



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0098995  
(43) 공개일자 2019년08월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A61K 31/496** (2006.01) **A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
**A61K 31/496** (2013.01)  
**A61K 39/3955** (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7019763
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월08일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년07월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/065270
- (87) 국제공개번호 WO 2018/107004  
국제공개일자 2018년06월14일
- (30) 우선권주장  
62/497,949 2016년12월08일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인  
릭스트 바이오텍놀로지, 인코포레이티드  
미국, 뉴욕주 11733, 이스트 세토킷, 248 루트 2  
5에이 넘버 2  
더 유나이티드 스테이츠 오브 어메리카, 애즈 리  
프리젠티드 바이 더 세크러테리, 디파트먼트 오브  
헬쓰 앤드 휴먼 서비스
- 미합중국 메릴랜드 20892-7660 베데스다 엠에스씨  
7660 이그제큐티브 불르바드 6011 쇼트 325 오피  
스 오브 테크놀로지 트랜스퍼 내셔널 인스티튜츠  
오브 헬스
- (72) 발명자  
코바흐 존 에스.  
미국 뉴욕 11733 이스트 세타우켓 틴거 레인 6  
짱 쟁평  
미국 미들랜드 20814 베데스다 아우비노에 팜 드  
라이브 10411  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
장훈

전체 청구항 수 : 총 49 항

(54) 발명의 명칭 면역 반응의 조절을 위한 옥사바이사이클로헵坦

### (57) 요 약

본 발명은 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류

*A61K 45/06* (2013.01)  
*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 16/2818* (2013.01)  
*C07K 16/2827* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*A61K 2039/545* (2013.01)  
*A61K 2300/00* (2013.01)  
*C07K 2317/21* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)

(72) 발명자

**호 스제 첸 원순**

미국 메릴랜드 20892-7660 베데스다 앤에스씨 7660  
스위트 325 6011 엑시큐티브 블루바드 내셔널 인스  
티튜츠 오브 헬쓰 오피스 오브 테크놀로지 트랜스  
페 디파트먼트 오브 헬쓰 앤드 휴먼

**왕 해루이**

미국 메릴랜드 20892-7660 베데스다 앤에스씨 7660  
스위트 325 6011 엑시큐티브 블루바드 내셔널 인스  
티튜츠 오브 헬쓰 오피스 오브 테크놀로지 트랜스  
페 디파트먼트 오브 헬쓰 앤드 휴먼

**루 통즈**

미국 캘리포니아 94085 서니베일 샌 미겔 애비뉴  
695

(30) 우선권주장

62/465,001 2017년02월28일 미국(US)  
62/545,373 2017년08월14일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

유효량의 체크포인트 (checkpoint) 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상체를 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 대상체를 치료하는데 효과적인, 방법.

#### 청구항 2

체크포인트 억제제 단독에 비해 치료를 증진시키기에 효과적인 특정량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상체를 치료하고 체크포인트 억제제를 투여하는 방법.

#### 청구항 3

유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 또는 암을 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 종양 또는 암을 치료하는데 효과적인, 방법.

#### 청구항 4

암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키기에 효과적인, 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 특정량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상체에서 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는 방법.

#### 청구항 5

유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 T-세포 활성화를 증가시키는 것을 포함하는, 암에 걸린 대상체에서 T-세포 활성화를 증가시키는 방법.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물의 유효량 및 상기 체크포인트 억제제의 유효량이 각각 상기 대상체에게 주기적으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물의 유효량 및 상기 체크포인트 억제제의 유효량이 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여되는, 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제가 상기 PP2A 억제제와 동시에, 그 전에 또는 그 후에 투여되는, 방법.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 함께 투여될 때의 상기 체크포인트 억제제의 유효량 및 상기 화합물의 유효량이, 동량의 각각의 제제가 단독으로 투여될 때 보다 상기 대상체를 치료하기에 보다 효과적인, 방법.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 함께 투여될 때의 상기 화합물의 유효량 및 상기 체크포인트 억제제의 유효량이 상기 대상체에서 상기 암의 임상 증상을 감소시키는데 효과적인, 방법.

#### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 상기 체크포인트 억제제의 면역치료 효과를 증진시

키는, 방법.

### 청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 면역 반응에 의한 치료에 민감한, 방법.

### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제가 CTLA-4 제제인, 방법.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제가 이필리무맙 또는 트레멜리무맙인, 방법.

### 청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 억제제가 항-PD-1 또는 항-PD-L1 제제인, 방법.

### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제가 아테졸리주맙, 니볼루맙 또는 펜브롤리주맙인, 방법.

### 청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 흑색종, 신세포 암종, 전립선암, 요로상피 암종 또는 난소암인, 방법.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 암이 흑색종인, 방법.

### 청구항 19

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이  $0.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $0.83 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $1.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $1.75 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$  또는  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여되는, 방법.

### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 화합물이  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여되는, 방법.

### 청구항 21

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 3주마다 3일 동안 투여되는, 방법.

### 청구항 22

제14항에 있어서, 상기 이필리무맙이  $0.5 \text{ mg}/\text{kg} \sim 10 \text{ mg}/\text{kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여되는, 방법.

### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 이필리무맙이 3주마다 또는 그 미만으로 90분에 걸쳐 정맥내 투여되는, 방법.

### 청구항 24

제14항에 있어서, 상기 아테졸리주맙이  $0.1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 20 \text{ mg}/\text{kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여되는, 방법.

### 청구항 25

제22항에 있어서, 상기 아테졸리주맙이 3주마다 또는 그 미만으로 60분에 걸쳐 정맥내 투여되는, 방법.

**청구항 26**

제16항에 있어서, 상기 니볼루맙이  $0.1 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여되는, 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 니볼루맙이 2주마다 또는 그 미만으로 60분에 걸쳐 정맥내 투여되는, 방법.

**청구항 28**

제16항에 있어서, 상기 펌브롤리주맙이  $1 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여되는, 방법.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 상기 펌브롤리주맙이 3주마다 또는 그 미만으로 30분에 걸쳐 정맥내 투여되는, 방법.

**청구항 30**

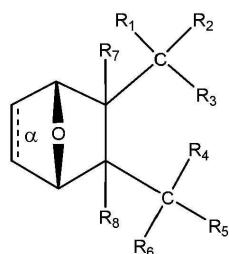
PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 CTLA-4의 기능을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제하는 방법.

**청구항 31**

PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 PD-1:PD-L1의 상호작용을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 PD-1:PD-L1의 상호작용을 억제하는 방법.

**청구항 32**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PP2A 억제제가 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는, 방법:



상기 구조에서,

결합 a는 존재하거나 부재하고;

R1과 R2는 함께  $=0^\circ$ 이고;

R3은  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^-$ ,  $\text{OR}_9$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_{1-6}\text{R}_9$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{S}^-$  또는  $\text{SR}_9$ 이고,

여기서,  $\text{R}_9$ 는  $\text{H}$ , 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 아릴이고;

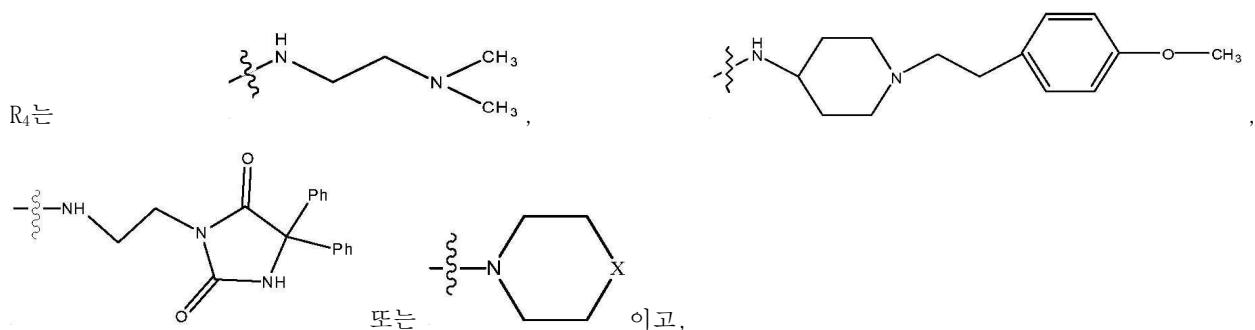
상기 구조에서,

결합 a는 존재하거나 부재하고;

R1과 R2는 함께  $=0^\circ$ 이고;

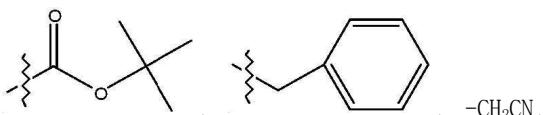
R3은  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^-$ ,  $\text{OR}_9$ ,  $\text{O}(\text{CH}_2)_{1-6}\text{R}_9$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{S}^-$  또는  $\text{SR}_9$ 이고,

여기서,  $\text{R}_9$ 는  $\text{H}$ , 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 아릴이고;



여기서,  $X$ 는  $O$ ,  $S$ ,  $NR_{10}$ ,  $N^+HR_{10}$  또는  $N^+R_{10}R_{10}O^-$ 고,

각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로  $H$ , 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴,  $-CH_2CO_2R_{11}$  또는  $-CH_2COR_{11}$ 이고,



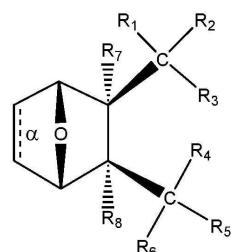
각각의  $R_{11}$ 은 독립적으로  $H$ , 알킬, 알케닐 또는 알키닐이고;

$R_5$ 와  $R_6$ 은 함께  $=O^-$ 고;

$R_7$  및  $R_8$ 은 각각  $H$ 이다.

### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조를 갖는, 방법:



### 청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 화합물에서의 결합  $\alpha$ 가 존재하는, 방법.

### 청구항 35

제32항 또는 제33항에 있어서, 상기 화합물에서의 결합  $\alpha$ 가 부재하는, 방법.

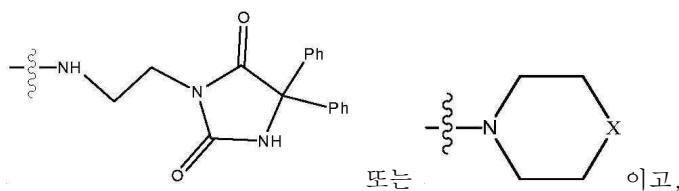
### 청구항 36

제32항 또는 제33항에 있어서,

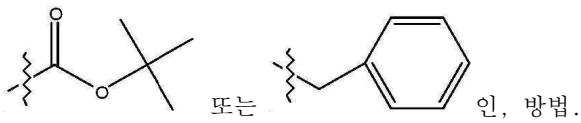
$R_3O^-$ ,  $OH^-$ ,  $O^-$  또는  $OR_9^-$ 이고,

여기서,  $R_9$ 는 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 아릴이고;





여기서, X는 O, S, NR<sub>10</sub>, N<sup>+</sup>HR<sub>10</sub> 또는 N<sup>+</sup>R<sub>10</sub>R<sub>10</sub>O이고,



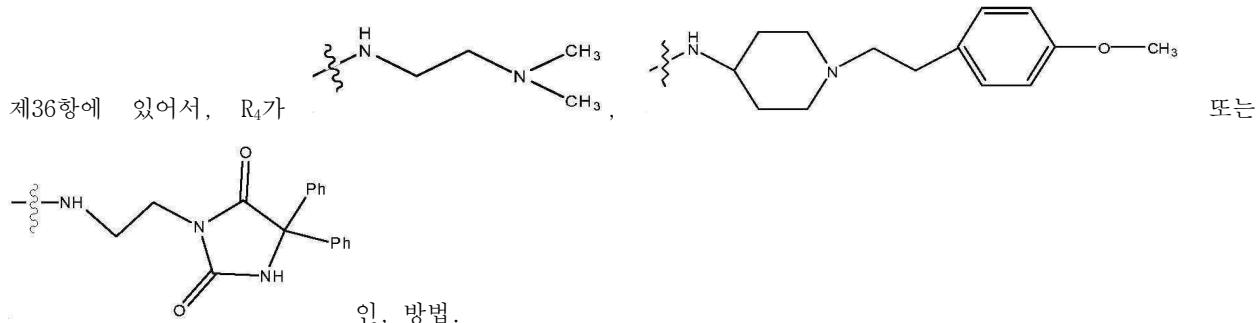
### 청구항 37

제36항에 있어서, R<sub>3</sub>O] OH, O<sup>-</sup> 또는 OR<sub>9</sub>O이고, 여기서, R<sub>9</sub>는 H, 메틸, 에틸 또는 페닐인, 방법.

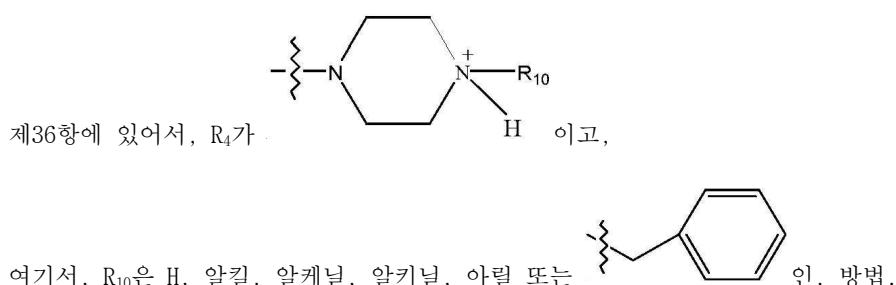
### 청구항 38

제37항에 있어서, R<sub>3</sub>O] OH, O<sup>-</sup> 또는 OR<sub>9</sub>O이고, 여기서, R<sub>9</sub>는 메틸인, 방법.

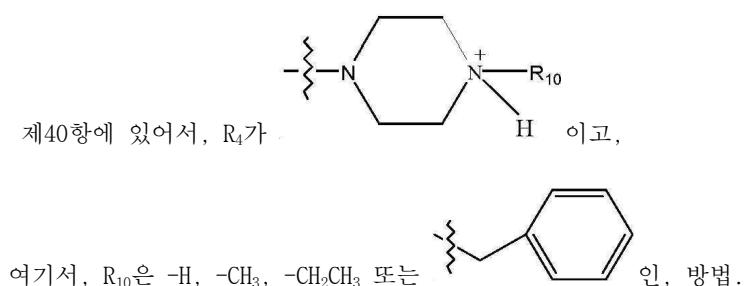
### 청구항 39



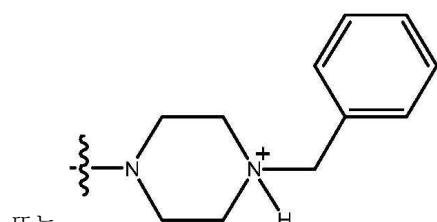
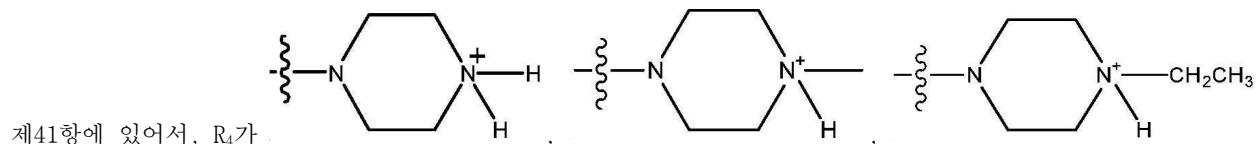
### 청구항 40



### 청구항 41

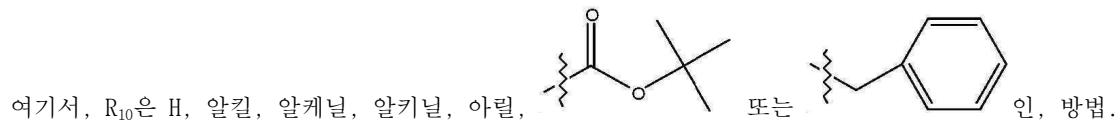
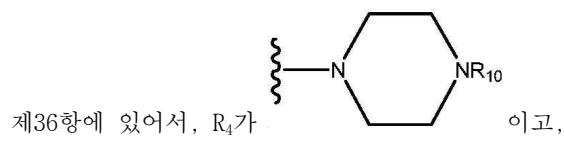


## 청구항 42

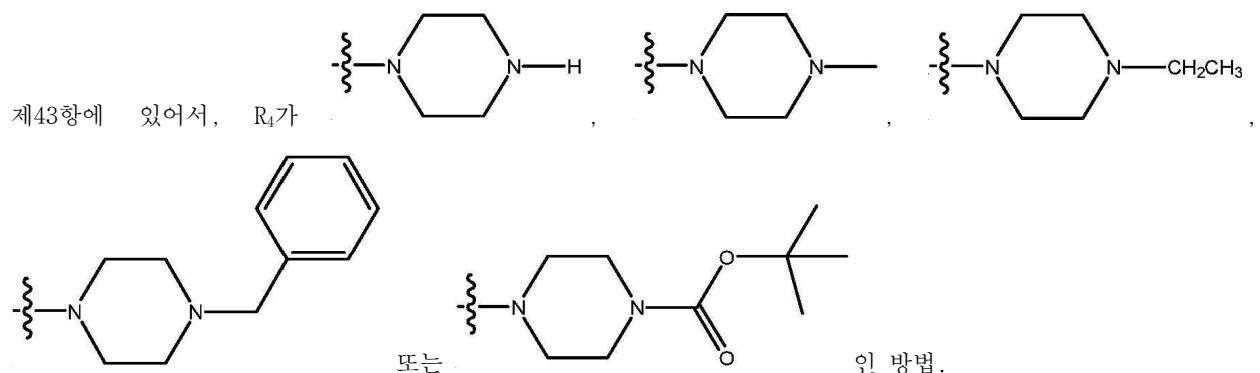


인, 방법.

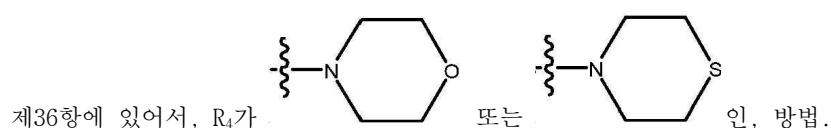
## 청구항 43



## 청구항 44

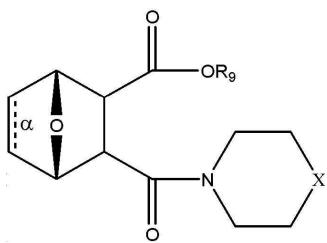


## 청구항 45



## 청구항 46

제34항 또는 제35항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는, 방법:



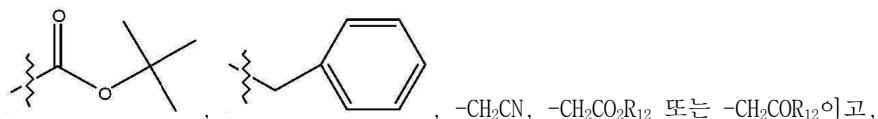
상기 구조에서,

결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;

$R_9$ 는 존재하거나 부재하고, 존재하는 경우, H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 페닐이고;

X는 O,  $NR_{10}$ ,  $NH^+R_{10}$  또는  $N^+R_{10}R_{10}^-$ 이고,

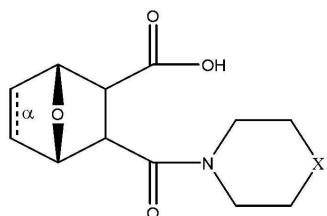
여기서, 각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴,



$R_{12}$ 는 H 또는 알킬이다.

#### 청구항 47

제46항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는, 방법:

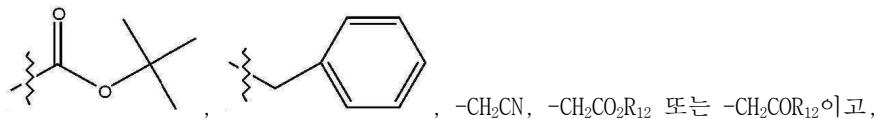


상기 구조에서,

결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;

X는 O 또는  $NR_{10}$ 이고,

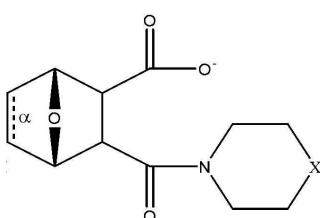
여기서, 각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴,



$R_{12}$ 는 H 또는 알킬이다.

#### 청구항 48

제46항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는, 방법:

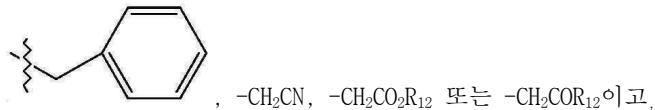


상기 구조에서,

결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;

$X$ 는 0 또는  $\text{NH}^+R_{10}$ 이고,

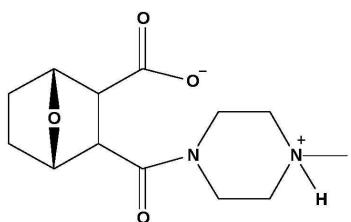
여기서,  $R_{10}$ 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴,



$R_{12}$ 는 H 또는 알킬이다.

#### 청구항 49

제40항에 있어서, 상기 화합물이 하기 구조, 또는 이의 염 또는 에스테르를 갖는, 방법:



#### 발명의 설명

#### 기술 분야

##### 관련 출원에 대한 상호 참조

본 출원은 2016년 12월 8일자로 출원된 미국 가특허 출원 62/497,949, 2017년 2월 28일자로 출원된 미국 가특허 출원 62/465,001 및 2017년 8월 14일자로 출원된 미국 가특허 출원 62/545,373의 이익을 주장하며, 이들의 전문은 본 출원에 참조로 포함된다.

#### 배경 기술

[0003] 단백질 포스파타아제 2A (protein phosphatase 2A: PP2A)는 ATM/ATR-의존성 반응 경로와 ATM/ATR-비의존성 반응 경로 둘 다의 수많은 단백질을 탈인산화시키는 아주 흔한 세린/트레오닌 포스파타아제이다 (문헌 [Mumby, M. 2007] 참조). PP2A의 약리학적 억제는 이전에 p53, γH2AX, PLK1 및 Akt와 같은 다양한 신호 전달 단백질의 구성 인산화 (constitutive phosphorylation)를 통해 방사선-매개된 DNA 손상에 대해 암 세포를 민감하게 하여 세포 주기 조절 완화, DNA 복구 억제 및 아폽토시스를 유발하는 것으로 나타났다 (문헌 [Wei, D. et al. 2013] 참조).

[0004] 가로 추출물 (밀라브리스 (*Mylabris*))의 기본 활성 성분인 칸타리딘은 PP2A의 강력한 억제제로 밝혀진 전통 중의학으로부터 유래된 화합물이다 (문헌 Efferth, T. et al. 2005). 칸타리딘이 이전에 간암 치료에 사용되고 다제내성 백혈병 세포주에 대해 효능을 나타냈지만 (문헌 [Efferth, T. et al. 2002]), 이의 심각한 독성은 이의 임상적 유용성을 제한한다. LB-100은 독성이 현저히 낮은 칸타리딘의 작은 분자 유도체이다. 이전의 전임상 연구는, LB-100이 교모세포종 (GBM), 전이성 크롬친화세포종 및 퀘장암에 대한 테모졸로마이드, 독소루비신 및 방사선 요법의 세포독성 효과를 증진시킬 수 있다는 것을 보여주었다 (문헌 [Wei, D. et al. 2013], [Lu, J. et al. 2009], [Zhang, C. et al. 2010] 및 [Martiniova, L. et al. 2011]). LB-100은 또한 고형 종양의 치료를 위해 도세탁셀과 조합하여 임상 1상 연구를 진행하고 있다 (문헌 [Chung, V. 2013]).

#### 발명의 내용

##### 발명의 개요

- [0006] 본 발명은 유효량의 체크포인트 (checkpoint) 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 대상체를 치료하는데 효과적인, 방법을 제공한다.
- [0007] 본 발명은 체크포인트 억제제 단독에 비해 치료를 증진시키기에 효과적인 특정량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하고 상기 체크포인트 억제제를 투여하는 방법을 또한 제공한다.
- [0008] 본 발명은 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 종양 또는 암을 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 종양 또는 암을 치료하는데 효과적인, 방법을 또한 제공한다.
- [0009] 본 발명은 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키기에 효과적인, 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 특정량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는 방법을 또한 제공한다.
- [0010] 본 발명은 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 T-세포 활성화를 증가시키는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 T-세포 활성화를 증가시키는 방법을 또한 제공한다.
- [0011] 본 발명은 PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 CTLA-4의 기능을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제하는 방법을 또한 제공한다.
- [0012] 본 발명은 PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 PD-1:PD-L1의 상호작용을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 PD-1:PD-L1의 상호작용을 억제하는 방법을 또한 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1. 엔트리에서 측정 가능한 질병이 있는 환자에서 지표 병변 크기의 최대 변화.
- 도 2. 연구 엔트리의 오름 차순으로 각 환자에 대한 안정성 또는 질병의 부분 반응 (적색 원)의 기간 (사이클 수).
- 도 3a. PP2A의 억제는 CD4 T-세포에서 IFN- $\gamma$  생산을 유의하게 증진시킨다. 40 nM의 LB-100의 존재 또는 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드로 활성화된 CD4 T-세포로부터의 IFN 감마 생산. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.
- 도 3b. PP2A의 억제는 CD4 T-세포에서 IFN- $\gamma$  생산을 유의하게 증진시킨다. 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드로 활성화된 CD4 T-세포로부터의 IFN 감마 생산. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.
- 도 4a. PP2A의 억제는 CD4 T-세포 증식을 유의하게 증진시킨다. 1000 nM의 LB-100의 존재 또는 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드로 증식된 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 첨가하거나 교체하였다.
- 도 4b. PP2A의 억제는 CD4 T-세포 증식을 유의하게 증진시킨다. 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드로 증식된 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.
- 도 5a. PP2A의 억제는 CD4 T-세포 증식을 유의하게 증진시킨다. LB-100의 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드로 증식된 CD4 T-세포의 대표적인 흐름 플롯. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.
- 도 5b. PP2A의 억제는 CD4 T-세포 증식을 유의하게 증진시킨다. 1000 nM의 LB-100의 존재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드로 증식된 CD4 T-세포의 대표적인 흐름 플롯. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.
- 도 6a. PP2A의 억제는 T-세포 상에서 공동자극 분자 OX40 발현을 유의하게 증진시킨다. 1000 nM의 LB-100의 존재 또는 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드에 의한 OX40 발현 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.
- 도 6b. PP2A의 억제는 T-세포 상에서 공동자극 분자 OX40 발현을 유의하게 증진시킨다. 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재 하에 5일 동안 CD3/CD28 비드에 의한 OX40 발현 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 7a. PP2A의 억제는, CD4 T-세포에서 IFN- $\gamma$  생산을 구동시키는 전사 인자 Tbet를 증진시킨다. 1000 nM의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 CD3/Cd28 비드에 의한 Tbet 발현 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 7b. PP2A의 억제는, CD4 T-세포에서 IFN- $\gamma$  생산을 구동시키는 전사 인자인 Tbet를 증진시킨다. 항-PD1 항체의 유무하에 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 증식된 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 8a. 조합 처리에 의한 CD4 T-세포의 향상된 증식. 항-PD1 항체의 유무하에 8 nM의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 증식된 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 8b. 조합 처리에 의한 CD4 T-세포의 향상된 증식. 항-PD1 항체의 유무하에 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 증식된 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 9의 A. 대조군에서 CD4 T-세포 증식의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 9의 B. LB-100에서 CD4 T-세포 증식의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 9의 C. 항-PD-1에서 CD4 T-세포 증식의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 9의 D. LB-100 + 항-PD-1에서 CD4 T-세포 증식의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 10a. 조합 처리에 의한 CD4 T-세포의 증진된 OX40 발현. 0.05 nM의 항-PD1 항체의 유무하에 8 nM의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 OX40 발현 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 10b. 조합 처리에 의한 CD4 T-세포의 증진된 OX40 발현. 항-PD1 항체의 유무하에 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 OX40 발현 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 11a. 조합 처리에 의한 CD4 T-세포의 증진된 Tbet 발현. 항-PD1 항체의 유무하에 200 nM의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 Tbet 발현 CD4 T-세포의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 11b. 조합 처리에 의한 CD4 T-세포의 증진된 Tbet 발현. 항-PD1 항체의 유무하에 다양한 농도의 LB-100의 존재 또는 부재하에 5일 동안 단핵구-유도된 수지상 세포와 함께 공동 배양된 CD4 T-세포에서 Tbet 발현의 백분율. LB-100을 첨가하거나 3일째에 교체하였다.

도 12. PP2A 억제제는 8개의 용량으로 2일마다 처리된 마우스에서 마우스 B16 흑색종 종양 성장을 유의하게 감소시켰다. 처리는 종양 이식 당일에 시작되었다. 대조군 - PBS, 낮은 용량 - 0.16 mg/kg, 중간 용량 - 0.32 mg/kg.

도 13의 A. PP2A 억제제는 미경험 (naive) 마우스에서 CD4/8 이팩터 세포를 증가시켰다. 생체내에서 낮은 용량의 LB 처리는 림프절에서 더 많은 CD8 (좌측) 및 CD4 (우측) 이팩터 T-세포를 유도하였다. 그룹 당 5마리. 대조군 - PBS, 낮은 용량 - 0.16 mg/kg, 중간 용량 - 0.32 mg/kg.

도 13의 B. PP2A 억제제는 미경험 마우스에서 CD4/8 이팩터 세포를 증가시켰다. 도 13의 A에서 CD44+CD62L- CD8 (좌측) 및 CD4 (우측)의 대표적인 유세포 계측 플롯. 대조군 - PBS, 낮은 용량 - 0.16 mg/kg, 중간 용량 - 0.32 mg/kg.

도 14a. PP2A 억제제는 혈액 및 비장에서의 CD8 T-세포 상에서 PD-1 발현을 감소시켰다. 생체내에서 낮은 용량의 LB 처리는 혈액에서 PD-1 발현 CD8+ T-세포를 감소시켰다.

도 14b. PP2A 억제제는 혈액 및 비장에서의 CD8 T-세포 상에서 PD-1 발현을 감소시켰다. 생체내에서 중간 용량의 LB 처리는 혈액에서 PD-1 발현 CD8+ T-세포를 감소시켰다.

도 15. PP2A 억제제는 사람 T-세포로부터 IFN- $\gamma$  생산을 증진시켰다. LB-100, 항-PD-1 또는 조합 (LB-100 및 항-PD-1)의 존재하에 단핵구 유도된 DC와 함께 공동 배양된 CD4 T-세포의 상청액에서의 IFN  $\gamma$  생산.

도 16의 A. PP2A 억제제는 사람 CD4 T-세포 상에서 PD-1 발현을 감소시켰다. 이소형 대조군의 존재하에 단핵구 유도된 DC와 함께 공동 배양된 PD-1 발현 CD4 T-세포의 백분율.

도 16의 B. PP2A 억제제는 사람 CD4 T-세포 상에서 PD-1 발현을 감소시켰다. LB-100의 존재하에 단핵구 유도된 DC와 함께 공동 배양된 PD-1 발현 CD4 T-세포의 백분율.

도 16의 C. PP2A 억제제는 사람 CD4 T-세포 상에서 PD-1 발현을 감소시켰다. 항-PD-1의 존재하에 단핵구 유도된 DC와 함께 공동 배양된 PD-1 발현 CD4 T-세포의 백분율.

도 16의 D. PP2A 억제제는 사람 CD4 T-세포 상에서 PD-1 발현을 감소시켰다. 조합 (LB-100 및 항-PD-1)의 존재하에 단핵구 유도된 DC와 함께 공동 배양된 PD-1 발현 CD4 T-세포의 백분율.

도 17a. CD8+CD44+ 이펙터 T-세포는 PP2A 억제제 LB-100 처리에 의해 증가한다. LB-100 또는 PBS로 처리된 B16 종양 보유 마우스의 종양 배액 림프절에서의 CD8+CD44+ T 이펙터 세포 집단의 백분율. 그룹 당 5마리.

도 17b. CD8+CD44+ 이펙터 T-세포는 PP2A 억제제 LB-100 처리에 의해 증가한다. 도 17a에서 나타낸 데이터의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 18a. B16 종양 보유 마우스의 림프절에서의 증가된 CD44+CD62L- CD4 이펙터 T-세포. LB-100 또는 PBS로 처리된 B16 종양 보유 마우스의 종양 림프절에서의 CD44+CD62L- CD4 이펙터 T-세포 집단의 백분율. 그룹 당 5마리.

도 18b. B16 종양 보유 마우스의 림프절에서의 증가된 CD44+CD62L- CD4 이펙터 T-세포. 도 18a에서 나타낸 데이터의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 19a. B16 종양 보유 마우스의 림프절에서의 증가된 CD44+CD62L- CD8 이펙터 T-세포. LB-100 또는 PBS로 처리된 B16 종양 보유 마우스의 종양 림프절에서의 CD44+CD62L- CD8 이펙터 T-세포 집단의 백분율. 그룹 당 5마리.

도 19b. B16 종양 보유 마우스의 림프절에서의 증가된 CD44+CD62L- CD8 이펙터 T-세포. 도 19a에서 나타낸 데이터의 대표적인 유세포 계측 플롯.

도 20의 A. CT26 세포를 BALB/c 마우스의 우측 흉부 측면에 피하로 이식하였다. 13일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 크기의 종양이 있는 마우스를 무작위 추출하고, 28일 동안 PBS 대조군, 항-PD-L1, LB-100 또는 조합 (LB-100 및 항-PD-1)으로 처리하였다. 시간 경과에 따른 각각의 종양 체적.

도 20의 B. CT26 세포를 BALB/c 마우스의 우측 흉부 측면에 피하로 이식하였다. 13일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 크기의 종양이 있는 마우스를 무작위 추출하고, 28일 동안 PBS 대조군, 항-PD-L1, LB-100 또는 조합 (LB-100 및 항-PD-1)으로 처리하였다. 시간 경과에 따른 종양 체적 중앙값.

도 20의 C. CT26 세포를 BALB/c 마우스의 우측 흉부 측면에 피하로 이식하였다. 13일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 크기의 종양이 있는 마우스를 무작위 추출하고, 28일 동안 PBS 대조군, 항-PD-L1, LB-100 또는 조합 (LB-100 및 항-PD-1)으로 처리하였다. 시간 경과에 따른 마우스 생존율.

도 21의 A. 초기 접종 후 약 60일째에, 치료된 마우스 및 CT26-미경험 대조군 마우스를 CT26 세포로 좌측면에 (재)접종하였다. 시간 경과에 따른 각각의 종양 체적.

도 21의 B. 초기 접종 후 약 60일째에, 치료된 마우스 및 CT26-미경험 대조군 마우스를 CT26 세포로 좌측면에 (재)접종하였다. 시간 경과에 따른 종양 체적 중앙값.

도 22의 A. CT26 세포를 BALB/c 마우스의 우측 흉부 측면에 피하로 이식하였다. 11일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 크기의 종양이 있는 마우스를 4개의 그룹으로 무작위 배정하였다: 대조군, CD8 고갈, CD8 고갈 + 조합 (LB-100 및 항-PD-1), 또는 조합 단독 (LB-100 및 항-PD-1). 고갈 그룹의 마우스에게 CD8 고갈 항체 (depleting antibody)를 제공하였다. 2일 후, 마우스에게 각각의 처리를 시작하였다. 시간 경과에 따른 각각의 종양 체적.

도 22의 B. CT26 세포를 BALB/c 마우스의 우측 흉부 측면에 피하로 이식하였다. 11일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 크기의 종양이 있는 마우스를 4개의 그룹으로 무작위 배정하였다: 대조군, CD8 고갈, CD8 고갈 + 조합 (LB-100 및 항-PD-1), 또는 조합 단독 (LB-100 및 항-PD-1). 고갈 그룹의 마우스에게 CD8 고갈 항체를 제공하였다. 2일 후,

마우스에게 각각의 처리를 시작하였다. 시간 경과에 따른 종양 체적 중앙값.

도 22의 C. CT26 세포를 BALB/c 마우스의 우측 흉부 측면에 피하로 이식하였다. 11일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 크기의 종양이 있는 마우스를 4개의 그룹으로 무작위 배정하였다: 대조군, CD8 고갈, CD8 고갈 + 조합 (LB-100 및 항-PD-1), 또는 조합 단독 (LB-100 및 항-PD-1). 고갈 그룹의 마우스에게 CD8 고갈 항체를 제공하였다. 2일 후, 마우스에게 각각의 처리를 시작하였다. 시간 경과에 따른 마우스 생존율.

도 23의 A. 도 22의 A~C에서 기재된 바와 같이, BALB/C 마우스를 CT26 종양 세포로 우측 흉부 측면에 피하 접종하고, 대조군 (PBS), LB-100, 항-PD-1 또는 조합 (LB-100 및 항-PD-1)으로 처리하였다. 처리 시작 후 12일째에 종양-침윤 T-세포를 유세포 계측법으로 분석하였다. 4시간의 PMA 자극 후 IFNg+를 생산하는 CD8+ 종양 침윤 T-세포의 백분율은 조합 그룹에서 증가하였다 (\* p = 0.05).

도 23의 B. 도 22의 A~C에서 기재된 바와 같이, BALB/C 마우스를 CT26 종양 세포로 우측 흉부 측면에 피하 접종하고, 대조군 (PBS), LB-100, 항-PD-1 또는 조합 (LB-100 및 항-PD-1)으로 처리하였다. 처리 시작 후 12일째에 종양-침윤 T-세포를 유세포 계측법으로 분석하였다. 종양에서 CD45+ 세포의 CD4+FoxP3 + T-조절 세포의 백분율은 LB-100 처리 그룹에서 감소하였다 (\*\* p < 0.01).

도 24의 A. BALB/c 마우스를  $0.5 \times 10^6$  개의 CT26 세포로 우측 흉부 측면에 피하 접종하였다. 종양이 50~100 mm<sup>3</sup> 사이에 도달할 때, 마우스를 4개의 처리 그룹으로 무작위 배정하고, 4주 동안 2일마다 처리하였다.

도 24의 B. 좌측, 각각의 종양 성장 곡선: 대조군, LB-100, 항-PD-1 및 조합. 중간, 시간 경과에 따른 평균 종양 크기. 우측, 시간 경과에 따른 누적 생존율.

도 24의 C. PD-1 차단과 PP2A 억제의 효능은 CD8+ T-세포에 의존한다. BALB/c 마우스를 24a에서와 같이 접종하였다. 종양이 30~100 mm<sup>3</sup>에 도달할 때, 마우스에서 CD8+ T-세포를 임시 고갈시키고, 조합으로 처리하였다.

도 24의 D. 좌측, 각각의 종양 성장 곡선: 대조군, 조합, CD-8 고갈 단독, 및 CD8 고갈과의 조합. 중간, 시간 경과에 따른 평균 종양 크기. 우측, 시간 경과에 따른 누적 생존율. 데이터는 독립적인 2가지 실험에 대해 나타낸 것이다. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 및 \*\*\*\*P < 0.0001 (로그 순위법 Mantel-Cox 검정).

도 25의 A. BALB/c 마우스를  $0.5 \times 10^6$  개의 CT26 세포로 피하 접종하고 처리하였다. CR 또는 미경험 대조군 마우스의 좌측 흉부 측면에  $0.5 \times 10^6$  개의 CT26 세포 또는 유두 지방 패드에  $1.25 \times 10^5$  개의 4T1 유방 암종 세포와의 조합을 초기 이식한 후 약 60일째에 재시험감염 (re-challenge)시켰다. CT26 단독으로 (재)시험감염된 마우스는 어떠한 CT 26 종양의 성장도 나타내지 않았다.

도 25의 B. 좌측, 각각의 종양 성장 곡선: 미경험 및 CR. 우측, 시간 경과에 따른 평균 종양 크기.

도 25의 C. 접종 후 18일째의 CT26 종양 체적의 정량화. (P < 0.001, 양측 스튜던트 t 검정).

도 25의 D. CR 및 미경험 마우스를 CT26 및 4T1 종양 세포로 (재)시험감염시켰다. 미경험 - CT26, CR - CT26, 미경험 - 4T1, CR - 4T1. 좌측, 각각의 종양 성장 곡선. 우측, 시간 경과에 따른 평균 종양 크기.

도 25의 E. 접종 후 18일째의 CT26 및 4T1 종양 체적의 정량화. (P < 0.0001, Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA).

도 25의 F. 접종 CT26 및 4T1 종양에 따른 대표적인 미경험 및 CR 마우스 그림.

도 26의 A. 비장의 CD8+ T-세포에서의 CD44 및 CD62L의 대표적인 FACS 플롯.

도 26의 B. 비장에서의 CD62-CD44+ (CD8+ T-세포)의 정량화 (n = 4~5).

도 26의 C. 종양 배액 림프절에서의 CD62-CD44+ (CD8+ T-세포)의 정량화 (n = 4~5).

도 26의 D. CD45+ 세포의 백분율로서의 CD8+ CD3+ T-세포의 대표적인 FACS 플롯.

도 26의 E. CD45+ 세포의 백분율로서 표현된 CD3+의 면역 침윤 분석 (n = 5). 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 26의 F. CD45+ 세포의 백분율로서 표현된 CD8+의 면역 침윤 분석 (n = 5). 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 26의 G. CD45+ 세포의 백분율로서 표현된 CD4+의 면역 침윤 분석 ( $n = 5$ ). 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 26의 H. 종양에서 CD4+ 세포에 대한 CD8+ 세포의 비율. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 26의 I. 종양에서 CD45+ 세포의 백분율로서 표현된 CD8+ 및 CD44+. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 26의 J. 종양에서 CD45+ 세포의 백분율로서 표현된 CD8+ 및 Ki67+. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 26의 K. 종양의 CD8+ 세포에서 PD1+의 발현.  $^*P < 0.05$ , (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA).

도 26의 L. 종양에서 CD4+ 세포의 발현.  $^*P < 0.05$ , (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA).

도 27의 A. 종양에서 FoxP3+ 및 CD4+ T-세포의 대표적인 FACS 플롯. 도 27의 B. 총 CD3+ 세포의 CD4+FoxP3+ T-세포의 백분율.

도 27의 C. 종양에서 CD4+FoxP3+ Treg 세포에 대한 CD8+ 세포의 비율 ( $n = 5$ ).

도 27의 D. CD45+ 세포의 CD8+IFN  $\gamma$  + T-세포의 대표적인 FACS 플롯.

도 27의 E. CD45+ 세포의 CD8+IFN  $\gamma$  + T-세포의 백분율.

도 27의 F. CD45+ 세포의 CD8+ TNF  $\alpha$  + T-세포의 백분율.

도 27의 G. CD45+ 세포의 CD8+ 이중 양성 IFN  $\gamma$  +TNF  $\alpha$  + T-세포의 백분율.

도 27의 H. CD45+ 세포의 CD8+그랜자임B+ T-세포의 백분율.

도 27의 I. CD4+ T-세포의 CD4+IFN  $\gamma$  +의 백분율.

도 27의 J. FACS에 의해 결정된 바와 같은 CD45+ 면역 세포 서브세트와 CD45- 세포의 요약. 서브세트는 획득한 모든 라이브 사례 (우측) 및 CD3+ 세포 (우측)의 백분율; 우측 다이어그램: 비 CD45-, CD3+, 비 CD3+ CD45 백혈구; 좌측 다이어그램: CD8, CD4-Treg, CD4-conv로서 표시된다.  $^*P < 0.05$ , (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 데이터는 5마리의 독립적으로 분석된 마우스/그룹에 의한 2가지 실험 중 하나를 나타낸다.

도 28의 A. LB-100 및/또는 aPD-1 처리를 받는 마우스의 비장에서 (A) CD4+의 활성화 및 면역 체크포인트 마커의 유세포 계측 분석. CD4+ T-세포에서, CD8+ T-세포와 달리, CD62L-CD44+ 발현에는 변화가 없었다. 면역 체크포인트 마커의 발현에도 또한 변화가 없었다: PD1, CTLA4, TIM3 및 OX40.

도 28의 B. LB-100 및/또는 aPD-1 처리를 받는 마우스의 비장에서 CD8+ 림프구의 활성화 및 면역 체크포인트 마커의 유세포 계측 분석. CD8+ T-세포에서, 면역 체크포인트 마커의 발현에는 변화가 없었다: PD1, CTLA4, TIM3 및 OX40.

도 29의 A. LB-100 및/또는 aPD-1 처리를 받는 마우스의 배액 림프절 (dLN)에서 CD4+의 활성화 및 면역 체크포인트 마커의 유세포 계측 분석. CD4+ T-세포에서, CD8+ T-세포와 달리, CD62L-CD44+ 발현에는 변화가 없었다. aPD-1 처리 그룹에서는 PD-1 발현에서 작지만 유의한 증가가 있었지만, LB-100 단독 또는 조합은 PD-1 발현을 더 이상 변화시키지 않았다. 다른 면역 체크포인트 마커의 발현에는 변화가 없었다: CTLA4, TIM3 및 OX40.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 29의 B. LB-100 및/또는 aPD-1 처리를 받는 마우스의 배액 림프절 (dLN)에서 CD8+ 림프구의 활성화 및 면역 체크포인트 마커의 유세포 계측 분석. CD8+ T-세포에서, 면역 체크포인트 마커의 발현에는 변화가 없었다: PD1, CTLA4, TIM3 및 OX40.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 30. 종양 침윤 림프구의 유세포 계측 분석을 위한 게이팅 전략. SSC-FSC 게이트를 사용하여 비-세포 잔해물을 배제한 후, FSC-H-FSA-A 게이트로 듀플렛을 배제하였다. 고정가능한 생/사 (live/dead; L/D) 염색을 사용하여 죽은 세포를 배제하였다. 이어서, CD45+ 팬 백혈구 마커의 발현에 기초하여 생세포를 게이팅하였다. CD45- 세포는 종양 세포로 간주되었다. 이어서, CD3, CD8, CD4 발현에 기초하여 CD45+ 세포를 추가로 표현형화하였다. CD45+CD3+CD8+ 세포를 CD8+ 림프구로서 게이팅하면서, CD45+CD3+CD4+ 세포를 CD4+ 림프구로서 게이팅하였다. 추가로, 이어서, CD4+ 및 CD8+ 서브세트의 염색을 텍스트로 표시된 바와 같이 수행하였다.

도 31의 A. CD45- 종양-상주 세포에 대한 CD3+, CD8+ 및 CD4+ 세포의 비율을 각 처리 그룹에 대해 나타냈다. CD4/종양 비율에는 변화가 없었지만, 조합 그룹에서는 대조군과 비교하여 CD3/종양 및 CD8/종양 비율이 증가하였다.

도 31의 B. 종양 중량 g 당 CD3+, CD8+ 및 CD4+ 세포의 수를 각 처리 그룹에 대해 나타냈다. 유사한 경향이 도 31의 A에서와 같이 나타났지만, aPD-1 처리 그룹 단독에서는 대조군과 비교하여 종양 그램 당 CD3+ 및 CD8+에서 유의한 차이가 있었다. CD3+ 및 CD8+/종양이 조합 처리에 대해 추가로 증가하는 경향이 있었지만, 통계적 유의성은 없었다.  $^*P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$  (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 32의 A. LB-100 및/또는 aPD-1 처리를 받는 마우스의 종양에서 CD4+ 림프구의 면역 체크포인트 마커의 유세포 계측 분석. CD4+ T-세포에서, 면역 체크포인트 마커의 발현에는 변화가 없었다: TIM3, OX40, CTLA4 및 LAG3.

도 32의 B. LB-100 및/또는 aPD-1 처리를 받는 마우스의 종양에서 CD8+ 림프구의 면역 체크포인트 마커의 유세포 계측 분석. CD8+ T-세포에서, 면역 체크포인트 마커의 발현에는 변화가 없었다: TIM3, OX40, CTLA4 및 LAG3.

도 33의 A. TNF- $\alpha$ + 증가를 보이는 대표적인 유세포 계측 플롯. 표시된 백분율은 총 CD3+에 대한 것이다.

도 33의 B. TNF- $\alpha$ + IFN- $\gamma$ + 이중 양성 증가를 보이는 대표적인 유세포 계측 플롯. 표시된 백분율은 총 CD8+에 대한 것이다.

도 33의 C. 그랜자임B + CD8 종양 침윤 T-세포의 증가를 보이는 대표적인 유세포 계측 플롯. 표시된 백분율은 총 CD3+ 세포에 대한 것이다.

도 34의 A. C57BL/6 마우스를 4개의 처리 그룹으로 무작위 배정하였다. 우측 흉부 측면에 피하로 처리를 개시한 후 2일째에  $2.5 \times 10^5$  개의 B16F10 세포를 접종하였다. 생존 종료점까지 마우스를 2일마다 처리하였다.

도 34의 B. 좌측, 각각의 종양 성장 곡선: 대조군, LB-100, 항-PD-1 및 조합. 우측, 시간 경과에 따른 평균 종양 크기.

도 34의 C. 접종 후 15일째의 B16 종양 체적의 정량화. ( $P < 0.0001$ , Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA).

도 34의 D. 시간 경과에 따른 누적 생존율.  $^*P < 0.05$ , (로그 순위법 Mantel-Cox 검정) 2가지의 독립적인 실험으로부터 데이터를 폴링 (pooling)하였다.

도 34의 E. 각 처리 그룹 (그룹 당  $n = 2\sim3$ )의 피부 및 침샘의 혈마토실린 및 에오신 염색의 대표적인 이미지. 축적 막대, 100  $\mu\text{m}$ .

도 35. 각 처리 그룹 (그룹 당  $n = 2\sim3$ )의 췌장, 폐 및 위의 혈마토실린 및 에오신 염색의 대표적인 이미지. 축적 막대, 100  $\mu\text{m}$ .

도 36의 A. CD3 T-세포를 마우스 비장 세포로부터 단리하고, 고정화 항-CD3 (10 .ig/ml) 및 가용성 항-CD28 (2 .ig/ml)을 사용하여 자극 유무하에 배양하였다. PP2A 효소 활성을 3시간의 활성화 후에 측정하였다. PP2A 활성은 LB-100 용량 적정의 존재하에 활성화된 대조군과 관련하여 측정하였다.

도 36의 B. LB-100 용량 적정의 존재하에 3시간의 자극 후에 Thr308 (p-AKT(T308)) 또는 Ser473 (p-AKT(S473))에서 인산화된 AKT의 유세포 계측 분석.

도 36의 C. LB-100 용량 적정의 존재하에 인산화된 S6 (p-S6)의 유세포 계측 분석.  $^*P < 0.05$ ,  $^{***}P < 0.001$ , (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 데이터는 유사한 결과를 갖는 독립적인 2가지 실험 중 하나의 실험에 대해 나타낸 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 37. 30분의 자극 후의 AKT 및 mTORC 신호 전달. LB-100 용량 적정의 존재하에 30분의 자극 후에 Thr308 (p-AKT(T308)), Ser473 (p-AKT(S473)) 또는 인산화된 S6 (p-S6)에서 인산화된 AKT의 유세포 계측 분석. (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 데이터는 유사한 결과를 갖는 독립적인 2가지 실험 중 하나의 실험에 대해 나타낸 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 38의 A. 좌측, Foxp3에 대해 양성인 CD4 세포의 %. 우측, LB-100에 의한 Foxp3 세포의 % 감소를 나타내는 대표적인 유세포 계측 데이터. 세포를 CD4+ 세포에서 계이팅하였다.

도 38의 B. GATA3의 세포내 수준을 유세포 계측법으로 측정하였다. 좌측, GATA3에 대해 양성인 CD4 세포의 %. 우측, LB-100에 의한 GATA3 세포의 % 감소를 나타내는 대표적인 유세포 계측 데이터.

도 38의 C. Tbet+ Th1 CD4 세포에 대한 GATA3+ Th2의 비율.

도 38의 D. IFN- $\gamma$ 의 세포내 생산을 유세포 계측법으로 측정하였다. 좌측,  $T_{H1}$  및  $T_{H2}$  조건하에 IFN- $\gamma$ 에 대해 양성인 CD4 세포의 %. 우측,  $T_{H1}$  및  $T_{H2}$  조건하에 LB-100에 의한 IFN- $\gamma$  세포의 % 증가를 나타내는 대표적인 유세포 계측 데이터.

도 38의 E. 3일 동안  $T_{H1}$  스큐잉 (skewing) 조건하에 활성화된 미경험  $CD4^+$  T-세포의 상청액에서의 TNF, IL2 및 IFN- $\gamma$  생산.

도 38의 F. 3일 동안  $T_{H2}$  스큐잉 조건하에 활성화된 미경험  $CD4^+$  T-세포의 상청액에서의 TNF, IL2, IFN- $\gamma$  및 IL4 생산. 사이토카인 수준을 절대 세포 수로 조정하였다.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$ , (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 데이터는 유사한 결과를 갖는 독립적인 2가지 실험 중 하나의 실험에 대해 나타낸 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

도 39의 A. IL4 및 GM-CSF 중에서 7일 동안 배양함으로써 정제된 단핵구로부터 DC를 유도하였다. 이어서,  $10^5$  개의 정제된 CFSE 라벨링된 CD4+ T-세포를, 5일 동안 이중 또는 삼중으로 LB-100의 적정하에  $10^4$  개의 동종 DC와 함께 공동 배양하였다. 3일째에 LB-100을 보충하였다. 5일째에 상청액을 수집하고, IFN- $\gamma$  생산에 대해 측정하였다. 배양된 세포에 대해 FACS 분석을 수행하였다.

도 39의 B. 세포질 CFSE의 희석으로 측정된, LB-100 용량 적정의 존재하에 CD4+ T-세포의 시험관내 증식. 좌측, 분열된 세포의 %를 LB-100의 농도에 대해 플로팅하였다. 우측, 1 uM의 LB-100에서 분열된 세포의 % 증가를 나타내는 대표적인 유세포 계측 데이터.

도 39의 C. 5일째에 IFN- $\alpha$  생산을 측정하였으며, LB-100에 의한 IFN- $\alpha$  분비의 용량 의존적 증가를 나타냈다.

도 39의 D. 5일간의 공동 배양 후, T-bet의 세포내 염색을 CD4+ T-세포에서 수행하였다. LB-100 농도에 대한 (CD4+ 세포의) CD4+Tbet+의 백분율.

도 39의 E. 조합 처리에 대한 시너지 반응을 나타내는, 이소형 대조군, LB-100 및/또는 니볼루맙으로 처리된 세포에서의 IFN- $\gamma$  생산.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$ ,  $^{***}P < 0.001$  (Tukey 다중 비교 검정에 의한 일원 ANOVA). 데이터는 유사한 결과를 갖는 독립적인 2가지 실험 중 하나의 실험에 대해 나타낸 것이다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014]

본 발명은 유효량의 체크포인트 (checkpoint) 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 대상체를 치료하는데 효과적인, 방법을 제공한다.

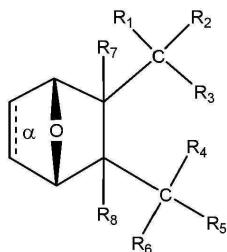
[0015]

본 발명은 체크포인트 억제제 단독에 비해 치료를 증진시키에 효과적인 특정량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상

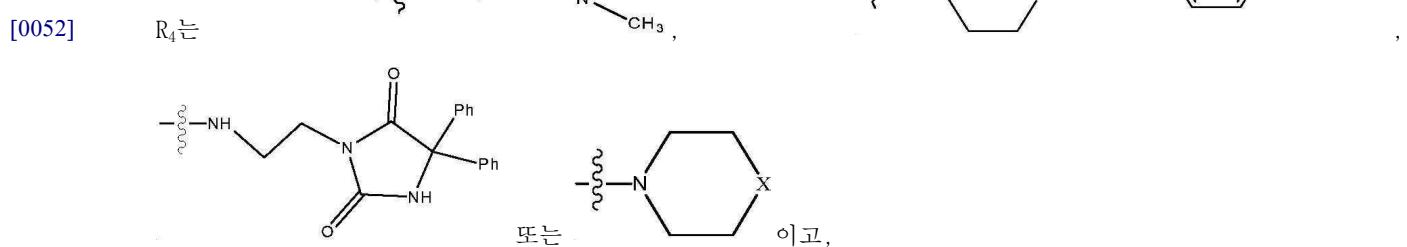
체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하고 상기 체크포인트 억제제를 투여하는 방법을 또한 제공한다.

- [0016] 본 발명은 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 종양 또는 암을 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 종양 또는 암을 치료하는데 효과적인, 방법을 또한 제공한다.
- [0017] 본 발명은 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키기에 효과적인, 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 특정 량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는 방법을 또한 제공한다.
- [0018] 본 발명은 유효량의 체크포인트 억제제와 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 T-세포 활성화를 증가시키는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 T-세포 활성화를 증가시키는 방법을 또한 제공한다.
- [0019] 일부 실시형태에서, 상기 화합물의 유효량 및 상기 체크포인트 억제제의 유효량은 각각 상기 대상체에게 주기적으로 투여된다.
- [0020] 일부 실시형태에서, 상기 화합물의 유효량 및 상기 체크포인트 억제제의 유효량은 동시에, 개별적으로 또는 순차적으로 투여된다.
- [0021] 일부 실시형태에서, 상기 체크포인트 억제제는 상기 PP2A 억제제와 동시에, 그 전에 또는 그 후에 투여된다.
- [0022] 일부 실시형태에서, 함께 투여될 때의 상기 체크포인트 억제제의 유효량 및 상기 화합물의 유효량은, 동량의 각각의 제제가 단독으로 투여될 때 보다 상기 대상체를 치료하기에 보다 효과적이다.
- [0023] 일부 실시형태에서, 함께 투여될 때의 상기 화합물의 유효량 및 상기 체크포인트 억제제의 유효량은 상기 대상체에서 상기 암의 임상 증상을 감소시키는데 효과적이다.
- [0024] 일부 실시형태에서, 상기 화합물은 상기 체크포인트 억제제의 면역치료 효과를 증진시킨다.
- [0025] 일부 실시형태에서, 상기 암은 면역 반응에 의한 치료에 민감하다.
- [0026] 일부 실시형태에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 CTLA-4 제제이다.
- [0027] 일부 실시형태에서, 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제는 이필리무맙 또는 트레멜리무맙이다.
- [0028] 일부 실시형태에서, 상기 면역 체크포인트 억제제는 항-PD-1 또는 항-PD-L1 제제이다.
- [0029] 일부 실시형태에서, 상기 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제는 아테졸리주맙, 니볼루맙 또는 펜브롤리주맙이다.
- [0030] 일부 실시형태에서, 상기 암은 흑색종, 신세포 암종, 전립선암, 요로상피 암종 또는 난소암이다.
- [0031] 일부 실시형태에서, 상기 암은 흑색종이다.
- [0032] 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는  $0.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $0.83 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $1.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $1.75 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$  또는  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여된다.
- [0033] 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여된다.
- [0034] 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 3주마다 3일 동안 투여된다.
- [0035] 일부 실시형태에서, 상기 이필리무맙은  $0.5 \text{ mg}/\text{kg} \sim 10 \text{ mg}/\text{kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여된다.
- [0036] 일부 실시형태에서, 상기 이필리무맙은 3주마다 또는 그 미만으로 90분에 걸쳐 정맥내 투여된다.
- [0037] 일부 실시형태에서, 상기 아테졸리주맙은  $0.1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 20 \text{ mg}/\text{kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여된다.
- [0038] 일부 실시형태에서, 상기 아테졸리주맙은 3주마다 또는 그 미만으로 60분에 걸쳐 정맥내 투여된다.
- [0039] 일부 실시형태에서, 상기 니볼루맙은  $0.1 \text{ mg}/\text{kg} \sim 10 \text{ mg}/\text{kg}$  또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여된다.
- [0040] 일부 실시형태에서, 상기 니볼루맙은 2주마다 또는 그 미만으로 60분에 걸쳐 정맥내 투여된다.

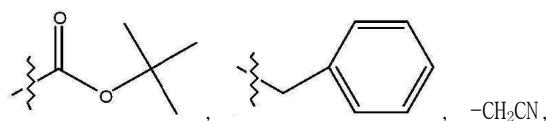
- [0041] 일부 실시형태에서, 상기 패브롤리주맙은 1 mg/kg ~ 10 mg/kg 또는 그 미만의 용량으로 정맥내 투여된다.
- [0042] 일부 실시형태에서, 상기 패브롤리주맙은 3주마다 또는 그 미만으로 30분에 걸쳐 정맥내 투여된다.
- [0043] 본 발명은 PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 CTLA-4의 기능을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제하는 방법을 또한 제공한다.
- [0044] 본 발명은 PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 PD-1:PD-L1의 상호작용을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 PD-1:PD-L1의 상호작용을 억제하는 방법을 또한 제공한다.
- [0045] 일부 실시형태에서, 상기 방법에서의 상기 PP2A 억제제는 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는다:



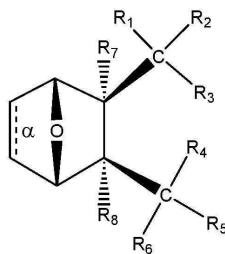
- [0046]
- [0047] 상기 구조에서,
- [0048] 결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;
- [0049]  $R_1$ 과  $R_2$ 는 함께  $=0^\circ$ 이고;
- [0050]  $R_3$ 은  $OH$ ,  $O^-$ ,  $OR_9$ ,  $O(CH_2)_{1-6}R_9$ ,  $SH$ ,  $S^-$  또는  $SR_9$ 이고,
- [0051] 여기서,  $R_9$ 는  $H$ , 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 아릴이고;



- [0053] 여기서,  $X$ 는  $O$ ,  $S$ ,  $NR_{10}$ ,  $N^+HR_{10}$  또는  $N^+R_{10}R_{10}^-$ 이고,
- [0054] 각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로  $H$ , 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴,  $-CH_2CO_2R_{11}$  또는  $-CH_2COR_{11}$ 이고,
- [0055] 각각의  $R_{11}$ 은 독립적으로  $H$ , 알킬, 알케닐 또는 알키닐이고;
- [0056]  $R_5$ 와  $R_6$ 은 함께  $=0^\circ$ 이고;
- [0057]  $R_7$  및  $R_8$ 은 각각  $H$ 이다.



[0058] 일부 실시형태에서, 상기 화합물은 하기 구조를 갖는다:



[0059]

[0060] 일부 실시형태에서, 상기 화합물에서의 결합  $\alpha$ 는 존재한다.

[0061]

일부 실시형태에서, 상기 화합물에서의 결합  $\alpha$ 는 부재한다.

[0062]

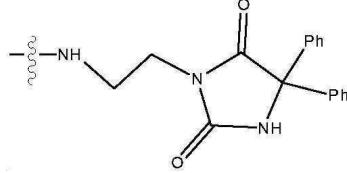
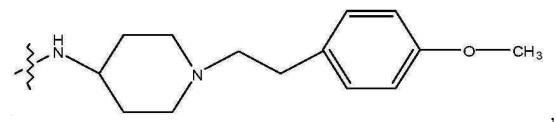
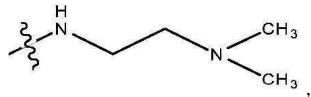
일부 실시형태에서,  $R_3$ 은  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^-$  또는  $\text{OR}_9$ 이고,

[0063]

여기서,  $R_9$ 은 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 아릴이고;

[0064]

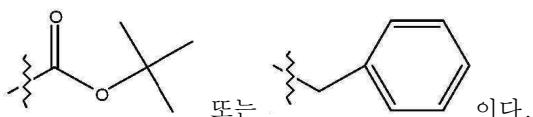
$R_4$ 는



또는  $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}(X)-$ 이고,

[0065]

여기서,  $X$ 는  $\text{O}$ ,  $\text{S}$ ,  $\text{NR}_{10}$ ,  $\text{N}^+ \text{HR}_{10}$  또는  $\text{N}^+ \text{R}_{10}\text{R}_{10}\text{O}^-$ 이고,



[0066]

각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로  $\text{H}$ , 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴,

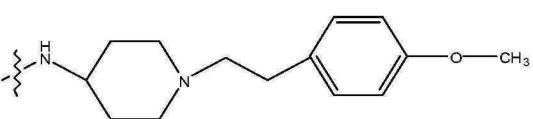
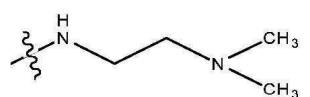
일부 실시형태에서,  $R_3$ 은  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^-$  또는  $\text{OR}_9$ 이고, 여기서,  $R_9$ 는  $\text{H}$ , 메틸, 에틸 또는 페닐이다.

[0067]

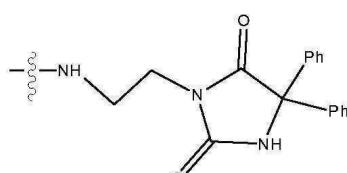
일부 실시형태에서,  $R_3$ 은  $\text{OH}$ ,  $\text{O}^-$  또는  $\text{OR}_9$ 이고, 여기서,  $R_9$ 는 메틸이다.

[0069]

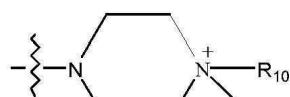
일부 실시형태에서,  $R_4$ 는



또는

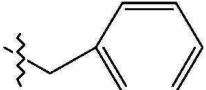


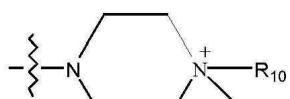
이다.



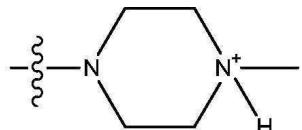
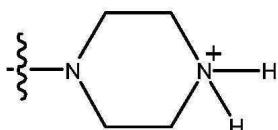
[0070]

일부 실시형태에서,  $R_4$ 는

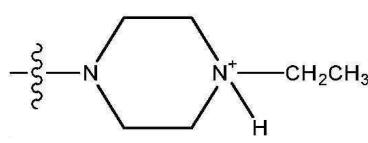
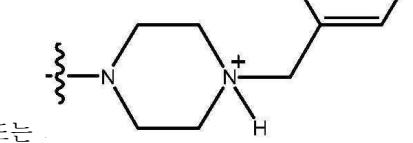
[0071] 여기서,  $R_{10}$ 은 H, 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴 또는 이다.

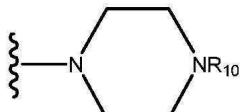


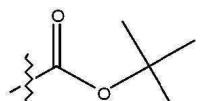
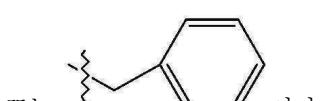
[0072] 일부 실시형태에서,  $R_4$ 는 이다.

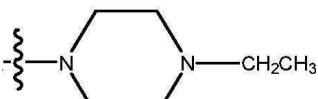
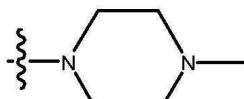
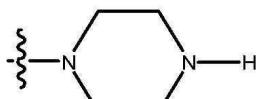


[0073] 일부 실시형태에서,  $R_4$ 는

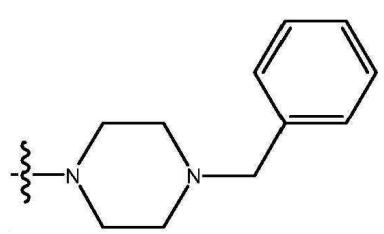
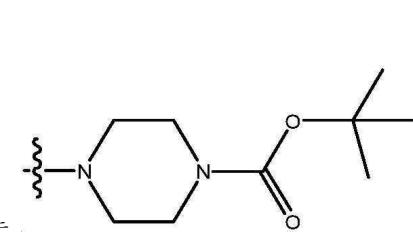
 또는 이다.

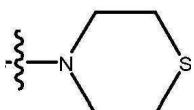
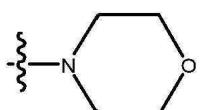


[0074] 일부 실시형태에서,  $R_4$ 는  또는 이다.



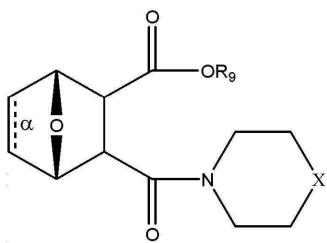
[0075] 일부 실시형태에서,  $R_4$ 는

 또는 이다.



[0076] 일부 실시형태에서,  $R_4$ 는

[0077] 일부 실시형태에서, 상기 화합물은 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는다:



[0078]

상기 구조에서,

[0080]

결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;

[0081]

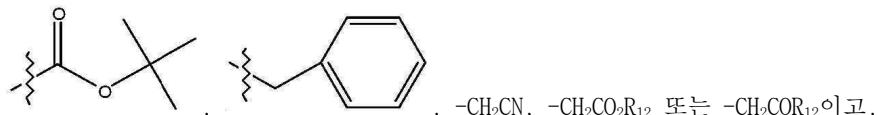
$R_9$ 는 존재하거나 부재하고, 존재하는 경우, H, 알킬, 알케닐, 알키닐 또는 페닐이고;

[0082]

X는 O,  $NR_{10}$ ,  $NH^+R_{10}$  또는  $N^+R_{10}R_{10}O^-$ 이고,

[0083]

여기서, 각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴,

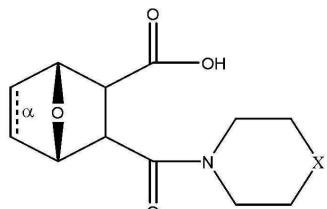


[0084]

$R_{12}$ 는 H 또는 알킬이다.

[0085]

일부 실시형태에서, 상기 화합물은 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는다:



[0086]

상기 구조에서,

[0088]

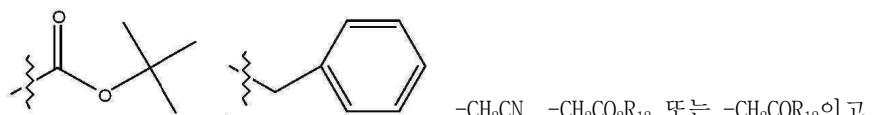
결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;

[0089]

X는 O 또는  $NR_{10}$ 이고,

[0090]

여기서, 각각의  $R_{10}$ 은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴,

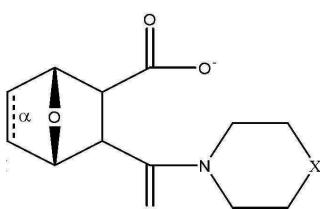


[0091]

$R_{12}$ 는 H 또는 알킬이다.

[0092]

일부 실시형태에서, 상기 화합물은 하기 구조, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르를 갖는다:



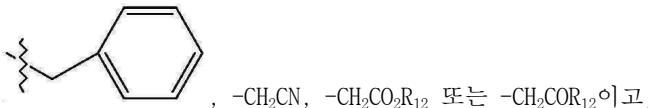
[0093]

상기 구조에서,

[0095] 결합  $\alpha$ 는 존재하거나 부재하고;

[0096] X는 O 또는  $\text{NH}^+ \text{R}_{10}\text{O}^-$ 이고,

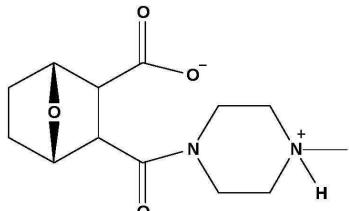
[0097] 여기서,  $\text{R}_{10}$ 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴,



,  $-\text{CH}_2\text{CN}$ ,  $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{R}_{12}$  또는  $-\text{CH}_2\text{COR}_{12}$ 이고.

[0098]  $\text{R}_{12}$ 는 H 또는 알킬이다.

[0099] 일부 실시형태에서, 상기 화합물을 하기 구조, 또는 이의 염 또는 에스테르를 갖는다:



[0100]

[0101] 본 발명은 PP2A 억제제를 T-세포에 투여하여 CTLA-4의 기능을 억제하는 것을 포함하는, T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제하는 방법을 제공한다.

[0102] 본 발명은 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 상기 대상체에서 CTLA-4의 기능을 억제하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 CTLA-4의 기능을 억제하는 방법을 또한 제공한다.

[0103] 본 발명은 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 T-세포 활성화를 증가시키는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 T-세포 활성화를 증가시키는 방법을 추가로 제공한다.

[0104] 본 발명은 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 상기 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는 방법을 더 추가로 제공한다.

[0105] 본 발명은 유효량의 CTLA-4 체크포인트 억제제 및 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 대상체를 치료하는데 효과적인, 방법을 제공한다.

[0106] 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 CTLA-4와 PP2A의 상호작용을 변화시킨다.

[0107] 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 CTLA-4에 대한 PP2A의 결합을 감소시킨다.

[0108] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암은 항-CTLA-4 면역 요법에 민감하다.

[0109] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 대상체는 CTLA-4에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 감소를 갖는다.

[0110] 본 발명은 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 상기 암을 치료하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 암이 항-CTLA-4 면역 요법에 민감한, 방법을 또한 제공한다.

[0111] 본 발명은 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 상기 암을 치료하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 암이 면역 요법에 민감한, 방법을 또한 제공한다.

[0112] 본 발명은 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하여 상기 암을 치료하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체가 CTLA-4에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 감소를 갖는, 방법을 또한 제공한다.

[0113] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암은 항-CTLA-4 면역 요법에 민감하다.

[0114] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 대상체는 CTLA-4에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 감소를 갖는다.

[0115] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암은 흑색종, 신세포 암종, 전립선암, 요로상피 암종 또

는 난소암이다.

[0116] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암은 흑색종이다.

[0117] 상기 방법 중 어느 한 방법의 일부 실시형태에서, 상기 항-CTLA-4 면역 요법에 민감한 암은 흑색종이다.

[0118] 일부 실시형태에서, 상기 암은 췌장암이다.

[0119] 일부 실시형태에서, 상기 암은 췌장암이고, 상기 Mad2를 과발현한다.

[0120] 일부 실시형태에서, 상기 암은 PP2A 기능 및/또는 DNA-손상-복구 경로에 이상이 있다.

[0121] 일부 실시형태에서, 상기 대상체는 섬유 육종, 연골 육종, 흉선종, 폐의 비정형 유암종, 난소암, 고환암, 유방암 또는 전립선암에 걸려 있다.

[0122] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 암에 걸린 대상체를 치료하는데 효과적이다.

[0123] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 상기 PP2A 억제제와 동시에, 그 전에 또는 그 후에 항암 요법을 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0124] 일부 실시형태에서, 상기 항암 요법은 체크포인트 억제제, 예를 들어, CTLA-4 체크포인트 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제의 화학 요법 효과를 증진시킨다.

[0125] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제는 항체이다.

[0126] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 CTLA-4와 PP2A의 상호작용을 변화시킨다.

[0127] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 CTLA-4에 대한 PP2A의 결합을 증가시킨다.

[0128] 항-CTLA-4 면역 요법에 민감한 암에는 전임상 또는 임상 시험에서 항-CTLA-4 면역 요법을 잘 받아 들이는 것으로 나타난 암이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0129] 항-PD-1 또는 항-PD-L1 면역 요법에 민감한 암에는 전임상 또는 임상 시험에서 항-PD-1 또는 항-PD-L1 면역 요법을 잘 받아 들이는 것으로 나타난 암이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0130] 일부 실시형태에서, 상기 화합물의 유효량은 상기 대상체에서 상기 암의 임상 증상을 감소시키는데 효과적이다.

[0131] 일부 실시형태에서, 상기 치료는 상기 대상체에서 세포독성 T-세포의 양을 증가시키는 것을 포함한다.

[0132] 일부 실시형태에서, 상기 치료는 상기 대상체에서 암 세포와 상호작용하는 세포독성 T-세포의 양을 증가시키는 것을 포함한다.

[0133] 일부 실시형태에서, 상기 치료는 상기 대상체에서 세포독성 T-세포에 의해 살해되는 암 세포의 양을 증가시키는 것을 포함한다.

[0134] T-세포 유형에는 "살해 (killer)" 세포독성 CD8<sup>+</sup> T-세포 및 "보조 (helper)" CD4<sup>+</sup> T-세포가 포함된다. 후자는, "T<sub>reg</sub>" 세포와 같은 면역 반응을 조절하는데 관여하는 아형과, 살해 T-세포 또는 항체-생산 B 세포를 자극할 수 있는 "비자기 (non-self)" 단백질의 인식을 포함하여 후천적 면역계를 자극하는 아형을 포함한다. 항원 노출 후에 "기억" T-세포로서 낮은 수준으로 유지되는 특정 T-세포 클론은, 특정 MHC/에피토프 조합에 의해 활성화되어 사이토카인 방출, 클론 확장 및 후천적 면역 반응을 유도한다.

[0135] 일부 실시형태에서, 상기 T-세포는 CD4+ T-세포, CD8+ T-세포 및/또는 CD4+CD8+ T-세포이다.

[0136] 일부 실시형태에서, 상기 암은 간 세포 암종, 사람 골육종, 원발성 간암, 위암, 난소암, 자궁내막암, 대장암, 비-소세포 폐암, 연조직 육종, 정상피종, 유방암, 림프종, 섬유 육종, 신경모세포종, 점액성 난소암, 요로상피성 방광암, 자궁 경부의 편평 세포 암종, 미만성 거대 B 세포 림프종, 폐 선종, 간 세포암, 장암, 섬유 육종, 골육종, 전립선암, 혈관근육지방종, 유방 선암종, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 및 다발성 골수 종 및 기타 혈장 세포 신생물이다.

[0137] 일부 실시형태에서, 상기 암은 폐 선종, 간 세포암, 간 세포 암종, 장암, 림프종, 섬유 육종, 골육종, 전립선암, 혈관근육지방종 또는 유방 선암종이다.

- [0138] 일부 실시형태에서, 상기 암은 급성 골수성 백혈병이다.
- [0139] 일부 실시형태에서, 상기 암은 유방암, 결장암, 대세포 폐암, 폐의 선암종, 소세포 폐암, 위암, 간암, 난소 선암종, 췌장 암종, 전립선 암종, 전골수구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종 및 혈장 세포 신생물, 대장암, 난소암, 림프종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 신경모세포종, 수모세포종, 교모세포종, 척삭종, 수막종 (비-악성 및 악성), 산재성 내재성 뇌교종 또는 비정형 유기형/간상 종양이다.
- [0140] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암은 유방암, 결장암, 대세포 폐암, 폐의 선암종, 소세포 폐암, 위암, 간암, 난소 선암종, 췌장 암종, 전립선 암종, 급성 전골수구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 다발성 골수종 및 혈장 세포 신생물, 대장암, 난소암, 림프종, 비-호지킨 림프종 또는 호지킨 림프종이다.
- [0141] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암은 뇌암이다.
- [0142] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 뇌암은 신경아교종, 모양세포성 성상세포종, 저등급 미만성 성상세포종, 역형성 성상세포종, 다형성 교모세포종, 펩지교종, 뇌실막세포종, 수막종, 뇌하수체 종양, 원발성 중추 신경계 림프종, 수모세포종, 두개인두종 또는 산재성 내재성 뇌교종이다.
- [0143] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 상기 대상체에게 항암제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0144] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 항암제는 X-방사선 또는 이온화 방사선으로부터 선택된다.
- [0145] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 표적 세포는 암 세포이다.
- [0146] 상기 방법의 일부 실시형태에서, 상기 암 세포는 유방암, 결장암, 대세포 폐암, 폐의 선암종, 소세포 폐암, 위암, 간암, 난소 선암종, 췌장 암종, 전립선 암종, 전골수구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 대장암, 난소암, 림프종, 비-호지킨 림프종 또는 호지킨 림프종 세포이다.
- [0147] LB-100의 유사체는 LB-100과 유사한 활성을 가지며, 본 출원에 기재된 방법에서 유사한 효과를 나타낸다. 이러한 유사체는 2008년 8월 14일자로 공개된 PCT 국제공개공보 WO 2008/097561, 2010년 2월 4일자로 공개된 PCT 국제공개공보 WO 2010/014254, 2015년 5월 21일자로 공개된 PCT 국제공개공보 WO 2015/073802 및 2016년 11월 24일자로 공개된 PCT 국제공개공보 WO 2016/186963에 기재되어 있으며, 이를 각각의 내용은 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0148] LB-100 및/또는 엔도탈의 생체내 전달을 위한 프로드럭으로서 작용하는 화합물은, LB-100과 유사한 활성을 가지며, 본 출원에 기재된 방법에서 유사한 효과를 나타낸다. 보다 구체적으로, 상기 프로드럭의 투여는 LB-100의 투여와 유사한 효과를 제공한다. B-100 및/또는 엔도탈의 프로드럭으로는 2015년 5월 21일자로 공개된 PCT 국제공개공보 WO 2015/073802 및 2016년 11월 24일자로 공개된 PCT 국제공개공보 WO 2016/186963에 기재된 화합물이 포함되며, 이를 각각의 내용은 본 출원에 참조로 포함된다.
- [0149] 달리 명시된 경우를 제외하고, 본 발명의 방법에서 사용된 화합물의 구조가 비대칭 탄소 원자를 포함하는 경우, 상기 화합물은 라세미체, 라세미 혼합물 및 단리된 단일 거울상 이성질체로서 존재하는 것으로 이해된다. 이러한 화합물의 모든 이성질체 형태는 본 발명에 명백하게 포함된다. 달리 명시된 경우를 제외하고, 각 입체 탄소는 R 또는 S 배열 형태일 수 있다. 따라서, 달리 명시되지 않는다면, 이러한 비대칭으로부터 발생하는 이성질체 (예를 들어, 모든 거울상 이성질체 및 부분 입체 이성질체)는 본 발명의 범위내에 포함되는 것으로 이해해야 한다. 이러한 이성질체는, 문헌 ["Enantiomers, Racemates and Resolutions" by J. Jacques, A. Collet and S. Wilen, Pub. John Wiley & Sons, NY, 1981]에 기재된 것들과 같은, 고전적 분리 기술 및 입체화학적으로 제어된 합성에 의해 실질적으로 순수한 형태로 수득될 수 있다. 예를 들어, 분할은 키랄 컬럼상에서의 제조용 크로마토그래피에 의해 수행될 수 있다.
- [0150] 본 발명은 또한 본 출원에 개시된 방법에서 화합물 상에 존재하는 원자의 모든 동위 원소를 포함하는 것으로 의도된다. 동위 원소는, 동일한 원자 번호를 갖지만 상이한 질량수를 갖는 원자들을 포함한다. 일반적인 예로써 제한 없이, 수소의 동위 원소는 삼중 수소 및 중수소를 포함한다. 탄소의 동위 원소는 C-13 및 C-14를 포함한다.
- [0151] 본 출원 전반에 걸친 구조내의 탄소의 임의의 표기는, 추가의 표기 없이 사용될 때,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  또는  $^{14}\text{C}$ 와 같은 탄

소의 모든 동위 원소를 나타내는 것으로 의도된다는 것에 주목해야 할 것이다. 또한,  $^{13}\text{C}$  또는  $^{14}\text{C}$ 를 함유하는 임의의 화합물은 구체적으로 본 출원에 개시된 화합물들 중 임의의 화합물의 구조를 가질 수 있다. 본 출원 전반에 걸친 구조내의 수소의 임의의 표기는, 추가의 표기 없이 사용될 때,  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  또는  $^3\text{H}$ 와 같은 수소의 모든 동위 원소를 나타내는 것으로 의도된다는 것에 또한 주목해야 할 것이다. 또한,  $^2\text{H}$  또는  $^3\text{H}$ 를 함유하는 임의의 화합물은 구체적으로 본 출원에 개시된 화합물들 중 임의의 화합물의 구조를 가질 수 있다. 동위 원소-라벨링된 화합물은 일반적으로, 사용된 라벨링되지 않은 시약 대신에 적절한 동위 원소-라벨링된 시약을 사용하여 당해 분야의 통상의 기술자들에게 공지된 통상의 기술에 의해 제조될 수 있다.

- [0152] 일부 실시형태에서, 상기 방법에서의 대상체는 당해 대상체에서 암을 치료하기 위해 본 발명의 화합물 및 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 투여받는다.
- [0153] 일부 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물에서의 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 리포솜을 포함한다.
- [0154] 일부 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물에서의 상기 화합물은 리포솜 또는 미소 구체 내에 포함된다.
- [0155] 일부 실시형태에서, 상기 약제학적 조성물은 상기 PP2A 억제제 및 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제를 포함한다.
- [0156] 상기 방법 또는 용도 중 어느 한 방법 또는 용도의 일부 실시형태에서, 상기 대상체는 사람이다.
- [0157] 상기 방법 또는 용도 중 어느 한 방법 또는 용도의 일부 실시형태에서, 상기 화합물 및/또는 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제는 상기 대상체에게 경구 투여된다.
- [0158] 본 발명은 T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제하는데 사용하기 위한 PP2A 억제제를 제공한다.
- [0159] 본 발명은 암에 걸린 대상체에서 CTLA-4의 기능을 억제하는데 사용하기 위한 PP2A 억제제를 제공한다.
- [0160] 본 발명은 암에 걸린 대상체에서 T-세포 활성화를 증가시키는데 사용하기 위한 PP2A 억제제를 제공한다.
- [0161] 본 발명은 암에 걸린 대상체에서 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는데 사용하기 위한 PP2A 억제제를 제공한다.
- [0162] 본 발명은, 암에 걸린 대상체를 치료하는데 사용하기 위한 PP2A 억제제로서, 상기 암이 항-CTLA-4 면역 요법에 민감한, PP2A 억제제를 제공한다.
- [0163] 본 발명은, 암에 걸린 대상체를 치료하는데 사용하기 위한 PP2A 억제제로서, 상기 대상체가 CTLA-4에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 감소를 갖는, PP2A 억제제를 제공한다.
- [0164] 본 발명은, 암에 걸린 대상체를 치료하는데 사용하기 위한, CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 PP2A 억제제를 제공한다.
- [0165] T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제하기 위한 PP2A 억제제의 용도.
- [0166] 암에 걸린 대상체에서 CTLA-4의 기능을 억제하기 위한 PP2A 억제제의 용도.
- [0167] 암에 걸린 대상체에서 T-세포 활성화를 증가시키기 위한 PP2A 억제제의 용도.
- [0168] 암에 걸린 대상체에서 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키기 위한 PP2A 억제제의 용도.
- [0169] 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 PP2A 억제제의 용도로서, 상기 암이 항-CTLA-4 면역 요법에 민감한, 용도.
- [0170] 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한 PP2A 억제제의 용도로서, 상기 대상체가 CTLA-4에 의해 매개되는 T-세포 활성화의 감소를 갖는, 용도.
- [0171] 암에 걸린 대상체를 치료하기 위한, CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 PP2A 억제제의 용도.
- [0172] 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, LB-100의 투여량을 투여받은 대상체의 혈류에서 LB-100의 농도를 최적화하는 방법을 또한 제공한다:
- [0173] (a) 상기 대상체에서 LB-100의 혈장 농도를 측정하는 단계;
- [0174] (b) (a)에서의 측정에 기초하여, 추가의 LB-100 용량이 상기 대상체에게 투여될 필요가 있는지 여부를 결정하는 단계; 및

- [0175] (c) (b)에서의 결정에 기초하여, 필요에 따라 LB-100의 추가의 투여량 또는 투여량들을 투여하는 단계.
- [0176] 일부 실시형태에서, 상기 단계 (b)는, (a)에서의 측정이 LB-100의 최소 유효 농도 (Minimum Effective Concentration: MEC)를 초과, 미만 또는 동일한지 여부에 기초하여, 추가의 LB-100 용량이 상기 대상체에게 투여될 필요가 있는지 여부를 결정하는 것을 포함한다.
- [0177] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 초기 용량은  $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 양이다.
- [0178] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은  $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$  내지  $5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 양이다.
- [0179] 일부 실시형태에서, 상기 화합물은  $0.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $0.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $0.83 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $1.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $1.75 \text{ mg}/\text{m}^2$ ,  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$  또는  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여된다.
- [0180] 일부 실시형태에서, 상기 화합물은  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 용량으로 투여된다.
- [0181] 일부 실시형태에서, 상기 화합물은 3주마다 3일 동안 투여된다.
- [0182] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은 상기 초기 용량보다 25% 더 적은 양이다.
- [0183] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은 상기 초기 용량보다 50% 더 적은 양이다.
- [0184] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은 상기 초기 용량보다 75% 더 적은 양이다.
- [0185] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은 상기 초기 용량보다 25% 더 많은 양이다.
- [0186] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은 상기 초기 용량보다 50% 더 많은 양이다.
- [0187] 일부 실시형태에서, 상기 대상체에게 투여되는 LB-100의 추가 용량은 상기 초기 용량보다 75% 더 많은 양이다.
- [0188] 일부 실시형태에서, 상기 대상체는 상기 투여와 동시에, 그 전에 또는 그 후에 항암 요법으로 추가로 치료된다.
- [0189] 항암 요법의 예로는 방사선 요법 또는 화학 요법, 항원 방출을 촉진하는 표적화 요법, 항원 제시를 촉진하는 백신접종, 공동 자극 분자를 위한 작용제 또는 T-세포 활성화를 증폭시키는 공동 억제 분자의 차단, 조절 T-세포 또는 골수-유래된 억제 세포의 수송 억제, 종양내 T-세포 침윤을 자극하는 항-혈관 내피 성장 인자, T-세포 침윤에 의해 암 인식을 증가시키거나 종양 살해를 자극하는 양자 세포 전달이 포함된다. 추가의 예는 문헌 [Swart et al. 2016], [Topalian et al. 2015] 및 [Tsiatas et al. 2016]에서 발견될 수 있다.
- [0190] 일부 실시형태에서, 상기 항암 요법은 면역 요법을 포함한다. "면역 요법"이라는 용어는, 면역 반응을 유도, 증강, 억제 또는 그렇지 않으면 변형시키는 것을 포함하는 방법에 의해 질환에 걸린 대상체를 치료하는 것을 지칭한다. 면역 요법제로는 CTLA-4, PD-1, PD-L1, GITR, OC40, LAG-3, KIR, TIM-3, B7-H3, B7-H4, CD28, CD40 및 CD137 중 1종 이상을 표적화하는 항체 제제가 포함될 수 있다.
- [0191] 일부 실시형태에서, 상기 항암 요법은 항암제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0192] 일부 실시형태에서, 상기 항암제는 면역 체크포인트 조절제이다. "면역 체크포인트 조절제"라는 용어는, 면역 체크포인트와 직접 또는 간접적으로 상호 작용하는 제제를 지칭한다. 면역 체크포인트 조절제는 억제 신호를 극복하고 암 세포에 대한 면역 부착을 허용 및/또는 증가시키기 위해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 면역 체크포인트 조절제는 면역 이펙터 반응 (예를 들어, 세포독성 T-세포 반응)을 증가시킨다. 일부 실시형태에서, 면역 체크포인트 억제제는 1종 이상의 항원에 대한 면역 관용을 감소, 제거 또는 예방한다. 예를 들어, 면역 체크포인트 조절제는, 음성 면역 반응 조절인자 (예를 들어, CTLA4)에 의해 신호 전달을 감소, 억제 또는 제거함으로써, 면역 반응의 양성 조절인자 (예를 들어, CD28)의 신호 전달을 자극 또는 증진시킴으로써, 또는 자가 면역 반응을 방지하고 면역 세포-매개된 조직 손상을 제한함으로써, 면역 세포 반응을 촉진시킬 수 있다.
- [0193] 일부 실시형태에서, 상기 항암제는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함한다.
- [0194] 일부 실시형태에서, 상기 항암제는 프로그래밍된 사멸-리간드 1 (Programmed Death-Ligand 1: PD-L1) 억제제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 PD-L1 억제제는 아테졸리주맙이다.
- [0195] Tecentriq™의 활성 성분인 아테졸리주맙은, 사람 프로그래밍된 사멸 리간드-1 (PD-L1) 차단 항체이다. 아테졸리주맙은 특정 항체 (Tecentriq, 식품 의약국 승인된 라벨링 (참조 ID:4000525) [온라인], Genentech Inc.,

2016 [2017년 2월 14자로 검색], 인터넷으로부터 검색: <URL: [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2016/761041lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2016/761041lbl.pdf)>)에 의해 확인된다.

[0196] 아테졸리주맙에 대한 권장 용량 및 일정은 질병 진행 또는 용인될 수 없는 독성까지 3주마다 60분에 걸쳐 정맥내 투여되는 1200 mg이다. 첫 번째 주입이 내약성을 갖는 경우, 후속 주입을 30분에 걸쳐 제공할 수 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 아테졸리주맙의 투여는 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg 또는 그 미만의 아테졸리주맙을 포함한다.

[0198] 일부 실시형태에서, 아테졸리주맙의 주기적 투여는 아테졸리주맙의 1, 2, 3, 4회 또는 그 미만의 투여를 포함한다.

[0199] 일부 실시형태에서, 니볼루맙의 투여는 2주마다 또는 3주마다 또는 그 미만이다.

[0200] 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 프로그래밍된 사멸-1 (PD-1) 수용체에 특이적으로 결합하여 PD-1 활성을 억제한다 ("항-PD-1 항체"). 일부 실시형태에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙 또는 펜브롤리주맙이다.

[0201] Opdivo<sup>TM</sup>의 활성 성분인 니볼루맙은, 사람 프로그래밍된 사멸 수용체-1 (PD-1) 차단 항체이다. 니볼루맙은 특정 항체 (Opdivo<sup>TM</sup>, 식품 의약국 승인된 라벨링 (참조 ID: 3677021) [온라인], Bristol-Myers Squibb, 2014 [2017년 2월 14자로 검색], 인터넷으로부터 검색: <URL: [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/1255541lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/1255541lbl.pdf)>)에 의해 확인된다.

[0202] 니볼루맙에 대한 권장 용량 및 일정은 질병 진행 또는 용인될 수 없는 독성까지 4회 용량으로 2주마다 60분에 걸쳐 정맥내 투여되는 3 mg/kg이다.

[0203] 일부 실시형태에서, 니볼루맙의 투여는 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg 또는 그 미만의 니볼루맙을 포함한다.

[0204] 일부 실시형태에서, 니볼루맙의 주기적 투여는 니볼루맙의 1, 2, 3, 4회 또는 그 미만의 투여를 포함한다.

[0205] 일부 실시형태에서, 니볼루맙의 투여는 2주마다 또는 3주마다 또는 그 미만이다.

[0206] Keytruda<sup>TM</sup>의 활성 성분인 펜브롤리주맙은, 사람 프로그래밍된 사멸 수용체-1 (PD-1) 차단 항체이다. 펜브롤리주맙은 특정 항체 (Keytruda, 식품 의약국 승인된 라벨링 (참조 ID: 3621876) [온라인], Merck & Co., 2014 [2017년 2월 14자로 검색], 인터넷으로부터 검색: <URL: [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/1255141lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/1255141lbl.pdf)>)에 의해 확인된다.

[0207] 펜브롤리주맙에 대한 권장 용량 및 일정은 질병 진행 또는 용인될 수 없는 독성까지 3주마다 30분에 걸쳐 정맥내 투여되는 2 mg/kg이다.

[0208] 일부 실시형태에서, 펜브롤리주맙의 투여는 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg 또는 그 미만의 펜브롤리주맙을 포함한다.

[0209] 일부 실시형태에서, 펜브롤리주맙의 주기적 투여는 펜브롤리주맙의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18회 또는 그 미만의 투여를 포함한다.

[0210] 일부 실시형태에서, 펜브롤리주맙의 투여는 2주마다 또는 3주마다 또는 그 미만이다.

[0211] 일부 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 세포독성 T-림프구 항원-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4: CTLA-4)에 특이적으로 결합하여 CTLA-4 활성을 억제한다 ("항-CTLA-4 항체"). 또 다른 실시양태에서. 일부 실시형태에서, 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙 또는 트레멜리무맙이다.

[0212] Yervoy<sup>TM</sup>의 활성 성분인 이필리무맙은, 사람 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4) 차단 항체이다. 이필리무맙은 특정 항체 (Yervoy, 식품 의약국 승인된 라벨링 (참조 ID: 3839653) [온라인], Bristol-Myers Squibb, 2015 [2017년 2월 14자로 검색], 인터넷으로부터 검색: <URL: [www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/125377s073lbl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/125377s073lbl.pdf)>)에 의해 확인된다.

[0213] 절제 불가능하거나 전이성 흑색종에 대한 이필리무맙의 권장 용량 및 일정은 4회 용량으로 3주마다 90분에 걸쳐 정맥내 투여되는 3 mg/kg이다. 흑색종의 아쥬반트 치료를 위한 이필리무맙의 권장 용량 및 일정은 4회 용량으로 3주마다 90분에 걸쳐 정맥내 투여되는 10 mg/kg이며, 이후 3년 동안 12주마다 정맥내 투여되는 10

mg/kg이다.

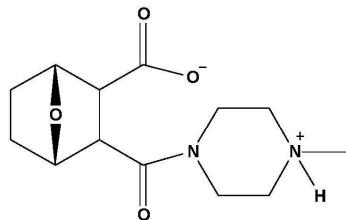
[0214] 일부 실시형태에서, 이필리무맙의 투여는 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg 또는 그 미만의 이필리무맙을 포함한다.

[0215] 일부 실시형태에서, 이필리무맙의 주기적 투여는 이필리무맙의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16회 또는 그 미만의 투여를 포함한다.

[0216] 본 발명은 유효량의 PP2A 억제제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 종양 또는 암을 치료하는 방법으로서, 상기 종양 또는 암이 면역 반응에 의한 치료에 민감한, 방법을 또한 제공한다.

[0217] 본 발명은 T-세포 반응을 증가시키는 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 암 세포에 대한 T-세포 반응을 증가시키는 방법을 또한 제공한다.

[0218] 일부 실시형태에서, 상기 PP2A 억제제는 하기 구조를 갖는다:



[0219]

[0220] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 1종 이상의 추가의 항암제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0221] 본 발명은 유효량의 항암 요법과 조합하여 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하는 방법으로서, 함께 복용할 때의 상기 유효량이 상기 대상체를 치료하는데 효과적인, 방법을 또한 제공한다.

[0222] 본 발명은 항암제 요법 단독에 비해 치료를 증진시키는데 효과적인 유효량의 PP2A 억제제를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체를 치료하고 상기 항암 요법을 투여하는 방법을 또한 제공한다.

[0223] 일부 실시형태에서, 상기 암은 면역 반응에 의한 치료에 민감하다.

[0224] 본 발명의 방법에 사용되는 화합물은 단백질 포스파타아제 2A (PP2A) 억제제이다. 제조 방법은 문헌 [Lu et al., 2009], 및 미국 특허 US 7,998,957 B2 및 US 8,426,444 B2에서 발견될 수 있다. LB-100 화합물은, 시험관내 사람 암 세포에서와 마우스에서 비경구로 투여될 때 마우스의 사람 종양 세포의 이종 이식편에서 PP2A의 억제제이다. LB-100은 마우스 모델 시스템에서 암 세포의 성장을 억제한다.

[0225] 본 출원에서 사용되는 재관류 손상과 관련된 "증상"은, 재관류 손상과 관련된 임의의 임상 또는 실험실 증상을 포함하며, 환자가 느끼거나 관찰할 수 있는 것에 한정되지 않는다.

[0226] 본 출원에서 사용되는 "질병의 치료" 또는, 예를 들어, 재관류 손상의 "치료"는, 질병 또는 질병과 관련된 증상 또는 병태의 예방, 억제, 퇴행 또는 정체를 유도하는 것을 포괄한다.

[0227] 본 출원에서 사용되는, 대상체에서 질병 진행 또는 질병 합병증의 "억제"는, 대상체에서 질병 진행 및/또는 질병 합병증을 예방 또는 감소시키는 것을 의미한다.

[0228] 본 출원에서 사용되는 "알킬"은 명시된 수의 탄소 원자를 갖는 분자쇄 및 직쇄 포화 지방족 탄화수소기 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, " $C_1-C_n$  알킬"에서와 같은  $C_1-C_n$ 은, 1, 2....., n-1 또는 n개의 탄소 원자를 선형 또는 분지 배열로 갖는 기를 포함하는 것으로 정의되고, 구체적으로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실 등을 포함한다. 한 실시형태는  $C_1-C_{20}$  알킬,  $C_2-C_{20}$  알킬,  $C_3-C_{20}$  알킬,  $C_4-C_{20}$  알킬 등일 수 있다. 한 실시형태는  $C_1-C_{30}$  알킬,  $C_2-C_{30}$  알킬,  $C_3-C_{30}$  알킬,  $C_4-C_{30}$  알킬 등일 수 있다. "알콕시"는 산소 가교를 통해 부착된 상기에서 기재된 바와 같은 알킬기를 나타낸다.

[0229] "알케닐"이라는 용어는, 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분자쇄 비방향족 탄화수소 라디칼을 지칭하며, 가능한 최대 수 이하의 비방향족 탄소-탄소 이중 결합이 존재할 수 있다. 따라서,  $C_2-C_n$  알케닐은 1, 2....., n-1 또는 n개의 탄소를 갖는 기를 포함하는 것으로 정의된다. 예를 들어, " $C_2-C_6$  알케닐"은,

2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자와 적어도 1개의 탄소-탄소 이중 결합 및, 예를 들어,  $C_6$  알케닐의 경우에는 각각, 3개 이하의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 알케닐 라디칼을 의미한다. 알케닐기는 에테닐, 프로페닐, 부테닐 및 사이클로헥세닐을 포함한다. 알킬에 대하여 상기에서 기재된 바와 같이, 상기 알케닐기의 치환, 분지쇄 또는 사이클릭 부분은 이중 결합을 포함할 수 있으며, 치환된 알케닐기를 나타내는 경우에는 치환될 수 있다. 한 실시형태는  $C_2-C_{12}$  알케닐,  $C_3-C_{12}$  알케닐,  $C_2-C_{20}$  알케닐,  $C_3-C_{20}$  알케닐,  $C_2-C_{30}$  알케닐 또는  $C_3-C_{30}$  알케닐일 수 있다.

[0230] "알키닐"이라는 용어는, 적어도 1개의 탄소-탄소 삼중 결합을 포함하는 치쇄 또는 분지쇄 탄화수소 라디칼을 지칭하며, 가능한 최대 수 이하의 비방향족 탄소-탄소 삼중 결합이 존재할 수 있다. 따라서,  $C_2-C_n$  알키닐은 1, 2.....,  $n-1$  또는  $n$ 개의 탄소를 갖는 기를 포함하는 것으로 정의된다. 예를 들어, " $C_2-C_6$  알키닐"은, 2 또는 3개의 탄소 원자와 1개의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖거나 4 또는 5개의 탄소 원자 및 2개 이하의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖거나 6개의 탄소 원자 및 3개 이하의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 알키닐 라디칼을 의미한다. 알키닐기는 에티닐, 프로피닐 및 부티닐을 포함한다. 알킬에 대하여 상기에서 기재된 바와 같이, 상기 알키닐기의 치쇄 또는 분지쇄 부분은 삼중 결합을 포함할 수 있으며, 치환된 알키닐기를 나타내는 경우에는 치환될 수 있다. 한 실시형태는  $C_2-C_n$  알키닐일 수 있다. 한 실시형태는  $C_2-C_{12}$  알키닐 또는  $C_3-C_{12}$  알키닐,  $C_2-C_{20}$  알키닐,  $C_3-C_{20}$  알키닐,  $C_2-C_{30}$  알키닐 또는  $C_3-C_{30}$  알키닐일 수 있다.

[0231] 본 출원에서 사용되는 "아릴"은, 각 환에서 10개 이하의 원자이고 적어도 1개의 환이 방향족인 임의의 안정한 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 탄소 환을 의미하는 것으로 의도된다. 이러한 아릴 요소의 예로는 폐닐, 나프틸, 테트라하이드로-나프틸, 인다닐, 바이페닐, 폐난트릴, 안트릴 또는 아세나프틸이 포함된다. 상기 아릴 치환기가 바이사이클릭이고 1개의 환이 비방향족인 경우, 부착은 방향족 환을 경유하는 것으로 이해된다. 본 발명에 포함되는 치환된 아릴은 임의의 적합한 위치에서 아민, 치환된 아민, 알킬아민, 하이드록시 및 알킬하이드록시에 의한 치환을 포함하며, 여기서, 상기 알킬아민 및 알킬하이드록시의 "알킬" 부분은 상기에서 정의된 바와 같은  $C_2-C_n$  알킬이다. 상기 치환된 아민은, 상기에서 정의된 바와 같이, 알킬기, 알케닐기, 알키닐기 또는 아릴기로 치환될 수 있다.

[0232] 알킬, 알케닐 또는 알키닐의 각각은 분지되거나 비분지되고 비치환되거나 치환된다.

[0233] 상기 알킬, 알케닐, 알키닐 및 아릴 치환기들은, 달리 정의되지 않는다면, 치환되거나 비치환될 수 있다. 예를 들어, ( $C_1-C_6$ ) 알킬은 OH, 옥소, 할로겐, 알록시, 디알킬아미노, 또는 모르폴리닐, 피페리디닐 등과 같은 헤테로 사이클릴로부터 선택된 1종 이상의 치환기로 치환될 수 있다.

[0234] 본 발명의 화합물에서, 알킬기, 알케닐기 및 알키닐기는 본 출원에서 정의된 비-수소기에 의해 가능한 정도까지 1개 이상의 수소 원자를 치환함으로써 추가로 치환될 수 있다. 이들에는 할로, 하이드록시, 머캅토, 아미노, 카복시, 시아노 및 카바모일이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0235] 본 출원에서 사용되는 "치환된"이라는 용어는, 소정의 구조가 상기에서 정의된 바와 같은 알킬기, 알케닐기, 또는 아릴기일 수 있는 치환기를 갖는 것을 의미한다. 상기 용어는 명명된 치환기에 의한 다수의 치환도를 포함하는 것으로 간주되어야 한다. 복수의 치환기 모이어티 (moiety)가 개시되거나 청구되는 경우, 상기 치환된 화합물은 1개 이상의 상기 개시되거나 청구된 치환기 모이어티에 의해 독립적으로 단일 또는 복수로 치환될 수 있다. 독립적으로 치환된다는 것은, 상기 (2개 이상의) 치환기가 동일하거나 상이할 수 있다는 것을 의미한다.

[0236] 당해 분야의 통상의 기술자는 본 발명의 화합물 상에서의 치환기 및 치환 패턴을 선택하여, 하기 제시된 방법 뿐만 아니라 당해 분야에 공지된 기술에 의해 용이하게 이용가능한 출발 물질로부터 용이하게 합성될 수 있으며 화학적으로 안정한 화합물을 제공할 수 있는 것으로 이해된다. 치환기 자체가 1개 초과의 기로 치환되는 경우, 이러한 복수의 기는, 안정한 구조가 생기는 한, 동일한 탄소 또는 상이한 탄소 상에 존재할 수 있는 것으로 이해된다.

[0237] 본 출원에서 사용되는 제제를 "투여하는 것"은 당해 분야의 통상의 기술자에게 잘 공지된 다양한 방법 또는 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 수행될 수 있다. 투여는, 예를 들어, 경구로, 비경구로, 복강내로, 정맥내로, 동맥내로, 경피로, 설하로, 근육내로, 직장으로, 경협측으로 (transbucally), 비강내로, 리포솜으로 (liposomally), 흡입을 통해, 질내로, 안구내로, 국소 전달을 통해, 피하로, 지방내로, 관절내로, 척수강내로, 뇌실내로, 심실내로, 종양내로, 뇌실질내로 또는 실질내로 수행될 수 있다.

- [0238] 다수의 일상적으로 사용되는 약제학적 담체를 적용하는 하기 전달 시스템이 사용될 수 있지만, 단지 본 발명에 따른 조성물을 투여하기 위해 고려된 다수의 가능한 시스템을 나타낼 뿐이다.
- [0239] 주사가능한 약물 전달 시스템으로는 용액, 혼탁액, 젤, 미소 구체 및 중합성 주사제가 포함되며, 용해도-변경제 (예를 들어, 에탄올, 프로필렌 글리콜 및 수크로스) 및 중합체 (예를 들어, 폴리카프릴락톤 및 PLGA)와 같은 부형제가 포함될 수 있다.
- [0240] 다른 주사가능한 약물 전달 시스템으로는 용액, 혼탁액, 젤이 포함된다. 경구 전달 시스템으로는 정제 및 캡슐이 포함된다. 이들은 결합제 (예를 들어, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리피닐 피롤리돈, 기타 셀룰로오스성 물질 및 전분), 희석제 (예를 들어, 락토오스 및 기타 당류, 전분, 디칼슘 포스페이트 및 셀룰로오스성 물질), 봉해제 (예를 들어, 전분 중합체 및 셀룰로오스성 물질) 및 윤활제 (예를 들어, 스테아레이트 및 탈크)와 같은 부형제를 포함할 수 있다.
- [0241] 이식가능한 시스템으로는 로드 (rod) 및 디스크가 포함되며, PLGA 및 폴리카프릴락톤과 같은 부형제를 포함할 수 있다.
- [0242] 경구 전달 시스템으로는 정제 및 캡슐이 포함된다. 이들은 결합제 (예를 들어, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스, 폴리피닐 피롤리돈, 기타 셀룰로오스성 물질 및 전분), 희석제 (예를 들어, 락토오스 및 기타 당류, 전분, 디칼슘 포스페이트 및 셀룰로오스성 물질), 봉해제 (예를 들어, 전분 중합체 및 셀룰로오스성 물질) 및 윤활제 (예를 들어, 스테아레이트 및 탈크)와 같은 부형제를 포함할 수 있다.
- [0243] 경점막 전달 시스템으로는 패치, 정제, 좌약, 페서리, 젤 및 크림이 포함되며, 가용화제 및 촉진제 (예를 들어, 프로필렌 글리콜, 담즙산 염 및 아미노산)과 같은 부형제, 및 기타 비히클 (예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜, 지방산 에스테르 및 유도체, 및 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 및 히알루론산과 같은 친수성 중합체)를 함유할 수 있다.
- [0244] 피부 전달 시스템으로는, 예를 들어, 수성 및 비수성 젤, 크림, 다상 애멜전, 마이크로애멜전, 리포솜, 연고, 수성 및 비수성 용액, 로션, 에어로졸, 탄화수소 기체 및 분말이 포함되며, 가용화제, 투과 촉진제 (예를 들어, 지방산, 지방산 에스테르, 지방 알코올 및 아미노산) 및 친수성 중합체 (예를 들어, 폴리카보필 및 폴리비닐 피롤리돈)과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 리포솜 또는 경피 촉진제이다.
- [0245] 재구성가능한 전달 시스템을 위한 용액, 혼탁액 및 분말은 혼탁제 (예를 들어, 검, 잔탄, 셀룰로오스성 물질 및 당류), 습윤제 (예를 들어, 소르비톨), 가용화제 (예를 들어, 에탄올, 물, PEG 및 프로필렌 글리콜), 계면활성제 (예를 들어, 나트륨 라우릴 설레이트, 스판 (Spans), 트윈 (Tweens) 및 세틸 피리딘), 보존제 및 항산화제 (예를 들어, 파라벤, 비타민 E 및 C, 및 아스코르브산), 케이킹 방지제, 코팅제 및 칼레이트화제 (예를 들어, EDTA)와 같은 비히클을 포함할 수 있다.
- [0246] 본 출원에서 사용되는 "약제학적으로 허용되는 담체"는, 합리적인 유익/위험 비율에 비례하여 과도한 부작용 (예를 들어, 독성, 자극 및 알러지 반응) 없이 사람 및/또는 동물에게 사용하기에 적합한 담체 또는 부형제를 지칭한다. 이것은 본 발명의 화합물을 상기 대상체에게 전달하기 위한 약제학적으로 허용되는 용매, 혼탁제 또는 비히클일 수 있다.
- [0247] 본 발명의 방법에 사용되는 화합물은 염의 형태일 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "염"은 화합물의 산성 또는 염기성 염을 제조함으로써 개질된 본 발명의 화합물의 염이다. 감염이나 질병을 치료하는데 사용되는 화합물의 경우, 상기 염은 약제학적으로 허용된다. 약제학적으로 허용되는 염의 예로는 아민과 같은 염기성 잔기의 무기산 또는 유기산 염; 폐놀과 같은 산성 잔기의 알칼리 또는 유기 염이 포함되지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 상기 염은 유기산 또는 무기산을 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 산성 염은 염화물, 브롬화물, 설페이트, 나이트레이트, 포스페이트, 설포네이트, 포르메이트, 타르트레이트, 말리에이트, 말레이트, 시트레이트, 벤조에이트, 살리실레이트, 아스코르베이트 등이다. 폐놀레이트 염은 알칼리 토금속 염, 나트륨, 칼륨 또는 리튬염이다. 이와 관련해서, "약제학적으로 허용되는 염"이라는 용어는, 본 발명의 화합물의 상대적인 비독성의 무기산, 유기산 또는 염기 부가 염을 지칭한다. 이러한 염은 본 발명의 화합물의 최종 단리 및 정제 중에 그 자리에서 제조될 수 있거나, 본 발명의 정제된 화합물을 유리 염기 또는 유리 산 형태로 적절한 유기산, 무기산, 유기 염기 또는 무기 염기와 별도로 반응시키고, 이에 따라 형성된 염을 단리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염으로는 브롬화수소, 염화수소, 설페이트, 바이설레이트, 포스페이트, 나이트레이트, 아세테이트, 발레레이트, 올리에이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토

실레이트, 시트레이트, 말리에이트, 푸마레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토비오네이트 및 라우릴설포네이트 염 등이 포함된다. (예를 들어, 문헌 [Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조).

[0248] 본 발명은 본 방법의 화합물의 에스테르 또는 약제학적으로 허용되는 에스테르를 포함한다. "에스테르"라는 용어는 R-CO-OR' 기를 함유하는 화합물을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 "R-CO-O" 부분은 본 발명의 모 화합물로부터 유도될 수 있다. 상기 "R" 부분은 알킬기, 알케닐기, 알키닐기, 헤테로알킬기, 아릴기 및 카복시 알킬기를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0249] 본 발명은 본 방법의 화합물의 약제학적으로 허용되는 프로드럭 에스테르를 포함한다. 본 방법의 화합물의 약제학적으로 허용되는 프로드럭 에스테르는 가용매분해에 의해 또는 생리학적 조건하에 모 화합물의 유리 카복시산으로 전환될 수 있는 에스테르 유도체이다. 프로드럭의 예로는 생체내에서 절단되어 관심 대상 화합물을 생성하는 알킬 에스테르가 있다.

[0250] 상기 화합물, 또는 이의 염, 쌍성 이온 또는 에스테르는 적절한 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적으로 허용되는 조성물로 임의로 제공된다.

[0251] 본 출원에서 사용되는 밀리그램으로 측정된 제제의 "양" 또는 "용량"은, 약물 생성물의 형태에 관계없이, 약물 생성물에 존재하는 제제의 밀리그램을 지칭한다.

[0252] 미국 국립 보건원 (National Institutes of Health: NIH)은 종 사이의 중량비에 대한 표면적을 설명하는 전환 계수를 제공하는 하기 등가 표면적 투약량 전환 계수 표 (표 A)를 제공한다.

[0253] [표 A]

[0254] 등가 표면적 투약량 전환 계수

		으로				
		마우스 20 g	래트 150 g	원숭이 3 kg	개 8 kg	사람 60 kg
등 가 비 율	마우스	1	1/2	1/4	1/6	1/12
	래트	2	1	1/2	1/4	1/7
	원숭이	4	2	1	3/5	1/3
	개	6	4	1 2/3	1	1/2
	사람	12	7	3	2	1

[0255]

[0256] 본 출원에서 사용되는 "치료학적 유효량" 또는 "유효량"이라는 용어는, 본 발명의 방식에서 사용될 때, 합리적인 유익/위험 비율에 비례하여 과도한 부작용 (예를 들어, 독성, 자극 및 알러지 반응) 없이 목적하는 치료학적 반응을 산출하기에 충분한 구성성분의 양을 지칭한다. 구체적인 유효량은 치료될 특정한 병태, 환자의 건강 상태, 치료될 포유 동물의 유형, 치료 기간, 동시 요법 (존재하는 경우)의 특성, 사용된 구체적인 제형, 및 화합물 또는 이의 유도체의 구조와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다.

[0257]

본 명세서에서 범위가 주어지는 경우, 당해 범위는 당해 범위 및 이의 임의의 하위 범위 내의 모든 정수 및 0.1 단위를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 77 내지 90%의 범위는 77, 78, 79, 80 및 81% 등을 개시하는 것이다.

[0258]

본 출원에 사용되는 명시된 수에 대한 "약"은 명시된 값의 +1% 내지 -1%의 범위를 포함한다. 예로써, 따라서, 약 100 mg/kg은 99, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, 99.5, 99.6, 99.7, 99.8, 99.9, 100, 100.1, 100.2, 100.3, 100.4, 100.5, 100.6, 100.7, 100.8, 100.9 및 101 mg/kg을 포함한다. 따라서, 한 실시형태에서는 약 100 mg/kg<sup>o</sup> 100 mg/kg을 포함한다.

[0259]

파라미터 범위가 제공되는 경우, 당해 범위 내의 모든 정수 및 이의 1/10은 또한 본 발명에 의해 제공되는 것으로

로 이해된다. 예를 들어, "0.2~5 mg/kg/일"은 0.2 mg/kg/일, 0.3 mg/kg/일, 0.4 mg/kg/일, 0.5 mg/kg/일, 0.6 mg/kg/일 등에서부터 5.0 mg/kg/일까지를 개시하는 것이다.

[0260] 전술한 실시형태의 경우, 본 출원에 개시된 각각의 실시형태는 다른 개시된 실시형태 각각에 적용가능한 것으로 고려된다. 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합은 본 발명의 범위내에 있다.

[0261] 본 발명은 하기 실험 세부 내용을 참조하여 보다 잘 이해될 것이지만, 당해 분야의 통상의 기술자라면 상세하게 설명된 구체적인 실험이 이후에 이어지는 청구범위에서 보다 완전하게 기재되는 본 발명을 단지 예시하는 것임을 용이하게 인식할 것이다.

#### 조합 요법

[0263] 흑색종과 같은 소정의 병태를 치료하기 위한 2종의 약물의 투여는 다수의 잠재적인 문제를 초래한다. 2종의 약물 사이의 생체내 상호 작용은 복잡하다. 임의의 단일 약물의 효과는 흡수, 분포 및 제거와 관련이 있다. 2종의 약물이 체내에 도입될 때, 각 약물은 다른 약물의 흡수, 분포 및 제거에 영향을 미치며, 이로 인해 다른 약물의 효과를 변경할 수 있다. 예를 들어, 하나의 약물은 다른 약물을 제거하는 대사 경로에 관여하는 효소의 생산을 억제, 활성화 또는 유도할 수 있다 (Guidance for Industry, 1999). 따라서, 2종의 약물이 동일한 병태를 치료하기 위해 투여될 때, 각각이 사람 대상체에서 다른 약물의 치료학적 활성을 보완하거나, 이에 영향을 미치지 않거나, 이를 방해하지 않을 것인지 여부는 예측할 수 없다.

[0264] 2종의 약물 사이의 상호 작용은 각 약물의 의도된 치료학적 활성을 영향을 미칠 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 상호 작용은 독성 대사 물질의 수준을 증가시킬 수 있다 (Guidance for Industry, 1999). 상기 상호 작용은 또한 각 약물의 부작용을 높이거나 줄일 수 있다. 따라서, 질병을 치료하기 위해 2종의 약물을 투여하면, 각 약물의 부정적인 부작용 프로파일에서 어떤 변화가 일어날지는 예측할 수 없다.

[0265] 또한, 2종의 약물 사이의 상호 작용의 효과가 언제 나타나게 될 것인지를 정확하게 예측하는 것은 어렵다. 예를 들어, 약물들 사이의 대사 상호 작용은 제2 약물의 초기 투여시에, 2종의 약물이 정상 상태의 농도에 도달한 후에 또는 약물들 중 1종의 약물의 중단시에 분명해질 수 있다 (Guidance for Industry, 1999).

#### 실험 세부 사항

##### **실시예 1. PP2A 억제 및 CTLA-4 활성**

[0268] 본 출원에 개시된 LB-100 화합물 및 LB-100의 기타 동족체는 CTLA-4와 PP2A의 상호 작용을 변화시켜 T-세포에서 CTLA-4의 기능을 억제함으로써 T-세포 활성화의 CTLA-4-매개된 억제를 차단한다. 이러한 상호 작용은 T-세포 활성화를 증가시킨다.

##### **실시예 2. 시험관내 연구: PP2A 및 CTLA4**

[0270] 일차 사람 T-세포 및 Jurkat T-세포를 LB-100으로 처리하고, T-세포 활성화 수준을 측정한다. LB-100은 T-세포의 활성화를 증가시킨다.

[0271] 일차 사람 T-세포 및 Jurkat T-세포를 LB-100으로 처리하고, PP2A:CTLA-4 상호 작용을 평가한다. LB-100은 PP2A와 CTLA-4의 상호 작용을 감소시킨다.

[0272] 일차 사람 T-세포 및 Jurkat T-세포를 LB-100으로 처리하고, PP2A 인산화 수준을 측정한다. LB-100은 T-세포에서 인산화를 증가시킨다.

##### **실시예 3. LB-100 및 유사체의 투여**

[0274] 일정량의 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 대상체에서 세포독성 T-세포의 수를 증가시킴으로써 암을 치료하는데 효과적이다.

[0275] 본 출원에 개시된 LB-100 화합물의 유사체를 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 대상체에서 세포독성 T-세포의 수를 증가시킴으로써 암을 치료하는데 효과적이다.

[0276] 일정량의 LB-100 화합물을 흑색종에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 대상체에서 세포독성 T-세포의 수를 증가시킴으로써 암을 치료하는데 효과적이다.

[0277] 본 출원에 개시된 LB-100 화합물의 유사체를 흑색종에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 대상체에서 세포독성 T-세포의 수를 증가시킴으로써 암을 치료하는데 효과적이다.

[0278] **실시예 4. CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100의 투여**

일정량의 CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물 및 억제제의 양은 상기 대상체를 치료하는데 효과적이다.

일정량의 CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 양은 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제의 항암 활성을 증진시키는데 효과적이다.

일정량의 CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 흑색종에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물 및 억제제의 양은 상기 대상체를 치료하는데 효과적이다.

일정량의 CTLA-4 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 흑색종에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 양은 상기 CTLA-4 체크포인트 억제제의 항암 활성을 증진시키는데 효과적이다.

[0283] **실시예 5: 이필리무맙 또는 트레멜리무맙에 대한 부가적 치료로서의 LB-100의 효능 평가**

부가적 치료는 시너지 효과를 제공하고, 부작용을 감소시켜 더 적은 용량을 가능하게 한다.

이필리무맙 또는 트레멜리무맙을 이미 투여받고 있는 흑색 종에 걸린 사람 환자의 부가적 치료로서의 LB-100의 주기적 투여는, 임상적으로 유의미한 이점을 제공하며, 이필리무맙 또는 트레멜리무맙이 (동일한 용량으로) 단독으로 투여될 때 보다 상기 환자를 치료하는데 있어서 보다 효과적이다 (적어도 부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다).

LB-100을 이미 투여받고 있는 흑색 종에 걸린 사람 환자의 부가적 치료로서의 이필리무맙 또는 트레멜리무맙의 주기적 투여는, 임상적으로 유의미한 이점을 제공하며, LB-100이 (동일한 용량으로) 단독으로 투여될 때 보다 상기 환자를 치료하는데 있어서 보다 효과적이다 (적어도 부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다).

상기 부가적 치료는 과도한 부정적인 부작용이 없거나 치료의 안전성에 영향을 미치지 않으면서 상기 환자를 치료하는데 있어서 효능을 또한 제공한다 (적어도 부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다). 각 제제가 단독으로 투여될 때와 비교하여,

1. 상기 부가적 치료는 흑색종에 걸린 환자에서 세포독성 T-세포의 양을 증가시키는데 있어서 보다 효과적이며 (부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다);

2. 상기 부가적 치료는 흑색종에 걸린 환자에서 흑색종의 진행을 늦추는데 있어서 보다 효과적이며 (부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다);

3. 상기 부가적 치료는 흑색종 환자에서 CTLA-4의 기능을 감소시키는데 있어서 보다 효과적이다 (부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다).

[0291] **논의 (실시예 1~5)**

암의 맥락에서 면역계의 중요성은 암 면역 요법의 발달로 점점 더 인식되고 있다. 자가면역을 예방하기 위한 면역계의 자연적인 조절 메커니즘은 면역감시를 피하기 위해 종양에 의해 종종 선택된다. 프로그래밍된 사멸-1 (PD-1) 및 세포독성 T-림프구 관련 단백질-4 (CTLA-4)와 같은 체크포인트 분자는, 종양에 의해 구성적으로 활성화되어, 종양의 신생 항원을 인식하는 세포독성 T-세포의 활성을 억제하는 면역계의 음성 조절인자이다 (문헌 [Topalian et al., 2015]). 면역억제성 T-세포 (Treg)는 또한 종양 미세환경 (TME)에 동원되어 CD8 T-세포의 효과를 감소시킨다. PD-1 또는 CTLA-4 신호 전달을 차단하는 단클론 항체는 전이성 흑색종에 걸린 일부 환자에서 지속적인 (durable) 장기 반응을 유도할 수 있다. 이로 인해, 미국 식품 의약국 (FDA)은 진행 흑색종 치료를 위해 2011년에 이필리무맙 (항-CTLA-4) 및 2014년에 니볼루맙 (항-PD-1)을 승인하였다. 암 요법에 대한 접근법에서 패러다임 변화를 이끌면서 복수의 기타 암에 체크포인트 억제제의 사용을 확대하기 위한 임상 시험이 현재 진행중이다. 그러나, 환자의 서브세트만이 단일 제제로서의 체크포인트 억제제에 대해 효과적으로 반응하는데, 이는 복수의 과정 메커니즘이 면역억제 TME를 생성하는데 관여한다는 사실을 강조한다. 따라서, 적극적인 연구 영역은 체크포인트 억제의 효과를 증대시킬 수 있는 조합 전략을 확인하는 것이다.

세포독성 T-림프구 관련 항원-4 (CTLA-4)는 면역글로불린 상위 계열의 활성화-유도된 당단백질이며, 이의 주요 기능은 T-세포 반응을 하향 조절하는 것이다 (문헌 [Brunet, J.F. et al. 1987]). CTLA-4는 T-세포의 표면 상에서 발현되며, 억제성 다운스트림 T-세포 수용체 (T-cell receptor: TCR) 신호 전달을 유도하고 T-세포 공동 자극 수용체인 CD28의 활성화를 제거하여 활성화의 초기 단계를 주로 억제함으로써 T-세포 활성화를 억제하고

특정 질병, 예를 들어, 암에 대한 면역 관용을 증가시킨다. CD28-의존성 공동 자극과 직접 음성 신호 전달의 길항 작용을 비롯한 여러 메커니즘이 CTLA-4의 억제 능력을 설명하기 위해 문서화되어 있다 (문헌 [Carreno, B.M. et al. 2000]). CTLA-4의 세포질 미부 (cytoplasmic tail)는 내재적 효소 활성이 결여되어 있기 때문에, 이러한 음성 신호의 전달은 CTLA-4와 주요 신호 전달 분자의 결합을 통해 제공될 가능성이 있다 (문헌 [Teft, W.A. Et al. 2006]).

[0294] CTLA-4의 억제는 면역-체크포인트 차단을 통한 암 치료를 목표로 삼았다. 세포 및 쥐파동물의 악성종양 모델에 의해, T-세포 반응의 음성 조절인자인 세포독성 T-림프구 항원-4 (CTLA-4)의 차단은 종양 세포에 대한 내인성 반응을 증가시킴으로써, 단독으로 또는 다른 치료학적 개입과 함께 사용될 때 종양 세포 사멸을 초래하는 것으로 입증되었다 (문헌 [Grosso, J.F. et al. 2013]). 전임상 결과는 완전한 사람 IgG1 단클론 항체 (mAb)인 이필리무맙 및 완전한 사람 IgG2 mAb인 트레멜리무맙의 임상 개발로 이어졌으며, 이들 각각은 CTLA-4에 결합한다.

[0295] 키나아제에 의한 단백질의 인산화 및 포스파타아제에 의한 이의 탈인산화는 세포 증식 및 세포 사멸을 비롯한 다수의 과정을 조절하는 세포의 신호 전달 경로의 중요한 구성요소이다 (문헌 [Shi et al. 2009]). 포스파타아제가 오랫동안 암 치료를 위한 잠재적으로 중요한 표적으로 여겨졌지만, 독성에 대한 우려로 인해 포스파타아제 억제제를 개발하려는 노력은 거의 없었다 (문헌 [Janssens et al. 2012]).

[0296] 단백질 포스파타아제 2A (PP2A)는 ATM/ATR-의존성 반응 경로와 ATM/ATR-비의존성 반응 경로 둘 다의 수많은 단백질을 탈인산화시키는 아주 흔한 세린/트레오닌 포스파타아제이다 (문헌 [Mumby, M. 2007] 참조). PP2A는 다양한 세포 과정에 관여한다. 면역계에서, PP2A는 CTLA-4와 결합하여 활성화된 T-세포의 억제를 유도하는 Akt의 탈인산화를 매개하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Parry et al. 2005]). PP2A의 약리학적 억제는 이전에 p53, γH2AX, PLK1 및 Akt와 같은 다양한 신호 전달 단백질의 구성 인산화를 통해 방사선-매개된 DNA 손상에 대해 암 세포를 민감하게 하여 세포 주기 조절 완화, DNA 복구 억제 및 아폽토시스를 유발하는 것으로 나타났다 (문헌 [Wei, D. et al. 2013] 참조).

[0297] 가로 추출물 (밀라브리스)의 기본 활성 성분인 칸타리딘은 PP2A의 강력한 억제제로 밝혀진 전통 중의학으로부터 유래된 화합물이다 (문헌 Efferth, T. et al. 2005). 칸타리딘이 이전에 간암 치료에 사용되고 다제내성 백혈병 세포주에 대해 효능을 나타냈지만 (문헌 [Efferth, T. et al. 2002]), 이의 심각한 독성은 이의 임상적 유용성을 제한한다. PP2A의 2종의 강력한 억제제인, 자연 발생 독성인 칸타리딘 및 이의 탈메틸화된 유사체인 노르 칸타리딘 (문헌 [Bertini et al. 2009])은, 거의 임상적인 세부 사항이 이용가능하지 않지만, 위장 암이 있는 중국 환자에서 항암 활성을 갖는 것으로 보고되었다 (문헌 [Wang et al., 1989]).

[0298] PP2A의 또 다른 선택적 억제제인 포스트리에신은 20년 전에 미국 NCI-후원된 몇가지 임상 1상 시험에서 평가되었다. 가장 큰 임상 시험에서, 포스트리에신은 용량 제한 독성 (dose-limiting toxicity: DLT)이 없는 46명의 고령 종양 환자 중 16명 (34.8%)에서 질병 안정성과 관련되었다 (문헌 [Le et al., 2004]). 임상 시험은 불충분한 약물 공급 때문에 완료되지 않았다.

[0299] LB-100은 독성이 현저히 낮은 칸타리딘의 작은 분자 유도체이다. LB-100 및 이의 지질-용해성 동족체인 LB-102는 다양한 사람 고령 종양으로부터 유래한 세포주의 증식을 억제한다. 두 화합물은 췌장 및 간 세포 암종, 섬유 육종, 크롬친화세포종, 신경모세포종 및 교모세포종의 이종 이식에 대한 시스플라틴, 독소루비신 및 테모졸로마이드; 및 췌장, 비인두 및 교모세포종 이종 이식에 대한 국소 X 선의 독성을 유의하게 증가시키지 않으면서 활성을 강화시킨다 (문헌 [Bai et al., 2014a], [Bai et al., 2014b], [Zhang et al., 2010], [Matiniova et al., 2011], [Lu et al., 2009], [Wei et al., 2013], [Lv et al., 2014] 및 [Gordon et al., 2015]). 또한, LB-100은 난소 암종 및 수모세포종 이종 이식에서 시스플라틴에 대한 내성을 역전시켰다 (문헌 [Chang et al., 2015] 및 [Ho et al., 2016]). 이전의 전임상 연구는, LB-100이 교모세포종 (GBM), 전이성 크롬친화세포종 및 췌장암에 대한 테모졸로마이드, 독소루비신 및 방사선 요법의 세포독성 효과를 증진시킬 수 있다는 것을 보여주었다 (문헌 [Wei, D. et al. 2013], [Lu, J. et al. 2009], [Zhang, C. et al. 2010] 및 [Martiniova, L. et al. 2011]).

[0300] LB-100은 또한 고령 종양의 치료를 위해 도세탁셀과 조합하여 임상 1상 연구를 진행하고 있다 (문헌 [Chung, V. 2013]). LB-100은 진행성 고령 종양의 안정화와 관련된 용량에서 양호한 내약성을 갖는 임상 1상 시험에서 최근에 나타난 포스파타아제 2A (PP2A) 단백질의 신규한 혁신적인 작은 분자 억제제이다 (문헌 [Chung et al. 2017]). PP2A는 CTLA-4의 다운스트림에서 Akt 신호 전달을 매개하는데 관련되어 왔다 (문헌 [Parry et al. 2005]). 생체내에서 풀링된 짧은 해어핀 RNA 스크린에서, 녹아웃되었을 때의 PP2A의 조절 서브유닛인 Ppp2r2d는 RNA 라이브리리내의 모든 유전자 중에서 종양 침윤 램프구의 증식을 최대 정도까지 증가시키는 것으로 밝혀

졌으며, 종양 미세환경에서 T-세포 증식을 억제하는데 있어서 PP2A를 중요한 조절인자로서 확인하였다 (문헌 [Zhou et al. 2014]). 또한, PP2A는 조절 T-세포 (Treg) 기능에 필수적인 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Apostolidis et al. 2014]).

[0301] 복수의 전임상 연구는 LB-100이 다양한 종양 모델에서 효과적인 화학 증감제 또는 방사선 증감제로서 밝혀졌지만 (문헌 [Hone et al., 2015]), 이것이 면역계에 미치는 영향을 연구한 바가 없다.

[0302] CTLA-4 기능의 손상은 암 환자가 자신의 암에 대해 보다 효과적인 세포독성 T-세포 공격을 시작할 수 있도록 한다. 치료학적 유효 용량에서 유의한 독성과 관련되는, CTLA-4의 선도적인 임상적으로 사용되는 조절인자인 이필리무맙 (Yervoy) 항체와는 달리, LB-100 화합물은 임의의 유의한 독성 또는 부작용의 부재하에 여러 가지 다양한 유형의 암의 안정성과 관련되어 있다.

[0303] 특히 진행 흑색종이 있는 환자에서 CTLA-4를 이필리무맙으로 억제하는 임상 활성에 대한 다수의 보고가 있다. 이를 연구들에 따르면, 이필리무맙 단일 제제 및 이와 다카바진과 같은 세포독성 약물 또는 또 다른 면역 체크포인트 억제제인 니볼루맙과의 조합은 암의 퇴행을 유발하는 것으로 나타난다. 단독 또는 이와 다른 제제인 이필리무맙과의 조합은 호디 등 (문헌 [Hodi et al., 2010])에 의한 연구에서와 같은 유의한 독성과 관련되어 있으며, 이 연구에서 환자의 15% 이하는 2.1%의 사망률을 비롯하여 3 또는 4 등급의 유해 사례가 있었다. 월속 등 (문헌 [Wolchok et al., 2013])은 진행 흑색종이 있는 환자에서 이필리무맙 + 니볼루맙을 연구하였지만, 3 또는 4 등급의 유해 사례가 환자의 53%에서 발생하였다. 따라서, 진행성 암의 안정화와 관련된 용량에서 제한적인 독성을 가지지 않으면서 항-CTLA-4 활성을 갖는 LB-100과 같은 분자의 이용가능성은 사람 암의 치료를 위한 매력적인 임상 후보물질이다. 현재, CTLA-4 조절에 대한 임상 반응의 분자 결정인자는 없다. 스나이더 등 (문헌 [Snyder et al., 2014])은 흑색종의 CTLA-4 치료로부터의 잠재적인 이점에 대한 유전적 원인을 보고하여 각 환자에 대한 종양 신생항원 후보물질을 특성화하기 위한 잠재적 기초를 제공하였다.

[0304] 임의의 특정 이론에 의해 구속되는 것은 아니지만, CTLA-4는 사람 T-세포에서 PP2A와 상호 작용하며, 이러한 상호 작용은 CTLA-4의 적절한 기능에 필수적이다고 믿어진다. 올바르게 기능할 때, CTLA-4는 T-세포 활성화를 억제하여 암 세포에 대한 면역 반응을 감소시킨다. 암이 있는 대상체에 대한 PP2A 억제제의 투여는 PP2A와 CTLA-4의 상호 작용을 변화시켜 CTLA-4의 정상적인 기능을 방해한다. T-세포에서의 CTLA-4 기능의 감소 또는 제거는 T-세포 활성화의 증가를 유도한다. T-세포 활성화의 증가는, 암 세포를 표적화하고 파괴하는 대상체의 세포독성 T-세포에서 증가를 초래한다. 기존 면역 체크포인트 억제제와 마찬가지로, LB-100은 단독으로 및/또는 다른 체크포인트 억제제와의 조합으로 효과적이다.

#### 실시예 6. 진행성 고형 종양이 있는 성인 환자에서의 LB-100 평가

[0305] PP2A는, 세포 분열, DNA 손상 반응, 상동 재조합 복구 및 유사 분열 종료 (mitotic exit)에서의 조절 역할 때문에, 암 요법에 대한 잠재적으로 중요한 표적으로 오랫동안 인식되어 왔지만, 이러한 효소의 억제는 임상 용도로 너무 독성이 있을 것으로 여겨져 왔다. 본 연구는 난치성 고형 종양이 있는 환자에서 PP2A 및 LB-100의 억제제의 안전성, 내약성 및 잠재적 항암 활성을 보여준다. PP2A 활성은 다수 유형의 암에서 직접 또는 간접적으로 돌연변이에 의해 변경된다. PP2A의 임상적으로 안전한 억제제의 이용가능성은 암 요법, 즉, PP2A 기능에서 및/또는 DNA 손상 복구 경로에서 돌연변이로 획득된 이상이 있는 암에서 PP2A의 약리학적 억제를 위한 유망한 신규한 방안을 열어 준다. 본 연구의 결과는 암 치료를 위한 LB-100 단독 및 다른 제제와의 조합의 추가 개발을 뒷받침한다.

[0306] **목적:** 진행성 고형 종양이 있는 성인 환자에서 포스파타아제 2A (PP2A) 단백질의 혁신적인 작은 분자 억제제인 LB-100의 안전성, 내약성 및 잠재적 활성을 평가하기 위함.

[0307] **실험 설계:** 3+3 용량 증량 설계에서 21일 주기로 3일 동안 매일 LB-100을 정맥내 투여하였다. 주요 목표는 최대 내약 용량 및 임상 2상 권장 용량을 결정하는 것이었다 (ClinicalTrials.gov: NCT01837667).

#### 재료 및 방법

[0308] 적격 환자는 표준 치료에 실패한 진행성 고형 종양을 받은 18세 이상이었다. 환자는 적어도 12주의 기대 수명 및 0 또는 1의 ECOG 수행능력 평가를 가지며 사전 동의를 제공할 수 있어야 했다. 참여 전, 환자는 선행 치료로부터 기준선 또는 1 등급 미만의 독성으로 회복하고, 충분한 골수 (절대 호중구 수  $> 1.5 \times 10^9/L$  및 혈소판 수  $> 100 \times 10^9/L$ ), 신장 (혈청 크레아티닌  $< 1.2 \text{ mg/dL}$ , 및 만일  $> 1.2 \text{ mg/dL}$ 인 경우, 크레아티닌 제거율 [Cockcroft-Gault 방법]  $> 60 \text{ mL/분}/1.73 \text{ m}^2$ ) 및 간 기능 (혈장 총 빌리루빈  $< 1.5 \text{ mg/dL}$ , 알라닌 트랜스아미나

아제 (alanine transaminase: ALT) 및 아스파르테이트 트랜스아미나아제 (aspartate transaminase: AST)  $< 2.5 \times$  정상 상한치)을 가져야 한다. 환자는 임의의 다른 미통제된 전신 질환을 갖지 않아야 한다. 가임 가능성이 있는 여성은 음성 혈청 또는 소변 임신 검사 결과를 가져야 했다.

#### [0311] 연구 설계 및 치료

[0312] 3주마다 3일 연속으로 투여된 LB-100의 안전성, 내약성 및 활성을 평가하기 위해 공개-라밸링, 용량 증량, 임상 1상 연구를 수행하였다. 최대 내약 용량 (maximum tolerable dose: MTD)에서 약동학 연구를 계획하였다. 개에서의 심각한 독성이 발생하지 않는 최대 용량의 시작 용량  $0.25 \text{ mg}/\text{m}^2$ , 1/15 및 용량 증량 계획은 FDA에 명시되어 있다. 본 연구는 각 연구 센터에서 사람 조사 위원회에 의해 승인되었으며, clinicaltrials.gov: NCT01837667에 등록되어 있다.

[0313] LB-100을 1회용 용액으로 공급하였다. 초기에, 15분에 걸쳐 LB-100을 50 mL의 식염수로 투여하였다. 혈청 크레아티닌이  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$  수준에서 비제한적으로 가역적으로 증가하기 때문에, 2시간에 걸쳐 LB-100을 500 mL의 생리 식염수로 투여하였다. 임의의 코호트내에서 용량 증량을 금지하였다. 허용되지 않는 독성, 질병 진행 또는 병발 질환이 중단을 요구하지 않는다면, 환자는 6회 이하 주기의 연구 요법을 받을 자격이 있었다. 진행 및 독성의 부재하에 6회 초과 주기가 허용되었다. 동물 독성 연구에서 고용량에서 심장 및 신장 독성 때문에, 환자는 매 주기마다 ECG, MUGA 또는 심장 초음파 사진, 심장 트로포닌 및 BNP를 비롯하여 광범위한 모니터링을 받았다. 각 주기의 전 및 1, 3, 8, 15 및 22일째에 혈액 화학, 요검사, 혈액학적 프로파일 및 활력 징후를 모니터링하였다. 실험실 파라미터를 최대 NCI-CTCAE (버전 4.0) 중증도 등급에 의해 표로 작성하였다. 안전성 검토 위원회는 2주마다 모든 임상 데이터를 평가하고, 코호트 간의 용량 증량을 승인하였다.

#### [0314] 독성 및 임상 활성의 평가

[0315] LB-100의 용량을 3명의 환자 그룹에서 증량하였다. 새로운 용량 수준의 첫 번째 환자를 3주 동안 관찰한 후, 당해 용량으로 다음 2명의 환자를 치료하였다. 잠재적인 DLT가 발생하였을 때, 3명의 새로운 환자를 당해 용량으로 진입시켰다. 또 다른 DLT가 발생한 경우, 3명의 추가 환자를 이전의 비-DLT 용량으로 치료하여 임상 2상 시험을 위해 당해 수준의 안전성을 결정하였다.

[0316] RECIST 버전 1.1을 사용하여 치료에 대한 반응을 평가하였다. LB-100의 2회 주기를 완료하고 적어도 1개의 기준 후 (post-baseline) 종양 평가를 받은 측정가능한 질병이 있는 모든 환자는 효능에 대해 평가할 수 있었다. 임의의 LB-100을 투여받은 환자는 안전성에 대해 평가할 수 있었다. NCI-CTCAE 버전 4.0에 따라 유해 사례 및 실험실 이상의 중증도를 보고하고, 국제 의약 용어를 사용하여 암호화한다.

#### [0317] 소결

[0318] 주요 목적은 3주마다 3일 연속으로 매일 정맥내 투여된 LB-100의 안전성, 내약성 및 최대 내약 용량을 결정하는 것이었다. 2차 목적은, MTD에서 LB-100을 투여받는 환자에서, 잠재적인 항-종양 활성의 모든 증거를 문서화하고, LB-100 및 대사산물인 엔도탈에 대한 약동학적 데이터를 수득하는 것이었다 (문헌 [Quang et al., 2016]).

#### [0319] 결과:

[0320] 7개의 용량 증량에 걸쳐 29명의 환자 엔트리가 있었다. 1명의 환자는 급성 감염 때문에 1개의 용량 후 치료를 중단하였고, 회복 후 재등록되었다. 두 코스 모두를 별도의 환자 엔트리로서 분석하였다. 2명의 환자는  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$  수준의 용량 제한 독성 (혈청 크레아티닌 또는 계산된 혈청 크레아티닌 제거율의 가역적 증가)을 나타냈다. 개연성 있거나 가능한 연구 약물 관련 3 등급 유해 사례는 6명 (20.7%)의 환자 [빈혈 ( $n = 2$ ), 감소된 크레아티닌 제거율, 호흡 장애, 저나트륨혈증, 림프구 감소증]에서 발생하였다. 20명의 반응-평가 가능한 환자 중 10명 (50%)은 4회 이상 주기 동안 안정한 질병이 있었다. 췌장 암종이 있는 1명의 환자는 추가의 5회 주기 동안 유지된 10회 주기 후에 잘 알려진 부분 반응이 있었다. 안정한 질병을 달성하는 기타 환자들은 다음 질병들 중 1종의 질병이 있었다: 섬유 육종, 연골 육종, 흉선종, 폐의 비정형 유암종, 난소암, 고환암, 유방암 ( $n = 2$ ) 및 전립선암. LB-100의 임상 2상 권장 용량은 3주마다 3일 동안 매일  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 이다.

#### [0321] 환자 특징

[0322] 진행 고형 종양이 있는 28명의 환자는 4개의 임상 사이트에 등록되었다. 인구통계학적 특징은 표 1에 열거되어 있다. 4명의 환자는 독성에 대해 평가할 수 없었다. 이들 환자들 중 3명은 주기 1을 완료하기 전에 질병과 관

련된 합병증이 있었다. 급성 감염 때문에 LB-100의 1회 용량 후에 폐의 비정형 유암종이 있는 4번째 환자를 연구에서 제외시키고, 7주 후에 연구에 다시 참가시켜 5회 주기 동안 안정한 질병을 달성하였다. 두 코스 모두를 분석에 포함시켰다. 이들 유해 사례 중 어느 사례도 약물 투여와 관련되지 않는 것으로 간주되었다.

[표 1]

		연구 집단 (n=28)
성별		
남성	14 (50.0%)	
여성	14 (50.0%)	
인종 기원		
백인	23 (82.1%)	
아시아인	3 (10.7%)	
보고되지 않음	1 (3.6%)	
기타	1 (3.6%)	
연령 (년)		
N	28	
평균	62.3	
표준 편차	10.66	
중앙값	64.0	
최소	35	
최대	79	
18 내지 64	15 (55.6%)	
65 +	13 (46.4%)	
원발성 부위		
폐 및 기관지	5 (17.9%)	
대장 (충수 제외)	5 (17.9%)	
유방	2 (7.1%)	
결합 및 연 조직	2 (7.1%)	
난소	2 (7.1%)	
고환	2 (7.1%)	
충수	1 (3.6%)	
골 및 관절	1 (3.6%)	
자궁체	1 (3.6%)	
췌장	1 (3.6%)	
전립선	1 (3.6%)	
직장	1 (3.6%)	
소장	1 (3.6%)	
흉선	1 (3.6%)	
자궁, NOS	1 (3.6%)	
외음부, NOS	1 (3.6%)	

표 1: 환자 기준선 임상 및 인구통계학적 특징

[0324]

### 용량 증량 및 독성

[0325] 24명의 환자는 LB-100의 3일 주기를 적어도 1회 완료하였다. 시험된 용량 수준은 0.25, 0.50, 0.83, 1.25, 1.75, 2.33 및  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$  이었다. 처음 6회 용량 수준 동안 DLT가 없었다.  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$  용량 수준에서, 전립선암이 있는 환자 및 연골 육종이 있는 환자는 4 주기 및 9 주기의 치료 중 DLT를 나타내지 않았다. 난소암이 있는 세 번째 환자는 1회 주기 후에 계산된 크레아티닌 제거율의 3 등급 증가를 나타내고 8일째 정상으로 돌아왔으며, 종양 진행 전  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 감소된 용량으로 3회 초과의 주기를 투여받았다. 섬유 육종이 있는 네 번째 환자는 첫 번째 코스 후에 계산된 크레아티닌 제거율의 3 등급 증가를 나타냈다. 크레아티닌은 21일째에 치료전 값으로 돌아왔으며,  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 두 번째 코스는 다른 독성 없이 크레아티닌 제거율의 2 등급 증가를 초래하였다. 용량을  $1.75 \text{ mg}/\text{m}^2$ 로 감소시키고, 36주 후에 진행될 때까지 독성 없이 10회 초과의 주기를 투여하였다.  $3.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 에서의 환자의 2/4가 1회 주기 동안 크레아티닌 제거율의 3 등급 증가를 나타냈으므로, 3명의 추가 환자를  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 선행 용량 수준에서 평가하였다. 이들 환자들은 제한 독성을 나타내지 않았으므로

당해 수준에서 MTD를 확립하였다. 가역적인 가벼운 피로 내지 중간 정도의 피로 이외에 증상을 보이는 독성은 없었다. 약물 투여와 가능하게 관련되는 유해 사례는 표 2에 열거되어 있다.

[표 2]

MedDRA 신호 용어[1][2]	1-2 등급	3등급	4등급	5등급
관련 치료-유발 유해 사례가 있는 경계 환자[3]	22 (75.9%)	6 (20.7%)	0	0
피로	8 (27.6%)	0	0	0
혈증 크레이티드 증가	5 (17.2%)	0	0	0
이스파르데이트 앤미노트랜스퍼라아제 증가	4 (13.8%)	0	0	0
부통	3 (10.3%)	0	0	0
고나트륨혈증	3 (10.3%)	0	0	0
체압부민 혈증	3 (10.3%)	0	0	0
구역질	3 (10.3%)	0	0	0
단백뇨증	3 (10.3%)	0	0	0
발열	3 (10.3%)	0	0	0
알라닌 앤미노트랜스퍼라아제 증가	2 (6.9%)	0	0	0
번비	2 (6.9%)	0	0	0
발초 신경병증	2 (6.9%)	0	0	0
발초 부종	2 (6.9%)	0	0	0
독성 빙백	2 (6.9%)	0	0	0
복부 불편	1 (3.4%)	0	0	0
복부 패만	1 (3.4%)	0	0	0
가속성 고열감	1 (3.4%)	0	0	0
빈혈증	1 (3.4%)	2 (6.9%)	0	0
관절통	1 (3.4%)	0	0	0
혈증 일칼리성 포스파타아제 증가	1 (3.4%)	0	0	0
혈증 요소 증가	1 (3.4%)	0	0	0
간디다증	1 (3.4%)	0	0	0
총통	1 (3.4%)	0	0	0
도란	1 (3.4%)	0	0	0
식욕 감소	1 (3.4%)	0	0	0
에드辱양 피부염	1 (3.4%)	0	0	0
설사	1 (3.4%)	0	0	0
현기증	1 (3.4%)	0	0	0
박출물 감소	1 (3.4%)	0	0	0
심전도 QT 연장	1 (3.4%)	0	0	0
보행 장애	1 (3.4%)	0	0	0
위장 장애	1 (3.4%)	0	0	0
견신 부종	1 (3.4%)	0	0	0
잇몸 통증	1 (3.4%)	0	0	0
고칼슘혈증	1 (3.4%)	0	0	0
고칼륨혈증	1 (3.4%)	0	0	0
고열감	1 (3.4%)	0	0	0
감각저하	1 (3.4%)	0	0	0
운동감소증	1 (3.4%)	0	0	0
체혈압	1 (3.4%)	0	0	0
여산소증	1 (3.4%)	0	0	0
불면증	1 (3.4%)	0	0	0
검막 입증	1 (3.4%)	0	0	0
근 연축	1 (3.4%)	0	0	0
근력 악화	1 (3.4%)	0	0	0
호중구 감소증	1 (3.4%)	0	0	0
부종	1 (3.4%)	0	0	0
피부 통증	1 (3.4%)	0	0	0
발초 주위	1 (3.4%)	0	0	0
발초 감각 신경병증	1 (3.4%)	0	0	0
혈소판수 감소	1 (3.4%)	0	0	0
풀마 삼출액	1 (3.4%)	0	0	0
빈호흡	1 (3.4%)	0	0	0
발림	1 (3.4%)	0	0	0
구토	1 (3.4%)	0	0	0
체중 감소	1 (3.4%)	0	0	0
크레이티닌 신장 제거율	0	1 (3.4%)	0	0
호흡 곤란	0	1 (3.4%)	0	0
고나트륨혈증	0	1 (3.4%)	0	0
혈프구수 감소	0	1 (3.4%)	0	0

[1] 백분율을 계산하기 위해 분모로서 사용된 환자의 수  
 [2] 복수의 치료-유발 유해 사례 (Treatment-Emergent Adverse Event: TEAE)가 있는 환자는 신호 용어 내에서 한번 계수된다.  
 [3] 치료-유발 유해 사례 (TEAE)는 첫 번째 충량의 연구 약물 치료 후 또는 치료 후 30일 기간 내에 발생하는 모든 AE로서 정의된다.

표 2: 안전성 집단에서의 유해 사례

[0328]

## 약동학

1명의 환자에서 1일째에 및 2명의 환자에서 1일째와 3일째에  $2.33 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 MTD의 LB-100로 2시간 주입 완료 전에 및 완료 후에 4시간에 걸쳐 LB-100과 엔도탈의 혈장 농도를 측정하였다 (문헌 [Quang et al., 2016]) LB-100의 약물 약동학은 1일째와 3일째에 유사하였으며, 낮은 제거율, 낮은 부피의 분포 및 짧은 반감기를 특징으로 하였다. 엔도탈의 혈장 농도는 주입 전체에 걸쳐 낮았으며, 1명의 환자에서 검출 하한치 미만 ( $5 \text{ ng}/\text{mL}$ )이었다. 다른 2명의 환자에서, 마지막 샘플링 시점 (4시간)에서 엔도탈의 최대 농도 ( $34.7 \text{ ng}/\text{mL}$ )를 관찰하였으며, 이로 인해 제거 반감기를 결정하지 못하였다 (표 3).

[0329]

[0331]

[표 3]

LB-100							
대상체 그룹	명목상 일	대상체	성별	용량 (mg/m <sup>2</sup> )	결보기 CL <sup>a</sup> (ng*h/mL)	결보기 V <sub>ss</sub> <sup>b</sup> (ng*h/mL)	T <sub>1/2</sub> (h)
1	1	001-0030	남성	2.33	2.5	0.52	1.10
	3			2.33	5.7	1.10	0.95
1	1	002-0028	여성	2.33	2.7	0.65	1.35
	3			2.33	2.0	0.47	1.56
1	1	003-0029	여성	2.33	4.7	1.06	1.58

정상 상태에서의 <sup>a</sup> 제거율 값 및 <sup>b</sup> 분포 부피는 근사치를 나타내는데, 이는 혈장 농도-시간 프로파일이 주입 완료 후 4 시간까지만 특성화 되었기 때문이다.

엔도탈

대상체 그룹	명목상 일	대상체	성별	용량 (mg/m <sup>2</sup> )	C <sub>최대</sub> (ng/mL)	T <sub>최대</sub> (h)	T <sub>1/2</sub> (h)	AUC (ng*h/mL)
1	1	001-0030	남성	2.33	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>
	3			2.33	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>
1	1	002-0028	여성	2.33	11.5	4	ND <sup>d</sup>	22
	3			2.33	34.3	4	ND <sup>b</sup>	143
1	1	003-0029	여성	2.33	14.8	4	ND <sup>b</sup>	28

<sup>a</sup> 엔도탈의 혈장 농도는 정량화의 하한치 (5 ng/mL) 미만이었다.  
<sup>b</sup> 말단 제거 반감기 및 <sup>c</sup> AUC 값은 정의될 수 없었다.

표 3: LB-100 및 엔도탈에 대한 약동학 파라미터

[0332]

[0333]

### 임상 활성의 평가

[0334]

측정가능한 질병이 있는 20명의 환자 중에서, 퀘장암이 있는 1명의 환자는 10회 주기 후에 나타나 5회 초과 주기 동안 지속되는 부분 반응을 나타냈으며, 16명의 환자는 지표 병변(들)의 진행을 나타내지 않았다. 이들 환자는 임상 진행을 나타내는 것으로 판단되는 새로운 병변 또는 증상의 출현에 대한 연구에서 제외되었다. 단지 3명의 환자, 즉, 십이지장 선암종이 있는 1명의 환자 및 결장 선암종이 있는 2명의 환자는 RECIST 기준에 의해 지표 병변(들)의 크기에서 유의한 증가를 나타냈다 (도 1).

[0335]

질병의 부분 반응 또는 안정성의 달성을 명확한 용량 의존성이 아니었으며, 퀘장암 (15회 주기) 및 폐의 비정형 유암종 (5회 주기)에서는 0.83 mg/m<sup>2</sup>에서, 유방암 (4회 주기)과 고환암 (5회 주기)에서는 1.25 mg/m<sup>2</sup>에서, 악성 흉선종 (8회 주기) 및 난소암 (6회 주기)에서는 1.75 mg/m<sup>2</sup>에서 발생하였다. 3.1 mg/m<sup>2</sup>에서, 연골 육종이 있는 환자는 정상 신장 기능에서 어떠한 변화도 없이 LB-100의 8회 주기 동안 안정한 반면, 3.1 mg/m<sup>2</sup>에서 시작한 섬유 육종이 있는 환자는 2회 용량 감소 후 12회 주기 동안 안정하였다 (도 2) .

[0336]

**결론:** LB-100의 안전성, 내약성, 항-종양 활성의 예비 증거 및 신규한 작용 메커니즘은 단독 요법 및 다른 요법과의 조합에 대한 개발을 지원한다.

[0337]

### 논의 (실시예 6)

[0338]

고형 종양이 있는 환자에서 PP2A의 강력한 억제제인 LB-100의 MTD를 측정하였다. 임상 2상 초기 권장 용량은 3주마다 3일 동안 2.33 mg/m<sup>2</sup>이며, 안정하거나 퇴행하는 질환의 경우에 신장 독성이 없으면 3.1 mg/m<sup>2</sup>으로 증량하고 신장 독성이 있으면 1.75 mg/m<sup>2</sup> 이하로 감량된다. 환자들이 질병의 안정성을 나타냈으며 퀘장암이 있는 1명의 환자가 3주마다 3일 동안 매일 0.83 mg/m<sup>2</sup>의 낮은 용량에서 퀘장암의 객관적인 퇴행을 나타냈기 때문에, 사람에서의 최적 항암 활성은 MTD 보다 상당히 적을 수 있다.

[0339]

적어도 2회 주기의 LB-100을 투여받은 20명의 환자 중 10명 (50%)은 제한 또는 누적 독성 없이 15회 주기 이하의 요법에 대해 안정한 질병을 나타냈다. 이러한 현상의 근본적인 메커니즘은 명확하지 않다. PP2A 활성은 돌연변이에 의해 또는 여러 가지 내인성 PP2A 억제제 중 1종 이상의 발현 증가에 의해 다수 유형의 암에서 손상되거나 증진된다 (문헌 [Chang et al., 2015], [Perotti et al., 2013], [Seshacharyulu et al., 2013] 및 [Sangodkar et. al; 2016]). 본 연구에서 퀘장암이 있는 1명의 환자가 객관적 반응을 나타내고 11개월에 걸쳐 안정한 질병을 나타냈기 때문에, 대다수의 사람 퀘장암에서 PP2A 과다 활성과 연관된 PP2A의 조절 서브유닛의 혼저한 과발현이 최근에 보고되었다 (문헌 [Hein et al., 2016])는 것은 특별히 관심 대상이다. 누드 마우스의

같은자리 이식된 사람 훼장 세포주에서의 이러한 서브유닛 PR55α의 녹다운은, 종양 형성 및 전이성 효능을 유의하게 감소시켰다 (문헌 [Hein et al., 2016]).

[0340] 한편, 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, PP2A 활성의 후천적 결핍은 종양을 PP2A의 추가의 약리학적 억제에 선택적으로 취약하게 할 수 있다. 예를 들어, del (5q) 골수이형성 증후군 (myelodysplastic syndrome: MDS)에서는 PP2A의 촉매적 서브유닛에 대한 대립 유전자가 결손된다 (문헌 [Sallman et al., 2014]). MDS의 표준 치료제인 레날리도마이드는 중간 정도의 PP2A 억제 활성으로 인해 이를 PP2A 반수-부족 (haplo-insufficient) del (5q) MDS 세포에 대해 선택적으로 세포 독성이 있는 것으로 보고되었다 (문헌 [Sallman et al., 2014]). PP2A 억제는 또한 Rb 및/또는 p53 경로의 돌연변이와 협력하여 발생하는 Mad2 (유사분열 정지 결핍 단백질 (mitotic arrest deficiency protein) 2)를 과발현하는 암 세포의 합성 치명상을 초래한다 (문헌 [Bian et al., 2014] 및 [Schvartman et al., 2011]). 본 연구에서, 부분 반응을 나타내는 환자의 훼장암은 Mad2를 현저하게 과발현하였다.

[0341] LB-100 단일 제제가 암 진행을 억제할 수 있는 또 다른 잠재적인 메커니즘은 세포독성 T-세포 기능을 증진시키는 것이다. 특정 이론에 구속시키고자 하는 것은 아니지만, PP2A의 포스파타아제 활성은 CTLA-4-매개된 T-세포 활성화 (문헌 [Teft et al., 2009]) 및 조절 T-세포 기능 (문헌 [Apostolidis et al., 2016])에 중요하다. 또한, PP2A의 조절 서브유닛인 Ppp2r2d의 억제는 T-세포 기능의 공지된 음성 조절인자의 것들 이외의 기작에 의해 T-세포 증식 및 사이토카인 생산을 증진시킨다 (문헌 [Zhou et al., 2014]). 그러나, 본 연구에서는 면역 체크포인트 차단을 유도하는 현재 승인된 화합물에 의해 발생하는 자가면역 활성을 암시하는 독성을 경험한 환자가 없었다.

[0342] PP2A의 임상적으로 안전한 억제제의 이용가능성은 암 요법을 위해 오랫동안 인식되었지만 무시된 치료학적 표적을 활용할 수 있는 기회를 제공한다. 본 임상 시험은 LB-100 단독이 항암 활성을 갖는다는 것을 시사한다. 그러나, PP2A의 약리학적 억제는, 특히 PP2A 기능 및/또는 DNA 손상 복구 경로에서의 후천적 이상에 의한 종양에 대한 세포독성 약물 (문헌 [Zhuang et al., 2009] 및 [Hong et al., 2015]) 및/또는 다른 유형의 면역 체크포인트 억제제와 조합될 때 암 요법에 가장 효과적 일 것 같다.

#### 실시예 7. LB-100와의 조합의 투여

[0343] 일정량의 항암 요법과 조합된 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물 및 항암 요법의 상기 양은 상기 대상체를 치료하는데 효과적이다.

[0344] 일정량의 항암 요법과 조합된 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 항암 요법 단독에 비해 항암 활성을 증진시키는데 효과적이다.

#### 실시예 8. PP2A 및 PD-1

[0345] PP2A의 약리학적 억제는 면역 활성화 및 암 면역 요법을 향상시킬 수 있다. PP2A의 억제는 통상적인 CD4 및 CD8 T-세포의 증식을 직접 증가시키고 Treg의 면역억제 기능을 손상시킴으로써 암 면역 요법을 향상시켜야 한다. LB-100은 면역 체크포인트 차단의 효과를 증가시킬 수 있다는 가설이 세워졌다. 이것은 PP2A의 약리학적 억제가 면역 요법과 상승작용할 수 있다는 것을 전임상 모델에서 입증하는 첫 번째 연구이다.

[0346] CD8+ 또는 CD4+ T-세포가 자가 단핵구-유도된 수지상 세포와 공동 배양된 사람 동종 혼합 림프구 반응에서 T-세포에 대한 LB-100의 효과를 평가하였다. 용량 의존적 증가는 CD8+ 및 CD4+ 세포에서의 T-세포 증식 (도 4a~4b 및 5a~5b) 및 CD4+ T-세포에서의 IFN $\gamma$  분비 증가 (도 3a~3b)에서 밝혀졌다. 용량 의존적 증가는 T-세포 상의 공동 자극 분자 OX40 발현 (도 6a~6b) 및 CD4+ T-세포에서 IFN $\gamma$  생산을 구동시키는 전사 인자 Tbet (도 7a~7b)을 증진시키 것으로 밝혀졌다. 동일한 분석으로 LB-100 + 항-PD-1 항체의 효과를 CD4+ T-세포에서 조사하였다. 상기 조합은 증식 (도 8a~8b, 9a~9d), OX40 발현 (도 10a~10b), Tbet 발현 (도 11a~11b) 및 항-PD-1 단독과 비교한 IFN $\gamma$  생산 (도 15)을 향상시켰다.

#### 실시예 9. LB-100 억제 및 PD-1 차단은 지속적인 CD8+ T-세포-매개된 종양 거부를 유도한다.

[0347] LB-100에 의한 PP2A의 억제가 면역-매개된 항종양 반응을 증진시킬 수 있다는 가설을 시험하기 위해, 마우스에게 CT26 종양 세포를 이식하였다. CT26은 저수준의 PD-L1을 발현하는 쥐과동물 결장 선암종이며, 항-PD1 요법에 내성이 있다. 약 13일 후, 30~100 mm<sup>3</sup> 사이의 종양 크기를 갖는 마우스를 4개의 쳐리 그룹 (PBS 대조군, LB-100 단독 - 0.16 mg/kg, 항-PD-1 단독 - 10 mg/kg 또는 둘 다의 조합)으로 무작위 배정하였다. 치료는 총 28일 동안 2일마다 제공되었다. 종양 크기를 2일마다 평가하였다 (도 20의 A~C). 항-PD1에 의한 단일 제제 치

료는 종양 부하를 감소시키거나 생존율을 증가시키는데 효과적이지 못하였다. LB-100 단독은 생존기간 중앙값을 21일에서 33일까지 증가시킬 수 있었다 ( $p = 0.02$ ). 조합 치료는 치료 후 14일째에 대조군 ( $p < 0.01$ )과 비교하여 평균 종양 체적을 70%까지 유의하게 감소시켰다. 생존기간 중앙값도 또한 21일에서 72일로 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 보다 두드러지게는, 마우스의 50%는 질병의 증거 없이 종양의 완전한 퇴행 (complete regression: CR)을 달성하였다. 이러한 반응은 치료 완료 후에 지속되었다.

[0351] 다음으로, 조합 요법으로부터 CR을 달성한 마우스가 장기 면역 기억을 발달시키는지 여부를 검사하였다. 초기 접종 후 약 60일째에, 치료된 마우스를 동일한 CT26 세포로 재접종하였다 (도 21의 A~B). 어떠한 마우스 ( $n = 8$ )도 재시험감염시에 종양을 발생시키지 않았다. CT26 미경험 마우스를 대조군의 역할을 하도록 동시에 접종하였다. 본 결과는 조합 요법으로 치료된 마우스가 종양-특이적 항원에 대해 장기 기억을 확립할 수 있었다는 것을 나타낸다.

[0352] 이어서, 종양 퇴행을 초래하는 항-PD-1과 LB-100의 상승 작용 효과가 CD8 T-세포에 의해 매개되는지 여부를 탐구하였다. 치료 개시 전에 고갈성 항생제 (depleting antibiotics)를 사용하여 CT26 종양 보유 마우스에 CD8 절제를 수행하였다. 치료 후 3일째에 비장 세포의 FACS에 의해 CD8+ T-세포 절제를 확인하였다. CD8이 고갈된 상태에서, 조합 요법은 항-종양 반응을 유도하지 못하였다. 조합을 투여받은 CD8+ 고갈된 마우스의 0%가 CD8+ 고갈되지 않은 그룹의 72%와 비교하여 CR을 달성하였다 (도 22의 A~C). 종합해 보면, 이들 결과는 LB-100의 효과가 종양에 대한 직접적인 세포독성 효과보다는 오히려 면역계에 의해 매개된다는 것을 입증하였다.

### 방법

[0354] 시약 - LB-100은 Lixte Biotechnology에 의해 제공되었다. 항-마우스 PD-1, 클론 RMP1-14 항체는 BioXcell에서 구입하였다. 다음 단클론 항체 (mAb)를 유세포 계측에 사용하였다: 래트 항-마우스 CD4-BV421, 래트 항-마우스 CD3-PE, 래트 항-마우스 CD8a-Alexa 647, 래트 항-마우스 CD45-BV785, 래트 항-마우스 IFNg-FITC, 래트 항-마우스 FOXP3-Alexa 647. 이들 항체는 Biolegend에서 구입하였다.

[0355] 세포주 및 마우스 - CT26.CL25 결장 암종 세포주는 ATCC로부터 획득하였다. 10% (vol/vol) FBS (Thermofisher), 100 U/mL 폐니실린 및 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신 (Gibco)을 함유하는 완전 배지 (RPMI 1640, Cellgro) 중에서 종양 세포를 배양하였다. 6 내지 8 주령의 암컷 BALB/c는 Charles River에서 구입하였다. 마우스를 미국 국립 보건원 (Bethesda, MD)의 실험실 동물 시설에 수용하였다. 모든 실험은 국립 보건원의 동물 관리 및 사용 국 (Office of Animal Care and Use)의 승인을 받았으며 미국 국립 보건원 지침에 따라 수행하였다.

[0356] 종양 접종 및 동물 연구 - CT26 종양 세포 ( $0.5 \times 10^6$ )를 복부 우측에 피하 주사하였다. 종양 이식 후 11일째에 시작하여 LB-100 및 항-PD-1을 각각 0.16 mg/kg 및 10 mg/kg의 용량으로 i.p. 경로에 의해 주사하고 28일 동안 2일마다 계속하였다. 종양의 크기를 2~3일마다 디지털 캘리퍼로 모니터링하여 체적 ( $\text{길이} \times \text{폭}^2 \times 0.5$ )으로 표시하였다. 종양이 궤양화/괴사되거나 종양 부하가 2,000  $\text{mm}^3$ 를 초과하거나 최대 직경이 2 cm를 초과하는 동물을 안락사시켰다.

[0357] CD8 T-세포의 고갈. 항-CD8 (클론 53.6.7) mAb (BioXcell)를 치료 2일 및 1일 전, 치료 당일, 치료 시작 후 5 일째 및 및 8일째에 주사하였다. 용량은 주사 1회당 0.1 mg이었다.

[0358] 종양 재시험감염 연구. 상기에서 기재된 바와 같은 조합 치료에 의해 이전에 치료된 마우스 및 미경험 BALB/c 마우스에게 CT26 세포를 좌측 (이전에 접종하지 않은) 흉부 측면에 접종하였다. 상기에서 기재된 바와 같이 종양을 주 당 2회 측정하였다. 종양이 궤양화/괴사되거나 종양 부하가 2,000  $\text{mm}^3$ 를 초과하거나 최대 직경이 2 cm를 초과하는 동물을 안락사시켰다.

### 실시예 10. LB-100 및 PD-1 차단은 종양 침윤 림프구 (Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL)를 조절한다.

[0360] 종양 침윤 림프구에 대해 치료 효과를 평가하였다 (도 23의 A~B) CT26 종양 보유 마우스를 상기에서와 같은 LB-100 및/또는 항-PD-1 항체로 처리하였다. 치료 12일 후, 종양을 FACS로 분석하였다. LB-100 및 항-PD-1 항체 조합으로 처리된 마우스 유래의 종양 침윤 CD8+ T-세포는 대조군 동물 및 항-PD-1 단독으로 처리된 동물 유래의 세포와 비교하여 IFNg+CD8+ T-세포에서 유의한 증가를 나타냈다 (11.0% 및 10.5%와 비교하여 25.3% 각각  $p = 0.05$ ). IFNg가 항종양 반응을 매개하는 가장 중요한 사이토카인이기 때문에, 이러한 결과는 조합 처리된 마우스가 이식된 종양에 대해 면역성을 증진시켰다는 기능적 확인이다. 또한, Treg에서 PP2A의 공지된 중요성을 고

려해 볼 때, LB-100 및/또는 항-PD-1 치료의 효과를 종양에 존재하는 Treg의 양에 대해 검사하였다. LB-100 단독은 종양 환경에서 Treg를 유의하게 고갈시켰다 (대조군에서의 14.7%와 비교하여 2.1%). 이러한 효과는 항-PD-1 또는 조합에 의한 Treg 고갈에 대한 효과와 정도가 유사하다. LB-100 단독이 Treg를 고갈시킬 수 있다는 사실은 LB-100 단독 처리 그룹에서 관찰된 작지만 유의한 생존 이득을 설명하는 가능한 메커니즘을 제시한다.

[0361] 또한 CR을 달성하는 마우스는 CT26 세포를 재접종하였을 때 종양 성장에 대해 저항성을 나타냈다. 고갈 항체를 이용하는 CD8+ T-세포 절제가 수행된 마우스는, CT26 종양을 거부할 수 없었다 - 조합 요법에 의한 처리에도 불구하고 0/8 (0%)인데, 이것은 항-PD-1 처리에 의한 LB-100의 항종양 효과가 CD8+ T-세포 매개된다는 것을 나타낸다. 결론적으로, 상승 작용적 동물 모델에서, PP2A 억제제 LB-100은 임상 시험에서 면역 요법을 증진시키는 능력의 조사를 지원하는 체크포인트 차단과 함께 상승 작용 가능성을 나타낸다.

[0362] 요약하면, 항-PD-1과 조합하였을 때의 LB-100은 처리된 마우스의 상당 부분의 완전한 퇴행을 초래하는 강력한 상승 작용 효과를 나타낸다는 것이 이러한 전임상 모델에서 증명되었다. 이러한 효과는 CD8+ T-세포를 통한 적응 면역에 의해 매개된다. 종양 퇴행과 관련된 면역 기억의 확립도 또한 존재한다. 이것은 면역 요법을 증진시키기 위한 표적으로서 PP2A의 약리학적 억제제를 사용하는 첫 번째 보고이다.

[0363] 종양은 종종 면역계를 회피하기 위한 복수의 메커니즘을 개발하였으며, 이들 메커니즘 중 하나는 T-세포가 종양을 공격하는 것을 효과적으로 억제하는 T-세포의 PD-1의 발현이다. 항-PD-1은 이러한 억제 신호를 제거하여 T-세포가 종양을 인식하고 근절하게 한다. 단백질 포스파타아제 2A (PP2A)의 억제제인 LB-100은 결장암의 전임상 모델에서 극적인 항종양 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다. 이러한 효과는 면역계의 증진에 의해 매개되는 것으로 밝혀졌다.

#### 실시예 11. PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100의 투여

[0365] 일정량의 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물 및 억제제의 상기 양은 상기 대상체를 치료하는데 효과적이다.

[0366] 일정량의 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 암에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제의 항암 활성을 증진시키는데 효과적이다.

[0367] 일정량의 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 흑색종에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물 및 억제제의 상기 양은 상기 대상체를 치료하는데 효과적이다.

[0368] 일정량의 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제와 조합된 LB-100 화합물을 흑색종에 걸린 대상체에게 투여한다. 상기 화합물의 상기 양은 상기 PD-1 및/또는 PD-L1 체크포인트 억제제의 항암 활성을 증진시키는데 효과적이다.

#### 실시예 12: 아테졸리주맙, 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙에 대한 부가적 치료로서의 LB-100의 효능 평가

[0370] 부가적 치료는 시너지 효과를 제공하고, 부작용을 감소시켜 더 적은 용량을 가능하게 한다.

[0371] 아테졸리주맙, 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙을 이미 투여받고 있는 흑색 종에 걸린 사람 환자의 부가적 치료로서의 LB-100의 주기적 투여는, 임상적으로 유의미한 이점을 제공하며, 아테졸리주맙, 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙이 (동일한 용량으로) 단독으로 투여될 때 보다 상기 환자를 치료하는데 있어서 보다 효과적이다 (적어도 부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다).

[0372] LB-100을 이미 투여받고 있는 흑색 종에 걸린 사람 환자의 부가적 치료로서의 아테졸리주맙, 니볼루맙 또는 펨브롤리주맙의 주기적 투여는, 임상적으로 유의미한 이점을 제공하며, LB-100이 (동일한 용량으로) 단독으로 투여될 때 보다 상기 환자를 치료하는데 있어서 보다 효과적이다 (적어도 부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다).

[0373] 상기 부가적 치료는 과도한 부정적인 부작용이 없거나 치료의 안전성에 영향을 미치지 않으면서 상기 환자를 치료하는데 있어서 효능을 또한 제공한다 (적어도 부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다). 각 제제가 단독으로 투여될 때와 비교하여,

[0374] 1. 상기 부가적 치료는 흑색종에 걸린 환자에서 세포독성 T-세포의 양을 증가시키는데 있어서 보다 효과적이며 (부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다);

- [0375] 2. 상기 부가적 치료는 흑색종에 걸린 환자에서 흑색종의 진행을 늦추는데 있어서 보다 효과적이며 (부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다);
- [0376] 3. 상기 부가적 치료는 흑색종 환자에서 PD-1 및/또는 PD-L1의 기능을 감소시키는데 있어서 보다 효과적이다 (부가 효과 또는 부가 효과 이상을 제공한다).
- [0377] 실시예 13: LB-100에 의한 단백질 포스파타아제-2A의 약리학적 억제는 PD-1 차단과 조합할 때 지속적인 면역-매개된 항종양 활성을 달성한다.
- [0378] 본 실시예는 특히, 항-PD1 (aPD-1) 차단과 조합될 때의 작은 분자 PP2A 억제제인 LB-100이 CT26 결장암 모델에서 지속적인 면역-매개된 항종양 반응을 상승적으로 유도한다는 것을 입증한다. 이러한 효과는 T-세포 의존성이었으며, 상당한 비율의 종양의 현저한 퇴행으로 이어졌다. 종양 림프구의 분석은 이펙터 T-세포의 침윤 증진 및 억제성 조절 T-세포의 고갈이 이펙터 대 조절 T-세포 비율을 현저하게 증가시켰다는 것을 입증하였다. 종양의 제거는 항원-특이적 2차 방어 면역을 확립하였다. LB-100 및 aPD-1 차단의 상승 작용 효과가 B16 흑색종 모델에서 관찰되었다. 또한, LB-100이 mTORC1 신호 전달 경로를 특이적으로 활성화시켜 미경험 CD4 세포의 조절 T-세포로의 분화를 감소시켰다는 결과는 본 출원에 기재되어 있다. 또한, Th1의 발현 증가 및 Th2 사이토카인의 발현 감소도 또한 밝혀졌다. 이들 데이터는 체크포인트 억제와 조합된 PP2A 억제의 적용 가능성 (translational potential)을 강조한다.
- [0379] LB-100 및 aPD-1 조합 처리는 CT26 종양의 거부를 상승작용으로 유도한다:
- [0380] PP2A 억제제가 aPD-1 불응성 종양에서 aPD-1 요법과 생체 내에서 상승 작용한다는 가설을 시험하기 위해, PD-L1 발현이 높지만 aPD-1 요법에 대한 반응이 제한적인 쥐과동물의 결장직장 암종인 CT26 종양을 사용하였다. 마우스에게 CT26 종양 세포 ( $0.25 \times 10^6$ )를 접종하였다. 10~13일 후, 50~100  $\text{mm}^3$  크기의 종양이 있는 마우스를 4개의 처리 그룹으로 무작위 배정하였다: 대조군 (PBS), aPD-1, LB-100, 및 aPD-1과 LB-100의 조합. 치료를 30일 동안 2일마다 투여하였다. 종양 성장을 2일마다 평가하였다 (도 24의 A). 본 모델에서, LB-100 단독은 종양 성장을 유의하게 감소시키지 못했지만 생존기간 중앙값을 연장시켰다 (33일째 대 21일째,  $p = 0.02$ ). 또한, aPD-1 단독은 종양 성장 또는 생존기간에 영향을 미치지 않았다. 그러나, LB-100과 aPD-1의 조합은 연구 기간 동안 50%의 완전 퇴행 (complete regression: CR)을 달성하면서 상당 부분의 종양을 현저하게 퇴행시켰다. 조합과 대조군 처리 아암 (arm) 사이에서 처리 후 8일째의 종양의 크기 ( $p \leq 0.05$ ) 및 생존 기간의 유의한 증가 ( $p < 0.005$ )에 유의한 차이가 있었다 (도 24의 B).
- [0381] LB-100과 aPD-1 조합의 효과는 CD8 T-세포에 의존한다: 다음으로, 지속적인 종양 퇴행을 초래하는 LB-100과 aPD-1 조합의 상승 작용 효과가 면역-매개된 과정인지 여부를 검사하였다. LB-100 및 aPD-1로 처리하기 전 및 처리 도중에 고갈 항체를 사용하여 CT26-종양 보유 마우스에 CD8+ T-세포 절제를 수행하였다 (도 24의 C). 처리 후 5일째에 FACS에 의해 주변부의 CD8+ 고갈을 확인하였다 (데이터를 도시하지 않음). CD8+ T-세포가 고갈되었을 때, LB-100과 aPD-1 조합은 종양 거부를 유도하지 않았다 (0 대 72%,  $p = 0.0015$ ) (도 24의 D). 평균 종양 체적은, 고갈되지 않은 그룹에서의 종양 체적과 비교하여, CD8 고갈이 있는 조합 그룹에서 처리 후 10일째에 13배 증가하였다 ( $612$  대  $46 \text{ mm}^3$ ,  $p < 0.001$ ). 생존 기간은 또한 CD8 고갈에 의해 유의하게 감소하였다 ( $p < 0.0001$ ). CD8 T-세포 고갈만이 종양 성장과 생존 기간 둘 다에서 대조군과 비교하여 작은 유해 효과를 나타냈는데, 이는 CD8+ T-세포-매개된 면역의 기준선 수준이 기준선 조건에서 CT26 성장을 제한하는 역할을 하였다는 것을 시사한다. 이들 데이터는 aPD-1과 LB-100의 상승 작용이 CD8+ T-세포-매개된 적응 면역에 의존하지만 종양 성장의 PP2A 억제의 직접 효과가 아니라는 것을 나타냈다.
- [0382] 조합 요법에 의해 치료된 마우스는 항원-특이적 장기 기억을 발달시킨다: 성공적인 적응 면역 반응의 훌마크 (hallmark)는 면역 기억의 확립이다. 다음 실험에서는 2차 방어 항종양 반응에 대한 완전 반응 (complete response: CR)을 경험한 마우스를 시험하였다. 초기 종양 이식 후 약 60일째에 마우스를 CT26 세포로 재시험감염시켰다 (도 25의 A). 이들 마우스는 CT26 세포 재시험감염에 대해 완전히 내성이 있었다 (도 25의 B). (재)이식 후 18일째의 평균 종양 크기는, CR 마우스에서의  $0 \text{ mm}^3$ 와 비교하여, 미경험 마우스에서  $480 \text{ mm}^3$ 이었다 ( $p < 0.0001$ ) (도 25의 C).
- [0383] 다음으로, 방어 2차 면역 반응이 CT26 종양에 대해 특이적인지 여부를 시험하였다. 초기 이식 후 약 60일째에, CR 마우스를 CT26 세포로 염구리에, 관련 없는 쥐과동물 유방암 세포주인 4T1 세포로 유두 지방 패드에 재시험감염시켰다 (도 25의 D). CR 마우스는 CT26에 대해서는 내성이 있었지만 4T1 세포에 대해서는 내성이 없었다.

접종 후 18일째, 미경험 마우스와 CR 마우스 사이의 4T1 종양 체적에는 차이가 없었으며, CT26은 CR 마우스에서 성장하지 못하였다 (도 25의 E-F). 이러한 결과는 2차 기억 반응이 CT26-발현된 항원에 대해 특이적이라는 것을 나타낸다.

**[0384]** 조합 치료에 의한 림프구의 활성화 증진: LB-100/aPD-1 조합에 의해 종양 거부를 매개하는 세포 메커니즘을 다루기 위해, 2차 림프 기관과 종양에서의 면역계 상태를 검사하였다. 마우스에게 CT26 종양을 이식하고, 상기에서 기재된 바와 같은 LB-100 및/또는 aPD-1로 처리하였다. 3일째, 2회 처리 후, 비장, 종양 배액 림프절 (dLN) 및 종양을 수확하여 유세포 계측법으로 분석하였다 (도 26~27). 2차 림프구 조직에서, CD44+CD62L-CD8+ T-세포의 빈도가 더 높은 것으로 나타난 바와 같이, 조합 요법으로 처리된 마우스에서 CD8+ T-세포의 활성화가 대조군과 비교하여 더 크게 관찰되었다 (도 26의 A-C). 비장에서, LB-100 단독에 의한 처리는 CD44+CD62L-CD8+ T-세포에서 적은 증가 (13.0%에서 16.6%로,  $p < 0.05$ )를 초래하였지만, 조합 치료는 LB-100 또는 aPD1 단독보다 더 큰 증가를 초래하였다 (각각 16.6% 및 15.5%와 비교하여 20.8%,  $p < 0.05$  및  $p < 0.005$ ) (도 26의 B). 유사하게, CD44+CD62L-CD8+ T-세포는 대조군과 비교하여 조합으로 처리된 마우스의 dLN에서 증가하였다 (7.4%에서 17.9%,  $p < 0.05$ ) (도 26의 C). 비장과 dLN 둘 다에서 CD4+ T-세포의 CD44+CD62L-서브세트의 빈도에는 차이가 없었다 (도 28의 A 및 도 29의 A). CD8+ 및 CD4+ T-세포 상에서 PD-1, CTLA4, TIM3 및 OX40의 발현을 비롯하여 면역 체크포인트 마커를 종양 배액 림프절 및 비장에서 검사하였다 (도 28 및 29). dLN의 aPD-1 처리된 CD4+ T-세포에서 PD-1 발현의 작지만 유의한 증가를 제외하고는 이들 마커의 발현에는 차이가 없었지만, LB-100 단독 또는 조합은 PD-1 발현을 더 이상 변화시키지 않았다 (도 29의 A).

**[0385]** 다음으로, 종양 침윤 림프구 (도 26~27, 30)의 포괄적인 분석을 수행하였다. 먼저, CD45+ 세포의 절대 백분율을 검사하였다. 처리 그룹 간에 유의한 차이는 없었다. 그러나, CD45+ 집단 내에서, 대조군과 비교하여 조합 처리에서 CD3+ T-세포의 유의한 증가가 있었다 (33.3%에서 49.9%로,  $p < 0.05$ ) (도 26의 E). 보다 중요하게는, CD3+ T-세포 집단의 이러한 증가는, CD45+ 세포 (25.9%에서 45.3%로,  $p \leq 0.01$ ) (도 26의 F) 또는 종양-상주 세포의 수 (8%에서 19%로,  $p < 0.05$ ) (도 31의 A)로 정규화되든지 간에, CD8+ T-세포의 유의한 증가 (도 26의 D)에 기인하였다. 유사한 경향이 종양 중량으로 정규화된 CD8+ T-세포에서 관찰되었다 (도 31의 B). 그 대신, CD4+ T-세포 집단은 변화가 없었으며 (도 26의 G, 도 31), CD8/CD4 비율의 현저한 증가를 초래하였다 (3.6에서 9.0로,  $p < 0.001$ ) (도 27의 H). 이것은 LB-100/aPD-1 조합이 면역 요법에 대한 반응의 가장 중요한 예측 인자 중 하나로 일관되게 보였던 종양으로의 증진된 CD8+ T-세포 수송을 초래하였다는 것을 나타냈다. 이 팩터 표현형 마커 CD44+를 라벨링하여 CD8+ TIL의 아집단 (subpopulation)을 추가로 검사하였다. 대조군에 비해 조합으로 처리된 마우스에서 CD8+CD44+ T-세포의 유의한 증가가 있었다 (9.8%에서 17.1%로,  $p \leq 0.01$ ) (도 26의 I). 세포 주기 관련 단백질 Ki67의 발현에 의해 측정되는 바와 같이, CD8+ TIL의 증가된 증식도 또한 밝혀졌다 (12.3%에서 22.5%로,  $p < 0.05$ ) (도 26의 J). 다음으로, PD-1, TIM3, OX40, CTLA4 및 LAG3을 비롯하여 TIL에서 다수의 면역 체크포인트 마커의 발현을 검사하였다. aPD-1에 의한 처리는 PD-1 발현에서 예상된 감소를 초래하였지만, LB-100 단독 또는 aPD-1에 대한 첨가는 CD4+ 및 CD8+ TILsS 모두에서 PD-1 발현을 더 이상 변화시키지 못했다 (도 26의 K-L). TIM3, OX40, CTLA4 및 LAG3의 발현은 단일 또는 조합 처리에 의해 CD4+ 또는 CD8+ TIL에서 유의하게 변화하지 않았는데 (도 32), 이는 이들 체크포인트 마커에 대한 표적 치료제와 LB-100을 조합할 가능성이 있다는 것을 시사한다.

**[0386]** PP2A가 억제성 Treg에서 필수적인 역할을 한다는 것을 입증하는 이전의 연구를 고려해 볼 때, LB-100의 첨가가 항-CTLA4 요법과 유사하게 Treg 고갈을 초래할 수 있는지 여부를 검사하였다. aPD-1은 종양의 수준에서 작용하며, Treg를 고갈시키는 제한된 능력으로 알려져 있다. 그러나, LB-100의 첨가에 의한 조합 처리는 TIL에서 CD4+FoxP3+ Treg 세포의 백분율을 유의하게 감소시켰다 (CD3+ T-세포를 10.3%에서 4.9%로,  $p < 0.05$ ) (도 27의 A~B). Treg의 부수적인 감소 및 CD8+ T-세포의 증가는 TIL에서 3.5배까지 Treg에 대한 CD8+의 비율의 극적인 증가를 초래하였다 (7.5에서 26.4로,  $p < 0.05$ ) (도 27의 C). 이후, TIL에서 LB-100/aPD-1 조합의 기능적 결과를 평가하였다. PMA/이오노마이신에 의한 시험관내 자극에 대응하는 IFN- $\gamma$ 의 세포내 발현을 분석하였다. 조합 처리는 대조군에 비해 CD8+ TIL에 의한 IFN- $\gamma$  생산을 유의하게 증진시켰다 (CD45+를 16.6%에서 31.5%로,  $p < 0.05$ ) (도 27의 D~E). 또한, 종양 괴사 인자 알파 (TNF- $\alpha$ ) 생산 (도 27의 F, 도 33의 A) 및 IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  이중 생산 (도 27의 G, 도 33의 B) CD8+ TIL의 빈도는 조합 치료에 의해 유의하게 증가하였다. LB-100/aPD1 처리에 의해 또한 유의하게 증가한 (도 27의 H, 도 33의 C) 그랜자임 B (GzmB) 발현에 의해 CD8+ TIL의 세포 용해 능력을 또한 결정하였다. CD4+ T-세포에서, IFN- $\gamma$  생산의 작지만 통계학적으로 유의한 증가를 관찰하였다 (CD4+ 세포를 6.1%에서 10.8%로,  $p < 0.05$ ) (도 27의 I). 이것은 LB-100/a-PD1 조합에 의한 CD4+ 침윤이 전반적으로 증가하지 않았지만, 종양에 존재하는 이팩터 CD4+ T-세포가 그럼에도 불구하고 IFN- $\gamma$  생산의 증강

에 의해 보다 기능적으로 활성이었다는 것을 시사한다.

[0387] 종합해 보면, LB-100과 aPD-1 차단의 조합은 TIL의 조성에 유의한 변화를 초래하였다 (도 27의 J). 전반적인 CD45+ 집단은 상대적으로 안정한 상태로 유지되었지만, CD8+ T-세포의 우세에 의해 구동된 CD3+ T-세포 침윤은 현저히 증가하였다. 동시에, Treg 집단을 부수적으로 고갈시켜 CD8/Treg 비율의 극적인 증가를 초래하였다. 또한, CD8+ T-세포는 사이토카인 발현에 의해 나타난 바와 같이 보다 증식성이고 기능적으로 활성이었다. 이러한 결과는 LB-100/a-PD1 조합이 면역 의존성 방식으로 CT26에서 지속적인 종양 거부를 유도할 수 있다는 관찰과 일치한다.

[0388] LB-100 및 aPD-1은 자가면역의 조직학적 증거 없이 B16 흑색종에서 항-종양 활성을 증진시킨다: 다음으로, LB-100/aPD-1 조합이 다른 aPD-1 내성 종양에 대해 효과적인지 여부를 결정하였다. 종양 예방 모델에서, 6~8 주령의 C57BL/6 마우스를 4개의 처리 그룹으로 무작위 배정하였다. PBS, LB-100, aPD-1 및 조합. 우측 흉부 측면에 피하로 처리를 개시한 후 2일째에 B16F10 세포 ( $2.5 \times 10^5$ )를 접종하였다. 생존 후 2일마다 치료를 투여하였다 (도 34의 A). 종양 이식 후 15일까지, 대조군과 단일 제제 아암 사이에는 차이가 없었다. 그러나, 종양의 크기는 대조군에 비해 조합 그룹에서 유의하게 작았으며 ( $305.9 \text{ mm}^3$ 에서  $109.0 \text{ mm}^3$ 로,  $p < 0.05$ ) (도 34의 B~C), 생존은 조합 처리에 의해 연장되었다 ( $p < 0.05$ ) (도 34의 D).

[0389] 조합 그룹의 마우스 중 어떠한 마우스도 자가 면역 염증성 사례 중 임의의 임상 징후를 나타내지 않았다는 것은 주목할 만하다. 그러나, LB-100/aPD-1 조합이 증가된 이펙터 기능 및 Treg 고갈을 초래한다는 것을 고려해 볼 때, 자가 면역은 중요하다. 따라서, 본 발명자들은 염증 징후를 찾기 위해 처리된 마우스의 여러 장기의 조직 구조 (histology)를 검사하였다. 생존 종료점에 도달한 C57BL/6 마우스를 희생시키고, 피부, 침샘, 췌장, 폐 및 위의 조직구조를 검사하였다 (도 34의 E, 도 35). 증가된 림프구 침윤 또는 자가 면역의 징후를 시사하는 증거는 어떤 치료 그룹에서도 없었다.

[0390] LB-100은 PP2A 활성을 억제하고 mTORC1 활성화를 증진시킨다: 마우스 비장 세포로부터 단리된 CD4 및 CD8 세포의 PP2A 효소 활성을 플레이팅된 CD3 및 가용성 CD28에 의한 시험관내 자극 3시간 후에 측정하였다. CD4 세포와 CD8 세포 둘 다에서 PP2A 효소 활성의 용량 의존적 감소가 있었으며, 이것은 CD4 세포에서 보다 CD8 세포에서 더 컸다 (도 36의 A).

[0391] 단리된 CD3 세포를 시험관내에서 활성화시킨지 3시간 후, 리보솜 S6 단백질 (S6), Thr473의 AKT 및 Thr308의 AKT의 인산화를 각각 확인함으로써 mTORC1, mTORC2 및 PI(3)K-AKT 경로의 활성을 평가하였다. LB-100은 mTORC2 및 PI(3)K-AKT 경로에 대해 최소로 영향을 미치지만 (도 36의 B), S6의 인산화에 의해 측정되는 바와 같이 mTORC1의 활성에서 용량 의존적 증가가 있는 것으로 밝혀졌다 (도 36c). 이러한 차이는 활성화 후 30분의 초기 시점에서 3개의 경로 중 어느 경로에서도 관찰되지 않았다 (도 37).

[0392] LB-100은 조절 또는 Th2 CD4 세포로의 미경험 CD4 세포 발달을 억제한다:

[0393] 미경험 CD4 세포를 마우스 비장 세포로부터 단리하고, TGF-β 또는 IL4의 존재하에 항-CD3 및 CD28에 의해 시험관내에서 활성화시켜, Treg 또는 Th2 CD4+ 세포의 발생을 각각 유도하였다. 72시간 후, Foxp3 또는 GATA3의 핵내 발현을 유세포 계측법에 의해 정량하여 Treg 또는 Th2 세포의 백분율을 각각 결정하였다. LB-100 처리는 TGF-β에 의한 Foxp3 (도 38의 A) 또는 IL-4에 의한 GATA3 (도 38의 B)의 유도를 용량 의존적 방식으로 유의하게 손상시켰다. 또한, Th2 및 Th1 CD4+ 세포의 상대적 비율을 T-bet에 대한 라벨링에 의해 정량화하였다. Tbet 발현 세포에 비한 GATA3 발현 세포의 빈도는 LB-100 처리에 의해 유의하게 감소하였다 (도 38의 C). 다음으로, LB-100 처리에 의한 Th1 CD4+ 세포의 기능적 결과를 조사하였다. Th1과 Th2 둘 다의 스큐잉 조건하에, PP2A 억제에 의한 IFN-γ 발현의 용량 의존적 증가가 있었다. 이것은 세포내 염색 (도 38의 D)과 사이토카인 분비 측정 (도 38의 E~F) 둘 다에서 나타났다. TNF-α 및 IL2를 비롯한 다른 Th1-관련 사이토 카인도 또한 Th1과 Th2 둘 다의 조건에서 증가하였다. IL4의 분비는 예상대로 감소하였다 (도 38의 F). 이들 데이터는, PP2A 억제가 Treg 형성을 감소시키고, Th1 사이토카인 분비의 전반적인 증가를 초래하는 Th1 계통 쪽으로의 CD4 세포 분화를 왜곡하였다는 것을 시사한다. 이러한 생체외 실험은, 생체내 TILS 결과와 일치하며, PP2A 억제가 mTORC1 과활성화를 통해 암 면역을 증진시켰다는 것을 잠재적으로 시사한다.

[0394] 사람 혼합 림프구 반응에서 LB-100의 시험관내 활성: LB-100의 면역 조절 효과가 임상적 유용성을 갖는지 여부를 확인하기 위해, 건강한 사람 기증자 유래의 PBMC를 사용하여 혼합 림프구 반응 (mixed lymphocyte reaction: MLR)을 수행하였다. 단핵구 유도된 수지상 세포를 세포질 염료 CFSE로 표지된 동종 CD4+ T-세포와 공동 배양하였다. LB-100을 공동 배양 당일 (0일째) 및 다시 3일째에 제공하였다. CD4 T-세포에 의한 증식 및 IFN-γ 분

비를 5일째에 평가하였다 (도 39의 A).  $1 \mu\text{M}$ 의 LB-100 처리에 의한 분열 세포의 백분율로 측정된 바와 ??이, CD4 T-세포 증식의 유의한 증가가 있었다 (대조군의 20%와 비교하여 31%) (도 39의 B). 낮은 LB100 농도에서 (서브-마이크로몰 범위에서) 증식 증가 경향이 또한 있었다.  $5 \mu\text{M}$ 의 높은 용량에서, 증식이 손상되었는데, 이는 면역력을 증진시키는 LB-100 노출의 최적 원도우가 있다는 것을 시사한다. 유사한 패턴이 IFN- $\gamma$  분비에 의해 관찰되었다 (도 39의 C).  $0.2 \mu\text{M}$  및  $1 \mu\text{M}$ 의 LB-100에서, IFN- $\gamma$  방출은 각각 3.5배 내지 4배 증진되었다. T-bet에 대한 라벨링에 의한 CD4 T-세포의 계통 분화의 효과도 또한 검사하였다.  $1 \mu\text{M}$ 의 LB-100은 T-bet 발현을 유의하게 증가시켰으며 (도 8의 D), 이는 LB-100이 Th1 분화 쪽으로의 CD4 계통을 왜곡하는 것으로 보이는 본 발명자들의 이전 결과를 확인해 준다. 다음으로, LB-100이 니볼루맙을 이용한 PD1 차단과 조합하여 시험관내에서 IFN- $\gamma$  분비를 증진시킬 수 있는지 여부를 시험하였다. 유사한 MLR 어세이를 LB-100으로 수행하였다. LB-100은 항-PD1 (aPD-1) 차단과 상승 작용하며 단일 제제와 비교하여 IFN- $\gamma$  분비 증진시키는 것으로 밝혀졌다 (도 39의 E).

#### [0395] 재료 및 방법

[0396] 약물 - 니볼루맙은 Bristol-Myers Squibb으로부터 입수하였으며, LB-100은 Lixte Biotechnology Holdings, Inc.로부터 입수하였다.

[0397] 세포주 - CT26.CL25 결장 암종, B16 F10 흑색종 및 4T1 유방 암종 세포주를 ATCC로부터 입수하였다. 10% (vol/vol) FBS (Gibco), 100 U/ml 폐니실린 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  스트렙토마이신 (Gibco)을 함유하는 완전 배지 (RPMI 1640, Gibco) 중에서 종양 세포를 배양하였다.

[0398] 상승 작용적 종양 모델 - NINDS 동물 사용 및 관리 위원회의 승인에 의해 마우스를 유지하고 실험을 수행하였다. CT26 종양의 경우: BALB/c (6~8 주령)는 Charles River Laboratory로부터 구입하였다. CT26 세포 ( $0.5 \times 10^6$ )를 우측 옆구리 내로 피하 주사하였다. 일단 종양이  $30\text{~}100 \text{ mm}^3$  (0일째)의 체적에 도달하면, 마우스를 무작위 배정하여 PBS, LB-100 ( $0.156 \text{ mg/kg}$ ) 및/또는 항-마우스 PD-1 ( $10 \text{ mg/kg}$ ) (RMP1-14, 래트 IgG2b, Bio X Cell)로 처리하였다. 치료를 30일 동안 2일마다 제공하였다. 캘리퍼를 사용하여 종양 체적을 2 일마다 측정하였으며, 종양 체적을 다음 수학식에 따라 계산하였다: 부피 ( $\text{mm}^3$ ) =  $L \times W^2/2$ , 여기서, L은 종양의 크기이고, W는 종양의 폭이다 (밀리미터 단위). B16 종양의 경우: C57BL/6 (6~8 주령)는 Charles River Laboratory로부터 구입하였다. 마우스를 각 처리 그룹으로 무작위 배정하고, 초기 처리 후 2일째에 B16F10 세포 ( $0.5 \times 10^6$ )를 우측 옆구리 내에 피하 주사하였다. 처리 및 측정을 2일마다 수행하였다. 생존 종료점은 다음 기준 중 하나에 도달했을 때로 정의되었다. 1)  $2000 \text{ mm}^3$ 를 초과하는 종양 체적, 2)  $2 \text{ cm}$ 를 초과하는 종양 직경, 3) 종양을 통한 심각한 치유되지 않는 피부 피사. 표시된 경우, 일부 마우스에게 CD8-고갈 항체 (클론 53.6.7; BioXcell)  $250 \text{ }\mu\text{g}$ 을 주사하여 CD8+ T-세포를 고갈시켰다. 치료 2일 및 1일 전, 치료 개시 당일, 시료 시작 후 5일째 및 및 8일째, 및 앞으로 매주마다 주사를 제공하였다.

[0399] 종양 재시험감염 연구 - CT26 종양으로부터의 조합 요법에 의해 이전에 치료된 (CR) 마우스 및 미경험 BALB/c 마우스에게  $0.5 \times 10^6$  개의 CT26 세포를 좌측 (CR) 및 우측 (미경험) 흉부 측면에 접종하였다. 표시된 경우, 일부 마우스를  $1.25 \times 10^5$  개의 4T1 유방 암종 세포로 유방 지방 패드에 또한 접종하였다. 이어서, 종양 체적을 상기에서와 유사하게 관찰하였다.

[0400] TIL의 단리 - 마우스의 우측 흉부 측면에  $0.5 \times 10^6$  개의 CT26 세포를 주사하고, 종양이  $50\text{~}100 \text{ mm}^3$  사이에 도달한 후 상기에서와 같이 처리하였다. 2회 처리 후, 마우스를 희생시키고 종양을 절제하였다. 종양 분리 키트 (Tumor Dissociation Kit; Miltenyi Biotec)를 사용하여 효소 분해의 존재하에 GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)를 사용하여 종양을 기계적 파괴를 수행하였다. TIL의 분석에 사용된 게이팅 전략은 도 S3에 도시되어 있다. 세포내 사이토카인 염색, 인 유동 및 유세포 계측법 - T-세포 함유 혼탁액을 고정가능한 생/사 염료 (Invitrogen)로 염색한 후, FACS 완충액 (0.5% BSA 및 0.1% 아지드화나트륨을 함유하는 PBS) 중에서 표면 항체 염색을 수행하였다. 세포내 염색을 위해, 세포를 표면 분자에 대해 염색한 후 고정화 및 투과화 (eBioscience)를 수행하였다. 사이토카인 염색을 위해, 염색을 수행하기 전에 PMA/이오노마이신 및 단백질 수송 억제제를 함유하는 세포 자극 칵테일 (Cell Stimulation Cocktail; eBioscience)로 세포를 먼저 자극하였다. 인산 염색 (phosphostaining)을 위해, 4% 포름알데하이드를 고정화에 사용하고 100% 메탄올을 투과화 프로토콜에 사용하였다. 세포를 유세포 계측기 (LSRII; BD Bioscience)로 분석 하였다. FlowJo 소프트웨어

어 (TreeStar)를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다.

- [0401] PP2A 포스파타아제 어세이 - 마우스 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 각각 CD4 및 CD8 단리 키트 (StemCell)로 단리하였다. 고정된 항-CD3 (10  $\mu$ g/ml) 및 가용성 항-CD28 (2  $\mu$ g/ml)을 사용하여 세포를 3시간 동안 활성화시켰다. 이어서, 제조업자의 설명서 (EMD Millipore)에 따라 말라카이트 그린 포스파타아제 어세이 키트를 사용하여 면역 침전 후에 PP2A 활성을 평가하였다.
- [0402] T-세포 자극 및 스큐잉 - 마우스 비장 세포 (StemCell)로부터 미경험 CD4 세포를 단리하였다. 고정된 항-CD3 (10  $\mu$ g/ml) 및 가용성 항-CD28 (2  $\mu$ g/ml)을 사용하여 세포를 3일 동안 활성화시켰다. 스큐잉 조건은 다음과 같았다: T<sub>H</sub>1, 1 .1g/ml 항-IL4, 5 ng/mL IL2, 및 10 ng/mL IL12; T<sub>H</sub>2, 1 .1g/ml 항-IFN- $\gamma$ , 5 ng/mL IL2, 및 10 ng/mL IL4; Treg, 1 .1g/ml 항-IFN- $\gamma$ , 및 1 ng/ml 항-IL4, 및 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1. 비드 기반 다중 피분석을 유동 면역 어세이 (multianalyte flow immunoassay) (BD Bioscience)를 사용하여 제조업자의 설명서에 따라 상청액에서 사이토카인 생산을 측정하였다. 계수 비드 (Biolegend)를 사용하여 절대 세포 수를 유세포 계측법으로 정량화하였다.
- [0403] 유세포 계측을 위한 항체 - 항-마우스:  $\alpha$ -CD45 (30-F11, BD),  $\alpha$ -CD3 (145-2C11, Biolegend),  $\alpha$ -CD4 (GK1.5, Biolegend),  $\alpha$ -CD8 (53-6.7, BD),  $\alpha$ -PD-1 (J43, ThermoFisher),  $\alpha$ -CTLA4 (1B8, abcam),  $\alpha$ -TIM-3 (B8.2C12, Biolegend),  $\alpha$ -OX-40 (OX-86, Biolegend),  $\alpha$ -CD62L (MEL-14, BD),  $\alpha$ -CD44 (IM7, Biolegend),  $\alpha$ -LAG-3 (C9B7W, Biolegend),  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  (XMG1.2, Biolegend),  $\alpha$ -TNF- $\alpha$  (MP6-XT22, Biolegend),  $\alpha$ -Granzyme B (NGZB, ThermoFisher),  $\alpha$ -FOXP3 (MF-14, Biolegend),  $\alpha$ -Ki67 (SolA15, ThermoFisher). 항-사람:  $\alpha$ -CD4 (A161A1, Biolegend),  $\alpha$ -T-bet (4B10, Biolegend),  $\alpha$ -Phospho-Akt (Ser473) (D9E, Cell Signaling),  $\alpha$ -Phospho-Akt (Thr308) (D25E6, Cell Signaling),  $\alpha$ -Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E, Cell Signaling).
- [0404] 조직구조 - 포르말린-고정된 조직을 처리하고, 혼마록실린 및 에오신으로 염색하고, 이사회-인증된 병리학자에 의해 맹검 평가하였다.
- [0405] 사람 혼합 림프구 반응 - <sup>39</sup>에서 이전에 기재된 바와 같이. 500 U/ml 인터루킨-4 (IL-4) 및 250 U/ml GM-CSF (R&D Systems)를 함유하는 시험관내에서 7일 동안 단핵구 단리 키트 (StemCell)를 사용하여 PBMC로부터 단리된 단핵구를 배양하여 수지상 세포 (DC)를 생산하였다. CD4 단리 키트 (StemCell)로 분리되고 CFSE (ThermoFisher)로 라벨링된 CD4+ T-세포 ( $1 \times 10^5$  개)를 동종 DC ( $1 \times 10^4$  개)와 공동 배양하였다. 어세이 개시시, 적정량의 LB-100 및/또는 니볼루맙을 첨가하였다. 3일 후, LB-100을 최종 지시 농도까지 보충하였다. 5일 후, 배양 상청액을 ELISA (eBioscience)로 분석하고, 세포를 유세포 계측법으로 분석하였다. 적어도 3명의 별도의 기증자를 확보하였으며, 1명의 대표적인 기증자의 결과를 보고하였다.
- [0406] 통계학 - 도면의 범례에서 달리 명시되지 않는다면, Tukey 다중 비교 검정을 사용하여 GraphPad Prism 소프트웨어로 샘플을 분석하였다. 산 점도 (scatter dot plot)는 SEM에 의해 평균으로서 묘사되어 있다.

[0407]

참고문헌

Apostolidis S, Rodríguez-Rodríguez N, Suárez-Fueyo A et al. Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2016, 17:556–64.

Bai X, Zhi X, Zhang Q et al. Inhibition of protein phosphatase 2A sensitizes pancreatic cancer to chemotherapy by increasing drug perfusion via HIF-1 $\alpha$ -VEGF mediated angiogenesis. *Cancer Lett.* 2014, 355:281–287.

Bai XL, Zhang Q, Ye LY, et al. Inhibition of protein phosphatase 2A enhances cytotoxicity and accessibility of chemotherapeutic drugs to hepatocellular carcinomas. *Mol Cancer Ther.* 2014, 13:2062–72.

Baroja, M.L. et al. Inhibition of CTLA-4 Function by the Regulatory Subunit of Serine/Threonine Phosphatase 2A. *J Immunol* 2002; 168:5070-5078.

Bertini I, Calderone V, Fragai M, Luchinat C, Tallu E. Structural Basis of Serine/Threonine Phosphatase Inhibition by the Archetypal Small Molecules Cantharidin and Norcantharidin. *J. Med. Chem.* 2009, 52:4838–4843.

Bian Y, Kitagawa R, KB Parmil, Fujii Y, Stepanov A, and Kitagawa K. Synthetic genetic array screen identifies PP2A as a therapeutic target in Mad2-overexpressing tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014, 111:1628–1633

Brahmer JR, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28, 31673175 (2010).

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P: A new member of the immunoglobulin superfamily – CTLA-4. *Nature* 1987, 328:267-270.

Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, Baroja ML, Madrenas J: CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol* 2000, 165:1352-1356.

Chang KE, Wei BR, Madigan JP et al. The Protein Phosphatase 2A Inhibitor LB-100 Sensitizes Ovarian Carcinoma Cells to Cisplatin-Mediated Cytotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 2015, 14:90–100.

Chapman NM, Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy* 6, 1295-1311 (2014).

Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39, 1-10 (2013).

Chuang, E. et al. The CD28 and CTLA-4 Receptors Associate with the Serine/Threonine Phosphatase PP2A. 2000, *Immunity*, Vol. 13, 313–322.

Chung V, Mansfield AS, Braiteh F, Richards D, Durivage H, Ungerleider RS, Johnson F, and Kovach JS. Safety, tolerability, and preliminary activity of LB-100, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in patients with relapsed solid tumors. *Clin Cancer Res* 2017.

[0408]

Chung, V. Phase I study of LB-100 with docetaxel in solid tumors. 2013: ClinicalTrials.gov.

Delgoffe GM, et al. The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat Immunol* **12**, 295-303 (2011).

Delgoffe GM. PP2A's restraint of mTOR is critical for T(reg) cell activity. *Nat Immunol* **17**, 478-479 (2016).

Ebert PJ, et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity* **44**, 609-621 (2016).

Efferth, T. et al. (2005) Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. *Biochem Pharmacol*. 69(5): p. 811-8.

Efferth, T. et al. (2002) Activity of drugs from traditional Chinese medicine toward sensitive and MDR1- or MRP1-overexpressing multidrug-resistant human CCRF-CEM leukemia cells. *Blood Cells Mol Dis*. 28(2): p. 160-8.

Eil R, Vodnala SK, Clever D., Klebanoff CA, Sukumar M, Pan JH, Palmar DC, Gros A, Yamamoto TN, Patel SJ, Guittard GC, Yu Z, Carbonaro V, Okkenhaug K, Schrump DS, Linehan WM, Roychoudhuri R, Restifo NP. Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature* 2016, 537:539-543.

Falconer IR, Humpage AR. Preliminary evidence for in vivo tumour initiation by oral administration of extracts of the blue-green alga cylindrospermopsis raciborskii containing the toxin cylindrospermopsin. *Environ Toxicol* **16**, 192-195 (2001).

Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett* **557**, 1-8 (2004).

Gordon IK, Lu J, Graves CA et al. Protein Phosphatase 2A Inhibition with LB-100 Enhances Radiation-Induced Mitotic Catastrophe and Tumor Growth Delay in Glioblastoma. *Mol Cancer Ther*. 2015, 14:1540-47.

Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* **205**, 565-574 (2008).

Hein AL, Seshacharyulu P, Rachagani S et al. PR55 $\alpha$  Subunit of Protein Phosphatase 2A Supports the Tumorigenic and Metastatic Potential of Pancreatic Cancer Cells by Sustaining Hyperactive Oncogenic Signaling. *Cancer Res*. 2016, 8:2243-53

Ho WS, Feldman MJ, Maric D et al. PP2A inhibition with LB-100 enhances cisplatin cytotoxicity and overcomes cisplatin resistance in medulloblastoma cells. *Oncotarget*. 2016, 7:12447-63.

Hodi, F. S. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. 2010, *N Engl J Med*, 363;8.

Holmgard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J Exp Med* **210**, 1389-1402 (2013).

[0409]

Hong CS, Ho W, Zhang C, Yang C, Elder JB, Zhuang Z. LB-100, a Small Molecule Inhibitor of PP2A with Potent Chemo- and Radio-sensitizing Potential. *Cancer Biol Ther*. 2015, 16:821–33.

Janssens V, Longin S, Goris J. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem Sci* 33, 113-121 (2008).

Janssens V, Rebollo A. The Role and Therapeutic Potential of Ser/Thr Phosphatase PP2A in Apoptotic Signalling Networks in Human Cancer Cells. *Curr Mol Med*. 2012, 12:268–287.

Joseph F. Grosso and Maria N. Jure-Kunkel. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun*. 2013; 13: 5.

Kiely M, Kiely PA. PP2A: The Wolf in Sheep's Clothing? *Cancers (Basel)* 7, 648-669 (2015).

Kingwell K. Cancer: Live screening of immunotherapy targets. *Nat Rev Drug Discov* 13, 258 (2014).

Kovach JS, Johnson F. (2008) Oxabicycloheptanes and oxabicycloheptenes, their preparation and use. US 7998957, Aug 16, 2011.

Larkin J, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 373, 23-34 (2015).

Lê L, Erlichman C, Pillon L et al. Phase I and pharmacokinetic study of fostriecin given as an intravenous bolus daily for five consecutive days. *Invest New Drugs* 2004, 22:159–167.

Lecca S, et al. Rescue of GABAB and GIRK function in the lateral habenula by protein phosphatase 2A inhibition ameliorates depression-like phenotypes in mice. *Nat Med* 22, 254-261 (2016).

Lu, J. et al. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. 106(28): p. 11697-702.

Lv Peng, Wang Y, Ma J et al. Inhibition of protein phosphatase 2A with a small molecule LB-100 radiosensitizes nasopharyngeal carcinoma xenografts by inducing mitotic catastrophe and blocking DNA damage repair. *Oncotarget*. 2014, 5:7512–7524.

Martiniova, L. et al. Pharmacologic modulation of serine/threonine phosphorylation highly sensitizes PHEO in a MPC cell and mouse model to conventional chemotherapy. *PLoS One*, 2011. 6(2): p. e14678.

Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer Discov* 4, 522-526 (2014).

Mumby M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell* 2007;130:21-4.

Ngiow SF, et al. A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Res* 75, 3800-3811 (2015).

Parry, R.V. et al. CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, p. 9543–9553 Vol. 25, No. 21.

Perotti D, Neviani P. Targeting A Tumor Suppressor To Suppress Tumor Growth: News and Views on Protein Phosphatase 2A (PP2A) as a Target for Anti-cancer Therapy. *Lancet Oncol.* 2013, 14:e229–e238.

Pico de Coana, Y. et al. Checkpoint blockade for cancer therapy: revitalizing a suppressed immune system *Trends in Molecular Medicine* (2015) 1–10.

Quang C, Simko JL, Nethero WC, Groeber EA, Kovach JS. LC-MS/MS Method Development and Validation for the Quantification of LB-100 and Endothall Metabolite in Biological Matrices (20). Poster MP 158, American Society for Mass Spectrometry Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June 6 2016, San Antonio, TX

Robert C, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* **372**, 320-330 (2015).

Rossini GP, Sgarbi N, Malaguti C. The toxic responses induced by okadaic acid involve processing of multiple caspase isoforms. *Toxicon* **39**, 763–770 (2001).

Sagiv-Barfi I, Kohrt HE, Czerwinski DK, Ng PP, Chang BY, Levy R. Therapeutic antitumor immunity by checkpoint blockade is enhanced by ibrutinib, an inhibitor of both BTK and ITK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E966-972 (2015).

Sangodkar J, Farrington CC, McClinch K, Galsky MD, Kastrinsky DB, Narla G. All roads lead to PP2A: exploiting the therapeutic potential of this phosphatase. *FEBS J* 2016, 283:1004-24.

Sallman D, Wei S, List A et al. PP2A: the Achilles heel in MDS with 5q deletion. *Front Oncol.* 2014, 4:1–7.

Schwartzman JM, Pascal HGD, Sotillo R, Coker C, Benezra R. Mad2 Is a Critical Mediator of the Chromosome Instability Observed upon Rb and p53 Pathway Inhibition. *Cancer Cell* 2011, 19:701–714.

Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K et al. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Lett.* 2013, 335:9–118.

Shi Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 2009, 139: 468–484.

Snyder, A. et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. 2014, *N Engl J Med*, 371;23.

Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res* **36**, 5593-5606 (2016).

Swart M, Verbrugge I, Beltman. Combination Approaches with Immune-Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 2016, 6:233.

Taffs RE, Redegeld FA, and Sitkovsky. Modulation of cytolytic T lymphocyte functions by an inhibitor of serine/threonine phosphatase, okadaic acid. Enhancement of cytolytic T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 1991, 147:722-728.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J: A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol* 2006, 24:65-97.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J: Structure-Function analysis of the CTLA-4 interaction with PP2A. *BMC Immunology* 2009, 10:23.

Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune Checkpoint Blockage: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* 2015, 27:450-461.

Tsiatas M, Mountzios, Curgliano. Future perspective in cancer immunotherapy. *Ann Transl Med* 2016, 4(14):273.

Wang C, et al. In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Immunol Res* 2, 846-856 (2014).

Wang GS. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies. *J Ethnopharmacol*. 1989, 2:147-62.

Wei, D. et al. Inhibition of protein phosphatase 2A radiosensitizes pancreatic cancers by modulating CDC25C/CDK1 and homologous recombination repair. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(16): p. 4422-32.

Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 2008, 14:152-160.

Yatsunami J, Komori A, Ohta T, Suganuma M, Yuspa SH, Fujiki H. Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res* 53, 992-996 (1993).

Zhang, C. et al. A synthetic cantharidin analog for the enhancement of doxorubicin suppression of stem cell-derived aggressive sarcoma. *Biomaterials*, 2010. 31(36): p. 9535-43.

Zhang M, Yogesha SD, Mayfield JE, Gill GN, Zhang Y. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *FEBS J* 280, 4739-4760 (2013).

Zhou P, Shaffer DR, Alvarez DA et al. In vivo Discovery of Immunotherapy Targets in the Tumor Microenvironment. *Nature* 2014, 506:52-57.

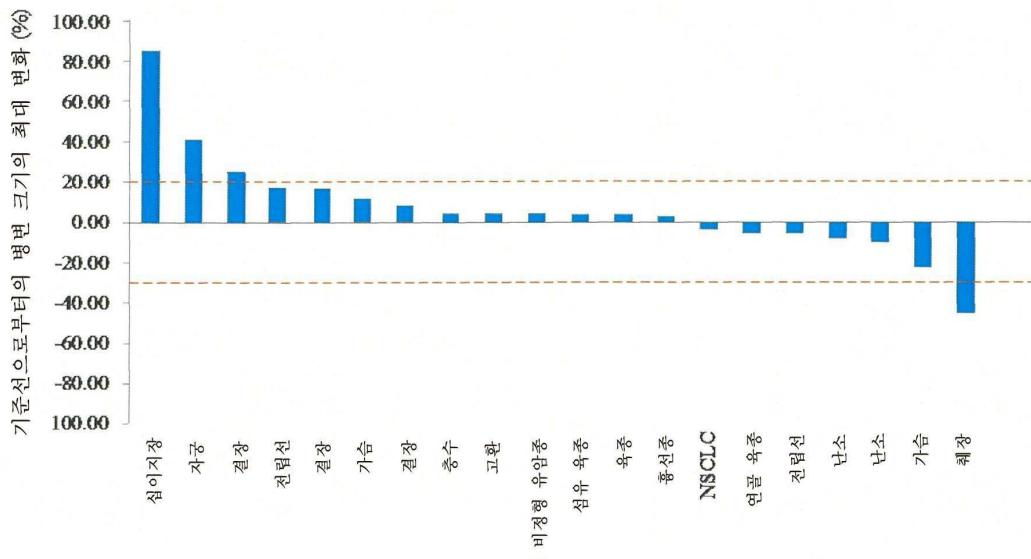
Zhuang Z, Lu J, Lonser R, Kovach JS. Enhancement of cancer chemotherapy by simultaneously altering cell cycle progression and DNA-damage defenses through global modification of the serine/threonine phospho-proteome. *Cell Cycle*. 2009, 8:3303-6.

US 8,697,845 B2, issued April 15, 2014.

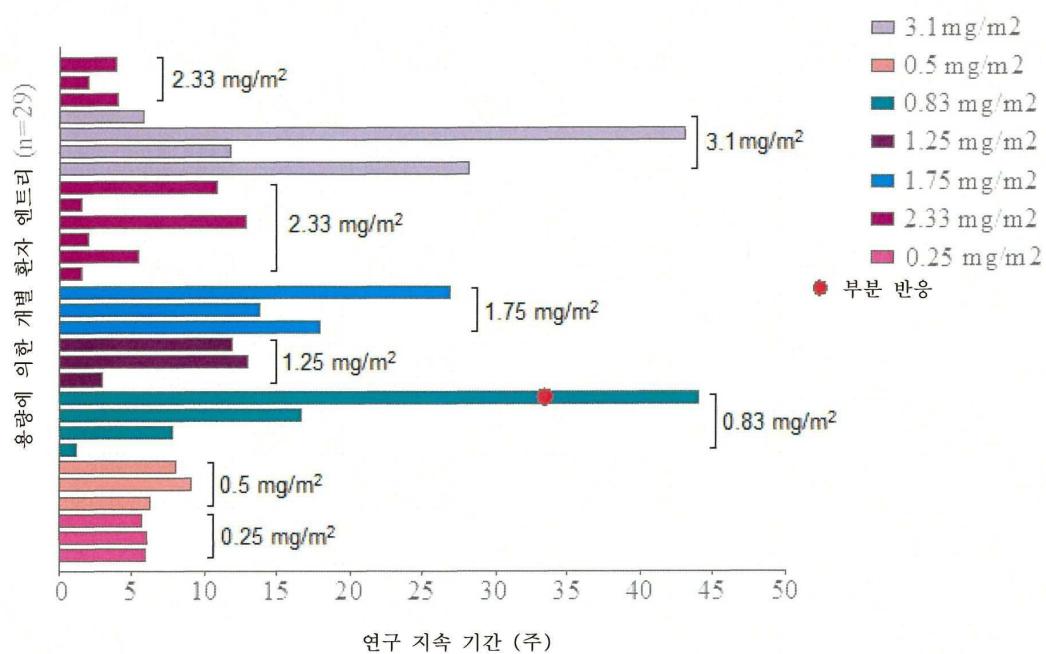
[0412]

## 도면

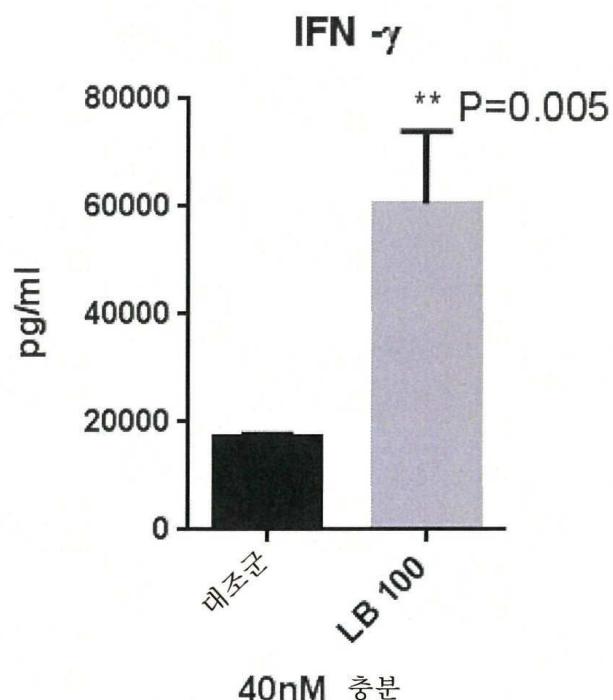
## 도면1



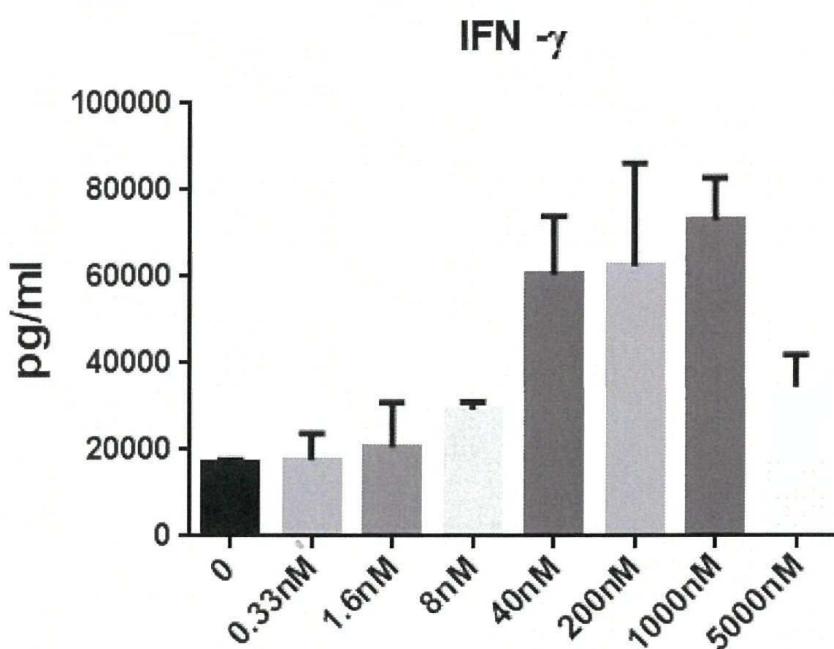
## 도면2



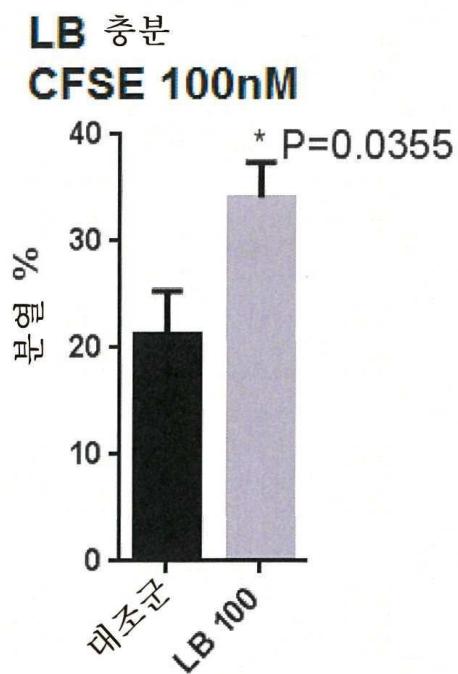
도면3a



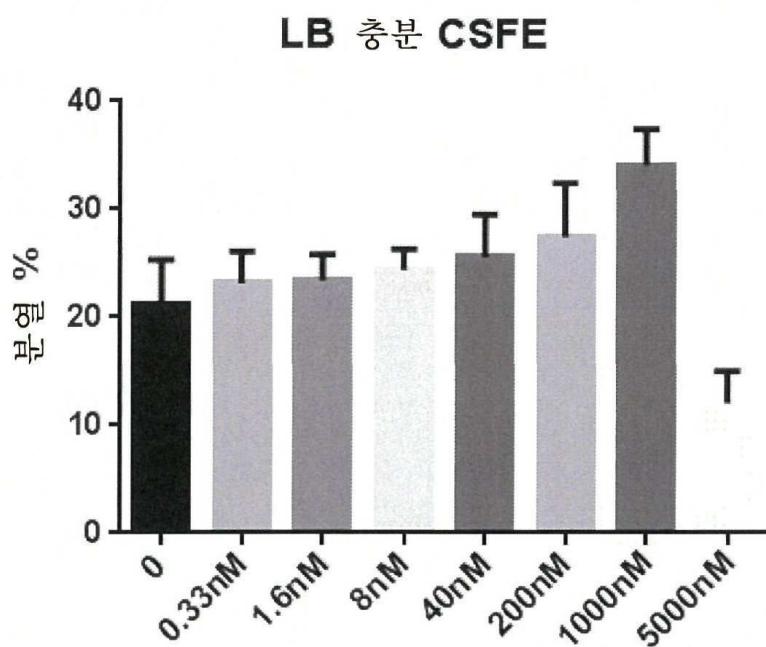
도면3b



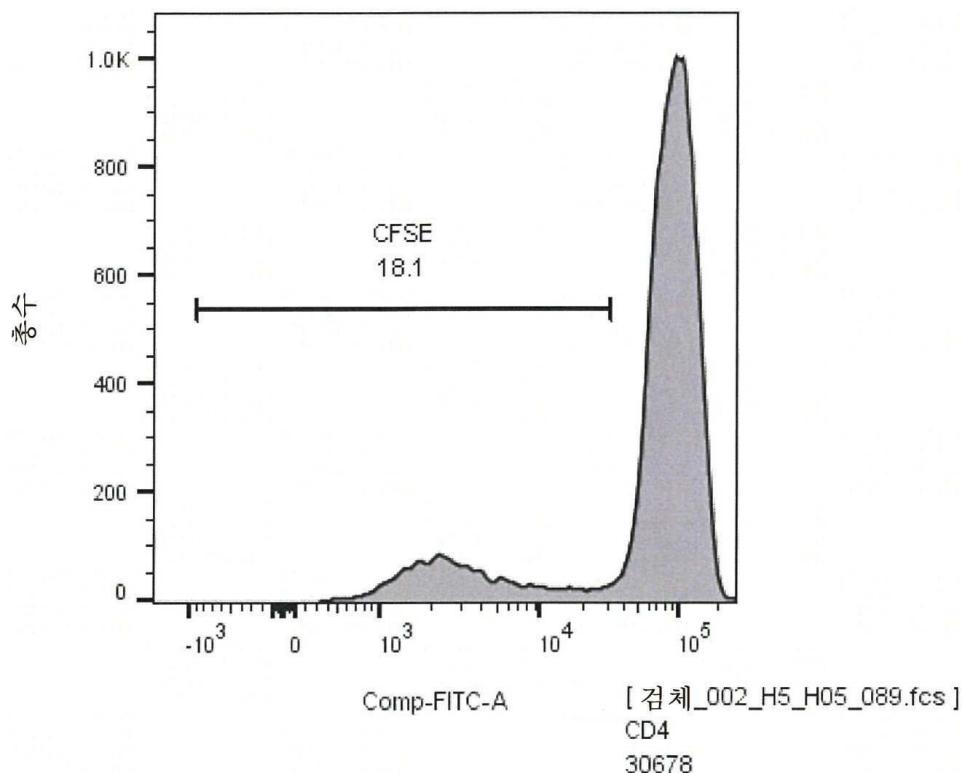
도면4a



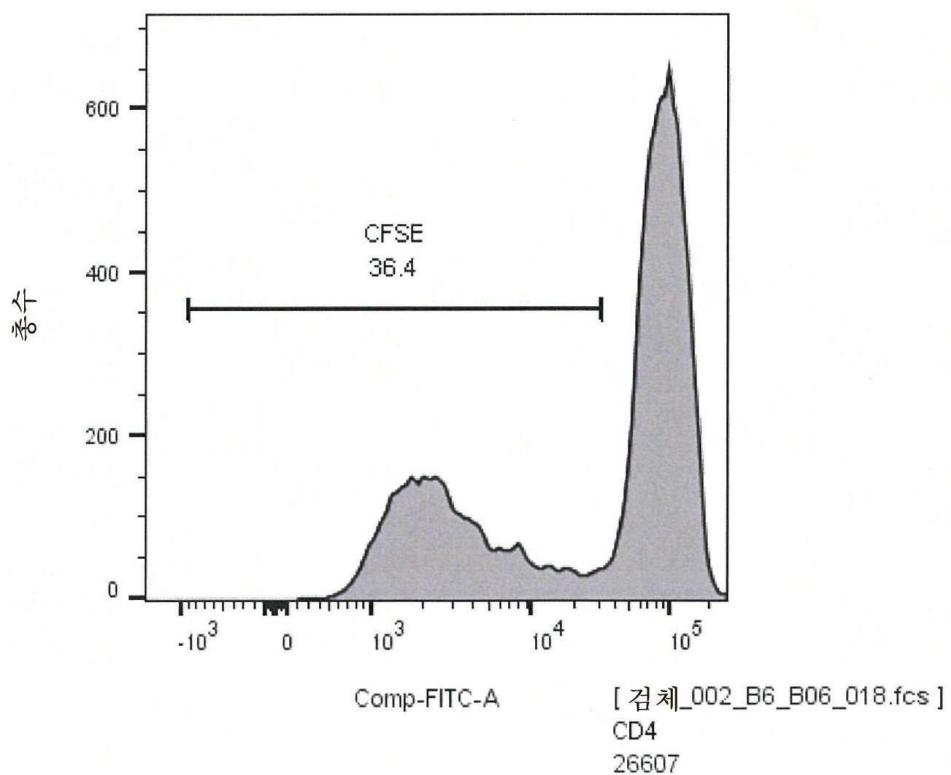
도면4b



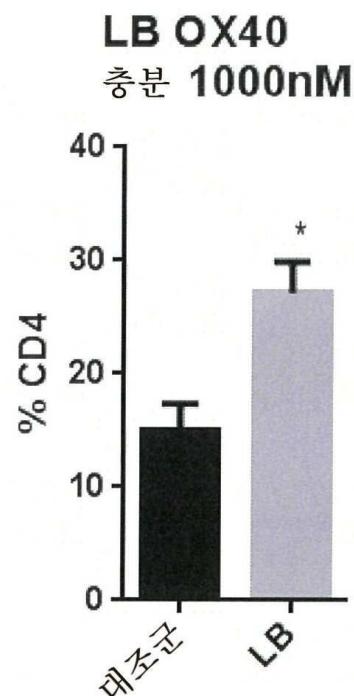
도면5a



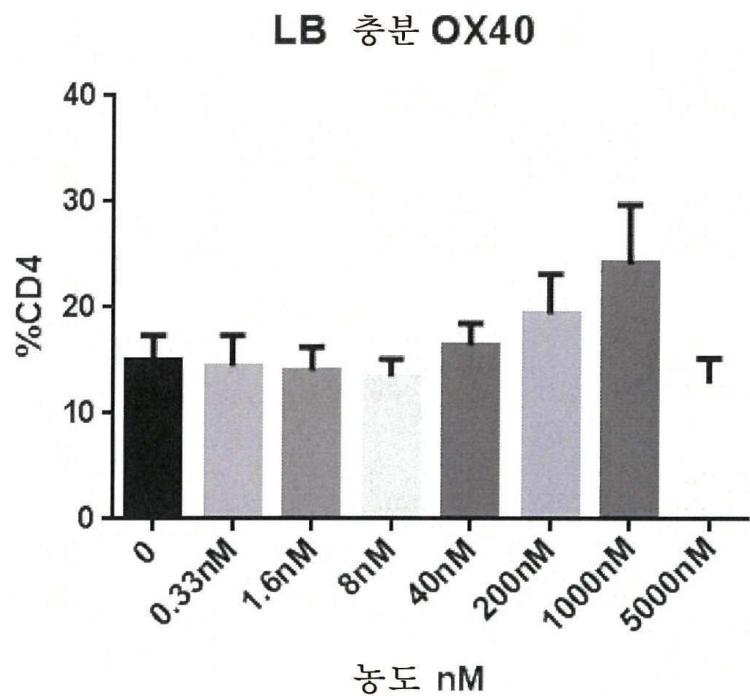
도면5b



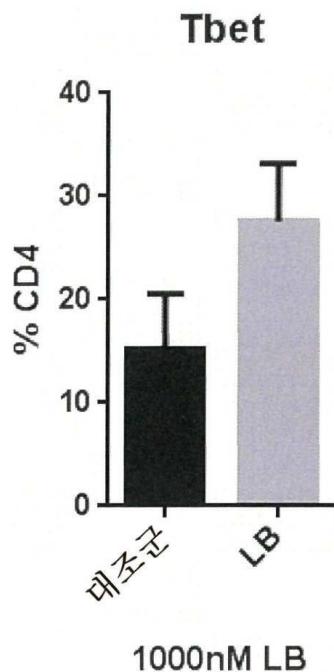
도면6a



도면6b

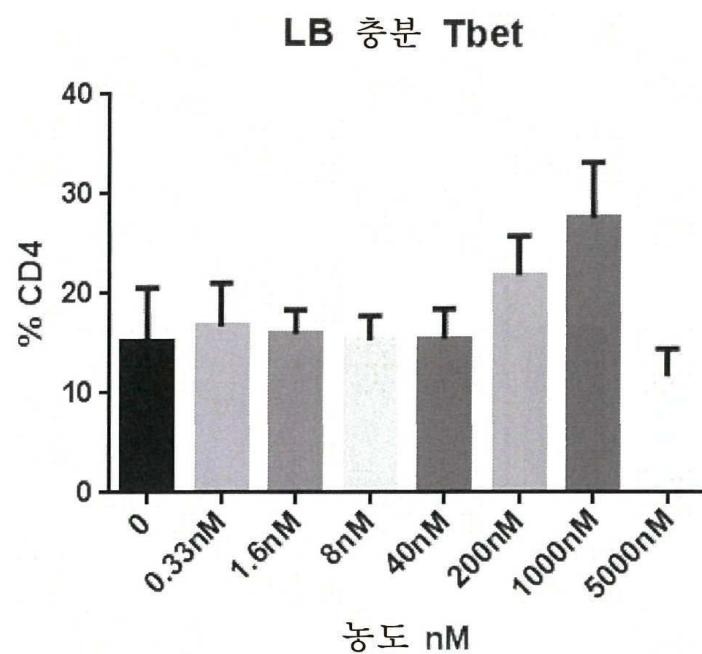


도면7a

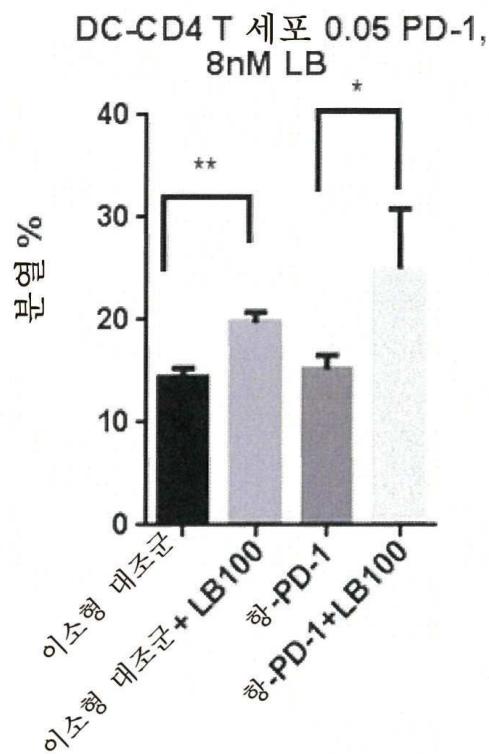


1000nM LB

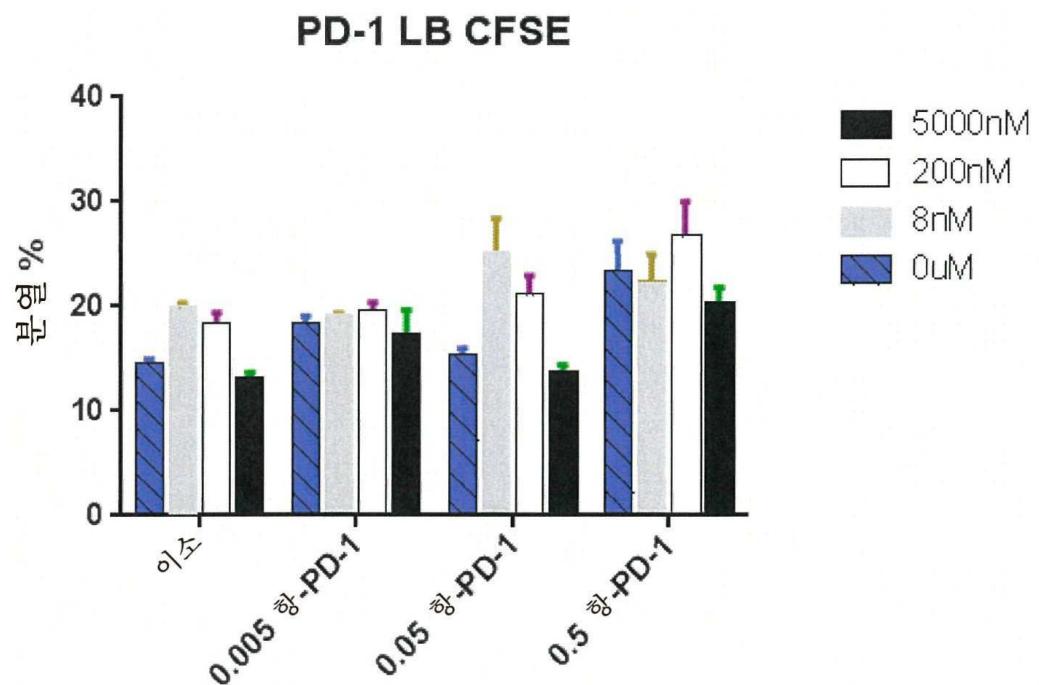
도면7b



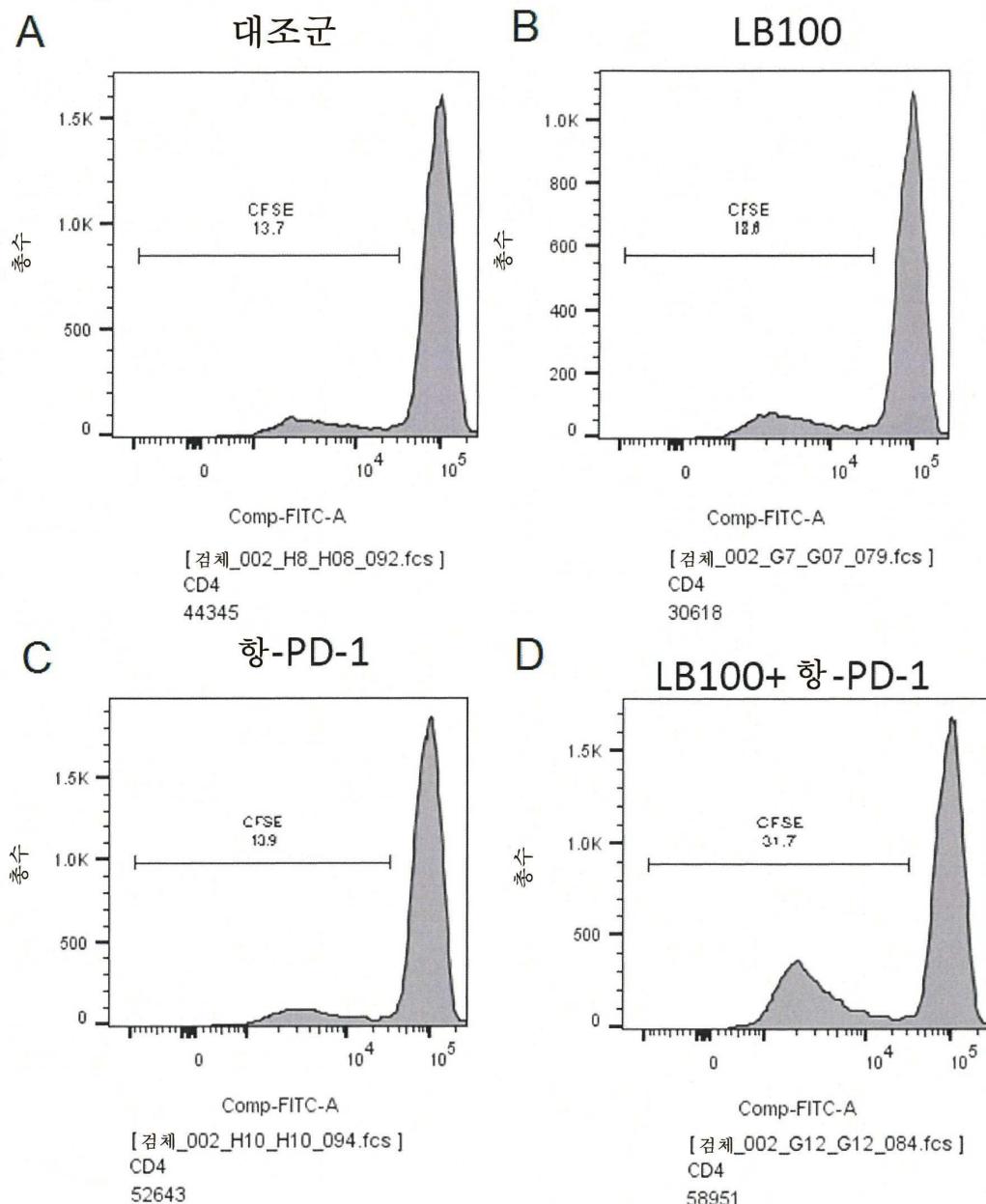
## 도면8a



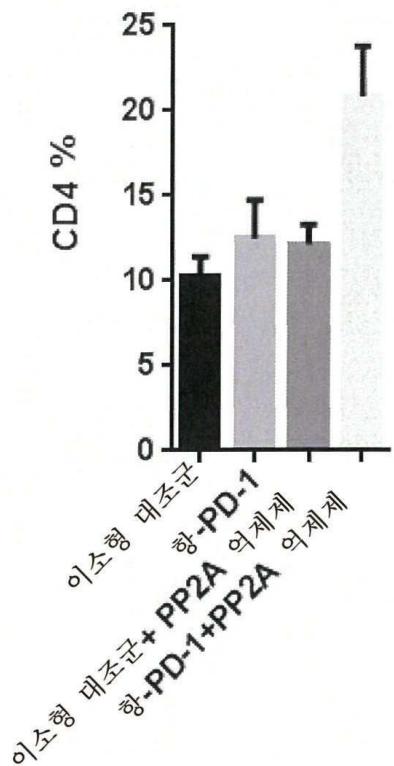
## 도면8b



## 도면9

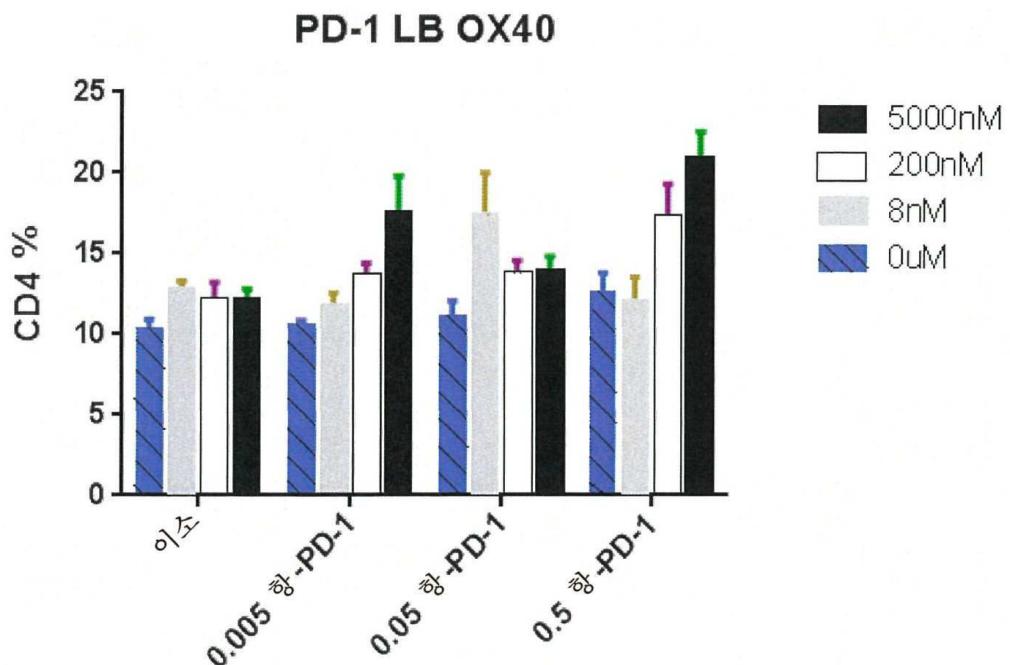


### 도면 10a

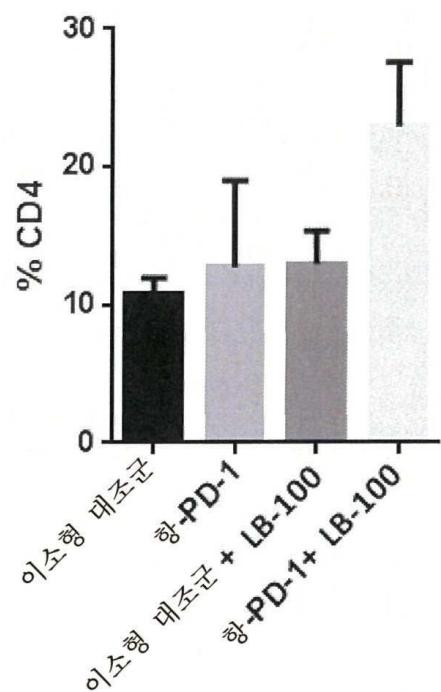


DC-CD4 T 세포 0.05 PD-1, 8nM LB

### 도면10b

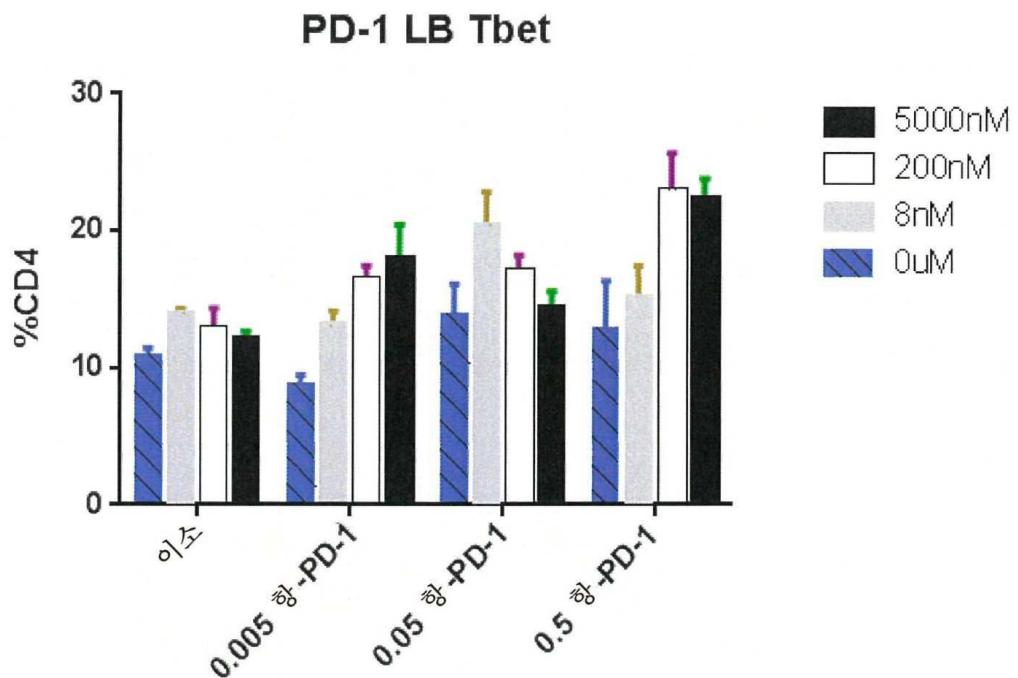


도면11a



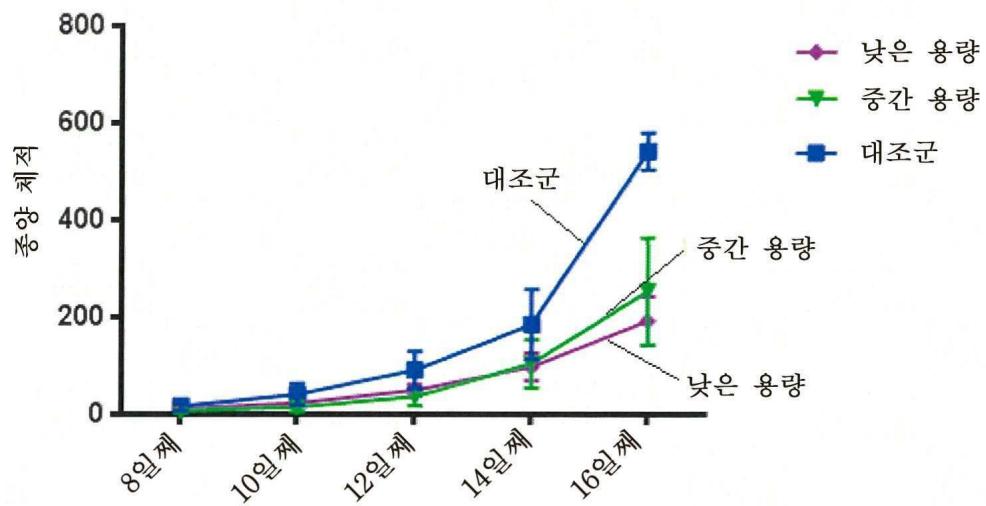
DC-CD4 T 세포 200nM

도면11b

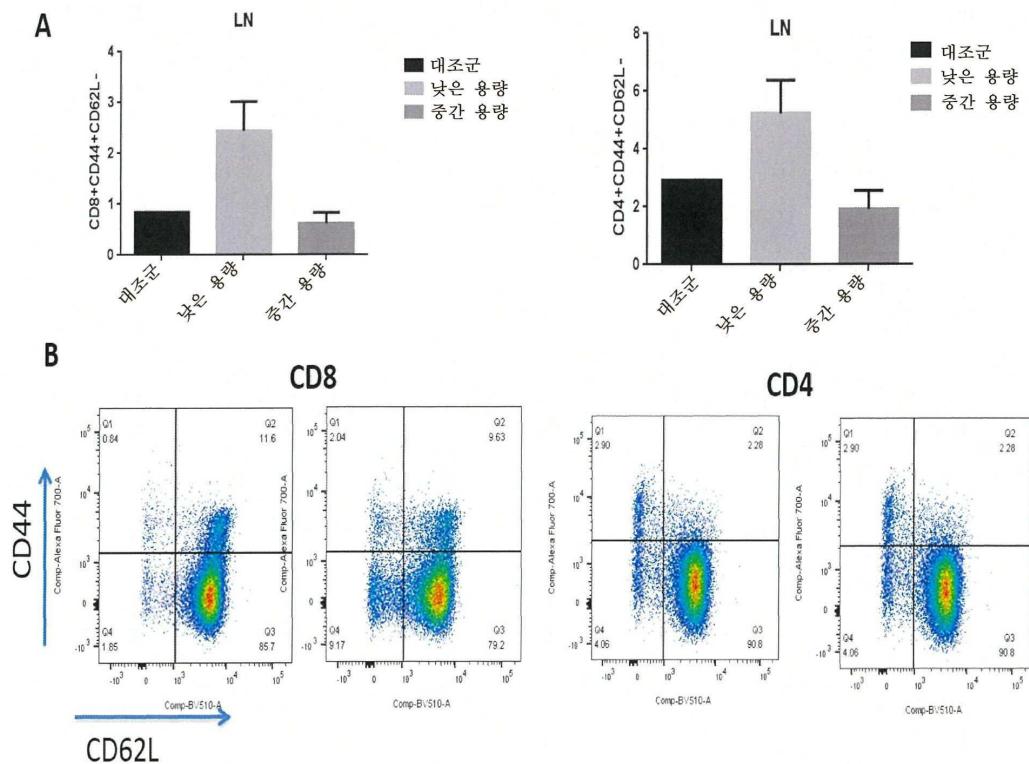


도면12

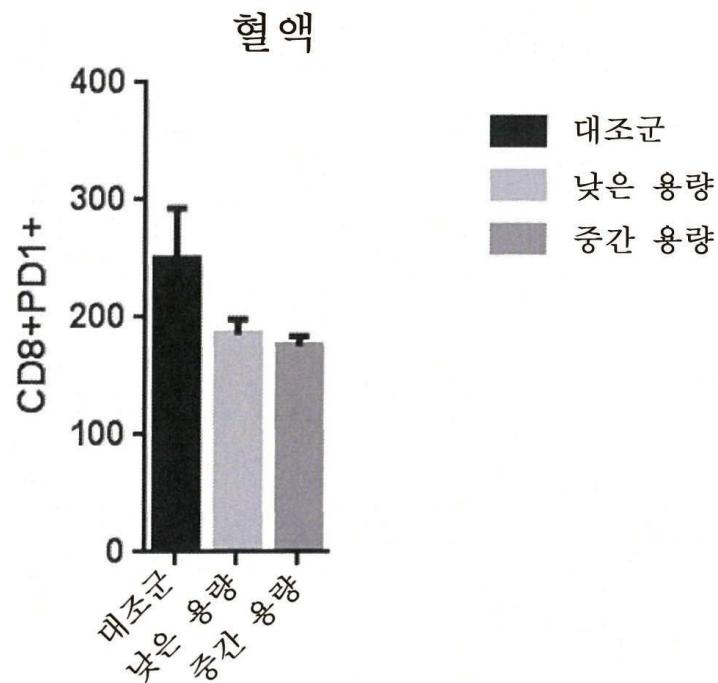
B16



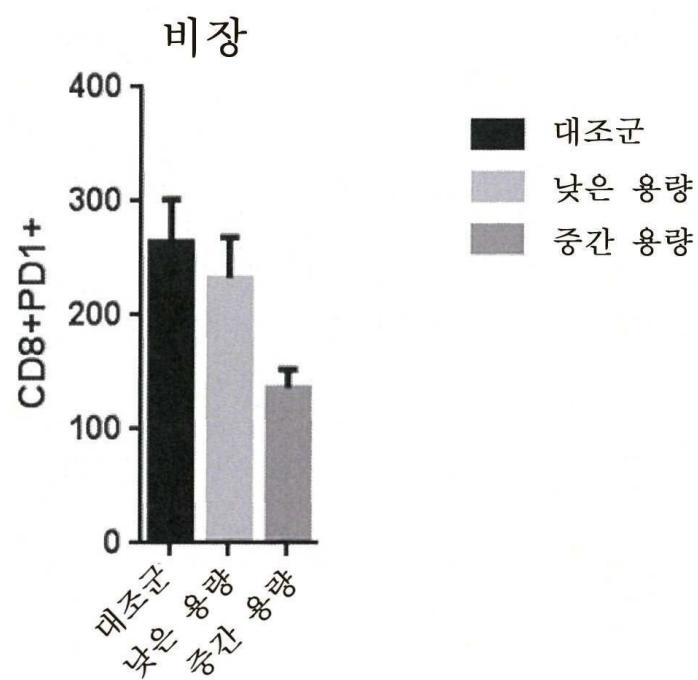
도면13



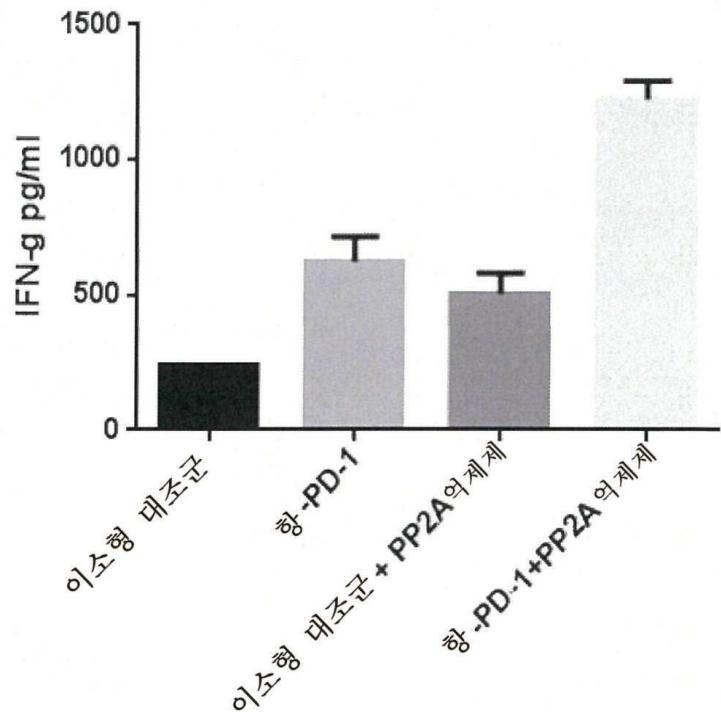
도면14a



도면14b

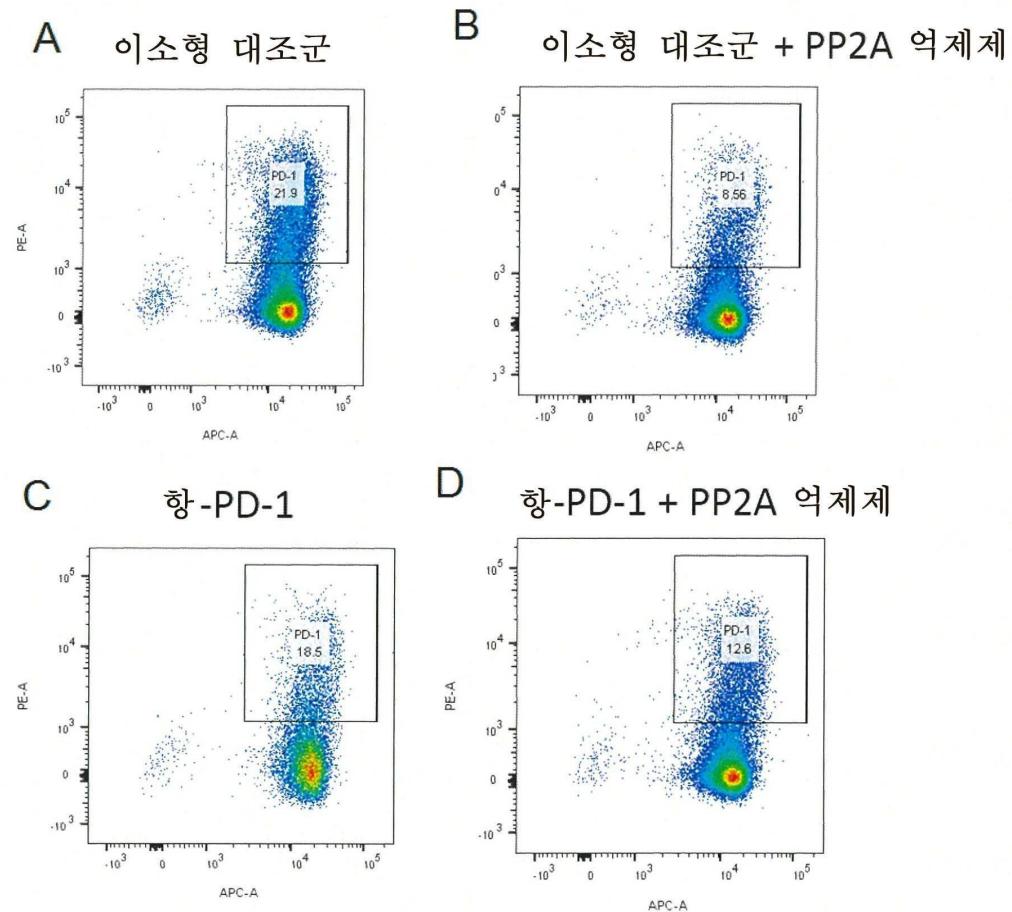


도면15

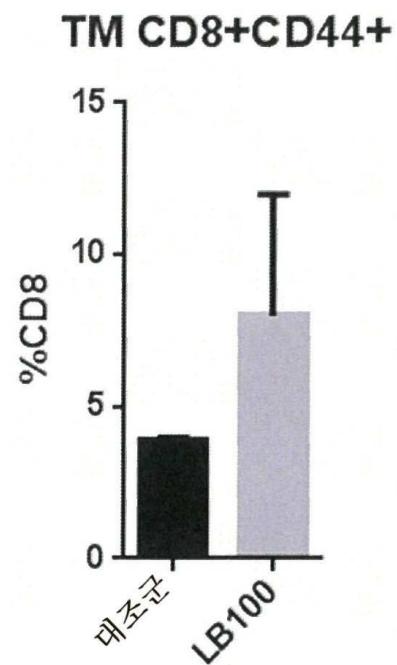


DC-CD4 T 세포

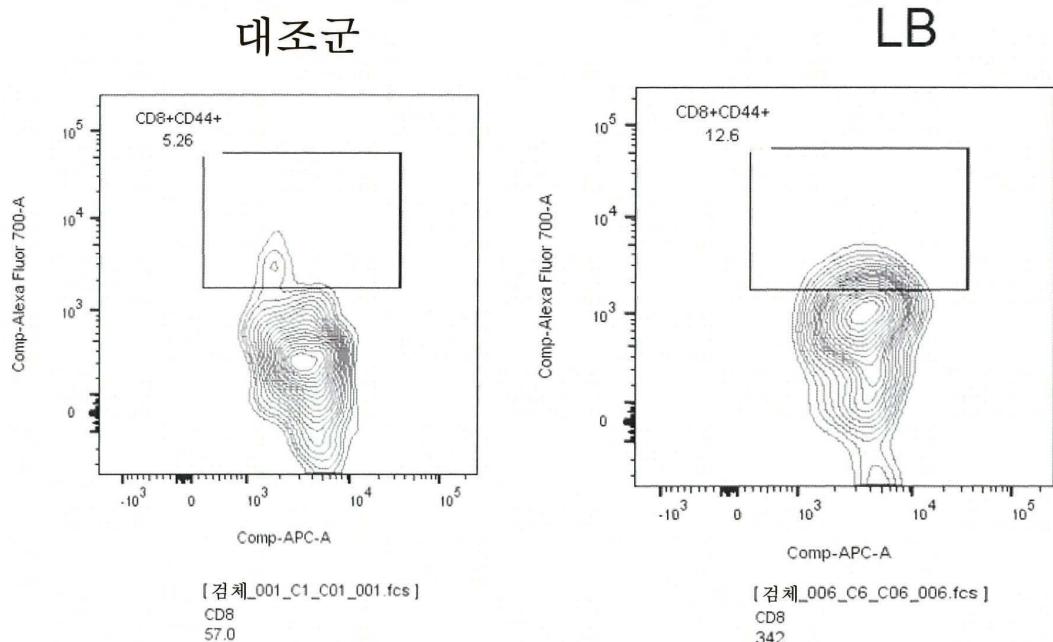
## 도면16



## 도면17a

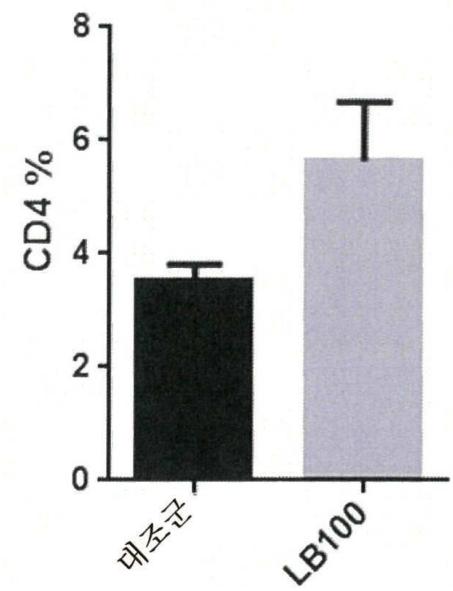


도면17b

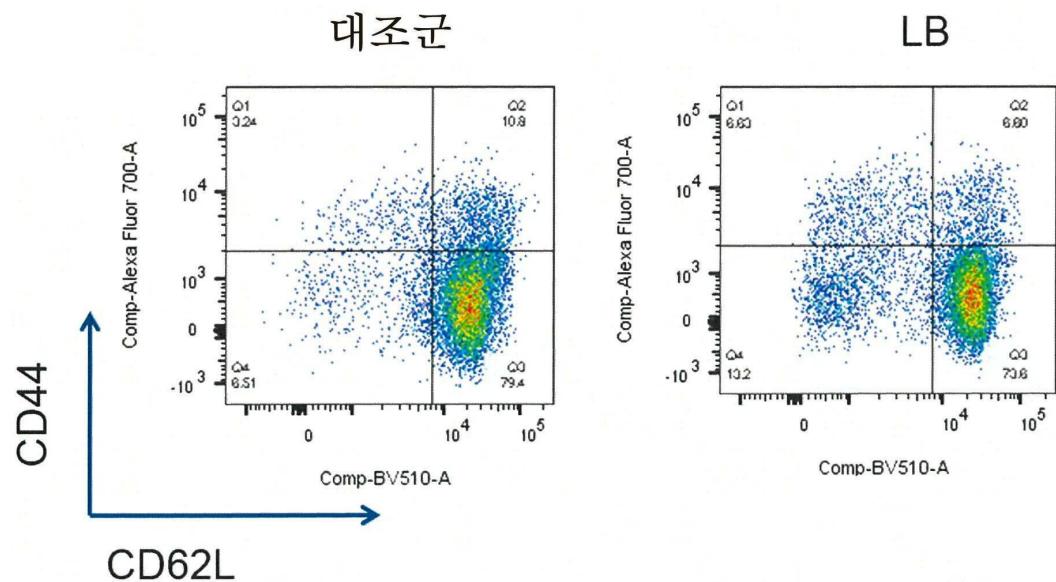


도면18a

## LN CD4+CD44+CD62I-

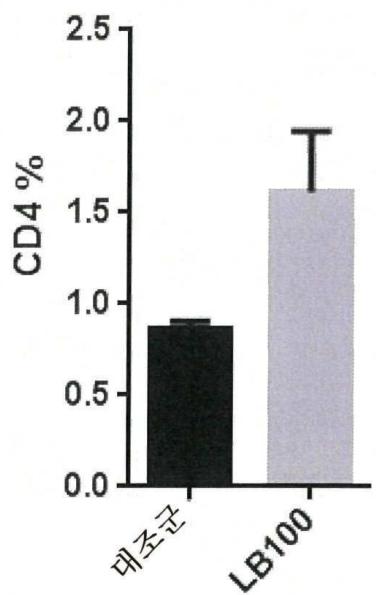


도면18b

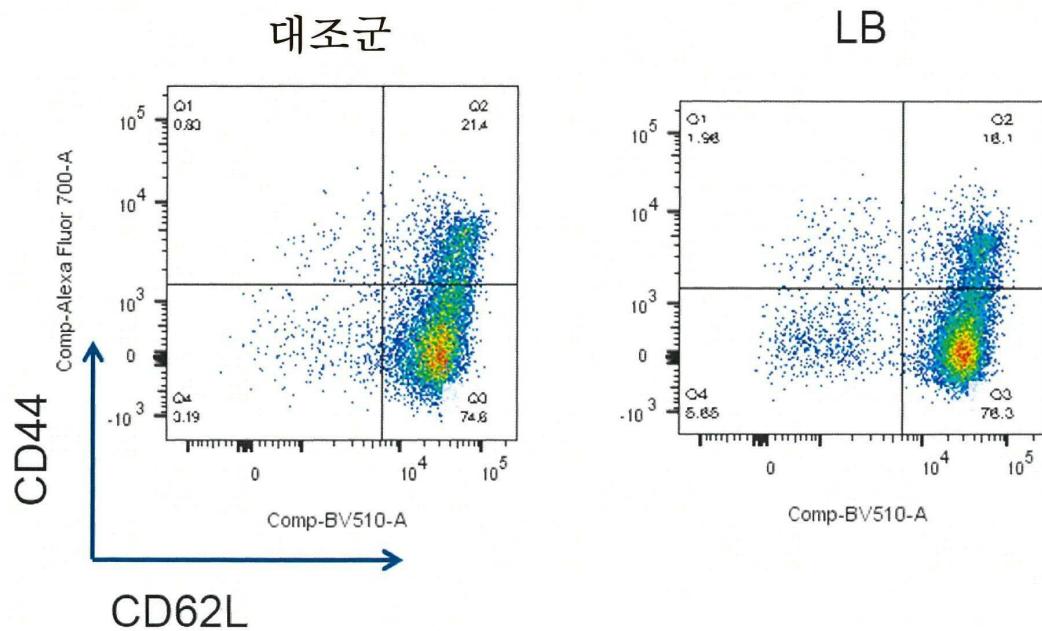


도면19a

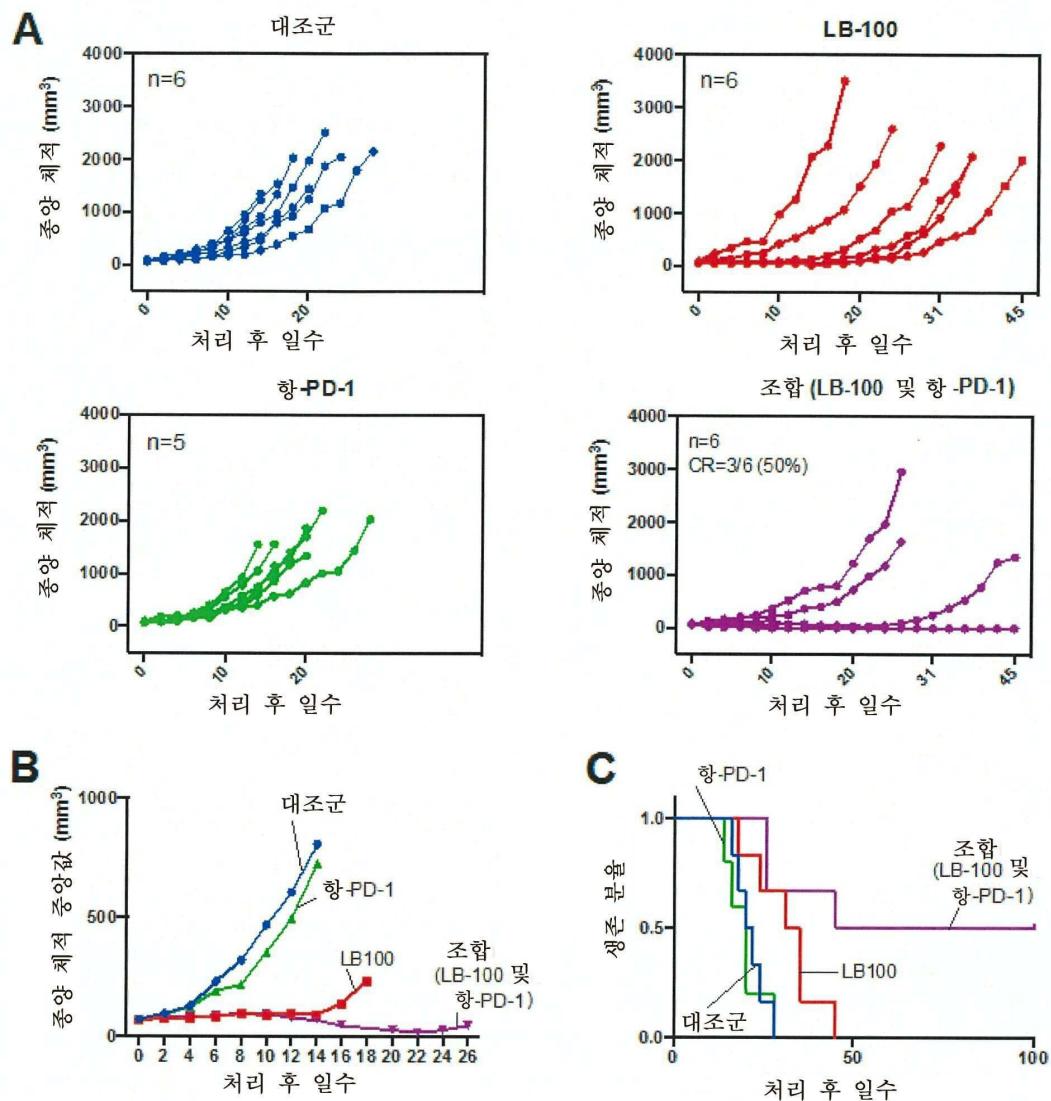
### LN CD8+CD44+CD62L-



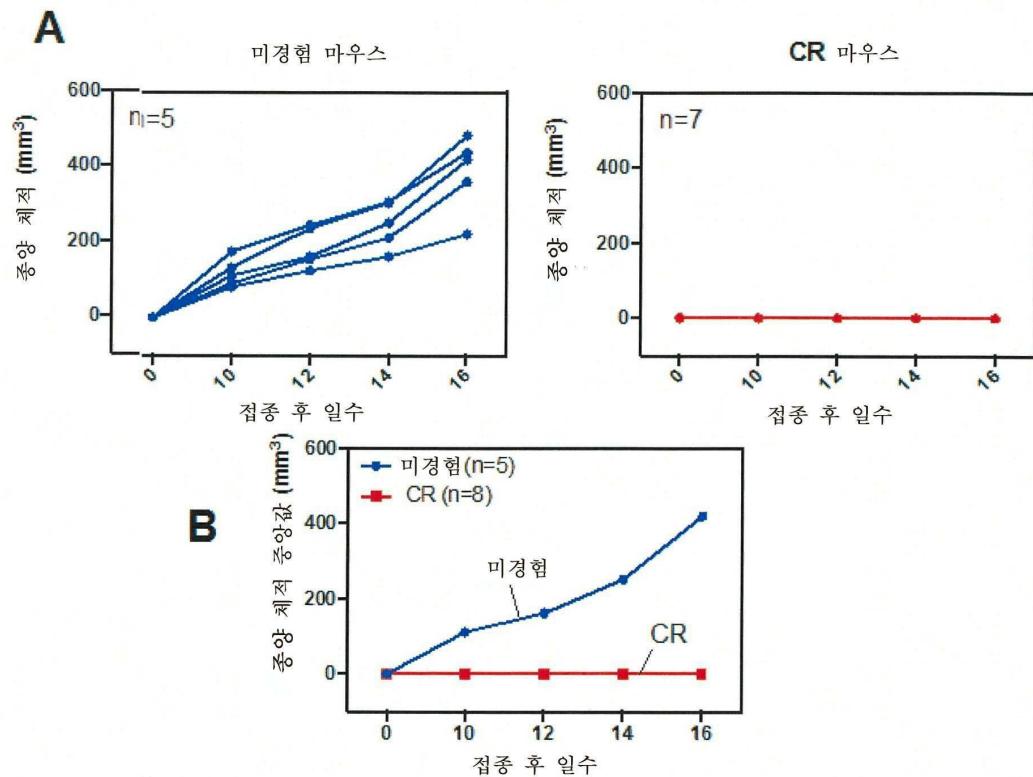
도면19b



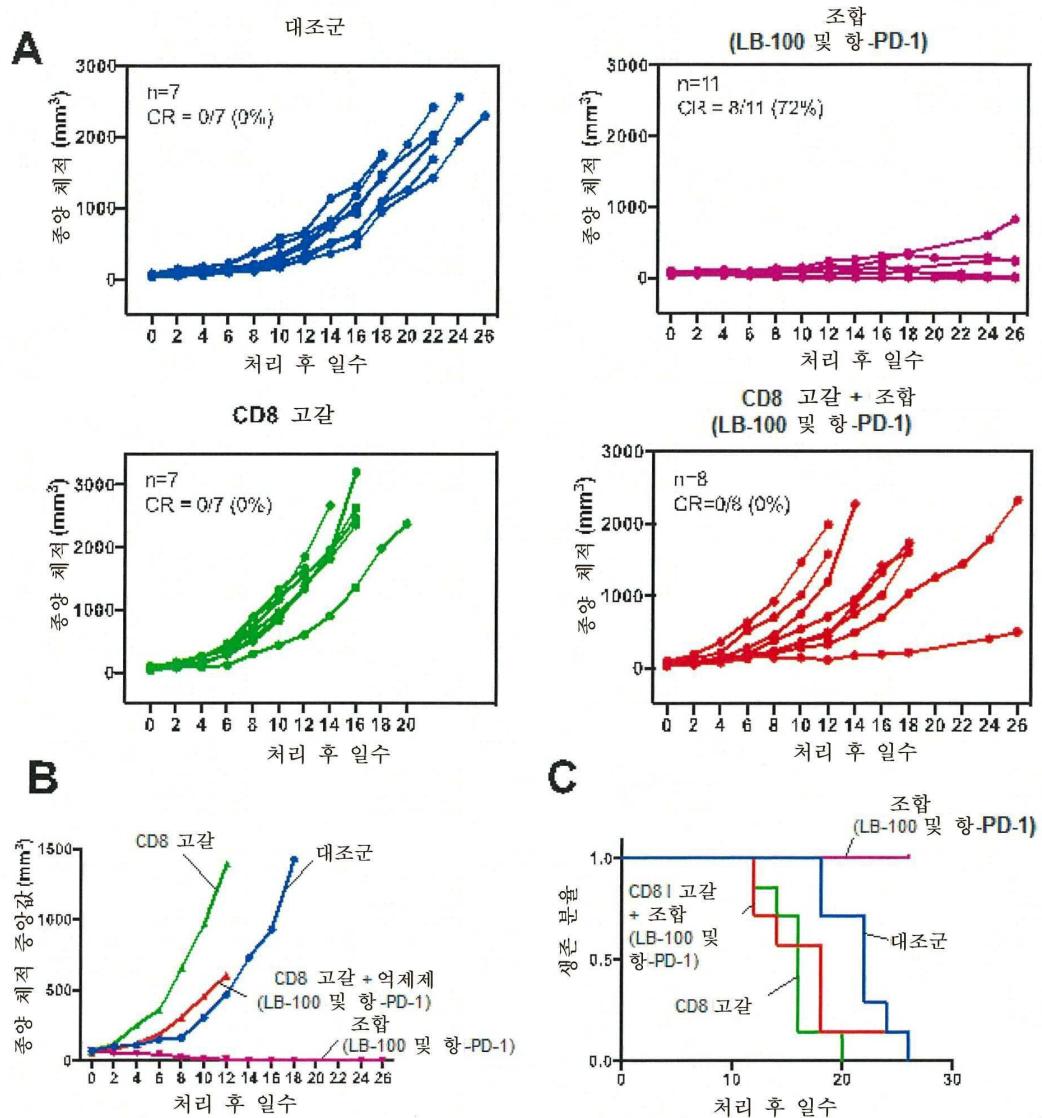
## 도면20



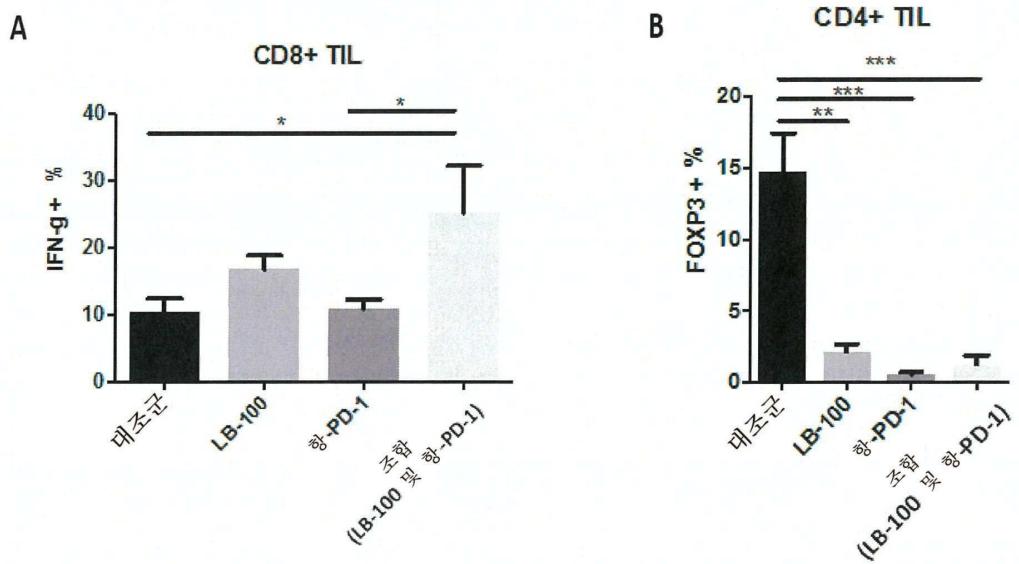
## 도면21



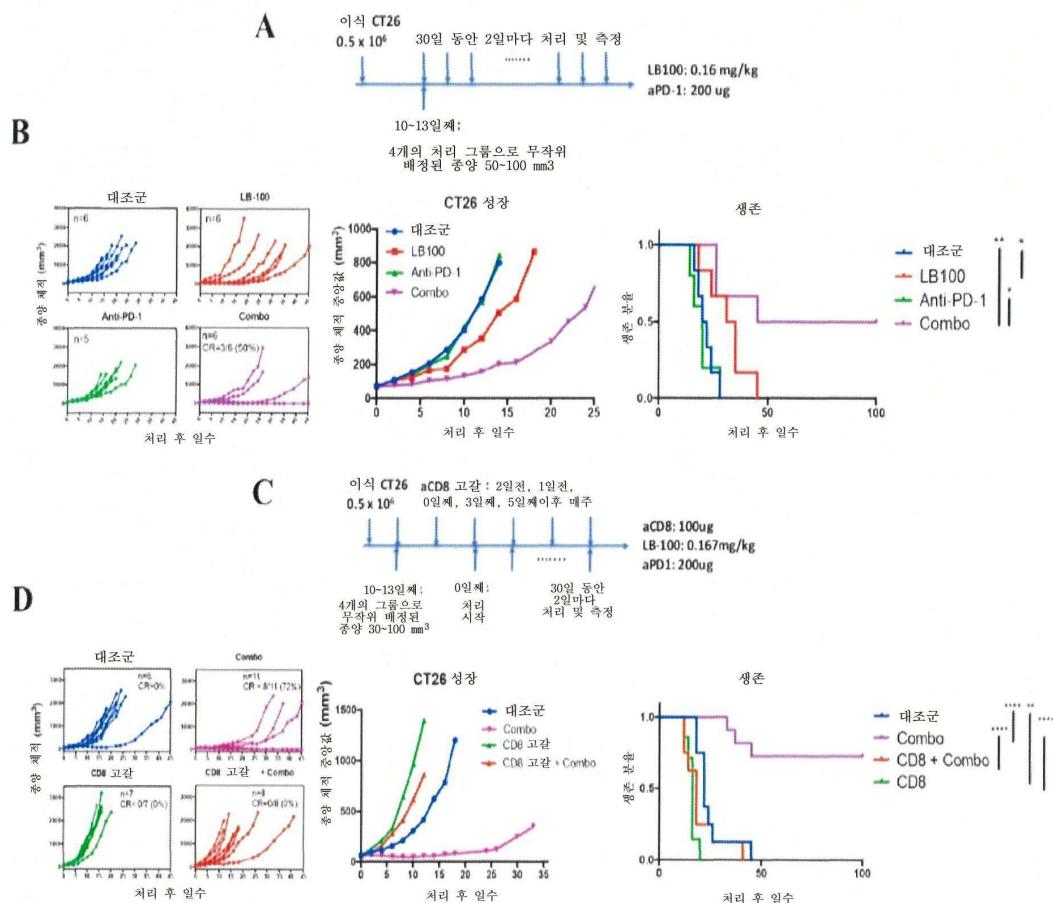
## 도면22



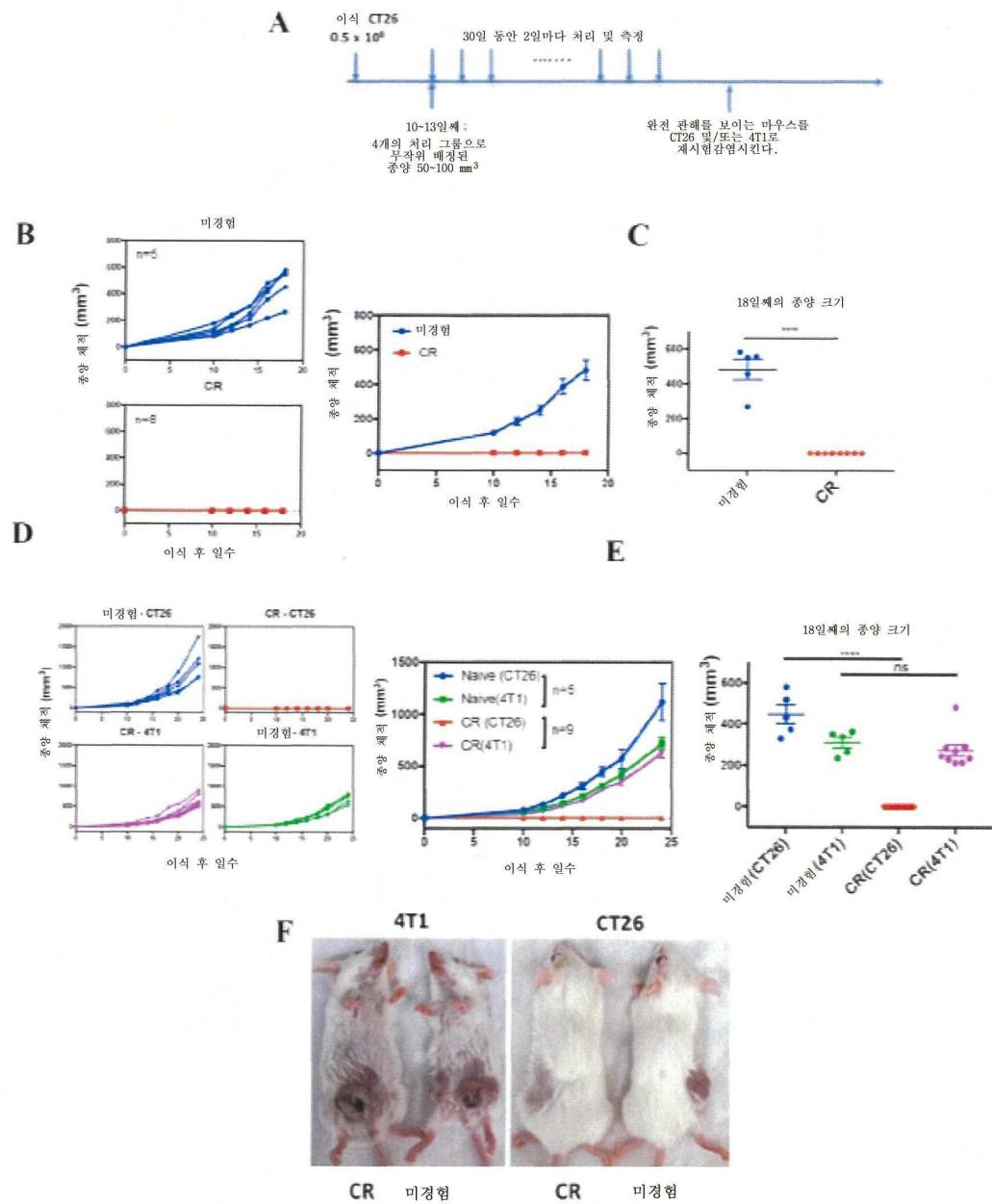
## 도면23



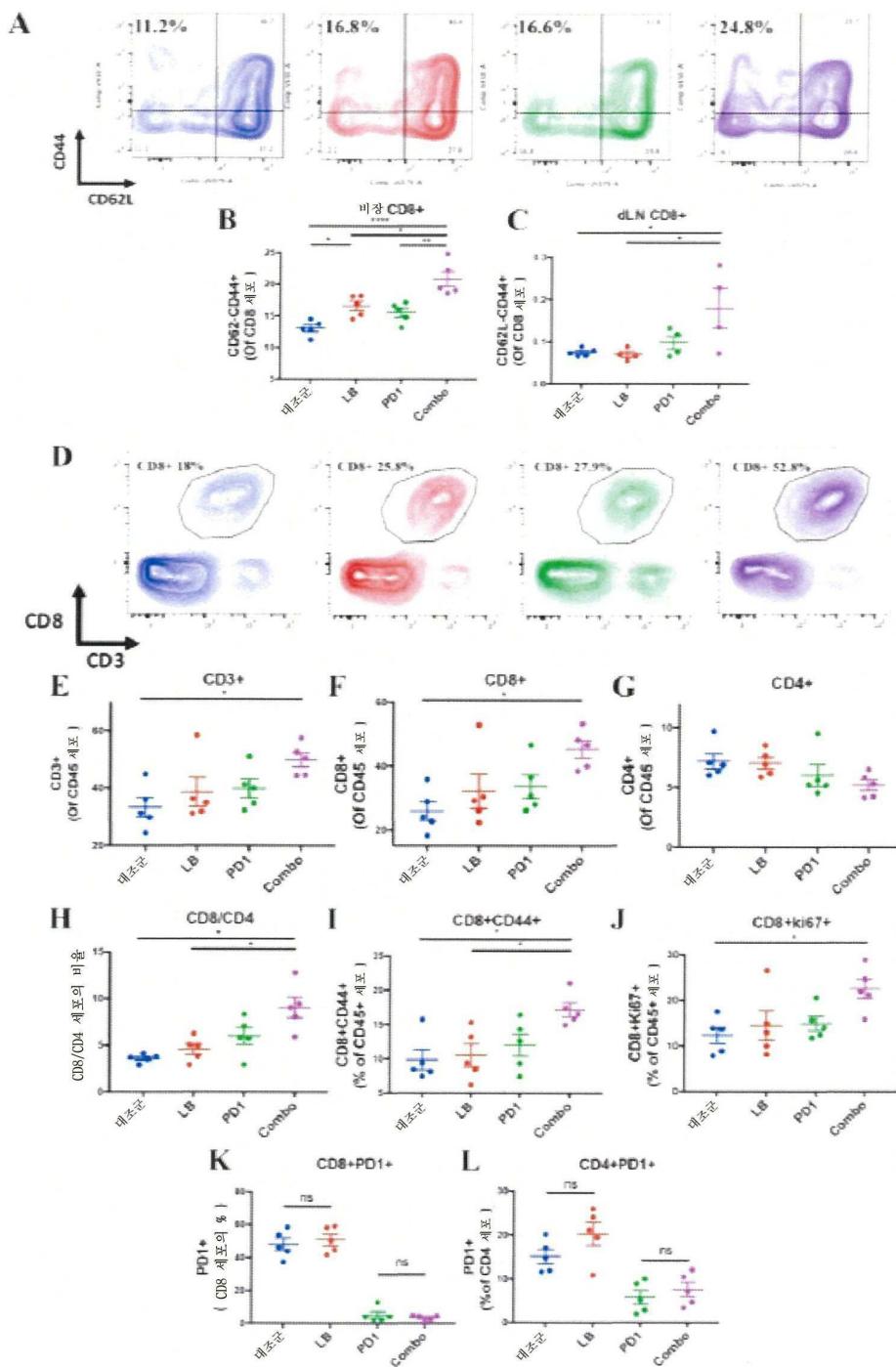
## 도면24



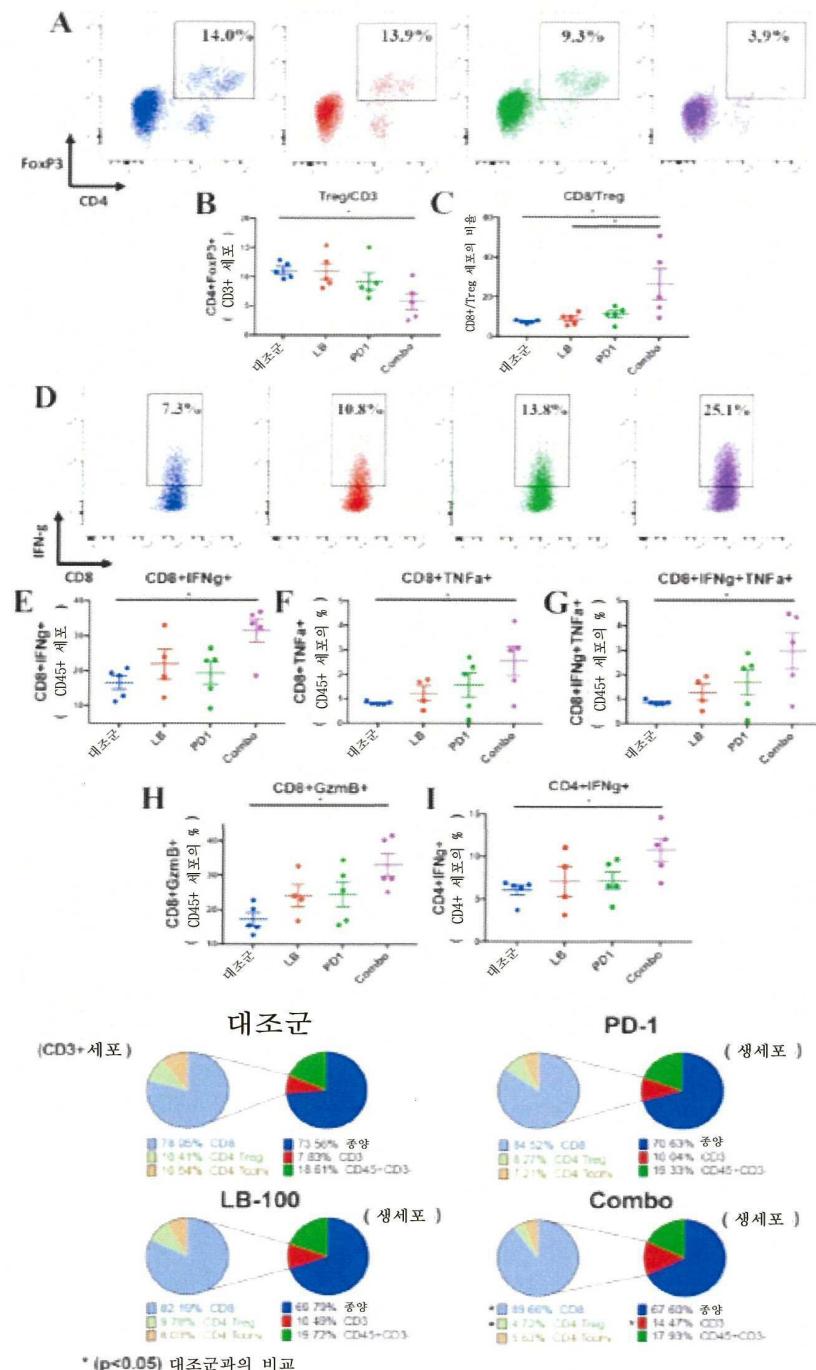
## 도면25



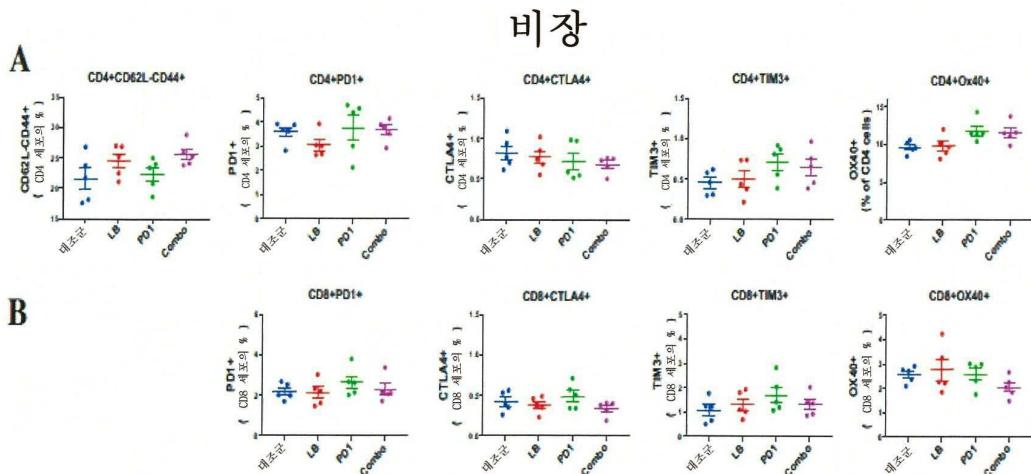
## 도면26



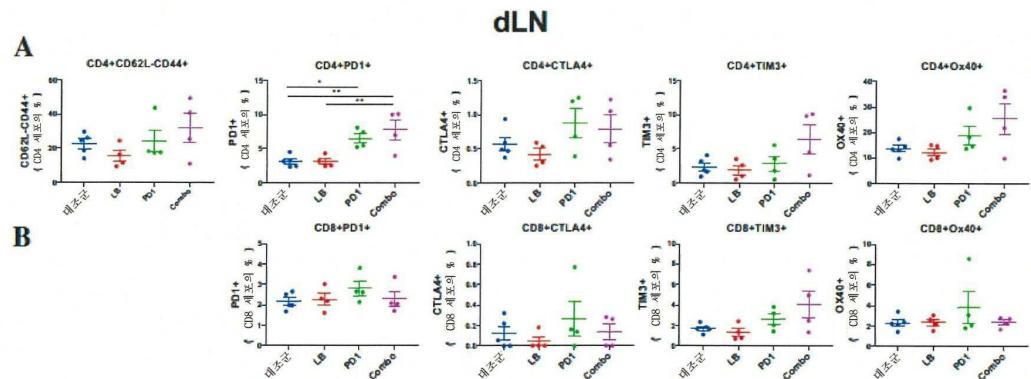
## 도면27



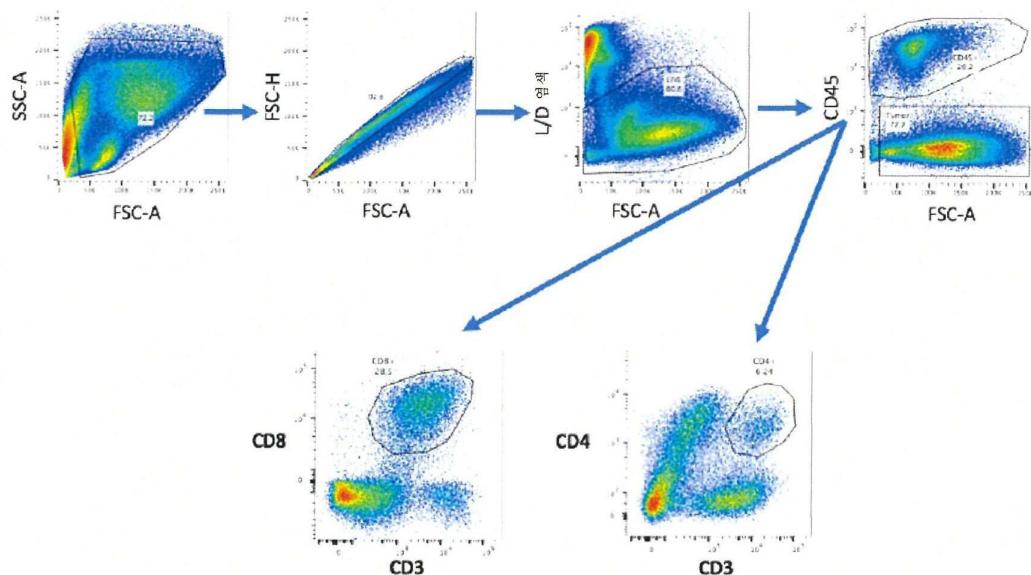
## 도면28



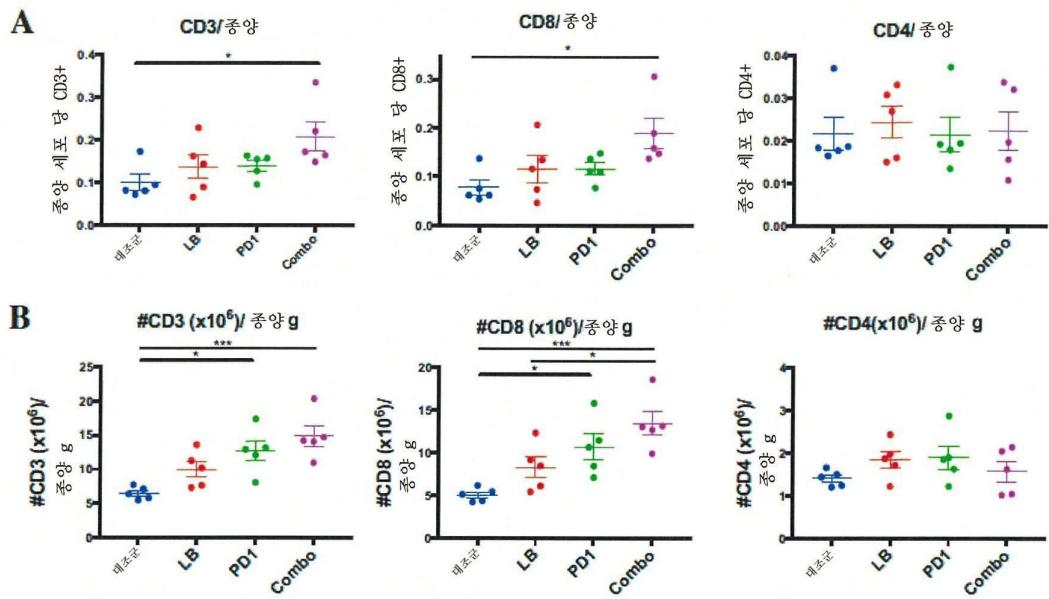
## 도면29



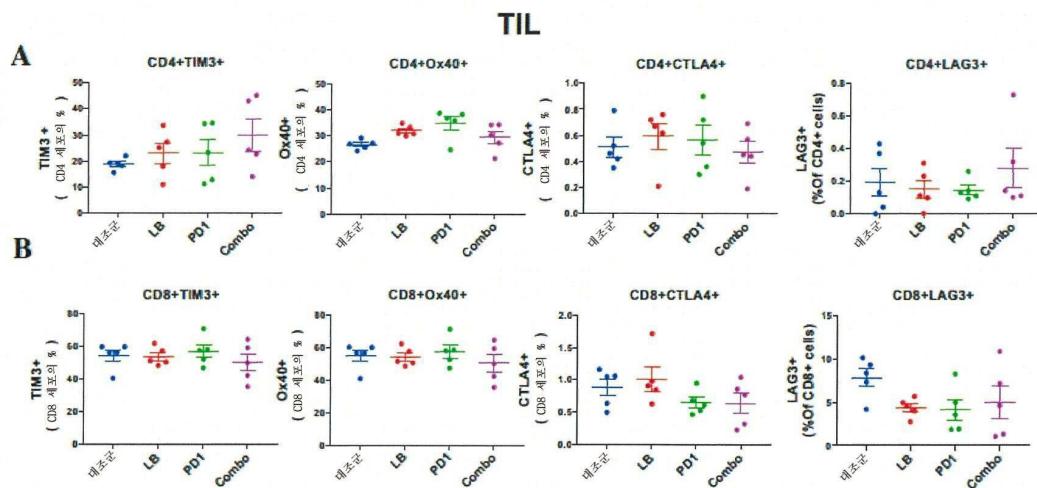
## 도면30



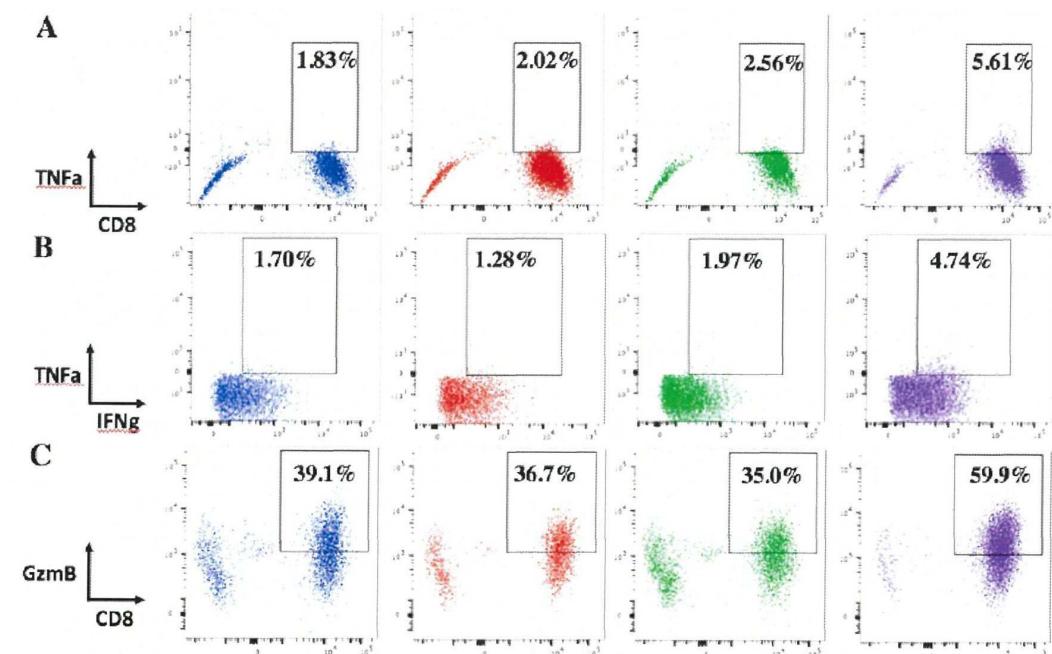
## 도면31



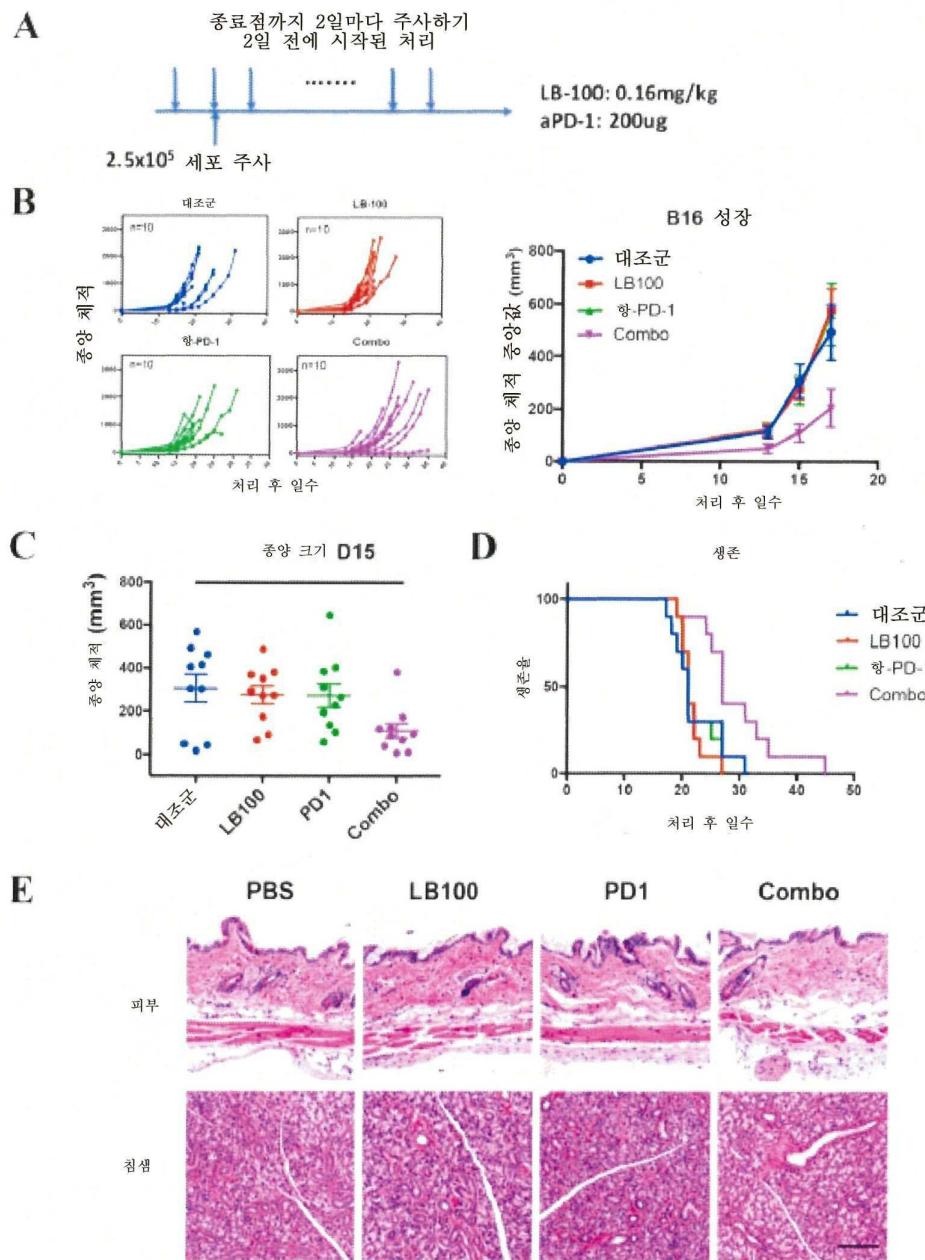
## 도면32



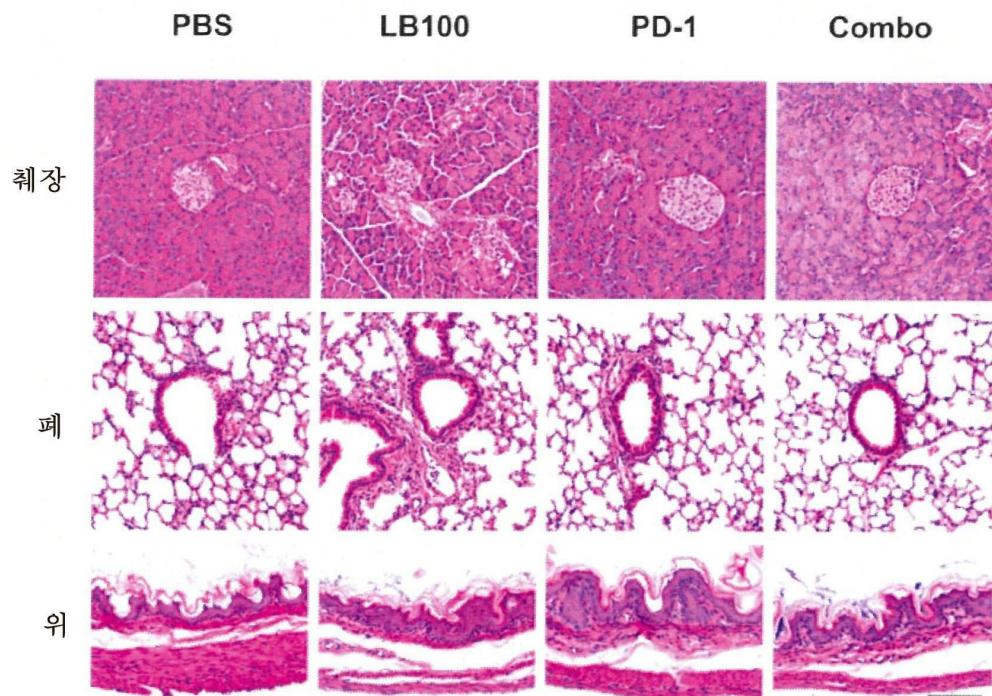
## 도면33



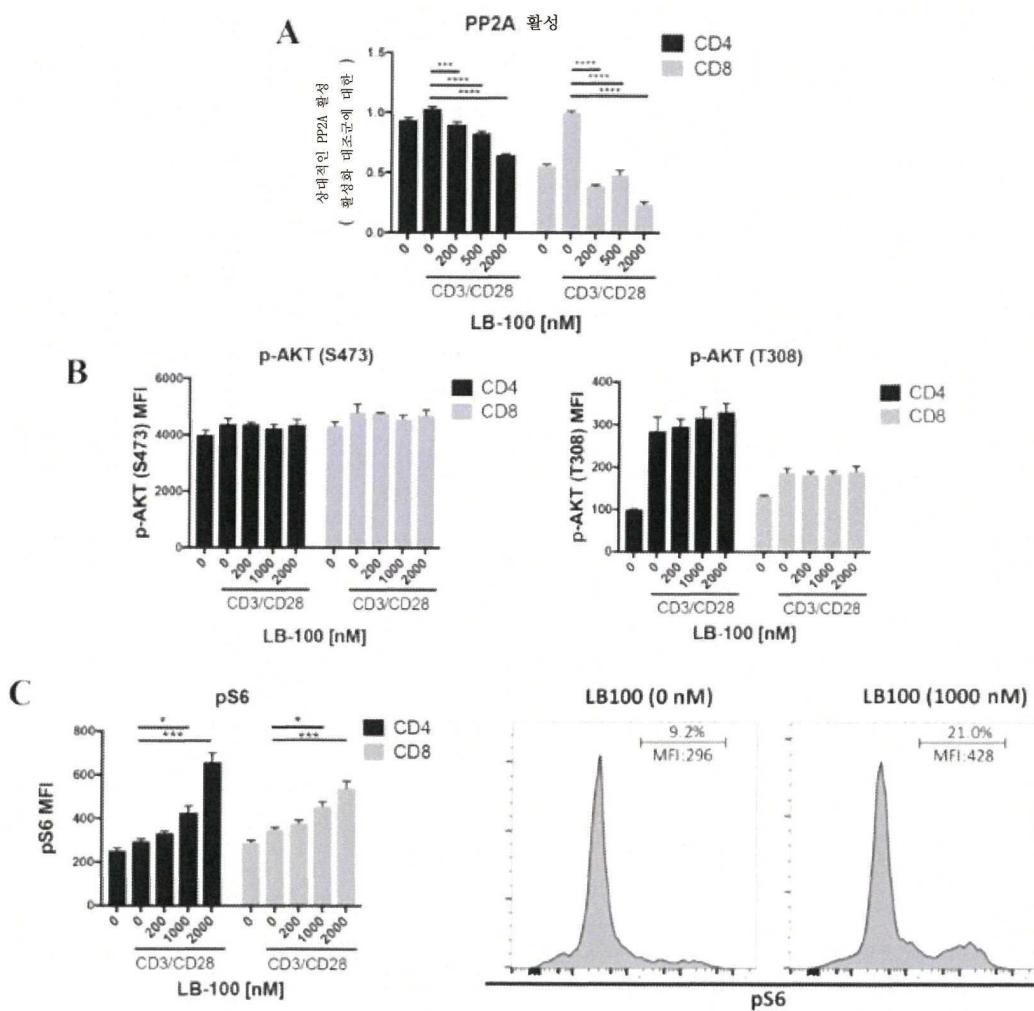
## 도면34



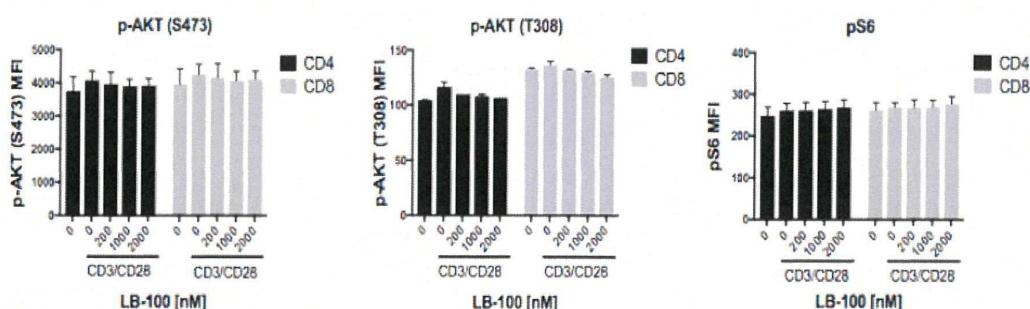
도면35



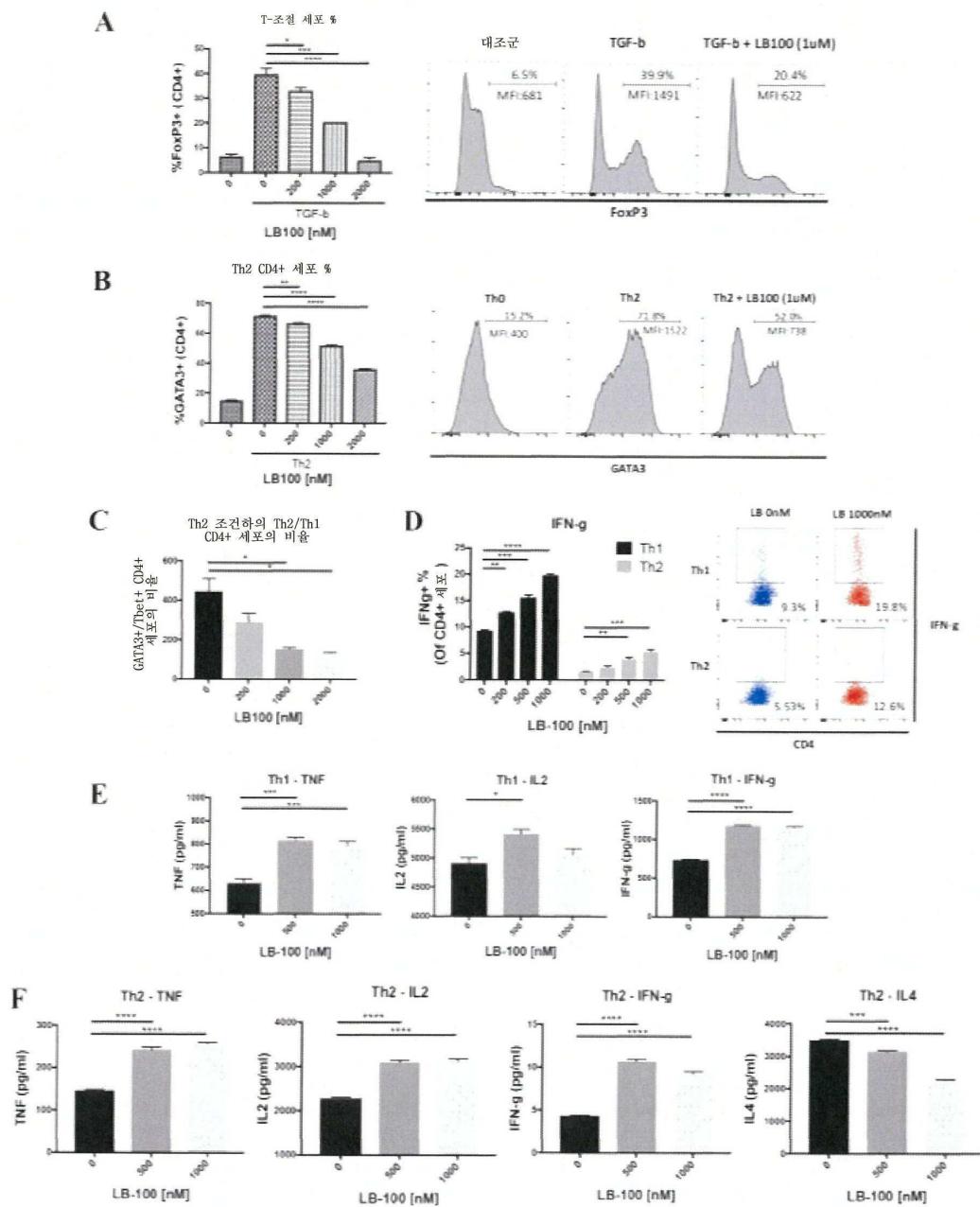
## 도면36



## 도면37



## 도면38



## 도면39

