택된 환자 집단, 전형적으로 전이성 암을 앓고 및/또는 완화적 치료를 받는 대상체, 방사선요법을 포기한 바 있는 전이성 암을 앓는 대상체, 방사선요법에 의해 (종래적으로) 치료되지 않는 암을 앓고 있는 대상체, 또는 액체 암을 앓는 대상체에서 특히 주목된다.

[0213] 참고문헌

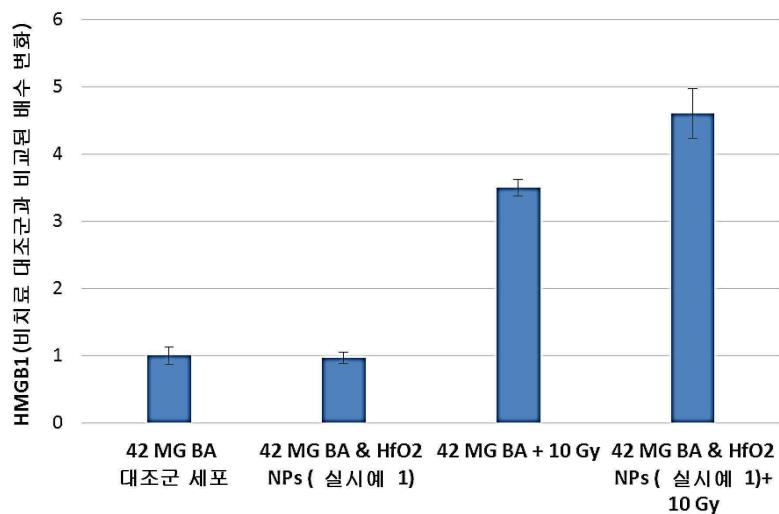
- [0214] - Dhara M. MacDermed et al. A rationale for the targeted treatment of oligometastases with radiotherapy. Journal of Surgical Oncology 2008. 98 202-206.
- [0215] - Ralph R. Weichselbaum et al. Oligometastases revisited. Nat. Rev. Clin. Oncol. 2011. 8, 378-382.
- [0216] - Sonam Sharma et al. Palliative radiotherapy: current status and future directions. Seminars on Oncology 2014. 41 (6) 751-763.
- [0217] - Sandra Demaria and Silvia C. Formenti. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation. Frontiers in Oncology. October 2012 Volume 2 Article 153 1-7.
- [0218] - Oliver Kepp. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. Oncoimmunology 2014 3(9) e955691.
- [0219] - Kobe Reynders et al. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. Cancer Treatment Review 2015 41(6), 503-510.
- [0220] - Scott J. Antonia et al. Immuno-oncology combinations: a review of clinical experience and future prospects. Clinical Cancer Research; 20(24) 2014 6258-6268.
- [0221] - Theresa L. Whiteside et al. Emerging opportunities and challenges in cancer immunotherapy. Clin Cancer Res 2016. 22(8) 1845-1855.
- [0222] - Nicolle H. Rekers et al. Combination of radiotherapy with the immunocytokine L19-IL2 : additive effect in a NK cell dependent tumour model. Radiotherapy and Oncology 2015, 116 438-442.
- [0223] - Y. Suzuki et al. Immunogenic Tumor cell death induced by chemoradiotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Cancer Res. 2012.72(16) 3967-76.

도면

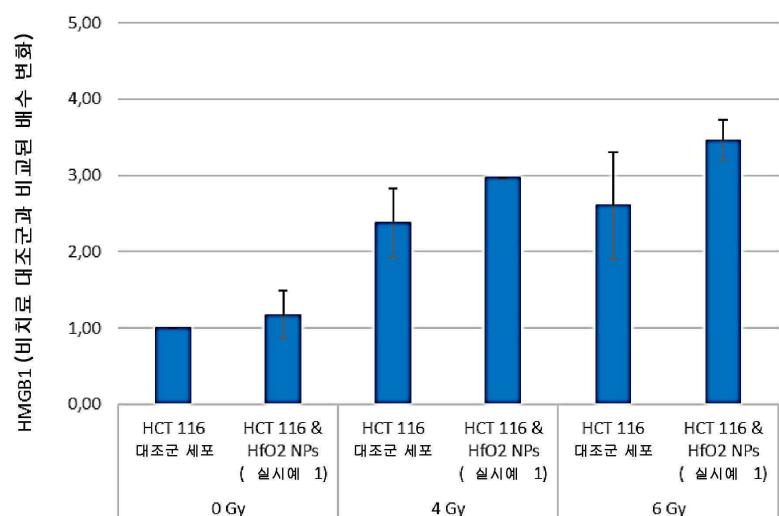
도면1



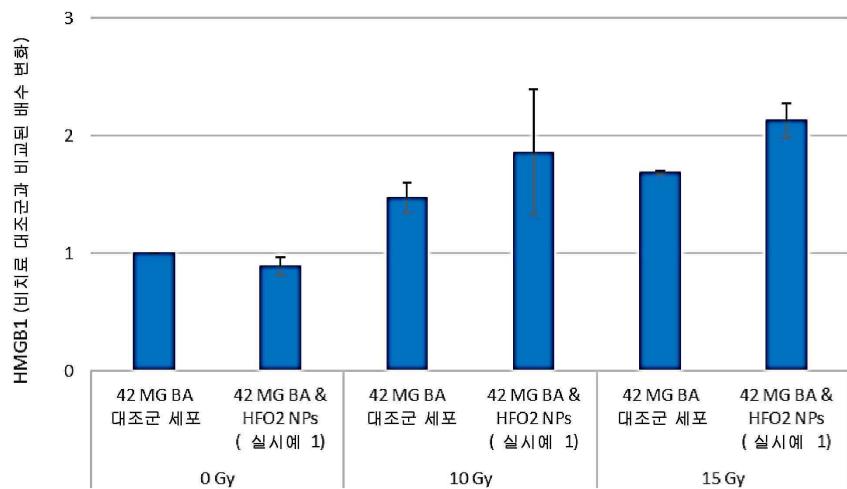
도면2



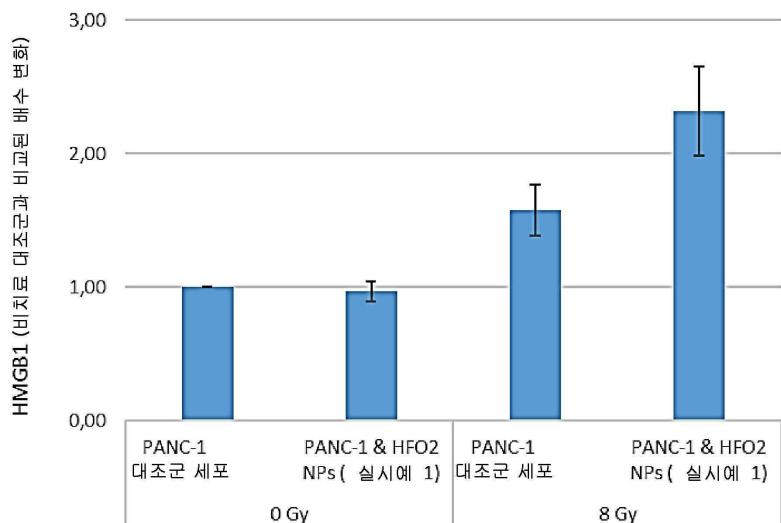
도면3a



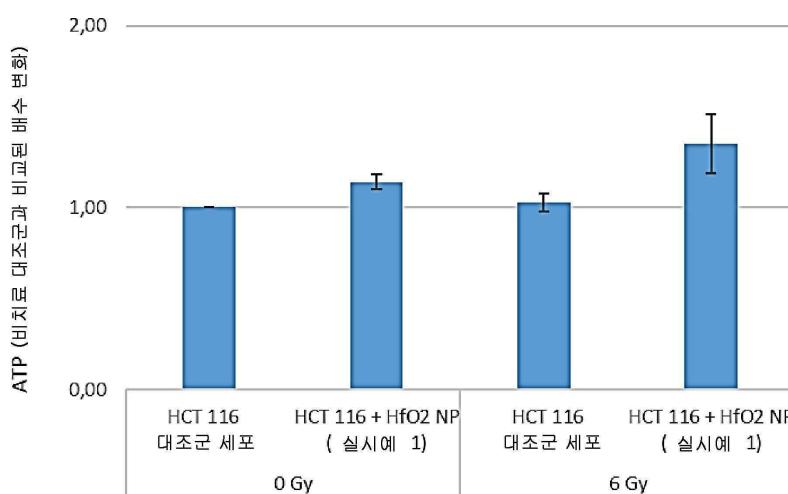
도면3b



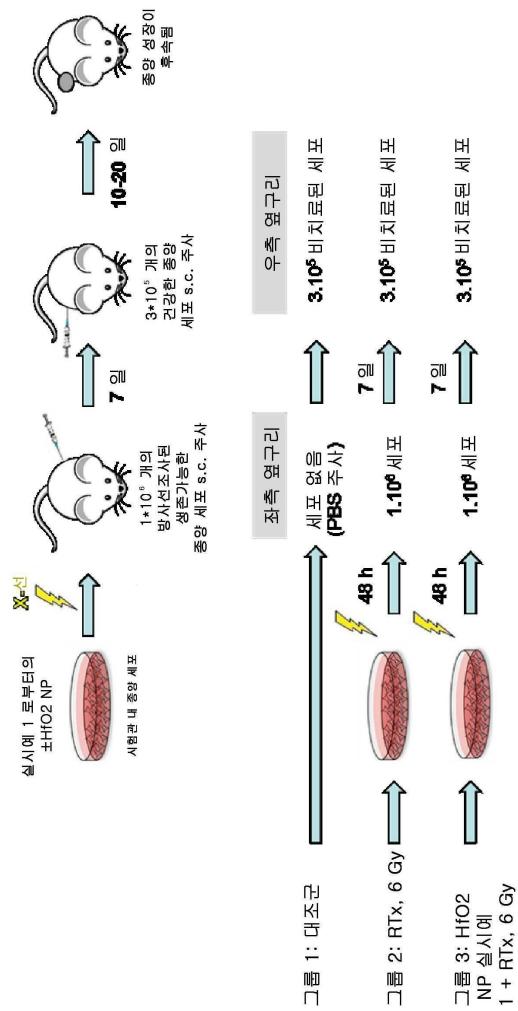
도면3c



도면4



도면5



도면6

