



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0117482  
(43) 공개일자 2023년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61K 39/00* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*A61K 39/001173* (2023.05)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
(21) 출원번호 10-2023-7026014(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2017년07월27일  
심사청구일자 2023년07월28일  
(62) 원출원 특허 10-2019-7005285  
원출원일자(국제) 2017년07월27일  
심사청구일자 2020년07월20일  
(85) 번역문제출일자 2023년07월28일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/044244  
(87) 국제공개번호 WO 2018/022933  
국제공개일자 2018년02월01일  
(30) 우선권주장  
62/367,528 2016년07월27일 미국(US)

(71) 출원인  
오비아이 파마 인코퍼레이티드  
대만, 타이페이 시티 115, 난강 디스트릭트, 유안  
취 스트리트, 19층, 넘버 3  
(72) 발명자  
유, 챕-더 토니  
미국 92121-3730 캘리포니아주 샌디에고 코너스톤  
코트 더블유.6020 오비아이 파마, 인크. 내  
유, 페이웨  
미국 92121-3730 캘리포니아주 샌디에고 코너스톤  
코트 더블유.6020 오비아이 파마, 인크. 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
양영준, 이상영

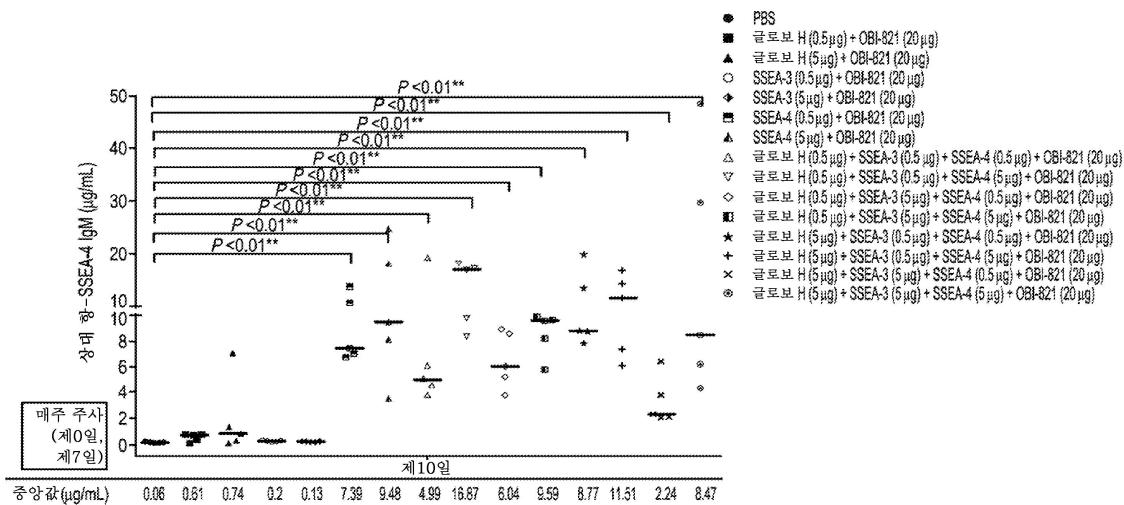
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 면역원성/치료 글리칸 조성물 및 그의 용도

### (57) 요약

본 개시내용은 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 당접합체 및 치료 아주반트 (OBI-821 또는 OBI-834)를 포함하는 면역원성/치료 조성물, 뿐만 아니라 증식성 질환, 예컨대 암을 치료하기 위해 그를 제조 및 사용하는 방법을 포함한다. 치료 접합체는 담체에 연결된 항원을 포함한다. 특히, 치료 접합체는 링커를 통해 연결된 SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3 모이어티 및 KLH 모이어티 서브유닛을 포함한다. 치료 조성물은 부분적으로 손상된 또는 비정상 세포, 예컨대 암 세포에 의해 제기된 위험으로부터 면역계를 통해 그 자신을 보호하는 신체의 자연적 능력을 부스팅하기 위한 암 백신 (1가, 2가 또는 3가 백신)으로서 작용하는 것으로 고려된다. 예시적인 면역 반응은 질환 예방, 질환의 발병 지연, 증상의 중증도 감소, 이환율 감소 및 사망 지연을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 질환의 중증도 감소를 특징으로 할 수 있다.

### 대 표 도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/545 (2013.01)

A61K 2039/55577 (2013.01)

A61K 2039/6081 (2013.01)

A61K 2039/627 (2013.01)

A61K 2039/70 (2013.01)

(72) 발명자

라이, 쿠오-파오

타이완 11503 타이페이 시티 난강 디스트릭트

유안-추 스트리트3 19에프 룸 더블유1907 오비아이

파마, 인크. 내

리, 웨이-한

타이완 11503 타이페이 시티 난강 디스트릭트

유안-추 스트리트3 19에프 룸 더블유1907 오비아이

파마, 인크. 내

챈, 이-주

타이완 11503 타이페이 시티 난강 디스트릭트

유안-추 스트리트3 19에프 룸 더블유1907 오비아이

파마, 인크. 내

린, 수-이

타이완 11503 타이페이 시티 난강 디스트릭트

유안-추 스트리트3 19에프 룸 더블유1907 오비아이

파마, 인크. 내

시에, 이-후앙

타이완 11503 타이페이 시티 난강 디스트릭트

유안-추 스트리트3 19에프 룸 더블유1907 오비아이

파마, 인크. 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 불활성 기체 하에서 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (MCCa) 링커를 통해 복수개의 SSEA-4 항원에 공유 연결된 티올화된 KLH 모이어티 서브유닛을 포함하는 당접합체; 및

(b) OBI-821 아주반트

를 포함하는 제약 조성물이며,

여기서 당접합체의 티올화된 KLH 모이어티 서브유닛은 응집되어 다양체 구조들을 형성하고, 그 중 주요 다양체 구조가 삼량체인 제약 조성물.

#### 청구항 2

(a) SSEA-4 항원; 및

(b) KLH인 담체 단백질

을 포함하는 백신이며,

여기서 SSEA-4 항원은 불활성 기체 하에서 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (MCCa) 링커를 통해 티올화된 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결되고,

SSEA-4 항원에 접합된 KLH 모이어티 서브유닛은 응집되어 다양체 구조들을 형성하고, 그 중 주요 다양체 구조가 삼량체인 백신.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

(a) 글로보 H 항원; 및

(b) KLH인 담체 단백질

을 포함하며,

여기서 글로보 H 항원은 불활성 기체 하에서 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (MCCa) 링커를 통해 티올화된 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결되고,

글로보 H 항원에 접합된 KLH 모이어티 서브유닛은 응집되어 다양체 구조들을 형성하고, 그 중 주요 다양체 구조가 삼량체인 제2 조성물

을 추가로 포함하는 것인 백신.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

(a) SSEA-3 항원; 및

(b) KLH인 담체 단백질

을 포함하며,

여기서 SSEA-3 항원은 불활성 기체 하에서 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (MCCa) 링커를 통해 티올화된 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결되고,

SSEA-3 항원에 접합된 KLH 모이어티 서브유닛은 응집되어 다양체 구조들을 형성하고, 그 중 주요 다양체 구조가 삼량체인 제3 조성물

을 추가로 포함하는 것인 백신.

### 청구항 5

제2항의 백신의 면역원성 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 면역 반응의 유도 또는 증진을 필요로 하는 대상체에서 면역 반응을 유도 또는 증진하는 방법이며, 여기서 백신이 2회 이상 투여되는 것인 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 투여가 면역 반응 부스터 작용제의 첨가를 추가로 포함하는 것인 방법.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

### 청구항 8

제5항에 있어서, 면역원성 유효량이 약 0.01  $\mu$ g 내지 약 250 mg인 방법.

### 청구항 9

제2항, 제3항, 또는 제4항의 백신의 치료 유효량을 글로보 시리즈 항원 발현 암의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 글로보 시리즈 항원 발현 암을 치료하는 방법.

### 청구항 10

제9항에 있어서, 백신이 2회 이상 투여되는 것인 방법.

### 청구항 11

제9항에 있어서, 암이 육종, 피부암, 백혈병, 림프종, 뇌암, 폐암, 유방암, 구강암, 식도암, 위암, 간암, 담관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암 또는 전립선암인 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 7월 27일 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/367,528을 우선권 주장한다. 상기 언급된 출원의 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 개시내용은 암 면역요법을 위한 조성물 및 방법, 및 특히 항암 면역 반응을 도출해낼 수 있는 면역원성/치료 당접합체에 관한 것이다.

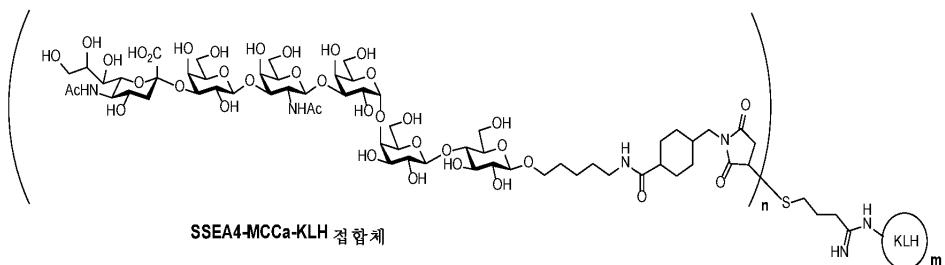
## 배경 기술

[0005] 수많은 표면 탄수화물이 악성 종양 세포에서 발현된다. 예를 들어, 글로보 H ( $\text{Fuc} \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ Gal} \beta 1 \rightarrow 3 \text{ GalNAc} \beta 1 \rightarrow 3 \text{ Gal} \alpha 1 \rightarrow 4 \text{ Gal} \beta 1 \rightarrow 4 \text{ Glc}$ )는 다양한 상피암에서 과다발현되는 것으로 밝혀졌고, 유방암 및 소세포 폐 암종에서의 종양 공격성 및 불량한 예후와 연관된다. 이전 연구는 글로보 H 및 스테이지-특이적 배아 항원 3 (SSEA-3, 또한 Gb5로 불림) ( $\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc} \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc} \beta 1$ )이 유방암 세포 및 유방암 줄기 세포에서 관찰되었다는 것을 밝혀냈다 (WW Chang et al. "Expression of Globo H and SSEA-3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis." PNAS, 105(33): 11667-11672, 2008). 핵사카라이드 ( $\text{Neu5Ac} \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc} \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc} \beta 1$ )인 SSEA-4 (스테이지-특이적 배아 항원-4)는 통상적으로 만능 인간 배아 줄기 세포에 대한 세포 표면 마커로서 사용되었으며, 중간엽 줄기 세포를 단리하고 신경 전구 세포를 풍부화하는데 사용되었다 (Kannagi R et al. EMBO J, 2:2355-2361, 1983). 이전 연구는 스테이지-특이적 배아 항원-4 (SSEA-4)가 다형성 교모세포 종 및 다른 암에서 잠재적 치료 표적으로서의 역할을 할 수 있다는 것을 밝혀냈다 (WW Chang et al. PNAS,

111(7): 2482-2487, 2014).

### 발명의 내용

- [0006] 본원에 개시된 바와 같이, 글로보 시리즈 항원 (글로보 H, SSEA-3 및 SSEA-4)은 암 세포를 고유하게 표적화하고, 치료제를 효과적으로 표적화 암 세포에 이르게 할 수 있는 것으로 인식되었다.
- [0007] 따라서, 본 개시내용은 일반적으로 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 및 SSEA-3)을 포함하는 치료 및/또는 예방 조성물, 뿐만 아니라 면역요법제, 백신, 투여 형태, 키트, 및 그의 제조 및 치료 방법을 포괄한다.
- [0008] 한 실시양태에서, 본 발명은 p-니트로페닐 링커, 4-(4-N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실 히드라지드 (MMCH) 링커 또는 4-(N-말레이미도메틸)-시클로헥산-1-카르복실레이트 (MCCa) 링커를 통해 담체 모이어티, 예를 들어 키홀 림펫 혜모시아닌 (KLH) 또는 디프테리아 독소 교차-반응 물질 197 (DT-CRM 197) 모이어티 서브유닛에 공유 연결된 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 모이어티를 포함하는 단리된 치료 접합체를 포괄한다.
- [0009] 또 다른 예시적 실시양태에서, 본 발명은 하기 일반 구조를 갖는 단리된 면역원성/치료 접합체를 포괄한다:



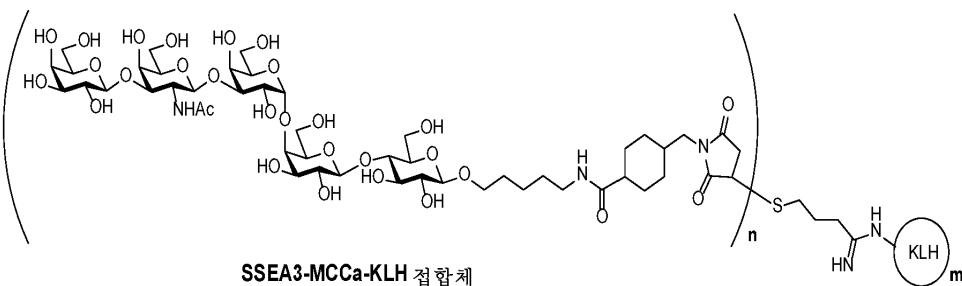
- [0010]
- [0011] 여기서 n은 독립적으로 약 1 내지 약 3000의 정수이고, m은 독립적으로 약 1 내지 약 20의 정수이다. 특정 실시양태에서, m이 1 초과인 경우에, KLH 모이어티는 응집되어 단량체 구조를 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 응집은 공유 결합이다. 특정의 다른 실시양태에서, 응집은 공유 결합이 아니다 (예를 들어, 응집이 H-결합 또는 소수성 상호작용에 의해 형성됨). 특정 실시양태에서, 단량체 KLH 모이어티 (즉, m=1인 경우)는 약 1 내지 약 150개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이량체 KLH 모이어티 (즉, m=2인 경우)는 약 1 내지 약 300개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 삼량체 KLH 모이어티 (즉, m=3인 경우)는 약 1 내지 약 450개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 사량체 KLH 모이어티 (즉, m=4인 경우)는 약 1 내지 약 600개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 오량체 KLH 모이어티 (즉, m=5인 경우)는 약 1 내지 약 750개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 육량체 KLH 모이어티 (즉, m=6인 경우)는 약 1 내지 약 900개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이십량체 KLH 모이어티 (즉, m=20인 경우)는 약 1 내지 약 3000개의 SSEA-4 모이어티를 포함할 수 있다.

- [0012] 본원에 개시된 임의의 측면에서, 면역원성/치료 접합체는 1개 이상의 DT-CRM 197 모이어티 또는 임의의 다른 적합한 면역원성 모이어티 또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

- [0013] 한 실시양태에서, SSEA-4 모이어티는 (Neu5Ac  $\alpha$  2  $\rightarrow$  3Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  3GalNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3Gal  $\alpha$  1  $\rightarrow$  4Gal  $\beta$  1  $\rightarrow$  4Glc  $\beta$  1)을 포함한다. 추가 실시양태에서, KLH 모이어티 서브유닛은 KLH-1 또는 KLH-2 모이어티 또는 그의 조합이다. 본원에 사용된 용어 "KLH"는 KLH-1, KLH-2 및/또는 그의 조합을 지칭한다.

[0014]

또 다른 예시적 실시양태에서, 본 발명은 하기 일반 구조를 갖는 단리된 면역원성/치료 접합체를 포괄한다:



[0015]

[0016]

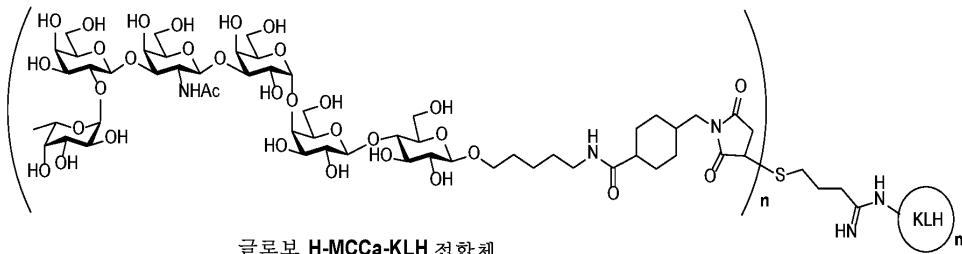
여기서  $n$ 은 독립적으로 약 1 내지 약 3000의 정수이고,  $m$ 은 독립적으로 약 1 내지 약 20의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $m$ 이 1 초파인 경우에, KLH 모이어티는 응집되어 다량체 구조를 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 응집은 공유 결합이다. 특정의 다른 실시양태에서, 응집은 공유 결합이 아니다 (예를 들어, 응집이 H-결합 또는 소수성 상호작용에 의해 형성됨). 특정 실시양태에서, 단량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=1$ 인 경우)는 약 1 내지 약 150개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=2$ 인 경우)는 약 1 내지 약 300개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 삼량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=3$ 인 경우)는 약 1 내지 약 450개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 사량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=4$ 인 경우)는 약 1 내지 약 600개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 오량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=5$ 인 경우)는 약 1 내지 약 750개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 육량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=6$ 인 경우)는 약 1 내지 약 900개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이십량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=20$ 인 경우)는 약 1 내지 약 3000개의 SSEA-3 모이어티를 포함할 수 있다.

[0017]

한 실시양태에서, SSEA-3 모이어티는 ( $\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}\beta 1$ )을 포함한다. 추가 실시양태에서, KLH 모이어티 서브유닛은 KLH-1 또는 KLH-2 모이어티 또는 그의 조합이다. 본원에 사용된 용어 "KLH"는 KLH-1, KLH-2 및/또는 그의 조합을 지칭한다.

[0018]

또 다른 예시적 실시양태에서, 본 발명은 하기 일반 구조를 갖는 단리된 면역원성/치료 접합체를 포괄한다:



[0019]

[0020]

여기서  $n$ 은 독립적으로 약 1 내지 약 3000의 정수이고,  $m$ 은 독립적으로 약 1 내지 약 20의 정수이다. 특정 실시양태에서,  $m$ 이 1 초파인 경우에, KLH 모이어티는 응집되어 다량체 구조를 형성할 수 있다. 특정 실시양태에서, 응집은 공유 결합이다. 특정의 다른 실시양태에서, 응집은 공유 결합이 아니다 (예를 들어, 응집이 H-결합 또는 소수성 상호작용에 의해 형성됨). 특정 실시양태에서, 단량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=1$ 인 경우)는 약 1 내지 약 150개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=2$ 인 경우)는 약 1 내지 약 300개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 삼량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=3$ 인 경우)는 약 1 내지 약 450개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 사량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=4$ 인 경우)는 약 1 내지 약 600개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 오량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=5$ 인 경우)는 약 1 내지 약 750개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 육량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=6$ 인 경우)는 약 1 내지 약 900개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이십량체 KLH 모이어티 (즉,  $m=20$ 인 경우)는 약 1 내지 약 3000개의 글로보 H 모이어티를 포함할 수 있다.

[0021]

한 실시양태에서, 글로보 H 모이어티는 ( $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}\beta 1 \rightarrow 3\text{Gal}\alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{Glc}$ )를 포함한다. 추가 실시양태에서, KLH 모이어티 서브유닛은 KLH-1 또는 KLH-2 모이어티 또는 그의 조합이

다. 본원에 사용된 용어 "KLH"는 KLH-1, KLH-2 및/또는 그의 조합을 지칭한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 실시양태는 KLH 모이어티 서브유닛을 포함하며, 여기서 각각의 KLH 모이어티 서브유닛은 키홀 럼펫 혼모시아닌 (KLH) 모이어티 서브유닛에 공유 연결된 1개 이상의 글로보 시리즈 항원 모이어티를 포함하는 것인 제약 조성물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 2개의 KLH 모이어티 서브유닛의 이량체를 포함하며, 여기서 각각의 KLH 모이어티 서브유닛은 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결된 1개 이상의 글로보 시리즈 항원 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 3개의 KLH 모이어티 서브유닛의 삼량체를 포함하며, 여기서 각각의 KLH 모이어티 서브유닛은 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결된 1개 이상의 글로보 시리즈 항원 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 적어도 4개의 KLH 모이어티 서브유닛을 포함하며, 여기서 각각의 KLH 모이어티 서브유닛은 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결된 1개 이상의 글로보 시리즈 항원 모이어티를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 KLH 모이어티 서브유닛의 혼합물 (예를 들어, 단량체, 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체 등)을 포함하며, 여기서 각각의 KLH 모이어티 서브유닛은 KLH 모이어티 서브유닛에 공유 연결된 다수의 글로보 시리즈 항원 모이어티를 포함한다.

[0023] 특정 실시양태에서, 특정의 예시적인 조성물 실시양태 및 그의 사용 방법은 본원에 기재된 다른 대표적인 화합물 및/또는 조성물 실시양태 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있거나 또는 제외할 수 있다 (예를 들어, 조건부).

[0024] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 아주반트를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "면역학적 아주반트"는 면역원에 대한 면역 반응을 증진 또는 변형시키는, 면역원과 함께 사용되는 물질을 지칭한다. 구체적으로, 용어 "아주반트" 및 "면역보조제"는 본 발명에서 상호교환가능하게 사용되며, 단독으로 숙주에게 투여된 경우에는 비면역원성일 수 있지만 또 다른 항원과 공동으로 투여된 경우에는 그러한 항원에 대한 숙주의 면역 반응을 증대시키는 화합물 또는 혼합물을 지칭한다. 하기 중 하나 이상을 비제한적으로 포함한, 면역 반응의 아주반트-매개된 증진 및/또는 그의 지속기간의 연장은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있다: (i) 항원 단독에 의한 면역화에 반응하여 생산된 항체에 비해 아주반트/항원 조합에 의한 면역화에 반응하여 생산된 항체의 수의 증가; (ii) 항원 또는 아주반트를 인식하는 T 세포의 수의 증가; 및 (iii) 1종 이상의 유형 I 시토카인의 수준의 증가.

[0025] 아주반트는 항원을 포함하는 제약 또는 백신 조성물의 일부로서 또는 항원을 함유하는 제2 조성물과 공동으로 투여되는 별개의 제제로서 투여될 수 있다. 임의의 이들 조성물에서 글리코스핑고지질 (GSL)은 다른 아주반트 및/또는 부형제/담체와 조합될 수 있다. 이들 다른 아주반트는 오일-에멀젼 및 유화제-기재 아주반트, 예컨대 완전 프로인트 아주반트, 불완전 프로인트 아주반트, MF59, 또는 SAF; 미네랄 젤, 예컨대 수산화알루미늄 (명반), 인산알루미늄 또는 인산칼슘; 미생물-유래 아주반트, 예컨대 콜레라 독소 (CT), 백일해 독소, 에스케리키아 콜라이 (*Escherichia coli*) 열-불안정성 독소 (LT), 돌연변이체 독소 (예를 들어, LTK63 또는 LTR72), 바실레 칼메테-게랭 (BCG), 코리네박테리움 파르븀 (*Corynebacterium parvum*), DNA CpG 모티프, 뮤라밀 디펩티드, 또는 모노포스포릴 지질 A; 미립자 아주반트, 예컨대 면역자극 복합체 (ISCOM), 리포솜, 생분해성 마이크로구체, 또는 사포닌 (예를 들어, QS-21); 시토카인, 예컨대 IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 또는 GM-CSF; 합성 아주반트, 예컨대 비이온성 블록 공중합체, 뮤라밀 웨პ티드 유사체 (예를 들어, N-아세틸-뮤라밀-L-트레오닐-D-아이소글루타민 [thr-MDP], N-아세틸-노르-뮤라밀-L-알라닐-D-아이소글루타민, N-아세틸뮤라밀-L-알라닐-D-아이소글루타민-L-알라닌-2-[1'-2'-디팔미토일-sn-글리세로-3-히드록시포스포릴옥시]-에틸아민), 폴리포스파젠, 또는 합성 폴리뉴클레오티드, 및 표면 활성 물질, 예컨대 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다가음이온, 웨პ티드, 탄화수소 에멀젼, 또는 키홀 럼펫 혼모시아닌 (KLH), 틀-유사 수용체 분자, LPS, 지단백질, 리포웨პ티드, 플라겔린, 이중-가닥 RNA, 바이러스 DNA, 비메틸화 CpG 아일랜드, 레바미솔, 바실루스 칼메테-게랭, 이소프리노신, 자닥신, PD-1 길항제, CTLA 길항제, CTLA 항체, 인터류킨, 시토카인, GM-CSF, 당지질, 알루미늄 염 기재 물질, 인산알루미늄, 명반, 수산화알루미늄, 리포솜, TLR2 효능제, 리포웨პ티드, 나노입자, 모노포스포릴 지질 A, OBI-821 아주반트, 사포닌, OBI-834 아주반트, C34 아주반트, 수중유 나노-에멀젼, 및 박테리아-유사 입자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 바람직하게는, 이들 추가의 아주반트는 또한 인간에서의 사용을 위해 제약상 허용된다.

[0026] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 IL-2, IL-12, IL-18, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, GM-CSF 및 TGF- $\beta$ 로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인을 포함한다. 추가 실시양태에서, 제약 조성물은 케모카인을 포함한다.

[0027] 추가 실시양태에서, 면역원성/치료 작용제는 제약 조성물로서 투여된다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 모노클로날 항체, 화학요법제, 호르몬 치료제, 레티노이드 수용체

조정제, 세포독성/세포증식억제제, 항신생물제, 항증식제, 항-mTOR 작용제, 항-Her2 작용제, 항-EGFR 작용제, 프레닐-단백질 트랜스퍼라제 억제제, HMG-CoA 리덕타제 억제제, 질소 머스타드, 니트로소 우레아, 혈관신생 억제제, 베바시주맙, 세포 증식 및 생존 신호전달 경로의 억제제, 아폽토시스 유도제, 세포 주기 체크포인트를 방해하는 작용제, 수용체 티로신 키나제 (RTK)를 방해하는 작용제, 인테그린 차단제, NSAID, PPAR 효능제, 내재적 다중약물 내성 (MDR)의 억제제, 항구토제, 빈혈의 치료에 유용한 작용제, 호중구감소증의 치료에 유용한 작용제, 면역-증진 약물, 비포스포네이트, 아로마타제 억제제, 신생물성 세포의 말단 분화를 유도하는 작용제,  $\gamma$ -세크레타제 억제제, 암 백신 (예를 들어, 능동적 면역요법), 모노클로날 항체 치료제 (예를 들어, 수동적 면역요법), 및 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 치료 조성물은 PD-1/PD-L1 억제제 (세포독성 T 세포 램프구 (CTL) 면역요법), CTLA-4 면역요법, CDK4/6 억제제 (표적 요법), PI3K 억제제 (표적 요법), mTOR 억제제 (표적 요법), AKT 억제제 (표적 요법), 범-Her 억제제 (표적 요법)를 추가로 포함할 수 있다. 이들 억제제는 변형되어 각각의 모노클로날 항체를 또한 생성할 수 있다. 이러한 항체가 본 발명의 치료 조성물에 포함될 수 있다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 추가 실시양태에서, 제약 조성물은 암 백신이다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 피하 투여용으로 제제화된다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 근육내 투여용으로 제제화된다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 동맥내 투여용으로 제제화된다. 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다.

### 도면의 간단한 설명

[0031] 본 발명의 보다 완전한 이해는 첨부 도면을 참조하여, 후속 상세한 설명과 함께 고려하였을 때 얻어질 수 있다. 도면에 도시된 실시양태는 단지 본 발명을 예시하고자 의도된 것이며, 본 발명을 도시된 실시양태로 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

도 1a는 검출기로서 다중-각도 레이저 산란 분광측정법 (MALS)을 사용한 KLH의 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)의 결과를 제시한다. 도 1b는 SEC-MALS를 사용한 KLH의 질량 분포 분석을 제시한다.

도 2는 SEC-MALS를 사용한 SSEA-4-KLH 당접합체 (도 2a), 글로보 H-KLH 당접합체 (도 2b) 및 SSEA-3-KLH 당접합체 (도 2c)의 질량 분포 분석을 제시한다.

도 3a 및 도 3b는 OBI-821 아주반트와 함께 상이한 용량의 SSEA-4-KLH 및 SSEA-4-DT 1가 백신에 의해 유도된 5 마리의 개별 마우스로부터의 항-SSEA-4 IgM 수준 및 중앙 농도의 결과를 제시한다. 도 3c 및 도 3d는 OBI-821 아주반트와 함께 상이한 용량의 SSEA-4-KLH 및 SSEA-4-DT 1가 백신에 의해 유도된 항-SSEA-4 IgG 수준의 결과를 제시한다.

도 4a 및 도 4b는 OBI-834 아주반트와 함께 상이한 용량의 SSEA-4-KLH 및 SSEA-4-DT 1가 백신에 의해 유도된 5 마리의 개별 마우스로부터의 항-SSEA-4 IgM 수준 및 중앙 농도의 결과를 제시한다. 도 4c 및 도 4d는 OBI-834 아주반트와 함께 상이한 용량의 SSEA-4-KLH 및 SSEA-4-DT 1가 백신에 의해 유도된 항-SSEA-4 IgG 수준의 결과를 제시한다.

도 5는 OBI-821 아주반트와 함께 2가 백신 (글로보 H-KLH와 조합된 SSEA-4-KLH 당접합체)에 의해 유도된 면역원성 결과를 제시한다. 도 5a는 항-글로보 H IgM 수준의 결과를 제시하고, 도 5b는 항-SSEA-3 IgM 수준의 결과를 제시하고, 도 5c는 항-SSEA-4 IgM 수준의 결과를 제시한다. 도 5d는 항-글로보 H IgG 수준의 결과를 제시한다. 도 5e는 항-SSEA-3 IgG 수준의 결과를 제시하고, 도 5f는 항-SSEA-4 IgG 수준의 결과를 제시한다.

도 6은 OBI-821 아주반트와 함께 3가 백신 (SSEA-4-KLH + 글로보 H-KLH + SSEA-3-KLH 당접합체)에 의해 유도된 면역원성 결과를 제시한다. 도 6a는 항-글로보 H IgM 수준의 결과를 제시하고, 도 6b는 항-SSEA-4 IgM 수준의 결과를 제시한다. 도 6c는 항-글로보 H IgG 수준의 결과를 제시하고, 도 6d는 항-SSEA-4 IgG 수준의 결과를 제시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명의 실시는, 달리 지시되지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 범위 내에 있는 문자 생물학, 미생물학 및 면역학의 통상적인 기술을 사용할 것이다. 이러한 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed., 1985); Culture Of

Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Antibodies: A Laboratory Manual, by Harlow and Lanes (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); 및 Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986)]을 참조한다.

[0033] 항체를 도출해내기 위한 합성 탄수화물 접합체의 사용은 1929년에 괴벨 및 에이버리에 의해 최초로 입증되었다. (Goebel, W. F., and Avery, O. T., J. Exp. Med., 1929, 50, 521; Avery, O. T., and Goebel, W. F., J. Exp. Med., 1929, 50, 533.) 탄수화물을 벤젠디아조늄 클리코시드를 통해 담체 단백질에 연결하였다. 합성 항원에 의한 토끼의 면역화로 폴리클로날 항체를 생성하였다. 다른 연구원 (Allen, P. Z., and Goldstein, I. J., Biochemistry, 1967, 6, 3029; Rude, E., and Delius, M. M., Carbohydr. Res., 1968, 8, 219; Himmelsbach, K., et al., Eur. J. Immunol., 1971, 1, 106; Fielder, R. J., et al., J. Immunol., 1970, 105, 265)도 탄수화물을 단백질 담체에 접합시키기 위한 유사한 기술을 개발하였다.

[0034] 당접합체는 종양 세포 상의 공지된 표적 작용제를 특이적으로 표적화하는 백신접종으로부터 생성되는 능동적 면역요법에 사용될 수 있다. 탄수화물 항원에 대한 반응은 보통 종양의 신체 거부를 도울 T 세포의 사용을 참여시키지 않는다. 접합체를 사용한 백신접종의 결과로서의 완전 종양 거부의 확률은 가능성성이 없는 것으로 생각되지만, 이러한 치료는 면역 감시를 부스팅할 것이고, 새로운 종양 콜로니의 재발은 감소될 수 있다. (Dennis, J., Oxford Glycosystems Glyconews Second, 1992; Lloyd, K. O., in Specific Immunotherapy of Cancer with Vaccines, 1993, New York Academy of Sciences, 50- 58). 토요쿠니 및 성할은 측정가능한 IgG 역가를 자극하는 합성 당접합체를 기재하였으며 (Toyokuni, T., et al., J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 395), IgG 반응이 헬퍼 T 세포의 참여와 일반적으로 연관되므로 이러한 결과는 중요하다.

[0035] 따라서, 본 개시내용은 SSEA-4에 의해 표적화/매개되는 면역원성/치료 화합물, 조성물 및/또는 제약 제제 조성물, 뿐만 아니라 면역요법제, 백신, 투여 형태, 키트, 및 그의 제조 및 치료 방법에 관한 것이다.

[0036] 단수 용어의 사용은 청구범위 및/또는 명세서에서 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우에 "하나"를 의미할 수 있지만, 그것은 또한 "하나 이상," "적어도 하나," 및 "하나 또는 하나 초과"의 의미와도 일치한다.

[0037] 본 출원 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 어떤 값이, 예를 들어 측정 장치, 값을 결정하는데 사용되는 방법, 또는 연구 대상체 중에 존재하는 변동에 대한 오차의 내재적 변동을 포함함을 나타내기 위해 사용된다. 전형적으로, 상기 용어는 상황에 따라 대략 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%의 또는 상기 값 미만의 변동성을 포함하는 것으로 의도된다.

[0038] 본원에 사용된 용어 "알킬"은, 달리 언급되지 않는 한, 1-20개의 탄소 원자를 함유하는, 예를 들어 C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>의 직쇄형 또는 분지형 1가 탄화수소를 지칭하며, 이들은 치환 또는 비치환될 수 있다. 알킬의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸 및 t-부틸을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0039] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 단지 택일만을 지칭하는 것으로 명백하게 나타내거나 또는 택일이 상호 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하는 것으로 사용되지만, 본 개시내용은 단지 택일만을 지칭하는 정의 및 "및/또는"을 지칭하는 정의도 지지한다.

[0040] 본 명세서 및 청구범위(들)에 사용된 용어 "포함하는" (및 "포함하는"의 임의의 형태, 예컨대 "포함하다" 및 "포함한다"), "갖는" (및 "갖는"의 임의의 형태, 예컨대 "갖다" 및 "갖는다"), "비롯한" (및 "비롯한"의 임의의 형태, 예컨대 "비롯하여 포함한다" 및 "비롯하여 포함하다") 또는 "함유하는" (및 "함유하는"의 임의의 형태, 예컨대 "함유한다" 및 "함유하다")은 포함적이거나 또는 개방형이며, 추가의 필수적이지 않은 요소들 또는 방법 단계들을 제외하지 않는다. 본 명세서에서 논의된 임의의 실시양태는 본 발명의 임의의 방법 또는 조성물과 관련하여 구현될 수 있는 것으로 고려되며, 그 반대도 고려된다. 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법을 달성하기 위해 사용될 수 있다.

[0041] "치료하는"은 장애, 장애의 증상, 장애에 속발성인 질환 상태, 또는 장애에 대한 소인을 치유, 완화, 경감, 구제, 예방 또는 호전시키기 위한 목적으로 대상체에게 치료 조성물을 투여하는 것으로 본원에서 지칭된다.

- [0042] "유효량"은 치료된 대상체에서 본원에 서술된 바와 같은 의학적으로 바람직한 결과를 가져올 수 있는 치료 조성물의 양이다. 의학적으로 바람직한 결과는 객관적일 수 있거나 (즉, 일부 시험 또는 마커에 의해 측정가능함) 또는 주관적일 수 있다 (즉, 대상체가 효과를 표시하거나 또는 효과를 느낌).
- [0043] 본원에 지정된 "치료 조성물을 사용한 치료를 받아들일 수 있는 질환"은 본원에 개시된 치료 조성물의 투여에 의해 치료될 수 있는 임의의 절차, 상태, 장애, 병 및/또는 질병을 의미한다.
- [0044] "증식성 장애"는 일부 유형의 세포가 너무 많이 생산되어 건강을 악화시키는 것이다. 증식성 장애는 양성 또는 악성일 수 있다. 증식성 장애는 예를 들어, 암을 포함할 수 있다.
- [0045] 본원에 사용된, 본원에 개시된 치료 조성물에 의해 치료될 수 있는 "암"은 비정상적 성장 상태를 갖는 세포를 포함한다. 암 세포는 정상 세포 메카니즘의 상실을 특징으로 할 수 있으며, 따라서 연속적으로 증식하고, 인접 조직을 침습하고, 신체 원위부까지 이동하고, 세포가 영양소를 얻는 새로운 혈관의 성장을 촉진할 수 있다. 본원에 사용된 암은 악성 또는 양성일 수 있다. 암은 신체 내의 임의의 조직으로부터 발생할 수 있다. 세포가 성장하고 증대함에 따라, 세포는 종양이라 불리는 조직 종괴를 형성한다. 용어 종양은 비정상적 성장을 또는 종괴를 포함할 수 있다. 종양은 암성 (악성) 또는 비암성 (양성)일 수 있다. 암성 종양은 이웃하는 조직을 침습하고, 신체 전반에 걸쳐 확산 (전이)될 수 있다. 그러나, 양성 종양은 일반적으로 이웃하는 조직을 침습하지 않고, 신체 전반에 걸쳐 확산되지 않는다. 암은 혈액 및 혈액-형성 조직의 암 (백혈병 및 림프종) 및 "고형" 종양으로 분류될 수 있다. "고형" 종양은 암종 또는 육종을 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 치료 조성물에 의해 치료될 수 있는 암은 부위에 의해 분류되는 암, 예를 들어 구강 및 인두 (입술, 혀, 타액선, 구강저, 잇몸 및 다른 입부위, 비인두, 편도, 구인두, 하인두, 다른 구강/인두)의 암; 소화기계 (식도; 위; 소장; 결장 및 직장; 항문, 항문관, 및 항문직장; 간; 간내 담관; 담낭; 다른 담낭; 췌장; 복막후강; 복막, 망, 및 장간막; 다른 소화기)의 암; 호흡기계 (비강, 중이, 및 부비강; 후두; 폐 및 기관지; 흉막; 기관, 종격, 및 다른 호흡기)의 암; 중피종; 골 및 관절; 및 연부 조직, 예를 들어 심장의 암; 흑색종 및 다른 비-상피 피부암을 포함한 피부암; 카포시 육종 및 유방암; 여성 생식기계 (자궁경부; 자궁체부; 자궁, 난소; 질; 외음부; 및 다른 여성 생식기)의 암; 남성 생식기계 (전립선; 고환; 음경; 및 다른 남성 생식기)의 암; 비뇨기계 (방광; 신장 및 신우; 요관; 및 다른 비뇨기)의 암; 눈 및 안와의 암; 뇌 및 신경계 (뇌; 및 다른 신경계)의 암; 내분비계 (갑상선 및 흉선을 포함한 다른 내분비선)의 암; 림프종 (호지킨병 및 비-호지킨 림프종), 다발성 골수종, 및 백혈병 (림프구성 백혈병; 골수성 백혈병; 단핵구성 백혈병; 및 다른 백혈병)을 포함한다.
- [0047] 본 발명에 따른 치료 조성물에 적합한 표적일 수 있는, 조직학적 유형에 의해 분류되는 다른 암은 신생물, 악성; 암종, NOS; 암종, 미분화, NOS; 거대 및 방추 세포 암종; 소세포 암종, NOS; 유두상 암종, NOS; 편평 세포 암종, NOS; 림프상피 암종; 기저 세포 암종, NOS; 모기질 암종; 이행 세포 암종, NOS; 유두상 이행 세포 암종; 선암종, NOS; 가스트린종, 악성; 담관암종; 간세포성 암종, NOS; 복합 간세포성 암종 및 담관암종; 섬유주선암종; 선양 낭성 암종; 선종성 폴립 내의 선암종; 선암종, 가족성 결장 폴립증; 고형 암종, NOS; 카르시노이드 종양, 악성; 세기관지폐포 선암종; 유두상 선암종, NOS; 혈색소성 암종; 호산성 암종; 호산세포성 선암종; 호염기구 암종; 투명 세포 선암종, NOS; 과립 세포 암종; 여포성 선암종, NOS; 유두상 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화성 암종; 부신 피질 암종; 자궁내막양 암종; 피부 부속기 암종; 아포크린 선암종; 피지 선암종; 귀지선암종; 점액표피양 암종; 낭선암종, NOS; 유두상 낭선암종, NOS; 유두상 장액성 낭선암종; 점액성 낭선암종, NOS; 점액성 선암종; 인환 세포 암종; 침윤성 관 암종; 수질성 암종, NOS; 소엽성 암종; 염증성 암종; 파제트병, 유방; 선방 세포 암종; 선편평세포 암종; 편평세포 화생을 동반한 선암종; 흉선종, 악성; 난소 기질 종양, 악성; 난포막종, 악성; 과립막 세포 종양, 악성; 남성모세포종, 악성; 세르톨리 세포 암종; 라이디히 세포 종양, 악성; 지질 세포 종양, 악성; 부신경절종, 악성; 유방외 부신경절종, 악성; 크롬친화세포종; 사구액관 육종; 악성 흑색종, NOS; 무멜라닌 흑색종; 표재 확산성 흑색종; 거대 색소 모반 내의 악성 흑색종; 상피양 세포 흑색종; 청색 모반, 악성; 육종, NOS; 섬유육종, NOS; 섬유성 조직구종, 악성; 점액육종; 지방육종, NOS; 평활근육종, NOS; 횡문근육종, NOS; 배아성 횡문근육종; 폐포 횡문근육종; 기질 육종, NOS; 혼합 종양, 악성, NOS; 릴러 혼합 종양; 신모세포종; 간모세포종; 암육종, NOS; 중간엽종, 악성; 브레너 종양, 악성; 엽상 종양, 악성; 활막 육종, NOS; 중피종, 악성; 미분화배세포종; 배아성 암종, NOS; 기형종, 악성, NOS; 난소 갑상선종, 악성; 용모막암종; 중신종, 악성; 혈관육종; 혈관내피종, 악성; 카포시 육종; 혈관주위세포종, 악성; 림프관육종; 골육종, NOS; 피질주위 골육종; 연골육종, NOS; 연골모세포종, 악성; 중간엽 연골육종; 골의 거대 세포 종양; 유잉 육종; 치원성 종양, 악성; 사기질모세포 치아육종; 사기질모세포종, 악성; 사기질모세포 섬유육종; 송과체종, 악성; 척삭종; 신경교종, 악성; 상의세포종, NOS; 성상세포종, NOS; 원형질성 성상세포종; 원섬유성 성

상세포종; 성상모세포종; 교모세포종, NOS; 펩지교종, NOS; 펩지모세포종; 원시 신경외배엽; 소뇌 육종, NOS; 신경절신경모세포종; 신경모세포종, NOS; 망막모세포종, NOS; 후각 신경원성 종양; 수막종, 악성; 신경섬유육종; 신경초종, 악성; 과립 세포 종양, 악성; 악성 림프종, NOS; 호지킨병, NOS; 호지킨 부육아종, NOS; 악성 림프종, 소림프구성; 악성 림프종, 대세포, 미만성; 악성 림프종, 여포성, NOS; 균상 식육종; 다른 명시된 비-호지킨 림프종; 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병, NOS; 림프성 백혈병, NOS; 형질 세포 백혈병; 적백혈병; 림프육종 세포 백혈병; 골수성 백혈병, NOS; 호염기구 성 백혈병; 호산구성 백혈병; 단핵구성 백혈병, NOS; 비만 세포 백혈병; 거핵모구성 백혈병; 골수성 육종; 및 모발상 세포 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0048] 본원에 정의된 "상피암"은 피부, 중공 내장 및 다른 기관의 상피 또는 관련 조직으로부터 발생하는 암(들)을 지칭한다. 상피암은 유방암, 폐암, 간암, 협부암, 위암, 결장암, 비인두암, 피부암, 신암, 뇌 종양, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 장암, 췌장암 및 방광암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0049] 본원에 사용된 "환자" 또는 "대상체"는 암과 같은 증식성 질환으로 진단되거나 또는 그러한 질환을 갖거나 질환이 발생할 것으로 의심되는 포유동물 대상체를 지칭한다. 예시적인 환자는 인간, 유인원, 개, 돼지, 소, 고양이, 말, 염소, 양, 설치류 및 암과 같은 증식성 질환의 발생에 유용할 수 있는 다른 포유동물일 수 있다.

[0050] 본원에 사용된 "실질적으로 정제된" 또는 "실질적으로 단리된"은 그의 천연 상태에서는 정상적으로 회합되어 있는 실질적으로 모든 다른 문자로부터 분리된 상태의 문자 (예를 들어, 화합물)를 지칭한다. 바람직하게는, 실질적으로 정제된 문자는 제제 중에 존재하는 우세한 종이다. 특히, 실질적으로 정제된 문자는 천연 혼합물 중에 존재하는 다른 문자 (용매 제외)가 60%를 초과하여 존재하지 않거나, 바람직하게는 75% 존재하지 않거나, 또는 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99% 또는 99.5% 존재하지 않거나, 또는 임의의 2개의 언급된 백분율 사이의 임의의 범위만큼 존재하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 정제된 문자는 천연 혼합물 중에 존재하는 다른 문자 (용매 제외)가 보다 바람직하게는 90% 존재하지 않고, 가장 바람직하게는 95% 존재하지 않는다. 용어 "실질적으로 정제된" 또는 "실질적으로 단리된"은 그의 천연 상태에서 존재하는 문자 또는 물질을 포함하지 않도록 의도된다. 특정 실시양태에서, 용어 "실질적으로 정제된" 또는 "실질적으로 단리된"은 1종의 KLH 모이어티를 또 다른 KLH 모이어티로부터 정제하는 것을 포함한다 (예를 들어, KLH 이량체 모이어티를 KLH 삼량체 모이어티로부터 실질적으로 정제하거나 또는 실질적으로 단리함). 예를 들어, 실질적으로 정제된 KLH 이량체 모이어티 (또는 다른 면역원성 다량체 모이어티)는 혼합물 중에 존재하는 다른 KLH 다량체가 60%를 초과하여 존재하지 않거나, 바람직하게는 75% 존재하지 않거나, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97.5%, 98%, 98.5%, 99% 또는 99.5% 존재하지 않거나, 또는 임의의 2개의 언급된 백분율 사이의 임의의 범위만큼 존재하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, KLH 이량체 (또는 다른 면역원성 다량체 모이어티)는 혼합물 중에 존재하는 다른 KLH 다량체가 보다 바람직하게는 90% 존재하지 않고, 가장 바람직하게는 95% 존재하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 용어 "실질적으로 정제된" 또는 "실질적으로 단리된"은 1종의 다량체 모이어티를 또 다른 다량체 모이어티로부터 정제하는 것을 포함하지 않지만, 예를 들어 1종의 KLH 모이어티를 또 다른 KLH 모이어티로부터 정제하는 것을 포함하지 않지만 (예를 들어, KLH 이량체 및 KLH 삼량체가 실질적으로 정제된 또는 실질적으로 단리된 조성물 중에 포함됨), 불순물이 실질적으로 제거된다.

[0051] "투여하는"은 환자에게 본 발명의 치료 조성물을 제공하는 것으로 본원에서 지칭된다. 예로서 및 제한 없이, 조성물 투여, 예를 들어 주사는 정맥내 (i.v.) 주사, 피하 (s.c.) 주사, 피내 (i.d.) 주사, 복강내 (i.p.) 주사, 또는 근육내 (i.m.) 주사에 의해 수행될 수 있다. 1종 이상의 이러한 경로가 사용될 수 있다. 비경구 투여는, 예를 들어 볼루스 주사 또는 일정 시간에 걸친 점진적 관류에 의한 것일 수 있다. 대안적으로 또는 공동으로, 투여는 경구 경로 또는 비강 경로에 의한 것일 수 있다. 추가로, 투여는 또한 볼루스의 외과적 침적 또는 의료 장치의 배치에 의한 것일 수 있다.

[0052] "치료를 필요로 하는 환자"는 증식성 장애로 진단되거나 또는 증식성 장애를 갖는 것으로 의심되는 환자로 본원에서 지칭된다. 한 실시양태에서, 환자는 암을 갖거나 또는 암이 발생할 가능성이 있다.

[0053] 본원에 사용된 용어 "항원"은 단백질 담체 및/또는 아주반트의 도움 하에 또는 그러한 도움 없이 면역 반응을 도출해낼 수 있는 임의의 물질로 정의된다. 바람직하게는 본 발명의 조성물의 항원은 탄수화물 및 보다 바람직하게는 글리칸-항원 및 가장 바람직하게는 SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3 모이어티를 포함한다.

[0054] 본원에 사용된 용어 "면역원성"은 면역 반응을 자극하는 면역원, 항원 또는 백신의 능력을 지칭한다.

- [0055] 본원에 사용된 용어 "면역요법"은 예방적 및/또는 치료적 목적을 달성하기 위해 면역계를 조정하는 개념에 기반한 다수의 치료 전략을 지칭한다.
- [0056] 본원에 사용된 용어 "에피토프"는 항체 또는 T 세포 수용체의 항원 결합 부위와 접촉하는 항원 분자의 부분으로 정의된다.
- [0057] 본 발명의 "치료 조성물"은 "면역원성 접합체 및/또는 치료 접합체" 및/또는 "치료 항체"를 포함한다. 치료 접합체는 담체에 연결된 적어도 1종의 항원을 포함한다. 바람직하게는, 치료 접합체의 연결은 공유 연결이다. 치료 접합체의 한 실시양태에서, 항원은 글리칸, 예컨대 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 모이어티이고, 담체는 KLH 모이어티 및/또는 KLH 모이어티 서브유닛이다. 이에 따라, 용어 치료 접합체는 1개 이상의 글로보 시리즈 항원 모이어티에 연결된 1개 이상의 KLH 모이어티 서브유닛을 포함한다. 한 실시양태에서, 용어 치료 접합체는 약 또는 적어도 1, 10,  $10^2$  또는  $10^3$ 개 또는 그 초과의 글로보 시리즈 항원 모이어티에 연결된 1개 이상의 KLH 모이어티를 포함한다. 또 다른 실시양태는 이러한 글로보 시리즈 항원 연결된 KLH 모이어티 서브유닛의 단리된 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체 또는 육량체, 또는 그의 조합을 포함한다.
- [0058] "치료 항체"는 본 발명의 치료 접합체 및 바람직하게는 치료 접합체의 글로보 시리즈 항원 모이어티 부분에 특이적으로 결합하는 항체 (하기에서 추가로 정의됨)로 정의된다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "백신"은 항원과 연관된 질환에 대한 면역을 부여하는데 사용되는 치료 접합체를 함유하는 치료 조성물을 지칭한다. 암 백신은 손상된 또는 비정상 세포, 예컨대 암 세포에 의해 제기된 위험으로부터 면역계를 통해 그 자신을 보호하는 신체의 자연적 능력을 부스팅하도록 설계된다. 보호성 면역 반응은 질환 예방, 질환의 발병 지연, 증상의 중증도 감소, 이환율 감소 및 사망 지연을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 질환의 중증도를 감소시키는 것이다. 바람직하게는, 백신은 체액성 면역 반응 (예를 들어, B 림프구에 의한 항체 생산의 자극) 및 세포성 면역 반응 (예를 들어, T-림프구 및/또는 다른 세포, 예컨대 NK 세포 및 대식세포에 의해 매개되는 면역 반응)을 둘 다 활성화시킬 수 있다. 면역 반응을 결정하기 위한 표준 검정, 예컨대 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA), 유동 세포측정법, 세포 증식 검정, CTL 검정 및 ADCC/CDC 검정이 개발되었다.
- [0060] 본원에 사용된 용어 "글리칸"은 폴리사카라이드 또는 올리고사카라이드를 지칭한다. 글리칸은 또한 당접합체, 예컨대 당단백질, 당지질, 당펩티드, 글리코프로테옴, 펩티도글리칸, 리포폴리사카라이드 또는 프로테오글리칸의 탄수화물 부분을 지칭하는 것으로 본원에서 사용된다. 글리칸은 통상적으로 모노사카라이드 사이의 O-글리코시드 연결만으로 이루어진다. 예를 들어, 셀룰로스는  $\beta$ -1,4-연결된 D-글루코스로 구성된 글리칸 (또는 보다 구체적으로는 글루칸)이고, 키틴은  $\beta$ -1,4-연결된 N-아세틸-D-글루코사민으로 구성된 글리칸이다. 글리칸은 모노사카라이드 잔기의 단독중합체 또는 이종중합체일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. 글리칸은 당단백질 및 프로테오글리칸에서와 같이 단백질에 부착된 것으로 발견될 수 있다. 이들은 일반적으로 세포의 외부 표면상에서 발견된다. O- 및 N-연결된 글리칸은 진핵생물에서 매우 통상적이지만, 또한 원핵생물에서도 보다 덜 통상적이긴 하지만 발견될 수 있다. N-연결된 글리칸은 시퀀에서 아스파라긴의 R-기 질소 (N)에 부착된 것으로 발견된다. 시퀀은 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr 서열이며, 여기서 X는 프랄린을 제외한 임의의 아미노산이다. 바람직한 글리칸은 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 모이어티이다.
- [0061] 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3)을 발현하는 암은 육종, 피부암, 백혈병, 림프종, 뇌암, 폐암, 유방암, 구강암, 식도암, 위암, 간암, 탑관암, 췌장암, 결장암, 신장암, 자궁경부암, 난소암 및 전립선암을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0062] "SSEA-4 모이어티"는 SSEA-4 또는 그의 단편 또는 유사체인 글리칸 (즉, 당 모이어티를 함유하는 분자)인 것으로 본원에서 정의된다. SSEA-4는 헥사사카라이드 에피토프 ( $\text{Neu5Ac} \alpha 2 \rightarrow 3\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc} \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc} \beta 1$ ), 및 임의로, 비-당 모이어티를 함유하는 글리칸이다. 그의 단편은 헥사사카라이드 에피토프의 단편, 및 적용가능한 경우, 비-당 모이어티를 함유하는 글리칸이다.
- [0063] "글로보 H 모이어티"는 글로보 H 또는 그의 단편 또는 유사체인 글리칸 (즉, 당 모이어티를 함유하는 분자)인 것으로 본원에서 정의된다. 글로보 H는 헥사사카라이드 에피토프 ( $\text{Fuc} \alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc} \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc} \beta 1$ ), 및 임의로, 비-당 모이어티를 함유하는 글리칸이다. 그의 단편은 헥사사카라이드 에피토프의 단편, 및 적용가능한 경우, 비-당 모이어티를 함유하는 글리칸이다.
- [0064] "SSEA-3 모이어티"는 SSEA-3 또는 그의 단편 또는 유사체인 글리칸 (즉, 당 모이어티를 함유하는 분자)인 것으로 본원에서 정의된다. SSEA-3은 펜타사카라이드 에피토프 ( $\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc} \beta 1 \rightarrow 3\text{Gal} \alpha 1 \rightarrow 4\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 4\text{Glc} \beta 1$ ), 및 임의로, 비-당 모이어티를 함유하는 글리칸이다. 그의 단편은 헥사사카라이드 에피토프의 단편, 및

적용가능한 경우, 비-당 모이어티를 함유하는 글리칸이다.

[0065] "키홀 림펫 해모시아닌" (KLH)은 거대 키홀 림펫인 메가투라 크레눌라타(*Megathura crenulata*)의 혈액립프에서 발견되는 큰, 멀티서브유닛, 산소-운반 금속단백질이다. KLH는 약 400 kDa (예를 들어, KLH 단량체) 내지 약 8000 kDa (예를 들어, KLH 이십량체)의 분자량을 갖는 응집체 중의 약 350,000 내지 약 390,000의 분자량을 갖는 서브유닛으로 이루어진 이종 글리코실화 단백질이다. KLH 서브유닛의 각각의 도메인은 단일 산소 원자에 함께 결합하는 2개의 구리 원자를 함유한다. 산소가 해모시아닌에 결합되는 경우에, 분자는 특유의 투명한, 유백색 청색을 띤다. 특정 실시양태에서, KLH 단백질은 인간에서 강력한 면역원성을 갖지만 안전하다. 특정 실시양태에서, KLH는, 황산암모늄 침전 및 투석을 전형적으로 포함하고 최고 순도를 얻기 위해 크로마토그래피 정제를 포함할 수 있는 일련의 단계에 의해, 메가투라 크레눌라타의 혈액립프로부터 정제될 수 있다. 특정 실시양태에서, KLH 정제는 또한 내독소 제거를 포함할 수 있지만, 내독소가 항체 생산을 위해 주사될 때 아주반트로서 작용할 수 있기 때문에 이 단계가 불필요할 수도 있다. 바람직하게는, 투명한 유백색 청색을 갖는 고품질 KLH 제제가 KLH 용해도의 최상의 지시제이다. 특정 실시양태에서, KLH 단량체 유닛은 약 4,000 kDa 내지 8,000 kDa의 총 분자량을 갖는 큰 다량체 (십량체 또는 이십량체)로 조립된다.

[0066] 특정 실시양태에서, 보다 고차의 KLH 다량체는 대략 8-10백만의 분자량을 가지며, 침강 계수는 약 92-107S이다. 존재하는 보다 고차의 KLH 다량체의 양은 침강-평형 및/또는 침강-속도 초원심분리 분석에 기반한다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 KLH는 증진된 면역원성 활성, 특히 증진된 항종양 활성을 나타낸다. 증진된 면역원성 활성은, 예를 들어, 비제한적으로 (a) KLH의 주사 (아주반트 부재), (b) 아주반트로서 사용되는 KLH, (c) 합텐 또는 약한 면역원성 항원을 위한 담체 면역원으로서 사용되는 KLH, 및 (d) 항종양제로서 사용되는 KLH에 의해 관찰된다. 본 발명의 KLH 조성물은 방광, 유방, 난소 종양 등을 포함하나 이에 제한되지는 않은 많은 종양에 대해 증진된 항종양 활성을 나타낸다. 특정 실시양태에서, 2개의 KLH 모이어티가 KLH 단량체 사이의 공유 연결을 통해 이량체를 형성할 수 있다. 이론에 제한됨 없이, KLH 모이어티 사이의 공유 연결은 디슬피드 결합을 통한 것이라 여겨진다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의 KLH 모이어티는 KLH 단량체, 이량체, 삼량체 등 사이의 공유 연결을 통해 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체 등을 형성할 수 있다. 이론에 제한됨이 없이, KLH 모이어티 사이의 공유 연결은 디슬피드 결합을 통한 것이라 여겨진다.

[0067] 특정 실시양태에서, 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 모이어티 단백질의 KLH 모이어티에 대한 접합 동안, 특정 실시양태에서의 KLH 모이어티 단백질은, 바람직하게는 글로보 시리즈 항원 모이어티 서브유닛 해리로 인해 무손상 분자와 비교하여 분자량의 감소를 나타낸다. 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 접합 방법은 이전에 보고되지 않았던 KLH 서브유닛 해리를 유발한다. 어떠한 특정한 이론에 얹매이는 것을 원하지는 않지만, 본 발명의 글로보 시리즈 항원 모이어티-KLH 모이어티 서브유닛 접합체의 높은 글리코실화 수준이 글로보 시리즈 항원 모이어티 사이의 수소 결합 형성을 유발하는 것으로 고려된다. 이에 따라, 특정 실시양태에서, KLH 모이어티 서브유닛 사이의 반 데르 발스 힘 및 소수성 상호작용이 글로보 시리즈 항원 수소 결합에 의해 대체되고, 이는 KLH 모이어티 서브유닛 분리를 유도한다. 접합 후에, 글로보 시리즈 항원 모이어티-KLH 모이어티 접합체의 KLH 모이어티 서브유닛은 바람직하게는 응집되어 신규 단량체, 이량체, 삼량체, 사량체, 오량체, 육량체 또는 그의 임의의 조합을 형성한다. 그에 따른, 예상외로 큰 에피토프 비를 갖는 예시적인 치료 글로보 시리즈 항원 모이어티-KLH 모이어티 접합체는 놀라운 예상외의 우수한 면역원성 속성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 글로보 시리즈 항원 모이어티는 KLH1 및 KLH2 상의 리신에 접합된다. 다른 실시양태에서, 글로보 시리즈 항원 모이어티는 KLH1 및 KLH2 상의 리신에 접합되지 않는다.

[0068] 본원에 사용된, 본원에 개시된 치료 접합체와 관련된 "에피토프 비"는, 예를 들어 치료 접합체에서의 항원 에피토프 대 담체 분자의 관계를 지칭한다. 바람직하게는, 그것은 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 모이어티 대 KLH 모이어티의 관계를 지칭한다. 가장 바람직하게는, 치료 접합체의 에피토프 비는 하기식을 사용하여 계산된다 = (실제 글로보 시리즈 항원 모이어티 중량/글로보 시리즈 항원 모이어티 분자량)/(실제 KLH 모이어티 중량/KLH 모이어티 분자량) 조합. 에피토프 비는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정가능하다. 바람직하게는, 글로보 시리즈 항원의 중량은, 예를 들어 고성능 음이온 교환 크로마토그래피와 펄스형 전류측정 검출 (HPAEC-PAD)에 의해 결정된다.

[0069] 특정의 예시적 실시양태에서, 본 발명은 또한 본원에 개시된 치료 접합체에 친화도로 특이적으로 결합하는 단리된 치료 항체, 뿐만 아니라 중식성 질환의 치료 및/또는 진단에서의 그의 용도를 포괄한다.

[0070] 본원에 사용된 용어 "항체" 및 "항체들" (이뮤노글로불린)은 모노클로날 항체 (전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 적어도 2개의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 인간

항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 단일-쇄 Fv (scFv), 단일-쇄 항체, 단일 도메인 항체, 도메인 항체, Fab 단편, F(ab')2 단편, 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편, 디슬피드-연결된 Fv (sdFv), 및 항-이디오타입 (항-Id) 항체 (예를 들어, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함), 인트라바디, 및 상기 중 어느 것의 에피토프-결합 단편을 포함한다. 특히, 항체는 이뮤노글로불린 분자를 포함하고, 이뮤노글로불린 분자의 면역학적 활성 단편, 즉, 이뮤노글로불린 분자의 항원-결합 부위를 함유하는 분자는 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위 부류의 것일 수 있다.

[0071] 본원에 기재된 치료(들)에 사용되는 에피토프, 예를 들어 치료 접합체의 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3) 모이어티에 대한 항체의 "친화도"는 관련 기술분야에서 널리 이해되고 있는 용어이며, 항체의 에피토프에 대한 결합의 정도 또는 강도를 의미한다. 친화도는 평형 해리 상수 (KD 또는 Kd), 겉보기 평형 해리 상수 (KD' 또는 Kd'), 및 IC<sub>50</sub> (경쟁 검정에서 50% 억제를 발휘하는데 필요한 양)을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 관련 기술분야에 공지된 수많은 방식으로 측정 및/또는 표현될 수 있다. 본 발명의 목적상, 친화도는 에피토프에 결합하는 주어진 항체 집단에 대한 평균 친화도인 것으로 이해된다. mL당 IgG의 mg 또는 mg/mL 단위로 본원에 보고된 KD' 값은 혈청 mL당 Ig의 mg을 나타내지만, 혈장이 사용될 수도 있다. 항체 친화도가 본원에 기재된 치료 방법의 투여, 또는 본원에 기재된 치료 방법의 선택을 위한 기준으로서 사용되는 경우에, 항체 친화도는 치료 전 및/또는 치료 동안에 측정될 수 있고, 얻어진 값은 임상의에 의해 인간 환자가 치료에 대한 적절한 후보인지 여부를 평가하는데 사용될 수 있다.

[0072] 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합하는"은 결합 쌍 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 상호작용을 지칭한다. 다양한 경우에서, 특이적으로 결합하는은 적어도 또는 약 10<sup>-6</sup> 몰/리터, 약 10<sup>-7</sup> 몰/리터, 약 10<sup>-8</sup> 몰/리터, 또는 그 미만, 약 10<sup>-9</sup> 몰/리터, 또는 약 10<sup>-10</sup> 몰/리터, 또는 그 미만, 또는 임의의 2개의 언급된 결합 친화도 상수 사이의 임의의 범위의 친화도 상수에 의해 구체화될 수 있다.

[0073] 글로보 시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 또는 SSEA-3)에 대한 예시적인 항체는 목적하는 항체의 증가에 대해 검사된 면역화된 대상체로부터의 체액, 예컨대 혈청을 수집함으로써, 및 임의의 통상적인 방법에 의해 혈액으로부터 혈청을 분리함으로써 제조될 수 있다.

[0074] 항체는 일반적으로 관련 항원 및 아주반트의 다수 주사에 의해 생성된다. 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 럼펫 혜모시아닌에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0075] 항원에 의한 동물의 면역화 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 항원의 복강내 주사 또는 피하 주사가 포유동물의 면역화를 위한 표준 방법이다. 보다 구체적으로, 항원이 적절한 양의 포스페이트 완충 염수 (PBS), 생리 염수 등에 희석되고 혼탁될 수 있다. 원하는 경우에, 항원 혼탁액이 적절한 양의 아주반트와 혼합된 다음, 대상체에게 투여될 수 있다.

[0076] 특정 실시양태에서, 대상체는 역가가 정체 상태를 유지할 때까지 적절한 양의 아주반트와 혼합된 항원을 여러번 투여함으로써 부스팅될 수 있다. 적절한 담체가 또한 면역화를 위해 사용될 수 있다. 상기와 같은 면역화 후에, 혈청이 목적하는 항체 양의 증가에 대해 소정의 방법에 의해 검사된다.

[0077] 백신은 탄수화물 항원 또는 그의 면역원성 단편 및 아주반트를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 백신은 탄수화물 항원 또는 그의 면역원성 단편; 담체 단백질 및 OBI-821 아주반트를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 백신은 SSEA-4로부터 선택된 탄수화물 항원, KLH 및 OBI-821 아주반트를 포함한다. 담체 단백질의 비제한적 예는, 예를 들어 KLH 또는 DT-CRM 197을 포함한다.

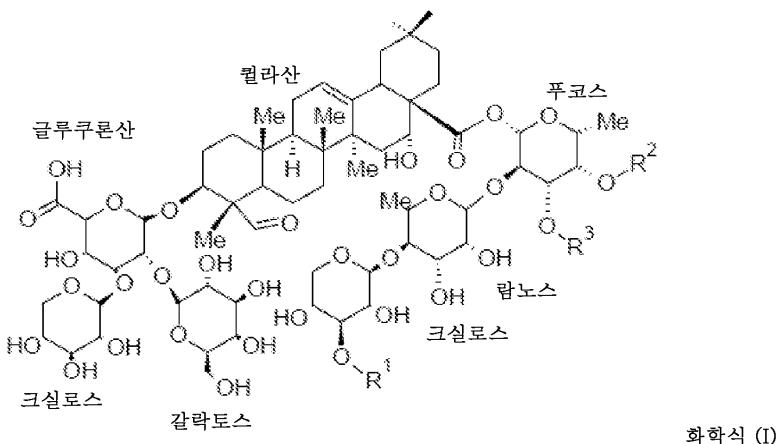
[0078] 치료 조성물은 다른 항암/항증식성 약물, 뿐만 아니라 아주반트 및 다른 면역조정 분자, 예컨대 시토카인 또는 케모카인을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조합은 개별 작용제/조성물의 공동-투여 또는 공동-제제일 수 있다. 이들 작용제는 개별 용기 또는 단일 용기에 넣어 함께 키트로 전달될 수 있다.

[0079] 아주반트는 다른 작용제의 효과를 조절하는 약리학적 또는 면역학적 작용제이다. 이들은 주어진 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 무기 또는 유기 화학물질, 거대분자 또는 전체 암 세포 또는 그의 부분일 수 있다. 아주반트는 완전 및 불완전 프로인트 아주반트, 톨-유사 수용체 분자 및 그의 모방체, LPS, 지단백질, 리포펩티드, 플라제린, 이중-가닥 RNA, 비메틸화 CpG 아일랜드, 레바미솔, 바실루스 칼메트-게랭, 옥트레오티드, 이소프리노신 및 자닥신, 박테리아 및 바이러스에 의해 전형적으로 방출되는 다양한 형태의 DNA 및 RNA, PD-1 길항체 및 CTLA 길항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 아주반트는 사포닌 아주반트이다.

[0080] 특정 실시양태에서, 사포닌 아주반트는 실질적으로 순수한 OBI-821 사포닌이다. 다른 실시양태에서, OBI-821은 그의 생물학적 활성 단편이다. 아주반트는 또한 불순한 형태의 OBI-821을 포함할 수 있다. 정제된 OBI-821은 본원에 기재된 백신과 함께 투여되거나 또는 다른 실질적으로 순수한 사포닌 또는 비-사포닌 아주반트와 혼합되었을 때 증진된 아주반트 효과를 나타낸다.

[0081] OBI-821 아주반트는 퀼라야 사포나리아(*Quillaja saponaria*) 몰리나 나무의 껍질로부터, 예를 들어 미국 특허 번호 5,057,540 및 미국 특허 번호 6,524,584에 기재된 바와 같이 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 저압 액체 실리카 크로마토그래피 및 친수성 상호작용 크로마토그래피 (HILIC)에 의해 높은 순도로 추출된 자연 발생 글리코시드이며, 상기 특허의 내용은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0082] 특정 실시양태에서, OBI-821 아주반트는 하기와 같은 화학식 I의 적어도 1종의 단리된 화합물을 포함한다:

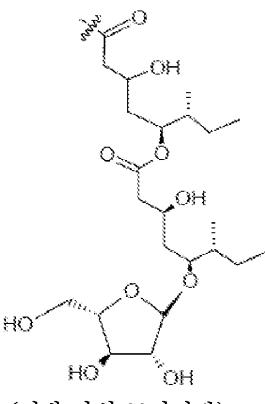


[0083]

[0084] 여기서

[0085]  $R^1$ 은  $\beta$ -D-아파오스 또는  $\beta$ -D-크실로스 또는 H이고;

[0086]  $R^2$  및  $R^3$ 은 독립적으로 H, 지방 아실 모이어티이다.



(지방 아실 모이어티)

[0087]

[0088] OBI-821 아주반트는 또한 하기 경우의 화학식 I의 단리된 화합물을 포함할 수 있다:

[0089] (i)  $R^1$ 은  $\beta$ -D-아파오스이고,  $R^2$ 는 상기 도시된 지방 아실 모이어티이고,  $R^3$ 은 H임 (1989 화합물 V1A);

[0090] (ii)  $R^1$ 은  $\beta$ -D-아파오스이고,  $R^2$ 는 H이고,  $R^3$ 은 상기 도시된 지방 아실 모이어티임 (1989 화합물 V1B);

[0091] (iii)  $R^1$ 은  $\beta$ -D-크실로스이고,  $R^2$ 는 상기 도시된 지방 아실 모이어티이고,  $R^3$ 은 H임 (1989 화합물 V2A); 또는

[0092] (iv)  $R^1$ 은  $\beta$ -D-크실로스이고,  $R^2$ 는 H이고,  $R^3$ 은 상기 도시된 지방 아실 모이어티임 (1989 화합물 V2B).

[0093] 집합적으로, 1989 화합물 V1A, 1989 화합물 V1B, 1989 화합물 V2A 및 1989 화합물 V2B는 "1989 화합물 혼합

물"로 불린다.

[0094] 표 1에 1989 화합물의 관능기 및 1989 화합물 혼합물 중 각각의 1989 화합물의 몰%가 요약되어 있다.

[0095] 표 1

몰 %	$R^1$	$R^2$	$R^3$
1989 화합물 V1A 60-75%	$\beta$ -D-아파오스 		H
1989 화합물 V1B 0-10%	$\beta$ -D-아파오스 	H	
1989 화합물 V2A 25- 40%	$\beta$ -D-크실로스 		H
1989 화합물 V2B 0-10%	$\beta$ -D-크실로스 	H	

[0096]

OBI-821 아주반트는 하기 경우의 화학식 I의 단리된 화합물을 포함할 수 있다:

[0097] (i)  $R^1$ 은 H이고,  $R^2$ 는 상기 도시된 지방 아실 모이어티이고,  $R^3$ 은 H임 (1857 화합물 A);

[0098] (ii)  $R^1$ 은 H이고,  $R^2$ 는 H이고,  $R^3$ 은 상기 도시된 지방 아실 모이어티임 (1857 화합물 B).

[0100] 집합적으로, 1857 화합물 A 및 1857 화합물 B는 "1857 화합물 혼합물"로 불린다.

[0101] 표 2에 1857 화합물의 관능기 및 1857 화합물 혼합물 중 각각의 1857 화합물의 몰%가 요약되어 있다. HPLC.

[0102]

표 2

몰 %	$\mathbf{R}^1$	$\mathbf{R}^2$	$\mathbf{R}^3$
1857 화합물 A 90-100%	H		H
1857 화합물 B 0-10%	H	H	

[0103]

[0104] OBI-821 아주반트는 하기 화합물 중 1종 이상을 포함한다:

[0105] (i) 1857 화합물 A;

[0106] (ii) 1857 화합물 B;

[0107] (iii) 1989 화합물 V1A;

[0108] (vi) 1989 화합물 V1B;

[0109] (v) 1989 화합물 V2A; 또는

[0110] (vi) 1989 화합물 V2B.

[0111] OBI-821 아주반트 중의 1857 화합물 혼합물 및 1989 화합물 혼합물의 백분율은 하기와 같은 범위일 수 있다:

[0112] (i) 약 1 몰% 내지 약 25 몰%의, 1857 화합물 혼합물을 포함하는 OBI-821; 및

[0113] (ii) 약 75 몰% 내지 약 99 몰%의, 1989 화합물 혼합물을 포함하는 OBI-821.

[0114] 모든 몰%는 0.1% 증분으로 달라질 수 있으며, 언급된 범위 중 어느 것 내의 임의의 % 범위를 포함할 수 있다 (예를 들어 약 75 몰% 내지 약 99 몰%는 약 87% 내지 약 90% 및 약 90.5% 내지 약 97%를 포함하고, 또한 약 1 몰% 내지 약 25 몰%는 약 3.5% 내지 약 11%, 약 10% 내지 약 14%를 포함함). 추가의 예시적인 몰%는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 내지 약 25%; 또는 약 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 내지 약 99%의 범위 또는 본원의 임의의 2개의 언급된 몰% 사이의 범위일 수 있다.

[0115] 1989 화합물 혼합물은 약 60-75 몰%의 1989 화합물 V1A; 약 0-10 몰%의 1989 화합물 V1B; 약 25-40 몰%의 1989 화합물 V2A; 및 약 0-10 몰%의 1989 화합물 V2B를 포함할 수 있다. 모든 몰%는 0.1 증분으로 달라질 수 있다 (예를 들어, 65%, 2.5%, 35.6%). 추가의 예시적인 몰%는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 내지 약 25%; 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74 내지 약 75%; 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 내지 약 40%의 범위 또는 본원의 임의의 2개의 언급된 몰% 사이의 범위일 수 있다.

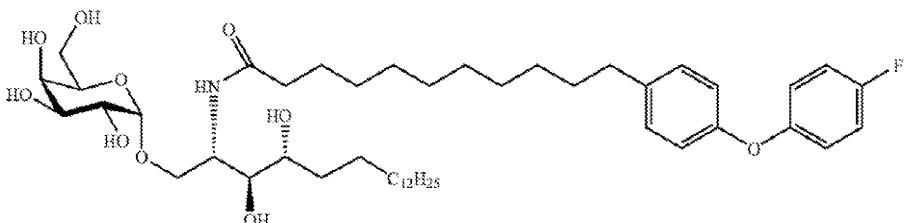
[0116] 1857 화합물 혼합물은 약 90-100 몰%의 1857 화합물 A; 약 0-10 몰%의 1857 화합물 B를 포함할 수 있다. 모든 몰%는 0.1 증분으로 달라질 수 있다 (예를 들어, 65%, 2.5%, 35.6%). 추가의 예시적인 몰%는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 내지 약 10% 또는 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 내지 약 99%의 범위 또는 본원의 임의의

2개의 언급된 몰% 사이의 범위일 수 있다.

[0117] 또 다른 실시양태에서, 실질적으로 순수한 OBI-821은 조 퀼라야 사포나리아 추출물로부터 정제되고, 여기서 상기 OBI-821은 11분간 1 mL/분의 유량으로 A:B 95%:5%에서 75%:25%로의 이동상을 포함하는 용리 프로그램 (여기서 이동상 A는 0.1% 트리플루오로아세트산이 함유된 증류수이고, 이동상 B는 0.1% 트리플루오로아세트산이 함유된 아세토니트릴임) 하에 5  $\mu$ m 입자 크기, 100  $\text{\AA}$  세공, 4.6mm IDx25cm L을 갖는 시메트리 C18 칼럼 상에서 역상-HPLC로 분석하였을 때, 용매 피크를 제외한 크로마토그램의 모든 피크의 총 면적의 90% 이상을 차지하는 단일 우세 피크를 특징으로 한다. 추가의 예시적인 % 비는 (약 95%, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 77, 76 내지 약 75%) 대 (약 25%, 24, 23, 22, 21, 20, 29, 28, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 내지 약 5%); 본원의 임의의 2개의 언급된 몰% 사이의 범위일 수 있다.

[0118] 백신은 탄수화물 항원 또는 그의 면역원성 단편 및 OBI-821 아주반트를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 백신은 탄수화물 항원 또는 그의 면역원성 단편; 담체 단백질 및 OBI-821 아주반트를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 백신은 SSEA-4로부터 선택된 탄수화물 항원, KLH 및 OBI-821 아주반트를 포함한다. 담체 단백질의 비제한적 예는 KLH를 포함한다.

[0119] 용어 "a-갈락토실-세라미드" 및 "a-GalCer"은 미국 특허 번호 8,268,969에 기재된 바와 같이, 자연 킬러 T 세포를 자극하여 T 헬퍼 1 (TH1) 및 TH2 시토카인을 둘 다 생산하는 당지질을 지칭하며, 상기 특허의 내용은 그 전문이 참조로 포함된다. 특정 실시양태에서, OBI-834 (또한 C34로 공지됨) 아주반트는 하기 예시적인 구조를 특징으로 한다:



[0120]

[0121] 본원에 사용된 용어 "시토카인"은 전구 세포가 특유의 특화된 세포 유형이 되게 하는 유전자 발현에서의 변화를 통상적으로 수반하는 면역 세포 분화 과정에 영향을 주어 면역 반응의 강도 및 지속기간을 조절하는 임의의 수 많은 소형 분비 단백질을 지칭한다. 시토카인은 그의 추정되는 기능, 분비 세포 또는 작용 표적에 기초하여, 림포카인, 인터류킨 및 케모카인으로서 다양하게 명명되었다. 예를 들어, 일부 통상적인 인터류킨은 IL-2, IL-12, IL-18, IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-4, IL-10, IL-13, IL-21, GM-CSF 및 TGF- $\beta$ 를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0122] 본원에 사용된 용어 "케모카인"은 림프구의 동원 및 활성화 수단을 제공하는, 감염 부위에서 방출되는 임의의 다양한 소형 화학주성 시토카인을 지칭한다. 케모카인은 감염 부위로 백혈구를 유인한다. 케모카인은 보존된 시스테인 잔기를 가지며, 이에 따라 4개의 군으로 할당된다. 대표적인 케모카인을 갖는 군은 C-C 케모카인 (RANTES, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  및 MIP-1 $\beta$ ), C-X-C 케모카인 (IL-8), C 케모카인 (림포탁틴) 및 CXXXC 케모카인 (프랙탈카인)이다.

[0123] 본 발명의 치료 조성물은 PD-1/PD-L1 억제제 (세포독성 T 세포 림프구 (CTL) 면역요법), CTLA-4 면역요법, CDK4/6 억제제 (표적 요법), PI3K 억제제 (표적 요법), mTOR 억제제 (표적 요법), AKT 억제제 (표적 요법), 범-Her 억제제 (표적 요법)를 추가로 포함할 수 있다. 이들 억제제는 변형되어 각각의 모노클로날 항체를 또한 생성할 수 있다. 이러한 항체가 본 발명의 치료 조성물에 포함될 수 있다.

[0124] 치료 조성물은 다른 항암제/항증식제 또는 화학요법제를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제의 예는 문헌 [Cancer Principles and Practice of Oncology by V.T. DeVita and S. Hellman (editors), 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers]에서 발견된다. 이러한 항암제는 하기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 호르몬 치료제 (예를 들어, 선택적 에스트로겐 수용체 조정제, 안드로겐 수용체 조정제), 모노클로날 항체 요법, 화학요법, 레티노이드 수용체 조정제, 세포독성/세포증식억제제, 항신생물제, 항증식제, 프레닐-단백질 트랜스페라제 억제제, HMG-CoA 리덕타제 억제제, 질소 머스타드, 니트로소 우레아, 혈관신생 억제제 (예를 들어, 베바시주맙), 세포 증식 및 생존 신호전달 경로의 억제제, 아폽토시스 유도제, 세포 주기 체크포인트를 방해하는 작용제, 수용체 티로신 키나제 (RTK)를 방해하는 작용제, 포유동물

라파마이신 표적 (mTOR) 억제제, 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2) 억제제, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR) 억제제, 인테그린 차단제, NSAID, PPAR 효능제, 내재적 다중약물 내성 (MDR)의 억제제, 항구토제, 빈혈의 치료에 유용한 작용제, 호중구감소증의 치료에 유용한 작용제, 면역-증진 약물, 비포스포네이트, 아로마타제 억제제, 신생물성 세포의 말단 분화를 유도하는 작용제,  $\gamma$ -세크레타제 억제제, 암 백신, 및 그의 임의의 조합.

[0125]

치료 조성물 (또한 본원에서 제약 조성물로 지칭됨)은 일반적으로 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는 담체"는 제약 투여와 상용성인, 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 보통 활성 화합물이 또한 조성물 내로 혼입될 수 있다. 제약 조성물은 그의 의도된 투여 경로와 상용성으로 제제화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하, 근육내, 동맥내, 경구 (예를 들어, 흡입), 경피 (국소), 경점막, 및 직장 투여를 포함한다. 비경구, 피내 또는 피하 적용에 사용된 용액 또는 혼탁액은 하기 성분을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 염수 용액, 포스페이트 완충 염수, 트리스-완충 염수, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아제, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 퀼레이트화제, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장성 조정제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스. pH 값은 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정될 수 있다. 비경구 제제는 유리 또는 플라스틱으로 제조된 앰플, 일회용 시린지 또는 다중 용량 바이알에 봉입될 수 있다.

[0126]

주사가능한 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 염수, 정박테리아수, 크레모포르 EL (Cremophor EL)® (바스프, 뉴저지주 파시파니) 또는 포스페이트 완충 염수 (PBS)를 포함한다. 모든 경우에, 조성물은 멸균되어야 하고 용이한 시린지성이 존재하는 정도로 유동적이어야 한다. 그것은 제조 및 저장 조건 하에 안정하여야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴을 사용하고, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기를 유지하고, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 다수의 경우에서, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물 중에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 지속 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물 중에 포함시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0127]

멸균 주사가능한 용액은 활성 화합물을 필요량으로 적절한 용매 중에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 혼입시키고, 필요에 따라, 이어서 멸균 여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비허를 내에 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법은 진공 건조 및 동결-건조를 포함하며, 이는 사전에 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 플러스 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 제공한다.

[0128]

경구 조성물은 일반적으로 불활성 희석제 또는 식용 담체를 포함한다. 경구 치료적 투여의 목적을 위해, 활성 화합물은 부형제와 함께 혼입될 수 있고, 정제, 트로키 또는 캡슐, 예를 들어 젤라틴 캡슐의 형태로 사용될 수 있다. 경구 조성물은 또한 구강세정제로서의 사용을 위해 유체 담체를 사용하여 제조될 수 있다. 제약상 상용성인 결합제 또는 아주반트 물질이 조성물의 일부로서 포함될 수 있다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 등은 하기 성분 중 임의의 것 또는 유사한 성질의 화합물을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 미세결정질 셀룰로스, 트라가칸트 겸 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분 또는 락토스, 봉해제, 예컨대 알긴산, 프리모겔 또는 옥수수 전분; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트 또는 스테로테스; 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 또는 향미제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미제.

[0129]

추가로, 경구 투여를 위한 본 발명의 제제는 제약상 허용되는 부형제, 예컨대 결합제 (예를 들어, 예비젤라틴화 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 허드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제 (예를 들어, 락토스, 미세결정질 셀룰로스 또는 인산수소칼슘); 윤활제 (예를 들어, 스테아르산마그네슘, 활석 또는 실리카); 봉해제 (예를 들어, 감자 전분 또는 소듐 스타치 글리콜레이트); 또는 습윤제 (예를 들어, 소듐 라우릴 슬레이트)를 사용하여 통상적인 수단에 의해 제조된, 예를 들어 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 관련 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다. 본 발명의 조성물은 또한, 예를 들어 폴리글리콜산/락트산 (PGLA)으로

부터 제작된 마이크로구체 또는 마이크로캡슐 내에 도입될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,814,344; 5,100,669 및 4,849,222; PCT 공개 번호 WO 95/11010 및 WO 93/07861 참조). 경구 투여용 액체 제제는, 예를 들어 용액, 시럽, 에멀젼 또는 혼탁액의 형태를 취할 수 있거나, 또는 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비허클에 의한 재구성을 위한 건조 생성물로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 제약상 허용되는 첨가제, 예컨대 혼탁화제 (예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화 식용 지방); 유화제 (예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비허클 (예를 들어, 아몬드 오일, 유성 에스테르, 에틸 알콜 또는 분별화 식물성 오일); 및 보존제 (예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)를 사용하여 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 제제는 또한 적절한 경우에 완충 염, 향미제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다. 경구 투여를 위한 제제는 활성 화합물의 제어 방출을 제공하도록 적합하게 제제화될 수 있다.

[0130] 흡입에 의한 투여 또는 비강 투여를 위한 화합물은 적합한 추진제, 예를 들어 이산화탄소와 같은 기체를 함유하는 가압 용기 또는 분배기, 또는 네뷸라이저로부터 에어로졸 스프레이의 형태로 전달된다.

[0131] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피일 수 있다. 경점막 또는 경피 투여를 위해, 투과될 장벽에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 경점막 투여의 경우, 세제, 담즙 염 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌제의 사용을 통해 수행될 수 있다. 경피 투여의 경우, 활성 화합물은 일반적으로 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 연고, 살브, 젤 또는 크림으로 제제화된다. 화합물은 또한 좌제 (예를 들어, 통상적인 좌제 베이스, 예컨대 코코아 버터 및 다른 글리세리드를 가짐) 또는 직장 전달을 위한 정체 관장제의 형태로 제조될 수 있다.

[0132] 구현에 따라, 활성 화합물은 화합물이 신체로부터 급속 제거되는 것을 방지할 담체를 사용하여, 예컨대 이식물 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제제로 제조된다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제제의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 것이다. 물질은 또한 상업적으로 입수될 수 있다. 리포솜 혼탁액 (세포-특이적 항원에 대한 모노클로날 항체를 갖는, 감염된 세포에 표적화되는 리포솜 포함)이 또한 제약상 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있으며, 상기 특허는 본원에 참조로 포함된다.

[0133] 경구 또는 비경구 조성물을 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 유리하다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단위 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 요구되는 제약 담체와 함께 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다.

[0134] 본 발명의 면역원성 제제는 비경구로, 즉 정맥내 (i.v.), 피하 (s.c.), 복강내 (i.p.), 근육내 (i.m.), 진피하 (s.d.) 또는 피내 (i.d.) 투여에 의해, 예를 들어 볼루스 주사, 연속 주입, 또는 유전자총 (예를 들어, 대상체에게 벡터 백신, 예컨대 네이키드 DNA 또는 RNA를 투여하기 위함)을 통한 직접 주사에 의해 전달될 수 있다. 주사를 위한 제제는 단위 투여 형태, 예를 들어 앰풀 또는 다중-투여 용기 (보존제가 첨가됨) 중에 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비허클 중의 부형제, 혼탁액, 용액 또는 에멀젼과 같은 형태를 취할 수 있고, 제제화제, 예컨대 혼탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비허클, 예를 들어 멀균 발열원 무함유 물로 재구성되는 분말 형태일 수 있다.

[0135] 본 발명은 또한 다양한 점막 백신접종 전략도 고려한다.

[0136] 투여량: 이러한 치료 조성물의 독성 및 치료 효능은, 예를 들어 LD<sub>50</sub> (집단의 50%에 치사성인 용량) 및 ED<sub>50</sub> (집단의 50%에서 치료상 유효한 용량)을 결정하기 위해 세포 배양물 또는 실험 동물에서의 표준 제약 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성과 치료 효과 사이의 용량 비가 치료 지수이며, 이는 비 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>으로 표현될 수 있다. 높은 치료 지수를 나타내는 치료 조성물이 바람직하다. 독성 부작용을 나타내는 화합물이 사용될 수 있지만, 이러한 화합물을 환부 위치에 표적화하여 비감염된 세포에 대한 잠재적 손상을 최소화함으로써 부작용을 감소시키는 전달 시스템을 설계하는데 주의를 기울여야 한다.

[0137] 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에서 사용하기 위한 소정 범위의 투여량을 설정하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없이 ED<sub>50</sub>을 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투여량은 사용되는 투여 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 본 개시내용의 방법에 사용되는 임의의 화합물에 대해, 치료 유효 용량은 세포 배양 검정으로부터 초기

에 추정될 수 있다. 세포 배양에서 결정된  $IC_{50}$  (즉, 증상의 반수-최대 억제를 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하는 용량이 동물 모델에서 설정될 수 있다. 이러한 정보는 인간에서 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는데 사용될 수 있다. 혈장에서의 수준은, 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0138] 개시된 조성물에서, 항원 및/또는 아주반트 또는 임의의 다른 관련 성분은 둘 다 면역원성 유효량으로 존재한다. 각각의 특이적 항원에 대해, 최적의 면역원성 유효량이 실험에 의해 결정되어야 한다 (주어진 환자 및/또는 치료 유형의 특이적 특징이 고려됨). 일반적으로, 이 양은 항원  $0.01 \mu\text{g}$ - $250 \mu\text{g}$ 의 범위이다. 본 발명의 특정의 예시적인 아주반트에 대해, 면역원성 유효량은 아주반트  $10$ - $250 \mu\text{g}$ 의 범위일 수 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, 치료 조성물의 치료 유효량 (즉, 유효 투여량)은 약  $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약  $250 \text{ g}/\text{kg}$ ,  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지  $10 \text{ g}/\text{kg}$ , 또는  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지  $1.0 \text{ g}/\text{kg}$ 의 범위, 또는 약 또는 적어도:  $0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009; 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225$ , 또는  $250$  그램 또는 마이크로그램/환자 체중 킬로그램, 또는 본원에 열거된 임의의 수치 사이의 임의의 범위, 또는 과도한 실험 없이 통상의 기술자에게 분명하고 그에 의해 이해될 다른 범위일 수 있다. 통상의 기술자는, 질환 또는 장애의 중증도, 선행 치료, 대상체의 전반적 건강 또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 특정 인자가 대상체를 효과적으로 치료하는데 요구되는 투여량 및 시기에 영향을 미칠 수 있다는 것을 인지할 것이다.

[0140] 다른 실시양태에서, 치료 조성물 중 글로보 시리즈 모이어티의 치료 유효량 (즉, 유효 투여량)은 약  $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약  $250 \text{ g}/\text{kg}$ ,  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지  $10 \text{ g}/\text{kg}$ , 또는  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$  내지  $1.0 \text{ g}/\text{kg}$ 의 범위, 또는 약 또는 적어도:  $0.001, 0.002, 0.003, 0.004, 0.005, 0.006, 0.007, 0.008, 0.009; 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09; 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225$ , 또는  $250$  그램 또는 마이크로그램/환자 체중 킬로그램, 또는 본원에 열거된 임의의 수치 사이의 임의의 범위, 또는 과도한 실험 없이 통상의 기술자에게 분명하고 그에 의해 이해될 다른 범위일 수 있다. 통상의 기술자는, 질환 또는 장애의 중증도, 선행 치료, 대상체의 전반적 건강 또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하나 이에 제한되지는 않는 특정 인자가 대상체를 효과적으로 치료하는데 요구되는 투여량 및 시기에 영향을 미칠 수 있다는 것을 인지할 것이다. 한 실시양태에서, 백신을 포함하는 제약상 허용되는 담체의 면역원성 유효량은 약  $0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55, 0.6, 0.65, 0.7, 0.75, 0.8, 0.85, 0.9, 0.95, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 2.25, 2.5, 2.75, 3.0, 3.25, 3.5, 3.75, 4.0, 4.25, 4.5, 4.75$  내지 약  $5.0 \mu\text{g}$ 의 범위, 또는 본원에 열거된 임의의 수치 사이의 임의의 범위이다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본 발명의 치료 조성물은 그를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 유방암과 같은 암을 갖는 대상체)에게, 평균적으로 무진행 생존 또는 전체 생존을 대조군 위약, 예를 들어 포스페이트 완충 염수 위약에 비해, 약 또는 적어도  $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50$ 일, 주, 개월 또는 년 연장시키는 방법으로 투여된다.

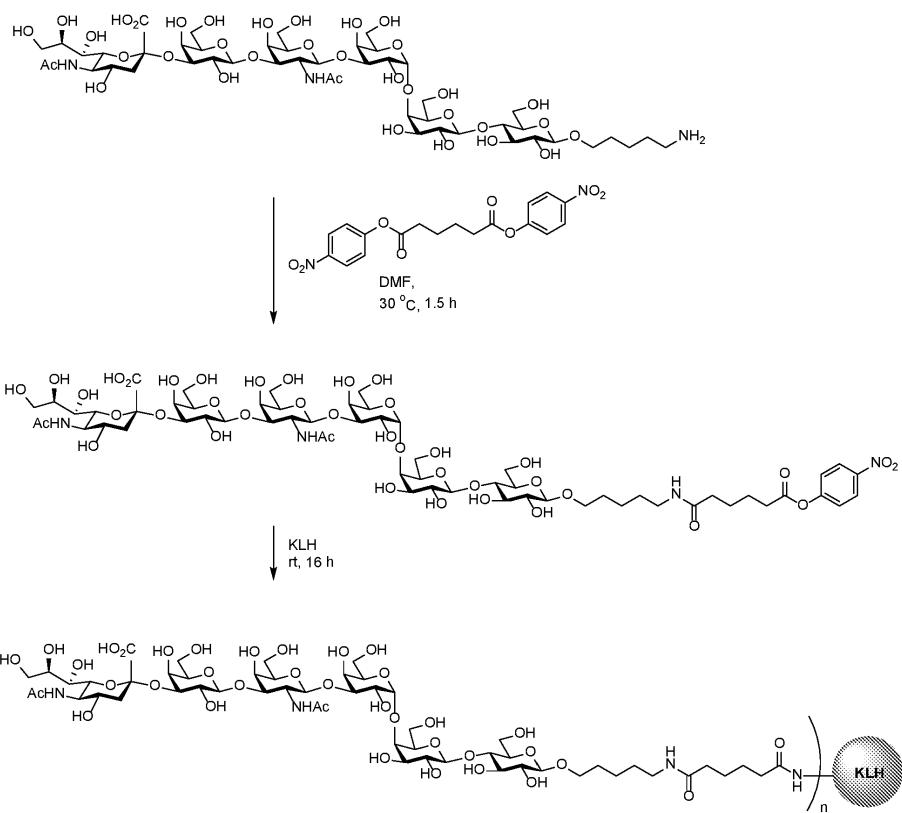
[0142] 실시예

[0143] 본 발명의 치료 조성물의 예시적인 SSEA-4 혼사사카라이드 부분을 알릴 글리코시드로서 화학적으로 합성한 다음, KLH 또는 디프테리아 독소 교차-반응 물질 197 (DT-CRM 197)과의 접합을 위해 제조하였다.

[0144] 실시예 1: 본 발명의 예시적인 당접합체 (SSEA-4-KLH 및 SSEA-4-DT)의 제조

[0145]

하나의 예시적 실시양태에서, 예시적인 SSEA-4-KLH의 화학적 합성은 하기 일반적 단계를 포함한다:



[0146]

[0147]

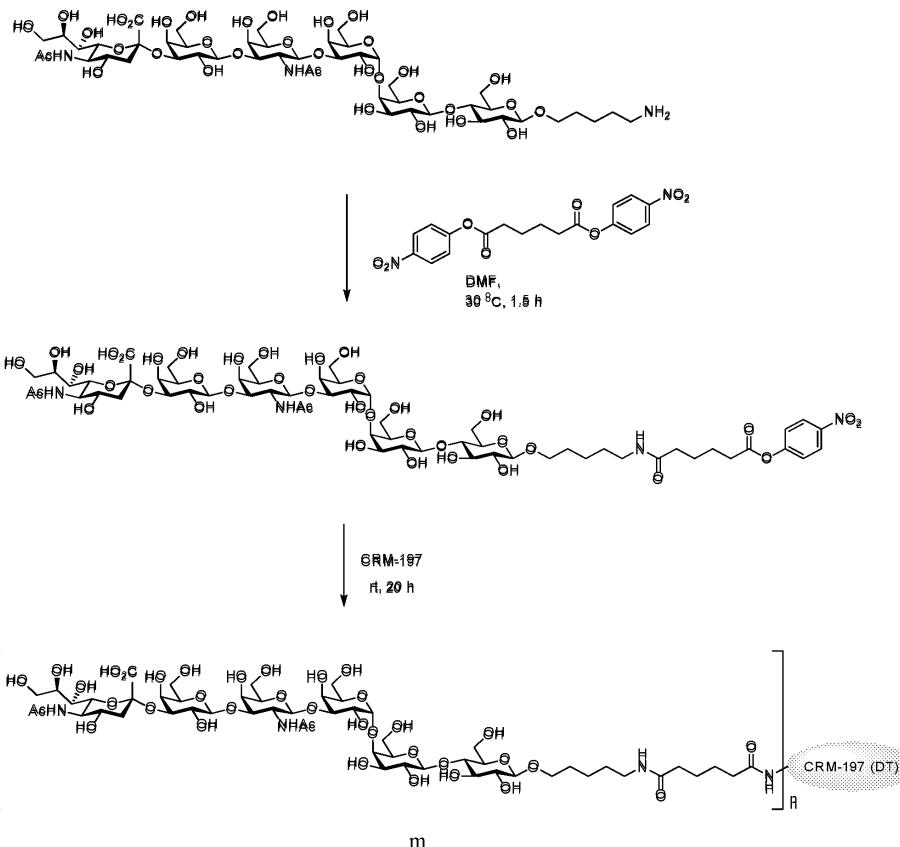
SSEA-4-NH<sub>2</sub> 제조: 10 mg SSEA-4 항원을 1.5  $\mu$ L 트리에틸아민 (NEt<sub>3</sub>) 중 5.0 당량의 p-니트로페닐 에스테르와 함께 첨가함으로써 예시적인 샘플을 제조하였다. 30°C에서 1.5시간 동안 인큐베이션한 후, SSEA-4를 300  $\mu$ L 1% 아세트산 중에서 켄칭하였다. 최종적으로 SSEA-4 항원을 0.22  $\mu$ m 필터를 통해 여과하고, 0.1% 아세트산 중에서 동결건조시켰다.

[0148]

SSEA-4-KLH 접합: 동결건조된 SSEA-4-NH<sub>2</sub>를 DMF 중에 용해시키고, pH 8.0에서의 KLH (포스페이트 완충 염수 용액, PBS 중에 용해됨)와 혼합하였다. 실온에서 16시간 동안 인큐베이션한 후, SSEA-4-KLH 혼합물을 MAP-TFF 시스템에 의해 정제하고, 저장 완충제를 DMF에서 PBS로 교환하였다.

[0149]

하나의 예시적 실시양태에서, SSEA-4-DT의 화학적 합성은 하기 일반적 단계를 포함한다:



[0150]

[0151]

SSEA-4-NH<sub>2</sub> 제조: 10 mg SSEA-4 항원을 2 μL 트리에틸아민 (NET3) 중 5.0 당량의 p-니트로페닐 에스테르와 함께 첨가함으로써 예시적인 샘플을 제조하였다. 30°C에서 1.5시간 동안 인큐베이션한 후, SSEA-4를 300 μL 1% 아세트산 중에서 켄칭하였다. 최종적으로 SSEA-4 항원을 0.22 μm 필터를 통해 여과하고, 0.1% 아세트산 중에서 동결건조시켰다.

[0152]

SSEA-4-DT 접합: 동결건조된 SSEA-4-NH<sub>2</sub> 링커를 DMF 중에 용해시키고, pH 9.5에서의 디프테리아 독소 교차-반응 물질 197 (DT-CRM 197) (포스페이트 완충 염수 용액, PBS 중에 용해됨)과 혼합하였다. 실온에서 20시간 동안 인큐베이션한 후, SSEA-4-DT 혼합물을 MAP-TFF 시스템에 의해 정제하고, 저장 완충제를 DMF에서 PBS로 교환하였다. SSEA-4-DT 및 SSEA-4-KLH 조성물의 요약을 표 3에 제시하였다.

[0153]

표 3: SSEA-4-DT 및 SSEA-4-KLH 당접합체의 요약

	SSEA-4-DT (로트 번호 LN-0189037)	SSEA-4-KLH (로트 번호 RD-BK-160707-01)
리신의 수	39	3000
단백질 농도	2.8 mg/mL	3.09 mg/mL
탄수화물 농도	0.376 mg/mL	0.277 mg/mL
에피토프 비	6.75	665
분자량	단량체: 65.36 kDa	≤ 3량체: 68.5% 10량체: 30.58% ≥ 20량체: 0.92%

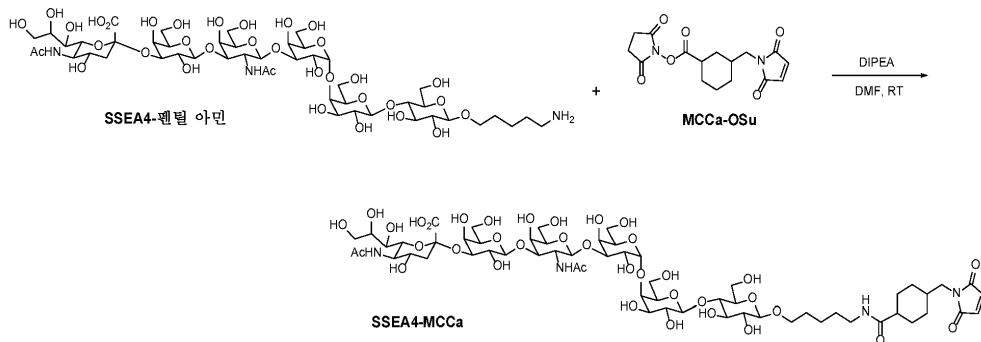
[0154]

[0155]

실시예 2: 본 발명의 당접합체 (SSEA-4-MCCa-KLH, 글로보 H-MCCa-KLH 및 SSEA-3-MCCa-KLH)의 제조

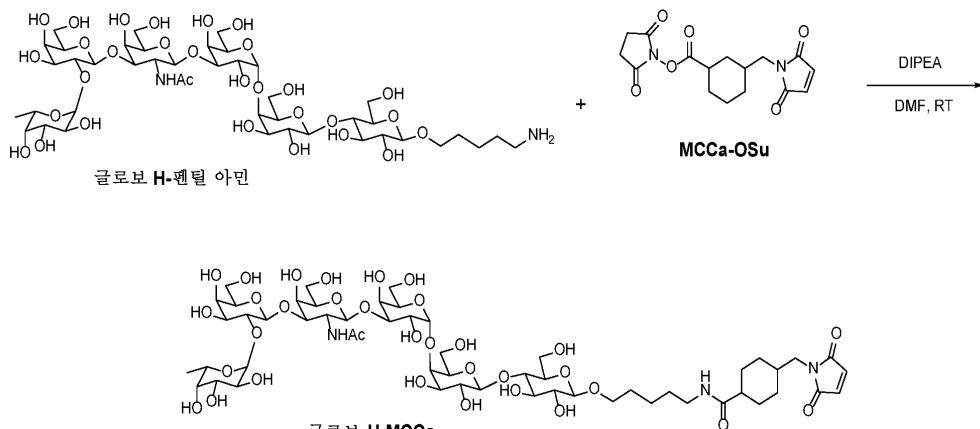
[0156] 1. 예시적인 당-MCCa 화합물을 제조하기 위한 일반적 절차

[0157] 아민 기질 (글로보 H-펜틸 아민, SSEA-3-펜틸 아민 또는 SSEA-4-펜틸 아민), MCCa-OSu 및 DIPEA를 주위 온도에서 DMF 중에 혼합하였다. 반응 조물질을 2시간 동안 교반하였다. 반응이 TLC 모니터링에 의해 완료된 것으로 평가된 후, 이어서 반응물을 냉각시키고, 중화하고, 물에 의해 켄칭하였다. 이어서 생성된 혼합물을 정제를 위해 RPC18 겔의 패드 상에 첨가하였다. RPC18 겔을 통한 크로마토그래피 정제 후, 수집된 분획을 회전-증발기 및 고-진공 시스템에 의해 농축시켜 예상된 당-MCCa 화합물을 백색 고체로서 수득하였다. 수율은 대략 65~80%이다.



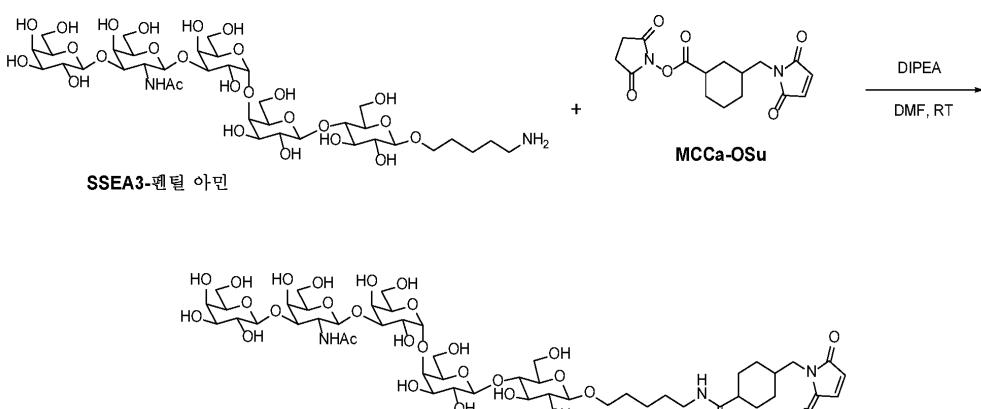
[0158]

[0159] SSEA-4-MCCA의 제조



[0160]

[0161] 글로보 H-MCCA의 제조



[0162]

[0163] SSEA-3-MCCA의 제조

[0164] 2. 예시적인 당-MCCa-KLH 접합 생성물을 제조하기 위한 일반적 절차

[0165] KLH를 변형된-KLH 중간체로 화학적으로 변형시킨 다음, 낮은 산소 수준 환경에서 당-MCCa에 접합시켜 조 당-

MCCa-KLH 접합 생성물을 수득한다.

[0166] 단계 1. KLH의 티올화

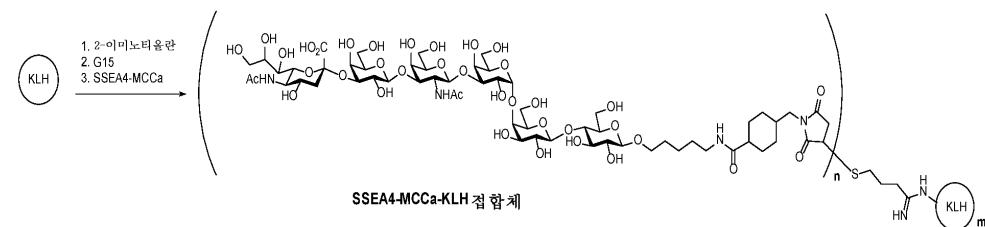
[0167] 완충제-교환된 KLH를 불활성 기체로 페징하였다. 페징 후, 2-이미노티울란 히드로클로라이드 (2-IT)를 불활성 기체 보호 하에 KLH에 첨가하였다. 반응물을 18°C에서 35분 동안 교반하였다. 35분 동안 교반한 후, 반응 조물질을 칼럼 크로마토그래피 정제를 위해 제조된 G-15 칼럼 상에 신속히 로딩하였다. 수집된 분획을 샘플링하고, BCA 플롯 및 엘만 플롯에 의해 시험하여 생성물을 확인하였다. 풀링된 단백질 중간체인 변형된-KLH를 바로 엘만 검정 및 BCA 검정을 위해 샘플링하여 SH 값 및 단백질 함량을 결정하였다. PBS 완충제를 수집된 변형된 KLH에 첨가하여 단백질의 농도를 약 0.6~1.0 mg/mL로 조정하였다.

[0168] 단계 2. 중간체의 접합

[0169] 제조된 중간체 화합물 (당-MCCA)을 PBS 완충제 중에 용해시켰다. 이 중간체를 변형된-KLH 병 안으로 순차적으로 옮겼다. PBS 완충제 용액을 첨가하여 당 병을 행군 다음, 이 용액을 접합 반응물로 옮겼다. 혼합한 후, 반응 조물질을 처음 30분, 및 이어서 1시간, 1.5시간, 2시간 및 3시간에 샘플링하여 #SH 값을 모니터링하였다. #SH 값이 200보다 낮은 경우에, 당-MCCA-KLH 접합체를 후속 작업 단계를 위해 동결기에 저장하였다.

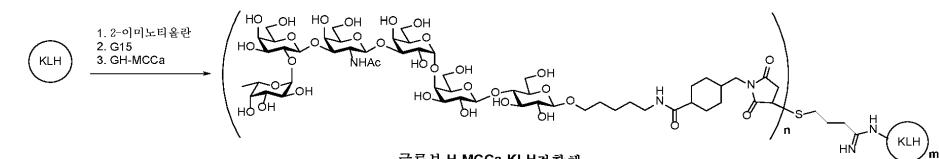
[0170] 단계 3. 정제에 의해 예상된 당-MCCA-KLH 접합 생성물 수득

[0171] 당-MCCA-KLH 조물질을 10배 부피에 대해 pH 7.2 PBS를 사용하여 TFF 시스템 여과 또는 원심분리의 여과에 의해 정제하였다. 여과물 용액을 수집하고, HPLC 분석을 위해 샘플링하였다. 정제된 당-MCCA-KLH를 추가의 방출 시험을 위해 동결기에 일시적으로 저장하였다.



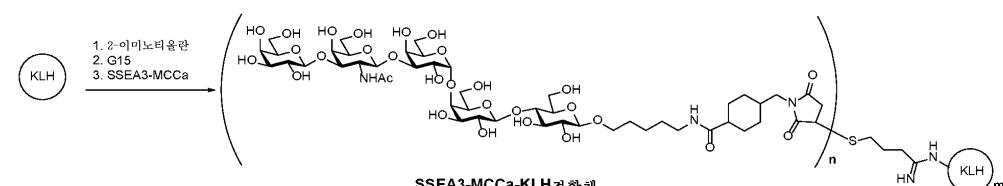
[0172]

[0173] SSEA-4-MCCA-KLH 접합체의 제조



[0174]

[0175] 글로보 H-MCCA-KLH 접합체의 제조



[0176]

[0177] SSEA-3-MCCA-KLH 접합체의 제조

[0178]

실시예 3: 당접합체 중 예시적인 글로보-시리즈 항원 (SSEA-4, 글로보 H 및 SSEA-3) 대 KLH의 에피토프 비의 분석

[0179]

KLH 이십량체 (자연적으로 응집된 형태)의 분자량은 대략 7.5 MDa ~ 8.6 MDa이다. 천연 KLH는 대략 8.6 MDa의 분자량을 갖는 것으로 확인되었다.

[0180]

KLH 및 글로보 시리즈 항원-KLH 당접합체 (SSEA-4-MCCA-KLH, 글로보 H-MCCA-KLH 및 SSEA-3-MCCA-KLH)의 질량 분포를 다중-각도 레이저 산란 분광계를 사용하는 크기 배제 크로마토그래피 (SEC-MALS)에 의해 추정 및 유도하

였다. 도 1a에서, KLH의 다량체 ( $n>7-20$ ) 및 올리고머 ( $n>20$ )가 관찰되었다. 도 1b는 이십량체의 피크 면적이 78.48%였고 멀티-데카머가 20.31%였다는 것을 제시하였다. KLH의 평균 관찰된 분자량 (MW)은 7476 kDa이었다. 도 2a는 사량체 ( $n=3$ )가 SSEA-4-MCCA-KLH 당접합체의 주요 성분 (58.7%)이었다는 것을 제시하였다. 유사하게, 도 2b (글로보 H-MCCA-KLH 당접합체) 및 도 2c (SSEA-3-MCCA-KLH 당접합체)는 또한 사량체 ( $n=3$ )가 글로보 H-MCCA-KLH 당접합체의 주요 성분 (58.9%) 및 SSEA-3-MCCA-KLH 당접합체의 주요 성분 (61.3%)이었다는 것을 제시하였다. 글로보 시리즈 항원 접합된 KLH 백신의 요약을 표 4에서와 같이 제시하였다.

표 4: 대표적인 예시적인 글로보 시리즈 항원 접합된 KLH 백신의 배치 분석 요약

명칭 (로트 번호)	SSEA-4-MCCA-KLH (RD-BK-170323)	글로보 H-MCCA-KLH (RD-BK-170307)	SSEA-3-MCCA-KLH (RD-BK-170317)
리신의 수	3000	3000	3000
단백질 농도	2.54 mg/mL	2.85 mg/mL	2.00 mg/mL
탄수화물 농도	0.498 mg/mL	0.657 mg/mL	0.313 mg/mL
에피토프 비	1459	1953	1552
올리고머 분포	1-2량체: 22.0% 3량체: 58.7% 4-8량체: 17.0% ≥10량체: 2.3 %	1-2량체: 17.5% 3량체: 58.9% 4-8량체: 19.7% ≥10량체: 3.9%	1-2량체: 16.4% 3량체: 61.3% 4-8량체: 19.7% ≥10량체: 2.6%

[0182]

실시예 4: 마우스에서의 면역화를 위한 예시적인 글로보 시리즈 항원 당접합체 백신의 제조

[0183]

6 내지 8주령 암컷 C57BL/6 마우스를 바이오라스코로부터 입수하고, 각각 1가, 2가 또는 3가 백신 효력 검정을 위해 레벨 바이오테크 잉크 및 유로핀스 판랩스에서 연구를 수행하였다. 투여 적어도 1일 전에, 동물을 체중에 기반한 무작위화 과정에 의해 연구군으로 선택할 것이며, 각각의 군은 5마리 마우스를 함유한다.

[0184]

이후에, 글로보 시리즈 항원 당접합체 (글로보 H-KLH, SSEA-3-KLH, SSEA-4-KLH/DT) 및 아주반트 (OBI-821 또는 OBI-834)를 제0일, 제7일, 제14일, 제21일 ( $20 \mu\text{g}$  OBI-821 아주반트 사용) 또는 제0일, 제14일, 제28일 ( $40 \mu\text{g}$  OBI-834 아주반트 사용)에 마우스의 좌측 및 우측 복부 부위 둘 다에 피하로 (s.c) 투여하였다 ( $0.5-5 \mu\text{g}$ ;  $100 \mu\text{L}$ /부위). 전혈 샘플을 연구 동안 하기 시점에 수집할 것이다 (OBI-821 아주반트 사용): 면역전 (제0일, 투여 전), 제10일, 제17일, 제24일 및 제31일. 혈액 시편을 연구 동안 하악하 수집을 통해 취하고, 마지막 시점 제43일 혈액 수거를 위해서는 심장 천자를 사용할 것이다. OBI-834 아주반트의 경우, 전혈 샘플을 면역전 (제0일, 투여 전), 제21일, 제28일, 제38일 및 제50일에 수집할 것이다. 혈액을 항응고제 첨가 없이 수집하고, 15분 동안  $4^\circ\text{C}$ 에서  $1,500 \text{ g}$ 로의 원심분리에 의해 혈청을 얻을 것이다. 생성된 혈청 시편을 시편 수집 퓨브로 옮기고, 후속 글리칸 어레이 검정에 의해 결정되는 효력 검정을 위해  $-60$  미만 내지  $-80^\circ\text{C}$ 에서 저장할 것이다.

[0185]

실시예 5: 글리칸 어레이 검정

[0186]

본 개시내용에서의 예시적인 시험 플랫폼은 아그니티오 바이오아이씨 시스템 (분석기 BA-G2012, Cat# A12101 및 펌핑 기계 (펌핑 기계 BA-G2012, Cat# A15101))을 이용하였으며, 이는 마이크로유체 카트리지 내에서 자동적으로 ELISA 반응을 수행하였다. 각각의 카트리지는 마이크로유체 펌프 및 밸브의 어레이, 채널 네트워크, 시약 저장 저장소, 글리칸 어레이 반응 구역 및 폐기물 저장 저장소를 함유하였다. 시험을 수행하기 위해, 모든 시약 및 시험 샘플을 그의 각각의 저장소로부터 글리칸 마이크로어레이를 함유하는 반응 구역 내로 순차적으로 펌핑하여 화학 발광을 동반한 멀티플렉스화 ELISA 반응을 수행하였다. 결과 데이터를 동시에 포획하고, 아그니티오 사이언스 앤드 테크놀로지 잉크.에 의해 제공된 LabIT 소프트웨어에 의해 데이터 분석을 수행하였다. 본 개시내용에 따라 적합하게 구성된 아그니티오 바이오아이씨 시스템의 장비의 사양은 PCT 특허 출원 (W02017041027A1)에서 보고되었다.

[0187]

예시적인 실험 물질:

[0188]

1. 샘플 희석제 (바이오체크, Cat# MB10175).

[0190] 2. 글리칸 칩, 차단 완충제 (단백질-무함유 차단 완충제, 써모 피셔 사이언티픽 인크., Cat#37571), 접합체 완충제, 세척 완충제 [포스페이트-완충 염수 (써모 피셔 사이언티픽 인크., Cat#70011) 플러스 0.2% (vol/vol) 트윈 20 (제이.티. 베이커, Cat#JTB-X251-07)], 기질 완충제 (A) 및 기질 완충제 (B) [슈퍼시그널 ELISA 펜토 최대 감수성 기질, 써모 피셔 사이언티픽 인크., Cat#37074]를 갖는 OBI-868 글리칸 칩 키트 (아그니티오, Cat# MG03-IgG, MM03-IgM). 글리칸 칩을 개별적으로 SSEA-4, SSEA-3 또는 글로보 H로 코팅하였다.

[0191] 3. 2차 항체: 염소 항-마우스 IgG-HRP (KPL, Cat# 474-1806) 또는 염소 항-마우스 IgM-HRP (KPL, Cat# 074-1803).

[0192] 시약 제조:

[0193] 1. 각각의 혈청/혈장 샘플을 위해, 247.5  $\mu$ L의 샘플 희석제에 2.5  $\mu$ L의 샘플을 첨가하고 잘 혼합하여 100배 희석물을 제조하였다. (샘플 희석 배수: 50x, 100x, 200x, 300x, 1,000x 및 10,000x). 임의의 항-글로보-시리즈 IgG/IgM 평균 강도가 내부 표준 곡선의 최고점을 초과하는 경우에, 샘플의 1,000배 및/또는 10,000배 희석물을 제조하였다.

[0194] 2. 2차 항체 용액: 하기 표에 기재된 바와 같이 접합체 완충제를 사용하여 2차 항체의 연속 희석물을 제조하였다. 샘플을 각각의 첨가/희석 사이에 잘 혼합하였다.

[0195] 표 5: 2차 항체 용액 제조

2차 항체	희석	샘플로부터 취함	항체 ( $\mu$ L)	접합체 완충제 ( $\mu$ L)	최종 부피 ( $\mu$ L)
항-마우스 IgG-HRP	1000x	스톡 (1x)	2	1998	2000
항-마우스 IgM-HRP	50x	스톡 (1x)	2	98	100
	3000x	50x	30	1770	1800

[0196]

[0197] 3. 기질 제조: 각각의 칩에 대해, 기질 완충제 (A) 및 (B) 둘 다의 분취물 65  $\mu$ L를 사용하여 샘플을 제조하고, 잘 혼합하였다. 혼합된 기질은 각각의 시험 전에 신선하게 제조되어야 한다.

[0198] 검정 절차: 620 마이크로리터 세척 완충제를 어레이의 "세척" 홀에 첨가하였다. 다음에, 120  $\mu$ L 차단 완충제를 어레이의 "차단" 홀에 첨가하였다. 이 시점에서, 120  $\mu$ L 2차 항체 용액 및 100  $\mu$ L 혈청을 개별적으로 어레이의 "접합체" 및 "혈청" 홀에 첨가하였다. 마지막에, 120  $\mu$ L 혼합 기질 완충제를 10분간 어레이의 "기질" 홀에 첨가하였다. 글리칸 어레이를 30분 동안 가압하기 위해 아그니티오 바이오아이씨 펌핑 기계 상에 놓았다. 결합된 혈청을 아그니티오 바이오아이씨 분석기를 사용하여 가시화 모니터링하였다.

[0199]

데이터 분석을 하기 단계에 의해 수행하였다:

[0200] 1. Y-축 상의 각각의 IgG/IgM 농도 및 X-축 상의 총 IgG/IgM 농도 ( $\mu$ g/mL)에 대해 얻은 평균 강도를 플로팅함으로써 내부 곡선을 생성한다. 내부 곡선  $R^2$ 는  $>0.95$ 여야 한다.

[0201] 2. 내부 곡선의 각각의 세트 및 칩의 항-글로보 시리즈 IgG/IgM (항-SSEA-4, 항-SSEA-3 또는 항-글로보 H)에 대한 평균 강도를 계산한다. 항-글로보 시리즈 IgG/IgM의 평균 강도는 내부 곡선의 최고점을 초과하지 않아야 한다.

[0202] 3. 마이크로소프트 엑셀® 또는 동등한 어플리케이션을 사용하여 내부 곡선에 측정된 강도 (Y-축)를 플러그 인 함으로써 미지의 샘플 중 항체 강도를 계산한다.

[0203] 4. 희석된 샘플의 경우, 농도에 희석 배율을 곱하여 샘플 중 실제 IgG/IgM 농도를 얻음으로써 보상한다.

[0204] 5. 하기 식에 의해 상대 IgG/IgM 농도를 계산 및 보고한다:

[0205] 상대 IgG/IgM 농도 ( $\mu$ g/mL) = 계산된 IgG/IgM 농도  $\times 0.1$

[0206] 결과

[0207] 1. 1가 백신 효력 검정 (OBI-821 또는 OBI-834 아주반트와 조합된 SSEA-4-KLH 또는 SSEA-4-DT)

[0208] 도 3에 제시된 바와 같이, SSEA-4-KLH 백신 + OBI-821 아주반트 (도 3a) 및 SSEA-4-DT 백신 + OBI-821 아주반

트 (도 3b)로 처리된 마우스는 제10일에 각각 3가지의 상이한 예시적인 대표적인 백신 용량 (0.05, 0.5 및 5  $\mu$  g)에서 항-SSEA-4 IgM 수준과 반응하였다. 항-SSEA-4 IgM 수준은 제10일에서 제43일까지 그 수준을 유지하였다. 그러나, SSEA-4-DT 백신의 항-SSEA-4 IgM 수준은 SSEA-4-KLH 백신보다 더 낮았다. 유사하게, SSEA-4-DT 백신의 항-SSEA-4 IgG 수준은 SSEA-4-KLH 백신보다 더 낮았다 (도 3c 및 3d에 제시됨). 그것은 KLH가 DT보다 더 높은 항체 반응을 유도할 수 있는 더 우수한 담체 단백질이라는 것을 나타냈다.

[0209] 도 4에 제시된 바와 같이, SSEA-4-KLH 백신 + OBI-834 아주반트 (도 4a) 및 SSEA-4-DT 백신 + OBI-834 아주반트 (도 4b)로 처리된 마우스는 제21일에 각각 3가지의 상이한 예시적인 대표적인 백신 용량 (0.05, 0.5 및 5  $\mu$  g)에서 항-SSEA-4 IgM 수준과 반응하였다. 항-SSEA-4 IgM 수준은 제21일에서 제50일까지 그 수준을 유지하였다. 그러나, SSEA-4-DT 백신의 항-SSEA-4 IgM 수준은 SSEA-4-KLH 백신보다 더 낮았다. 유사하게, SSEA-4-DT 백신의 항-SSEA-4 IgG 수준은 SSEA-4-KLH 백신보다 더 낮았다 (도 4c 및 4d에 제시됨). 그것은 KLH가 DT보다 더 높은 항체 반응을 유도할 수 있는 더 우수한 담체 단백질이라는 것을 나타냈다.

[0210] 2. 효능을 입증하는 대표적인 2가 백신 효력 검정 (OBI-821 아주반트와 조합된 SSEA-4-KLH + 글로보 H-KLH)

[0211] 이전 결과에 따라, 본 발명자들은 하기 실험을 위해 KLH 및 OBI-821을 선택하였다. 도 5에 제시된 바와 같이, SSEA-4-KLH 백신 + OBI-821 아주반트로 처리된 마우스는 제10일에 항-글로보 H (도 5a), 항-SSEA-3 (도 5b) 및 항-SSEA-4 (도 5c) IgM 수준과 반응하였고, 각각 제10일에서 제43일까지 그 수준을 유지하였다. 유사하게, SSEA-4-KLH 백신 + OBI-821 아주반트로 처리된 마우스는 제10일에 항-글로보 H (도 5d), 항-SSEA-3 (도 5e) 및 항-SSEA-4 (도 5f) IgG 수준과 반응하였고, 각각 제10일에서 제43일까지 그 수준을 유지하였다.

[0212] 3. 효능을 입증하는 대표적인 3가 백신 효력 검정 (OBI-821 아주반트와 조합된 SSEA-4-KLH + 글로보 H-KLH + SSEA-3-KLH)

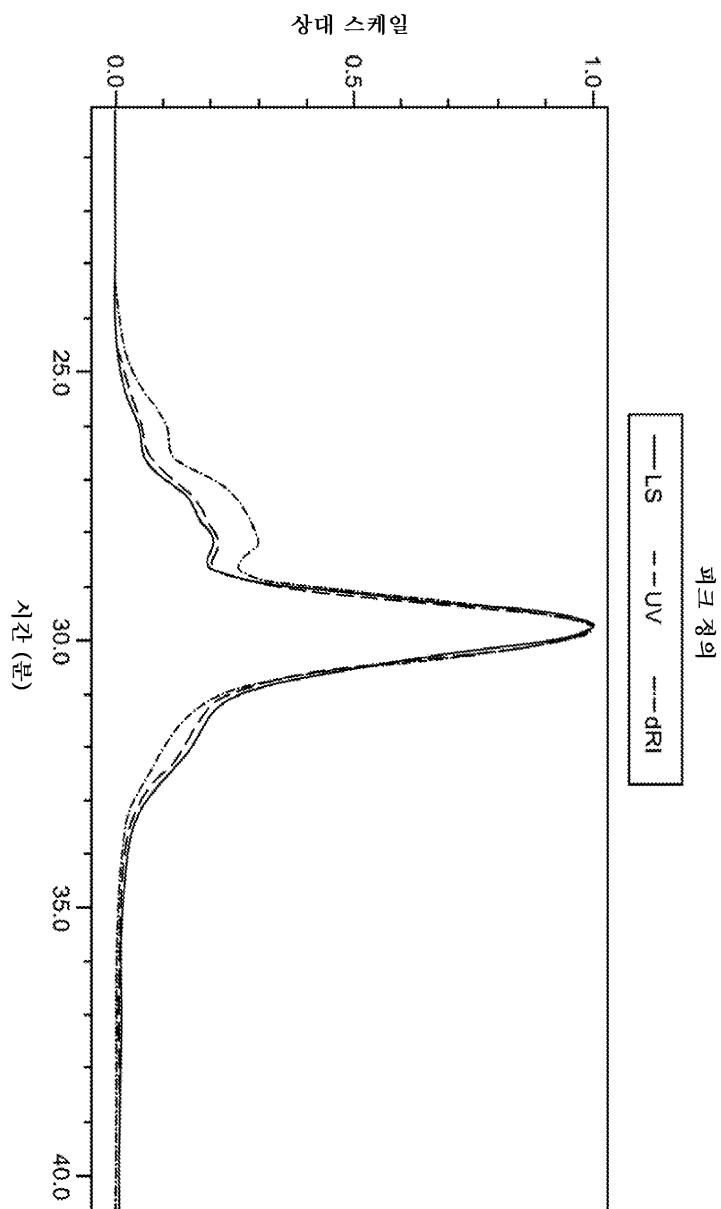
[0213] 최종적으로, 본 발명자들은 하기 검정을 위해 3가 백신 (SSEA-4-KLH + 글로보 H-KLH + SSEA-3-KLH)을 확립하였다. 도 6에 제시된 바와 같이, 3가 백신 + OBI-821 아주반트로 처리된 마우스는 제10일에 항-글로보 H (도 6a) 및 항-SSEA-4 (도 6b) IgM 수준과 반응하였다. 유사하게, 3가 백신 + OBI-821 아주반트로 처리된 마우스는 제10일에 항-글로보 H (도 6c) 및 항-SSEA-4 (도 6d) IgG 수준과 반응하였다. 이들 양성 결과는 글로보 시리즈 항원 (글로보 H, SSEA-3 및 SSEA-4)의 1가 또는 다가 백신의 면역원성을 나타냈다.

[0214] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어 및 임의의 두문자어는 본 발명의 분야에 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 정보를 전달하는 임의의 조성물, 방법, 키트 및 수단을 사용하여 본 발명을 실시할 수 있지만, 정보 전달을 위한 바람직한 조성물, 방법, 키트 및 수단이 본원에 기재되어 있다.

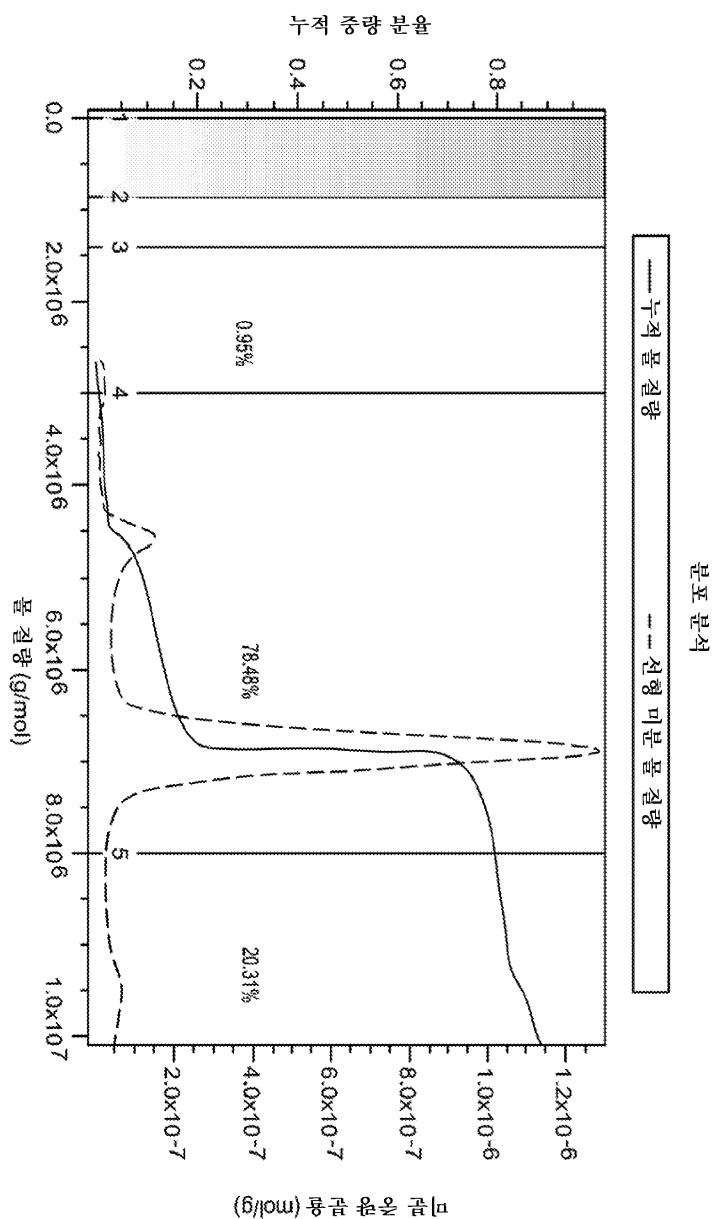
[0215] 본원에 인용된 모든 참고문헌은 법이 허용하는 최대 정도로 본원에 참조로 포함된다. 이를 참고문헌의 논의는 단지 그 저자에 의해 이루어진 주장을 요약하기 위한 것으로 의도된다. 임의의 참고문헌 (또는 임의의 참고문헌의 일부분)이 관련 선행 기술임을 인정하는 것은 아니다. 출원인은 임의의 인용된 참고문헌의 정확도 및 적절성에 대해 이의를 제기할 권리를 보유한다.

도면

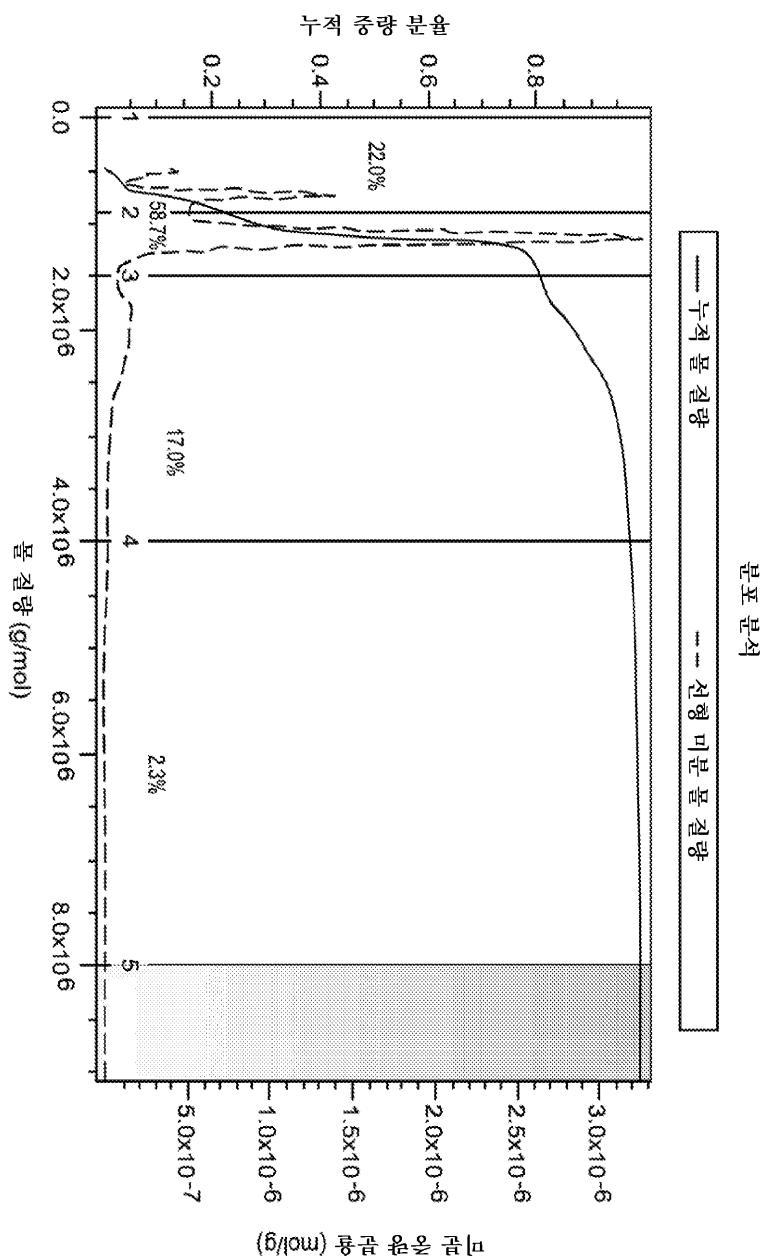
도면 1a



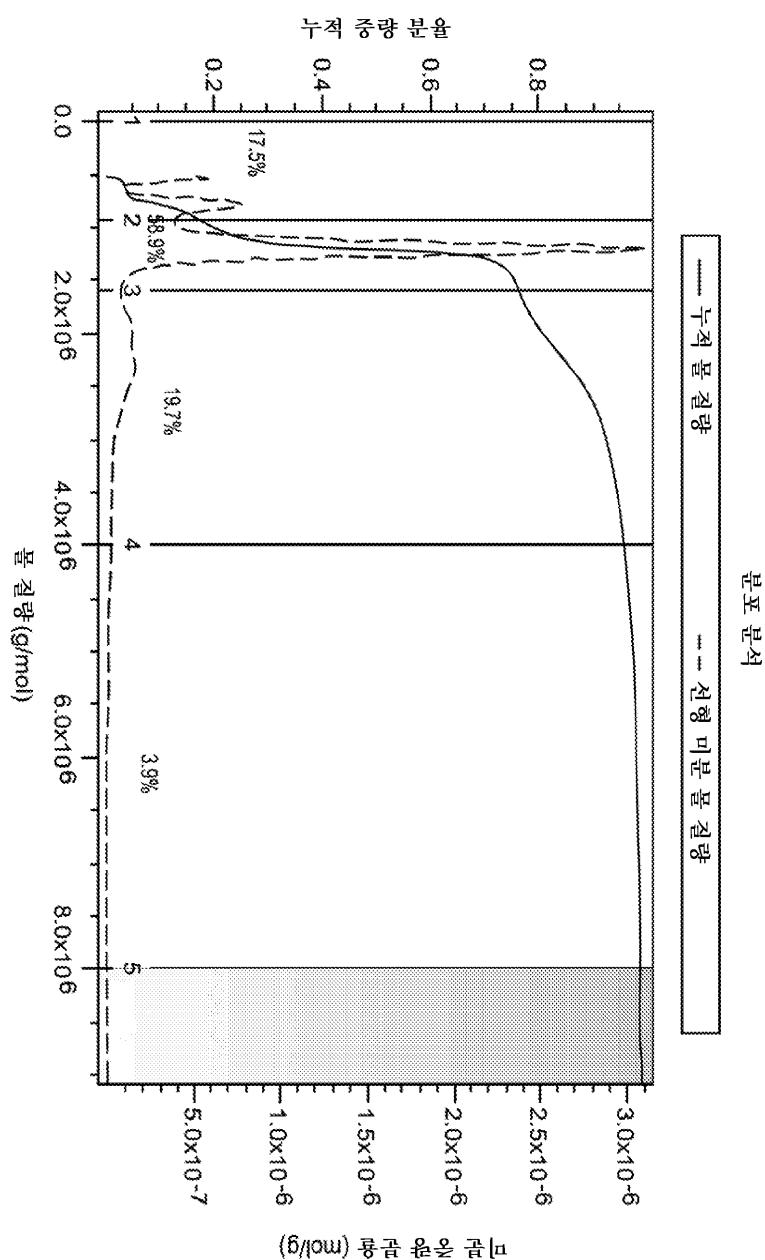
도면 1b



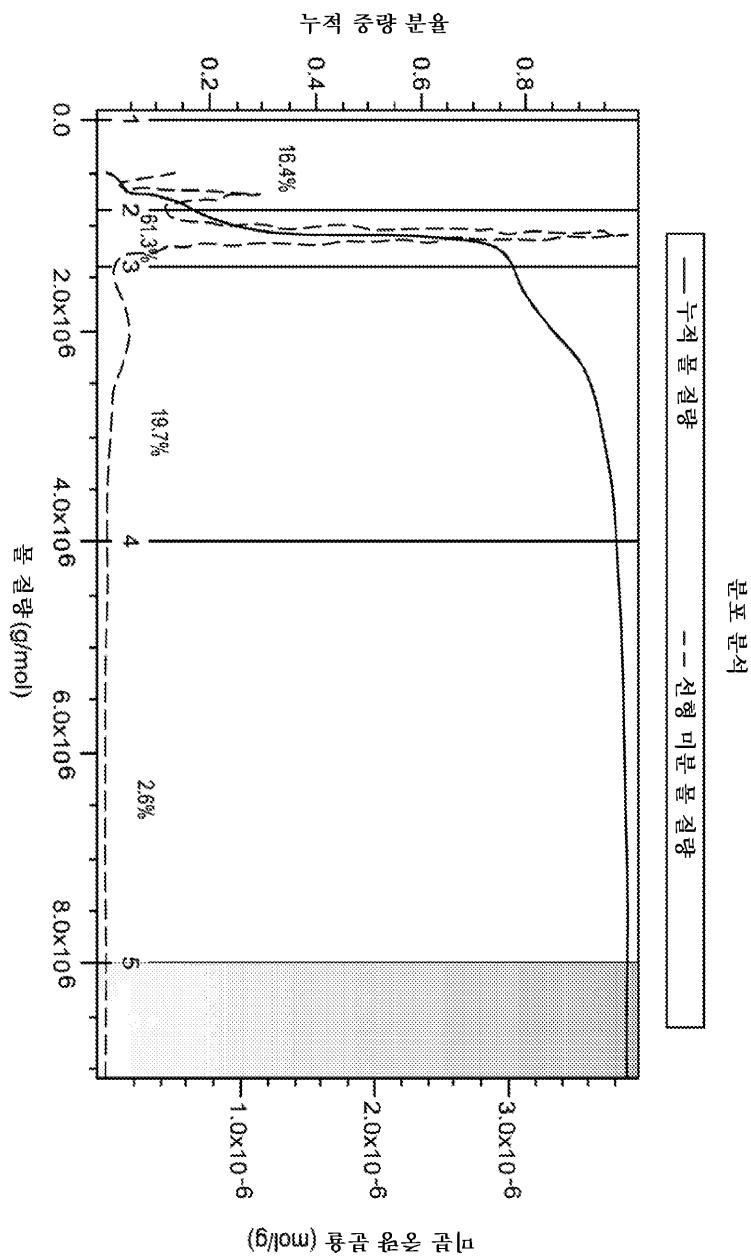
도면2a



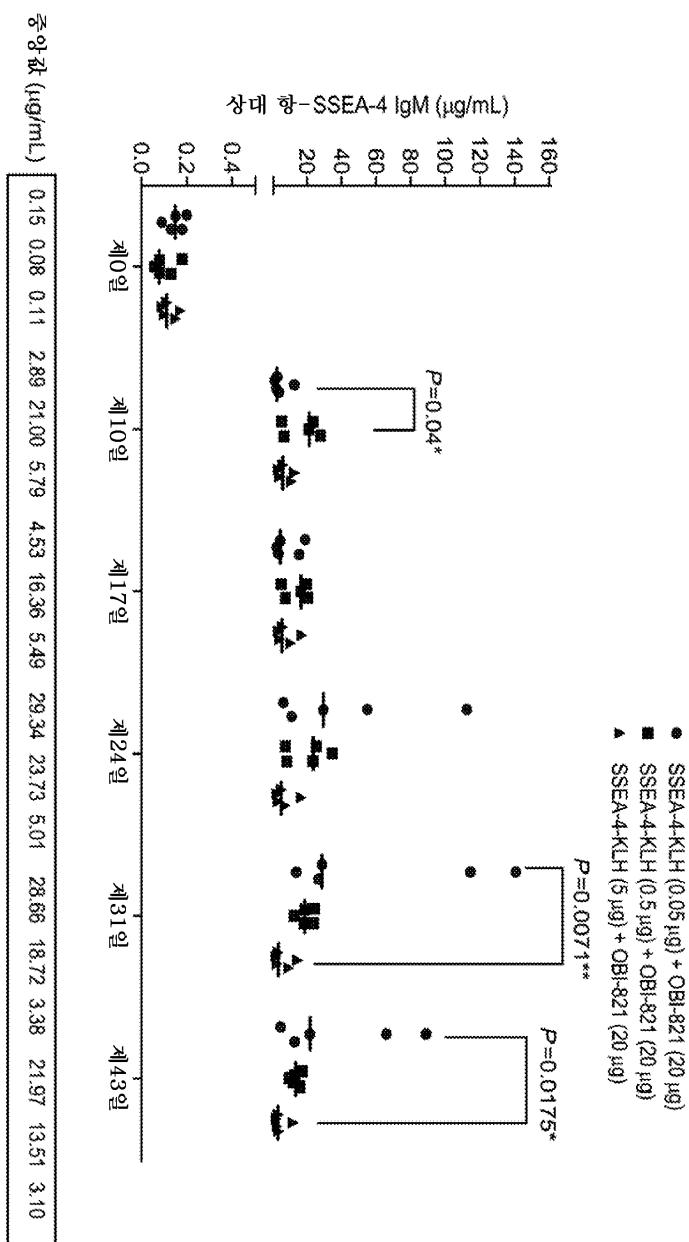
도면2b



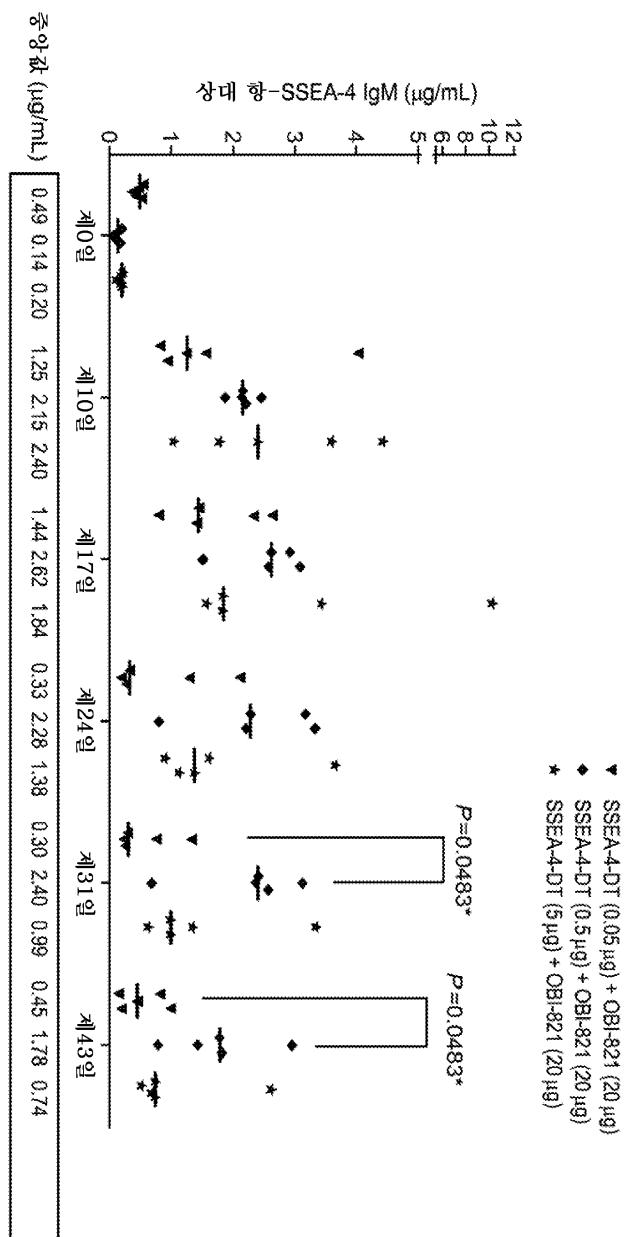
## 도면2c



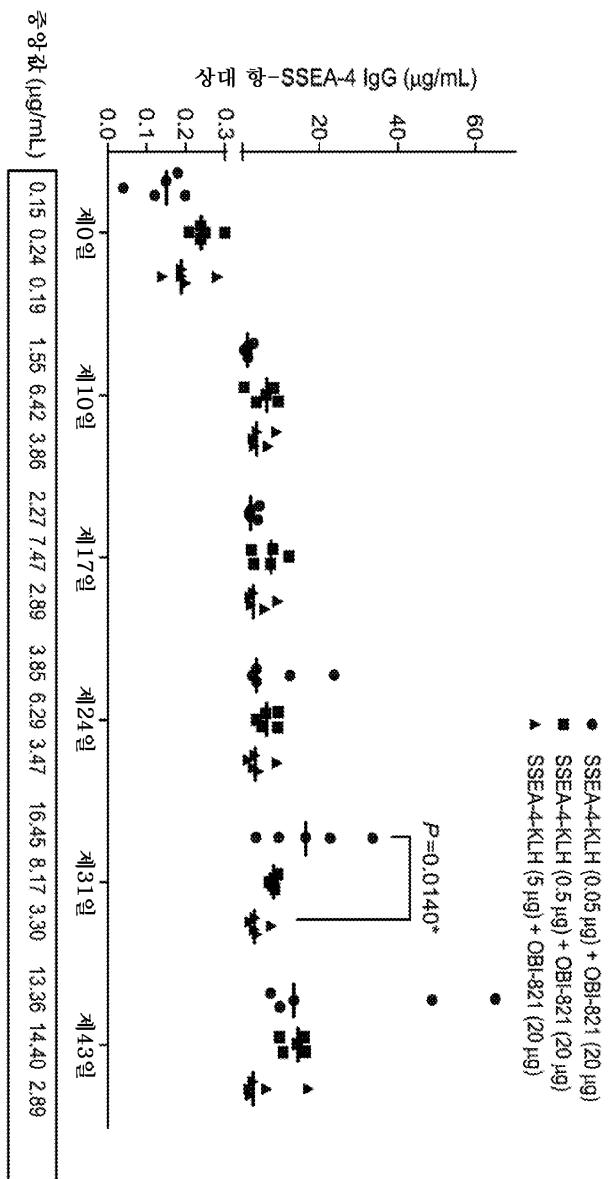
도면3a



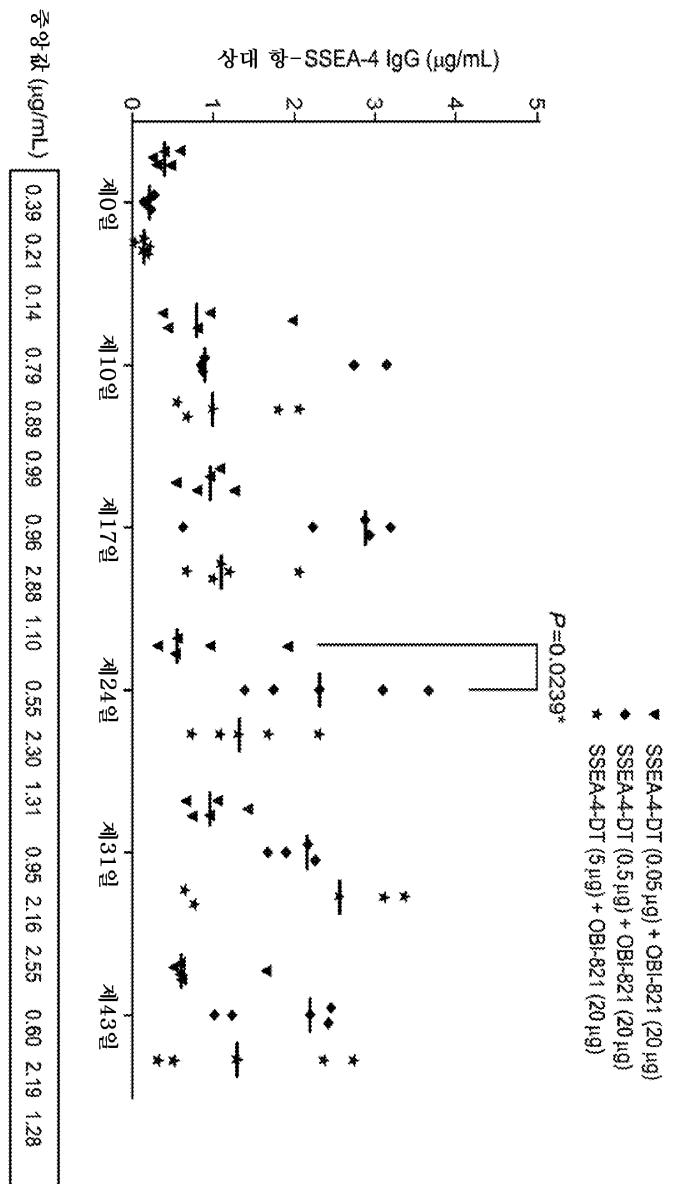
도면3b



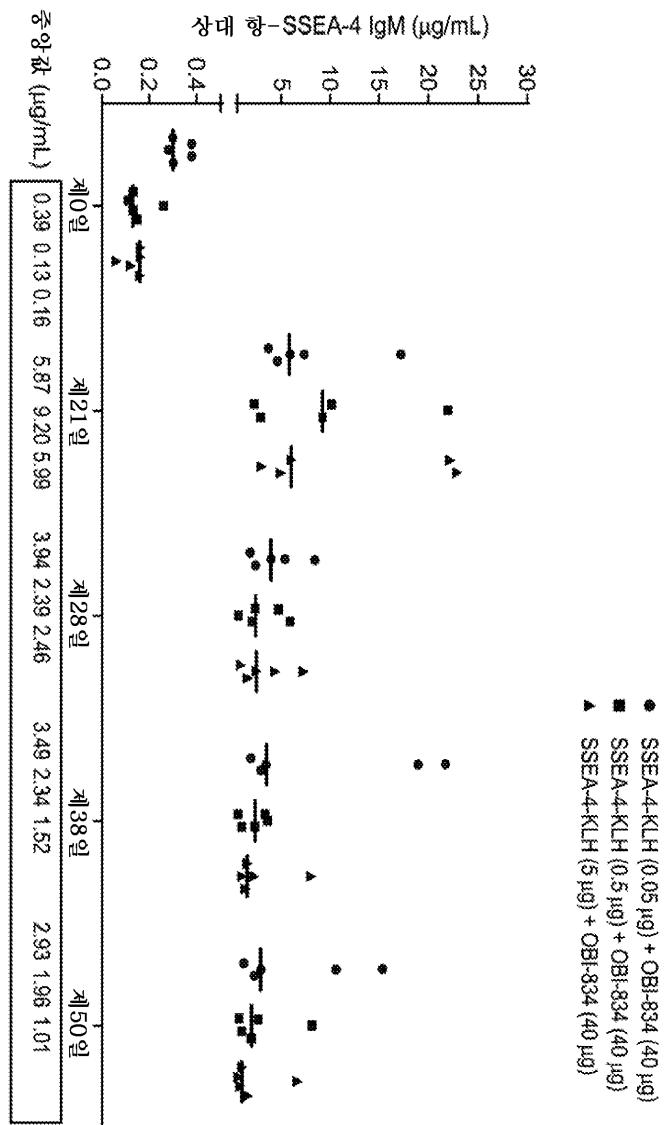
## 도면3c



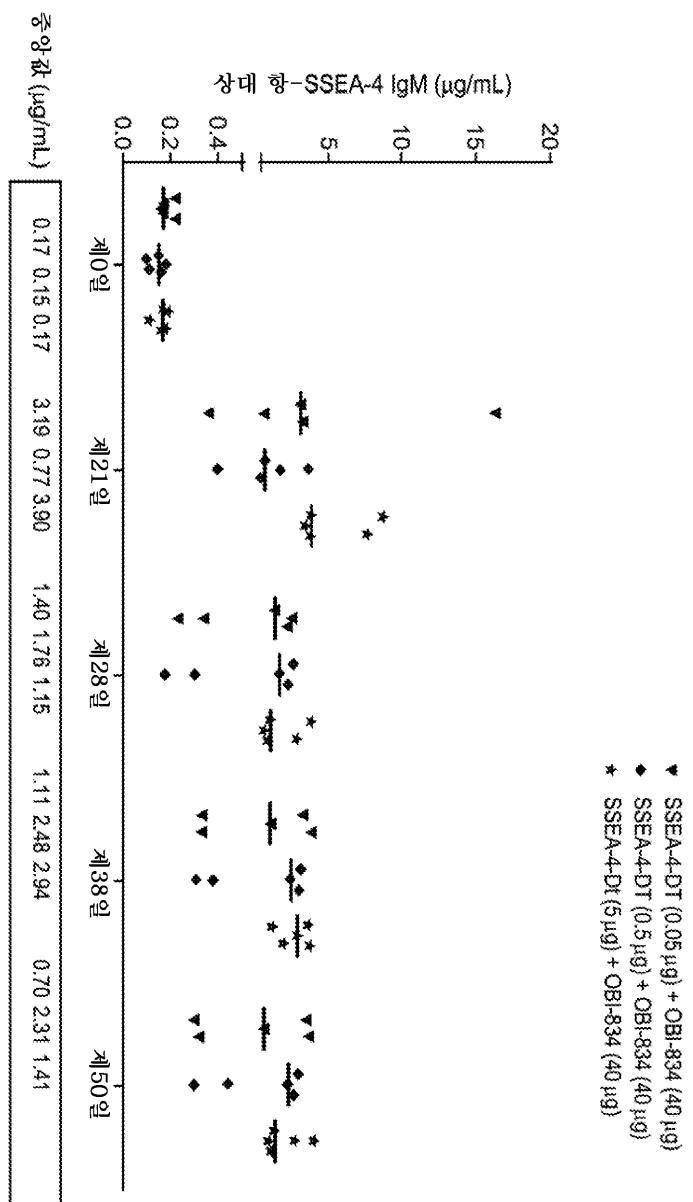
도면3d



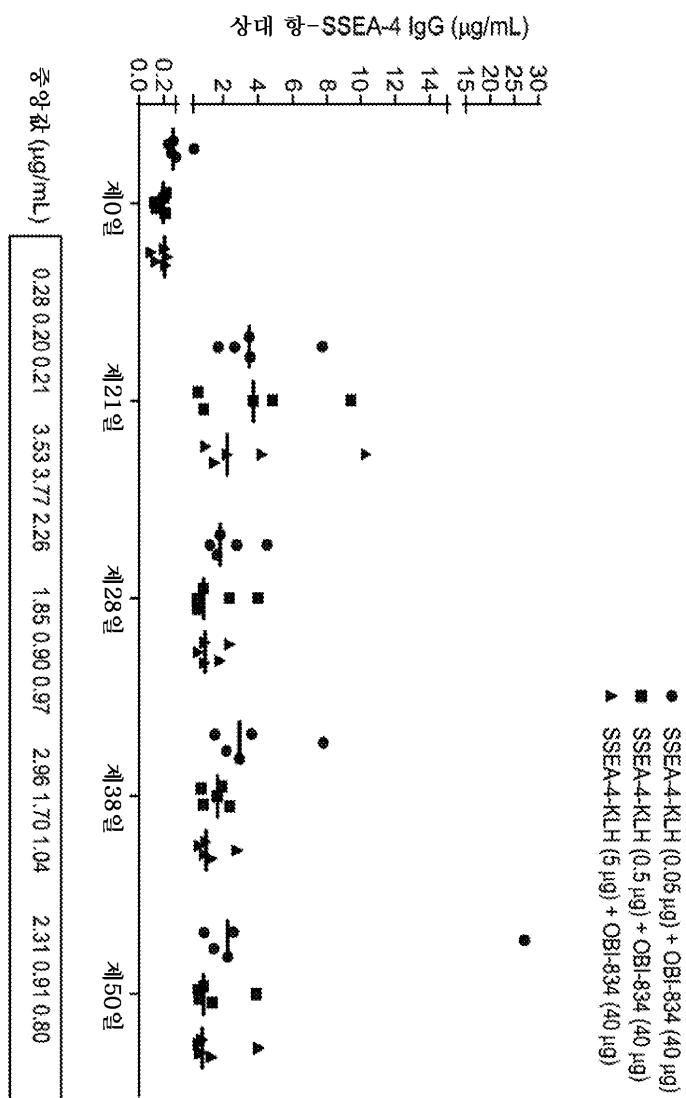
도면4a



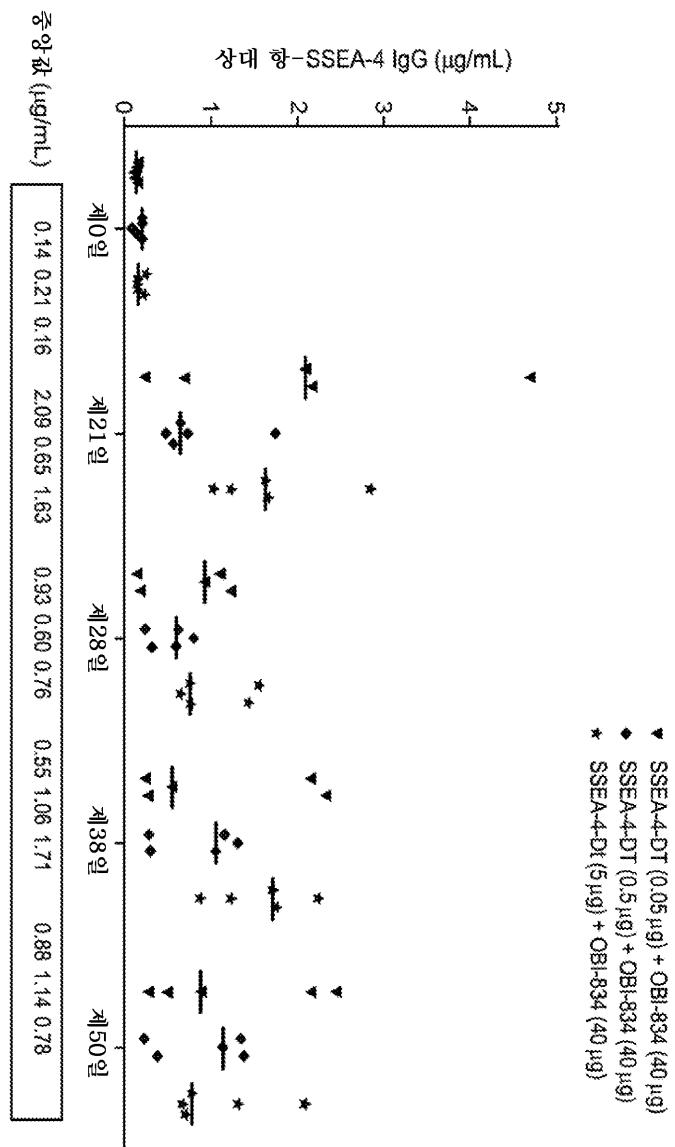
도면4b



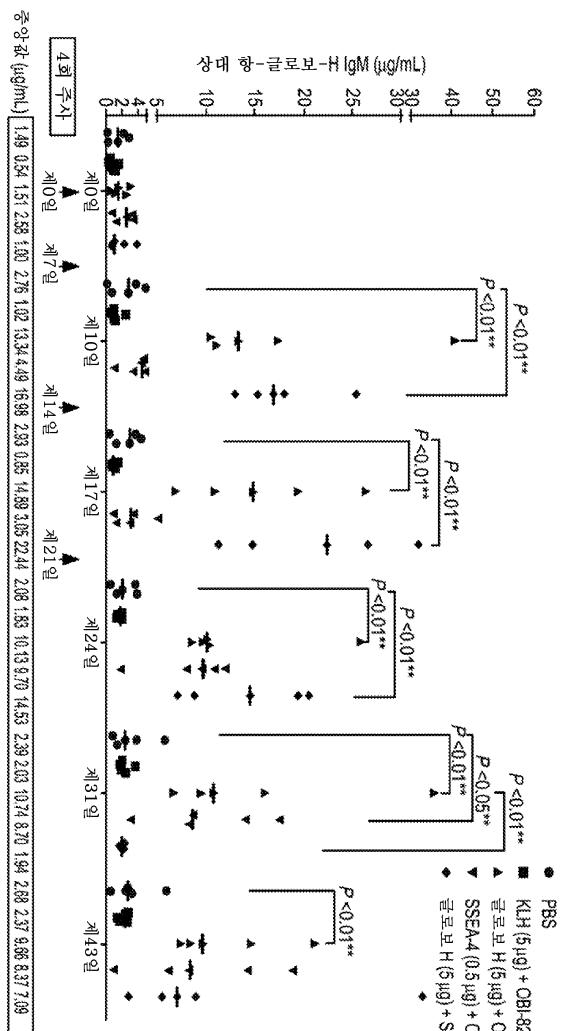
도면4c



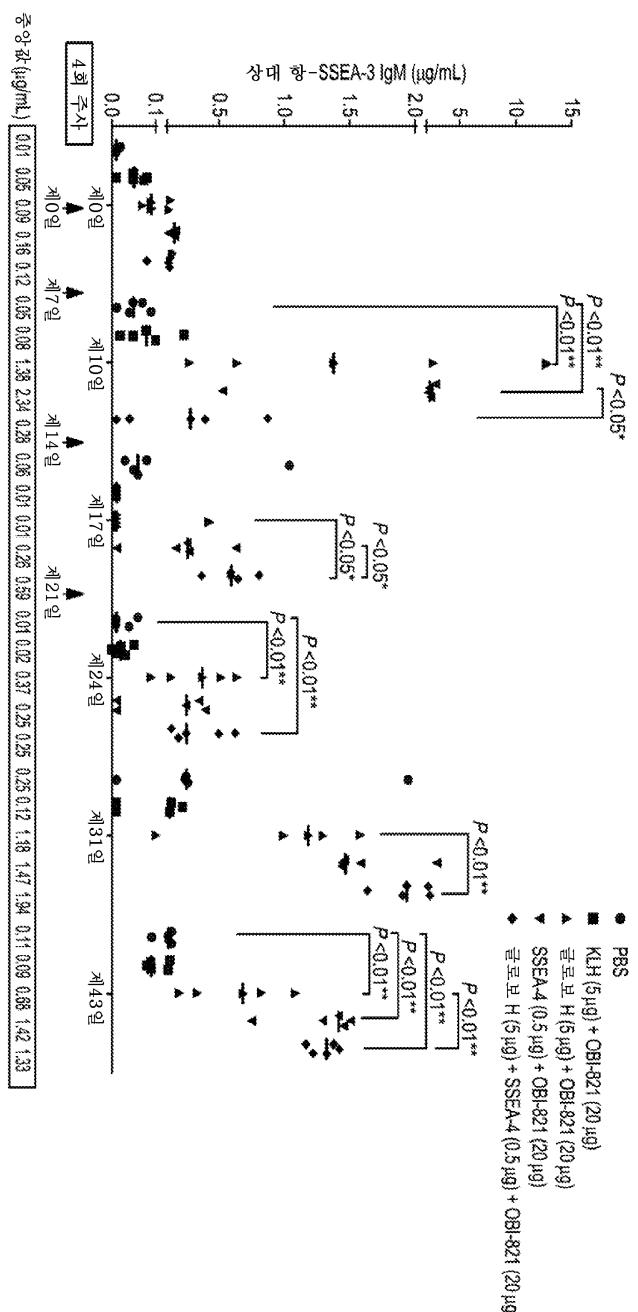
## 도면4d



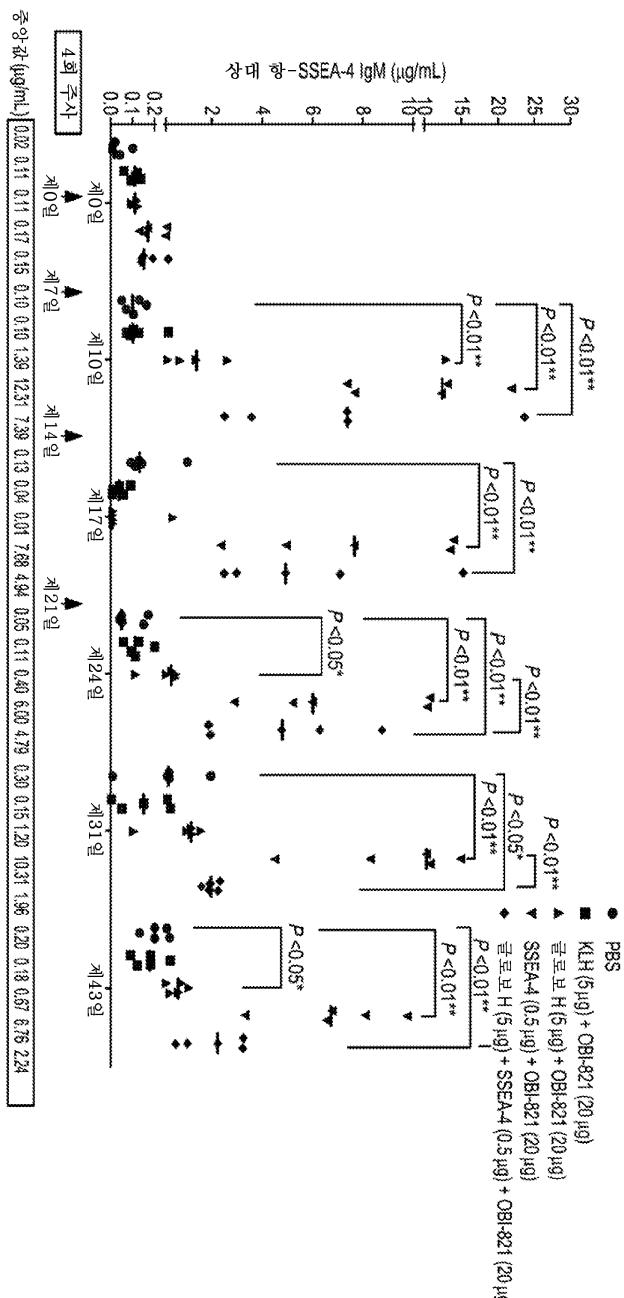
## 도면5a



## 도면5b

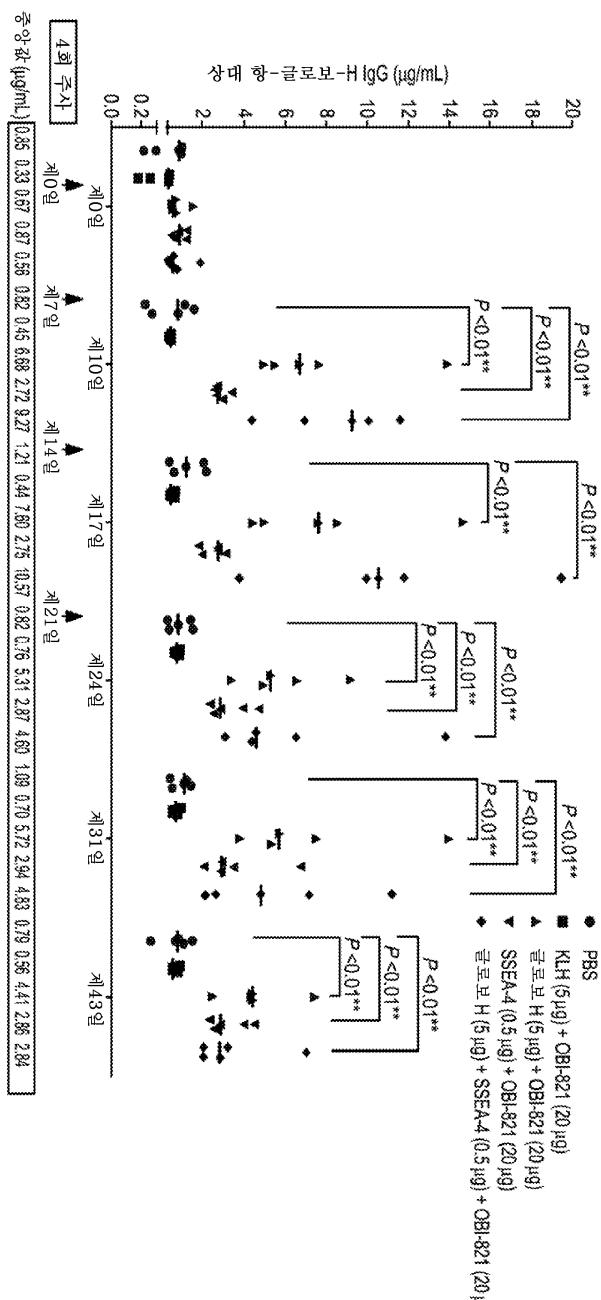


### 도면5c

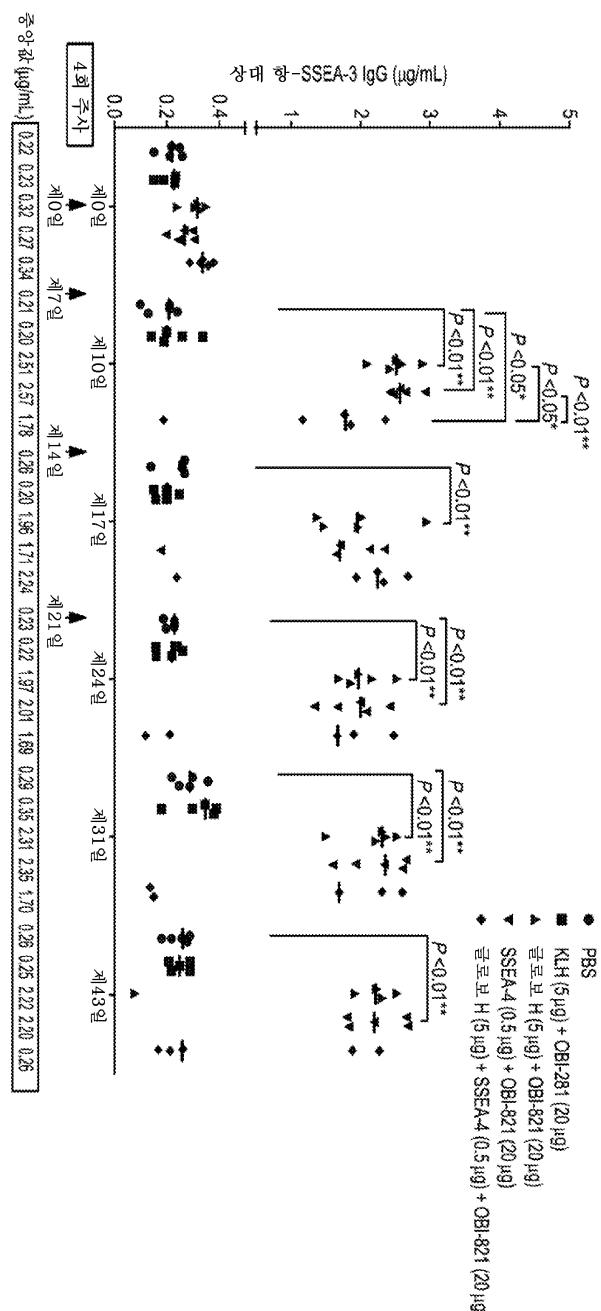


증양값( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	0.02	0.11	0.11	0.17	0.15	0.0	0.10	1.39	12.31	7.39	0.13	0.04	0.01	7.68	4.84	0.05	0.11	0.40	6.03	4.79	0.30	0.15	1.20	10.31	1.96	0.20	0.18	0.67	6.75	2.24
--------------------------------	------	------	------	------	------	-----	------	------	-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	------	------	------	------	------	------

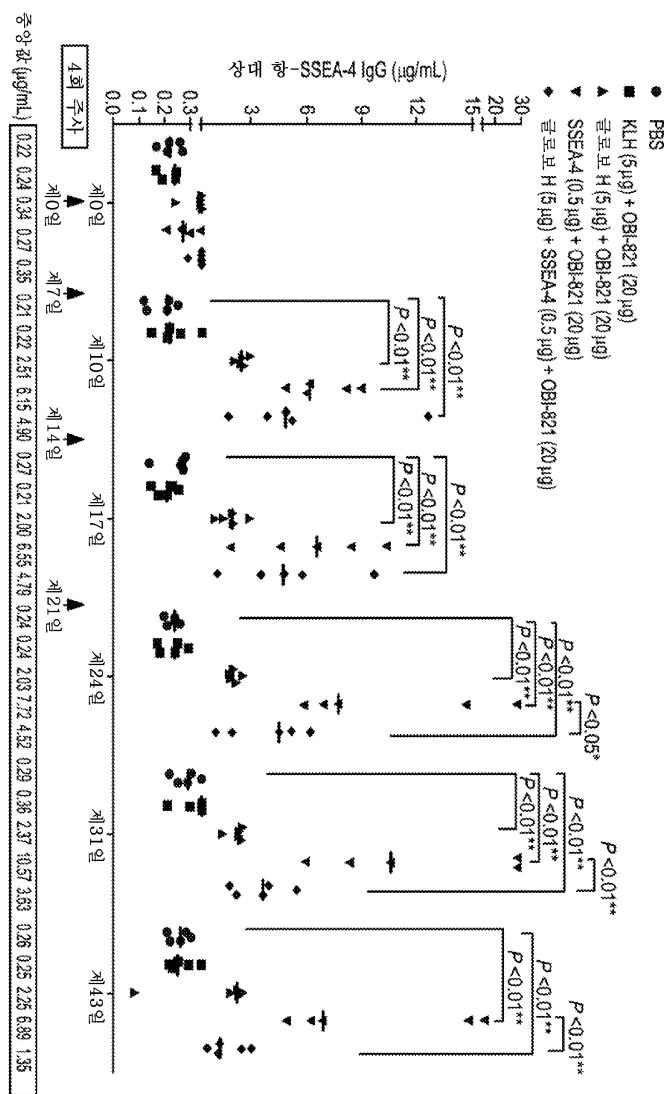
## 도면5d



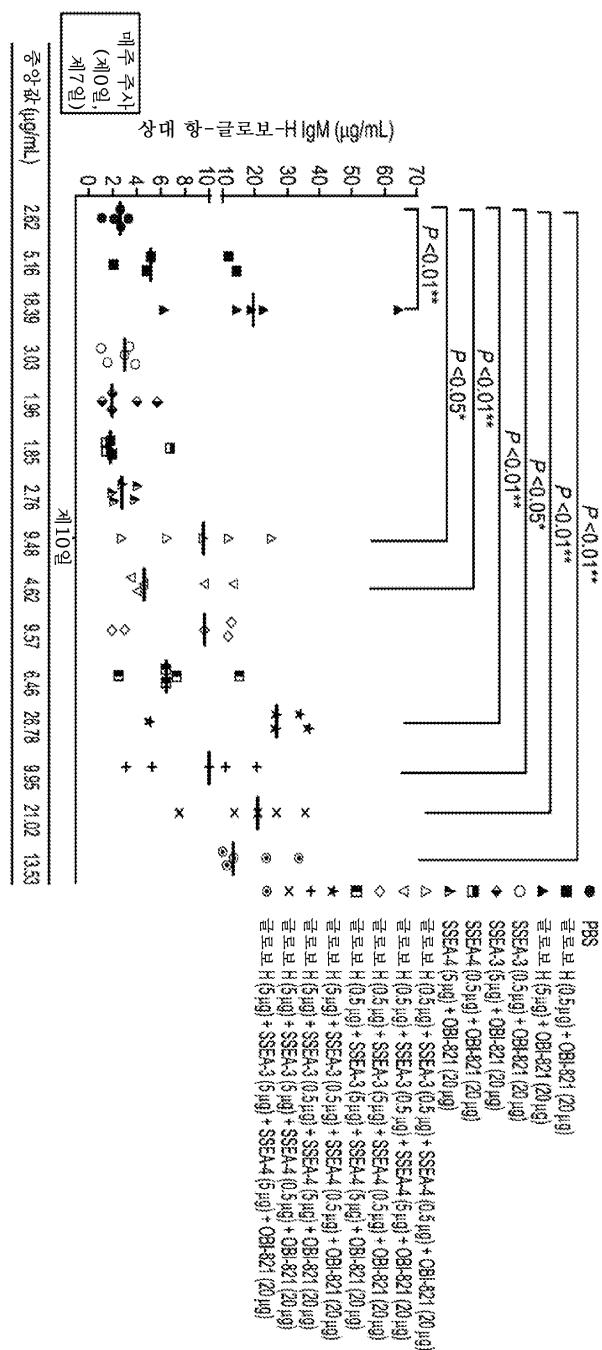
## 도면5e



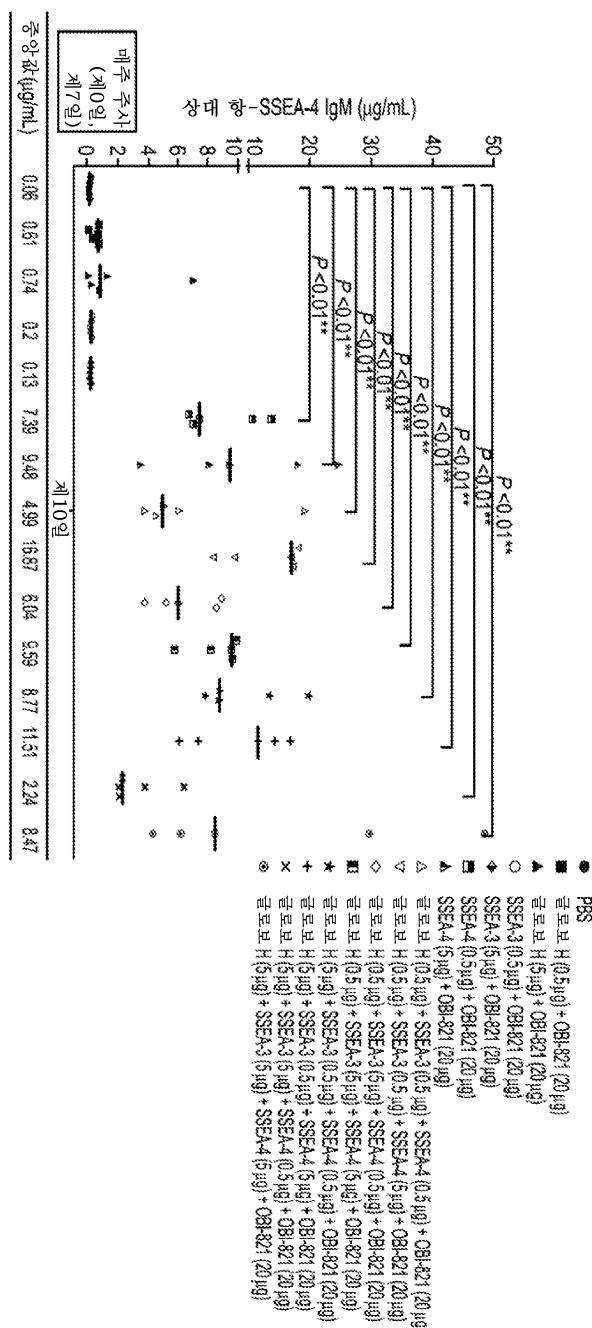
## 도면5f



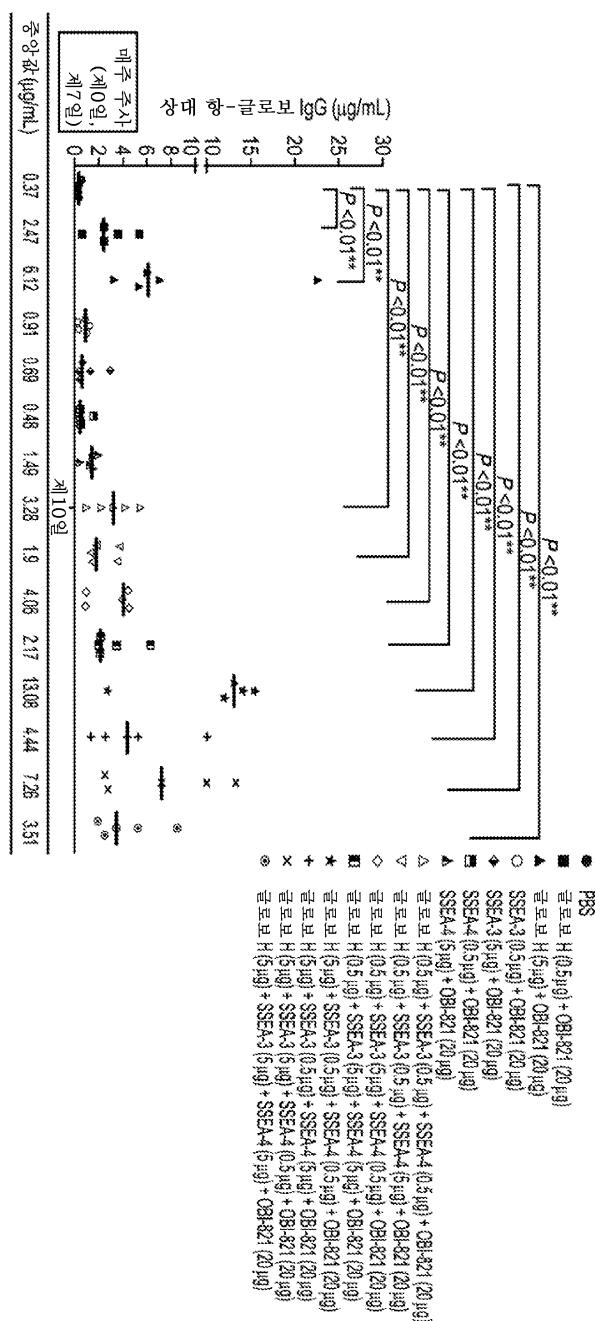
## 도면6a



### 도면 6b



## 도면6c



주제 (제7일)	상대 항-글로보 IgG (μg/mL)
제0일	0.37
제7일	2.47
제7일	6.12
제7일	0.91
제7일	0.83
제7일	0.48
제7일	1.46
제7일	3.28
제7일	1.9
제7일	4.06
제7일	2.17
제7일	13.08
제7일	4.44
제7일	7.26
제7일	3.51

## 도면 6d

