



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0139445
(43) 공개일자 2022년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7068 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7068 (2013.01)
A61K 41/0057 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7034306(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년04월10일
심사청구일자 2022년09월30일
(62) 원출원 특허 10-2018-7032029
원출원일자(국제) 2017년04월10일
심사청구일자 2020년04월08일
(85) 번역문제출일자 2022년09월30일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2017/050440
(87) 국제공개번호 WO 2017/179053
국제공개일자 2017년10월19일
(30) 우선권주장
62/320,549 2016년04월10일 미국(US)

(71) 출원인
예다 리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드
이스라엘 레호보트 7610002 피오 박스 95 옛 더
웨이즈만 인스티튜트 오브 사이언스
메모리얼 슬로안 케터링 캔서 센터
미국, 뉴욕 10065, 뉴욕, 요크 애비뉴 1275
(72) 발명자
셀츠, 아비그도르
이스라엘 레호보트 7632104, 4 토르 하아비브 스트리트
살로몬, 요람
이스라엘 레호보트 7610002, 와이즈만연구소 예다
리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드, 사서함
95
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

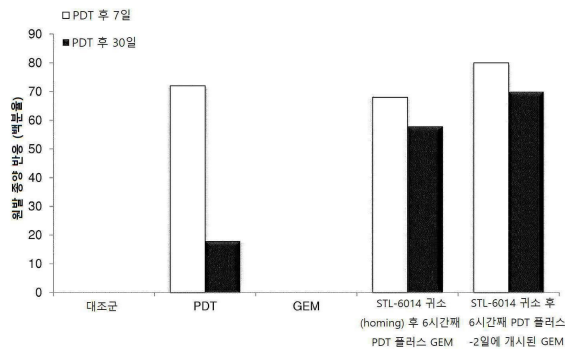
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료를 위한 병용 요법**

(57) 요약

암의 병용 요법에 사용되는 항-골수 유래 억제세포 제제 ("항-MDSCs 제제") 및 박테리오클로필 유도체 (hereinafter "Bchl-D)를 개시하며, 여기에서 상기항-MDSC 제제 및 상기 Bchl-D는 순차적으로 투여되며 상기 Bchl-D 투여 후에는 광역학 요법 (PDT) 또는 혈관 표적 PDT (VTP)가 수행된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

아게미, 리락흐

이스라엘 레호보트 7610002, 와이즈만연구소 예다
리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드, 사서함
95

하브리, 레이첼

이스라엘 레호보트 7610002, 와이즈만연구소 예다
리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드, 사서함
95

프레이즈, 디나

이스라엘 레호보트 7610002, 와이즈만연구소 예다
리서치 앤드 디벨롭먼트 캄파니 리미티드, 사서함
95

김, 광희

미국 10065, 뉴욕 뉴욕 박스524 1257 옥 애비뉴,
메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터

콜먼, 조나단

미국 10065, 뉴욕 뉴욕 박스524 1257 옥 애비뉴,
메모리얼 슬로안-케터링 캔서 센터

명세서

청구범위

청구항 1

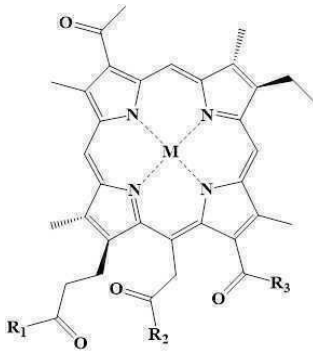
병용으로 사용하기 위한 항-골수 유래 억제 세포 제제 (항-MDSC 제제) 및 음이온성 박테리오클로필 유도체 (Bchl-D)를 포함하는, 원발 고형 종양 또는 이의 전이를 치료하기 위한 약학 조성물으로서,

상기 항-MDSC 제제 및 Bchl-D는 순차적으로 투여하기 위한 것이고, 상기 Bchl-D의 투여 후에 광역학요법 (PDT)이 수행되고,

상기 항-MDSC 제제는 쯤시타빈이고,

상기 항-MDSC 제제는 5 내지 12일 이상의 소정의 시간 간격으로 항-MDSC 제제를 4 내지 10회 투여하는 것을 포함하는 메트로놈 화학요법에 따라 투여되고, 여기에서 두 개의 상기 소정의 시간 간격 사이의 간격은 각각의 소정의 시간 간격보다 더 길고,

상기 Bchl-D는 하기 화학식 I을 갖는, 약학 조성물:



(I)

상기 식에서,

M은 Pd를 나타내고;

R₁은 O-R₄이고, 여기에서 R₄는 H, 암모늄기 또는 Na⁺ 또는 K⁺로부터 선택되는 1가의 금속 양이온이고;

R₂는 -O-(C₁-C₃) 알킬이고;

R₃은 -NH-(CH₂)₂-SO₃⁻ R₆⁺ 이고, 여기에서 R₆⁺는 Na⁺ 또는 K⁺로부터 선택되는 1가의 금속 양이온임.

청구항 2

제1항에 있어서,

R₂는 -O-메틸인, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 음이온성 Bchl-D는 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸) 아마이드와 포타슘 및 소듐으로부터 선택되는 1가의 알칼리 금속 또는 암모늄의 염인, 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 음이온성 Bchl-D는 본원에서 WST11로 명명된 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸) 아마이드 다이포타슘 염인, 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 PDT는 혈관-표적 PDT (VTP)이고, 처치되는 부위(area)는 Bchl-D 투여가 완료된 후 단기간 조사되는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 처치되는 부위는 Bchl-D 투여가 완료된 후 0-30분 동안 조사되는 것인, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 PDT 치료는 Bchl-D의 단독 투여 후 처치되는 국소 부위를 조사하는 것을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 항-MDSC 제제는 PDT 치료 전 일회 및 그 후 소정의 시간 간격으로 수 회 투여되는 것인, 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 항-MDSC 제제는 PDT 치료 후 소정의 시간 간격으로 수회 투여되는 것인, 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 Bchl-D는 WST11이고, Bchl-D 투여 후 VTP가 수행되는 것인, 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

처치되는 부위는 Bchl-D 투여가 완료된 후 0-30분 동안 조사되는 것인, 약학 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 항-MDSC 제제는 단일화학요법의 제제의 치료적 유효량보다 3 또는 4배 더 낮은 용량으로 투여되는 것인, 약학 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 고형 종양은 흑색종, 신장세포암, 대장암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 뇌암, 췌장선암 및 두경부암 으로부터 선택되는 것인, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 치료 및 암의 치료를 위한 병용 치료 요법에 관한 것이다.

[0002] **정의 및 약어:** Bchl: 박테리오클로로필; Bchl-D: 박테리오클로로필 유도체; BLI, 생체발광 영상; Bpheid: 박테리오페오포르바이드 a (중양 금속 원자가 없는 Bphe 유래의 C-17²-프리 카르복실산); CTX, CY: 싸이클로포스파마이드; DC: 수지상 세포; DDW, 재증류수; GEM: 쟈자르, 쟈시타빈; GFP, 초록 형광 단백질; IVIS, 인비보 광학 영상 시스템; Luc, 루시페린, 루시페라제; IVIS, 인비보 광학 영상 시스템; luc, 루시페라제; Ly6G, 림포사이트 안티젠 6 복합체(lymphocyte antigen 6 complex)는 골수 유래 세포에 의해 발현되는 21-25kD의 글라이코실포스파티딜이노시톨(GPI)-연결된 분화 항원임; Ly6G, 림포사이트 안티젠 6 복합체(lymphocyte antigen 6 complex)는 골수 유래 세포에 의해 발현되는 21-25kD의 글라이코실포스파티딜이노시톨(GPI)-연결된 분화 항원임; MDSCs: 골수 유래 억제 세포; **로도박테리오클로린:** 17번 위치에 -CH₂CH₂COOH 기, 13번 위치에 -COOH, 2, 7, 12, 8번 위치에 메틸 기 그리고 3 및 8번 위치에 에틸 기를 갖는 테트라사이클릭 7,8,17,18-테트라하이드로포르피린; Pd-Bpheid: Pd-박테리오페오포르바이드 a; NIR: 근적외선; PDT: 광역학 요법; RGD-4C: 환형 노나펩타이드 CDCRGDCFC-NH₂; ROS: 반응성 산소종; VTP: 혈관 표적(vascular-targeted) PDT;

배경 기술

[0003] 암 및 면역 억제 세포를 표적으로 하는 치료 모달리티(modality)의 조합은 원발 종양 성장을 제어하고 전이 성장을 예방하기 위한 유망한 방법을 구성한다.

[0004] 골수유래 억제 세포(Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)는 이들의 골수 기원, 미성숙 상태 및 잠정적 T 세포 반응의 억제능에 의해 정의되는 이질적 세포의 집단이다. 이들은 건강한 사람의 면역반응 및 조직 복구를 조절하고, 세포집단은 염증, 감염 및 암 동안에 빠르게 확장한다. MDSC는 크게 두 서브셋으로 구성된다- 과립구성(G-MDSC) 및 단핵구성(M-MDSC)- 이들은 형태적으로 각각 과립구 및 단핵구와 유사하다(Gabrilovich, 2017).

[0005] MDSC는 암에서 강력한 면역억제 활성을 발휘한다. MDSC는 암에 침윤하여 암특이적 세포독성 T 세포를 강하게 억제한다 (Gabrilovich, 2017). 종양은 주변 환경 및 떨어진 부위에서 항종양 면역을 제지하고, 종양 확장을 촉진시키기 위해 이러한 MDSC의 특징을 “활용(harness)” 하도록 진화해왔다. MDSC 활성을 제지하기 위한 새로운 방법은 면역 반응에 의한 종양 세포의 효과적인 조절에 결정적이다 (Condamine et al., 2015; Diaz-Montero et al., 2009; Gabrilovich, 2017; Marvel and Gabrilovich, 2015; Najjar and Finke, 2013; Quail, 2013 #18).

[0006] 단핵 또는 다핵핵 타입의 골수-유래 억제세포(MDSC)는 면역 억제를 촉진하고 그 결과 암세포가 산화질소 및 퍼옥시나이트라이트 생성을 통해 세포독성 T 세포를 중화하여 항-종양 면역으로부터의 도피하는 것을 촉진한다 (Condamine et al., 2015; Gabrilovich and Nagaraj, 2009). 부가하여, 골수 전구세포의 MDSC로의 초기 분화는 종양-회합 항원(TAA)의 전문적 제시, 선천적 면역 및 적응 면역 반응에 필요한 수지상 세포의 성숙에 기인한다

(Gabrilovich, 2017). 유방암, 전립선암, 폐암, 신장암 및 기타 암의 초기 국소화된 단계에서 퍼지고 전이되는 단계로의 진행은 MDSC의 증식과 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다 (환자의 주변부, 비장, 림프절 및 종양 미세환경에서(Brusa et al., 2013; Condamine et al., 2015; Gabrilovich, 2017; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Najjar and Finke, 2013)). MDSCs의 증가는 CD4 및 CD8 T 세포의 활성을 차단하여 면역 억제를 증대시킨다 (Gabrilovich, 2017). 이러한 증가는 암세포의 G-CSF, GM-CSF, IL-6 및 기타 다른 것과 같은 사이토카인의 분비 및 뒤이은 MDSC로부터 IL-6 및 기타 다른 것을 통한 자가분비 자극과 주로 연관되어졌다 (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). 증가된 농도에서, MDSC는 면역 감시 및 독성으로부터 순환하는 암세포 및 원발 종양을 보호하여 종양 niches를 확립하는 것을 돕는다.

[0007] MDSC를 억제하는 다수의 방법이 현재 연구 중에 있다. 이러한 방법은 넓게는 다음과 같이 분류될 수 있다: (a) MDSC를 성숙한, 비-억제성 세포(ATRA(올트랜스 레티노산), 비타민 D)로 분화를 촉진 (Najjar and Finke, 2013), (b) MDSC의 농도 감소(수니티니브(sunitinib), 젬시타빈(GEM), 플루오로우라실(f-5U), 바르독솔론 메틸(bardoxolone methyl(CDDO-Me)) (Najjar and Finke, 2013), 또는 (c) 기능적으로 MDSC 억제(포스포디에스터라제 유형5 (PDE-5) 억제제, 사이클로옥시게나제 2 (COX-2) 억제제) (Najjar and Finke, 2013).

[0008] 임상분야에서 다양한 암의 치료에 사용되는 젬시타빈(GEM, Gemzar), 플루오로우라실(f-5U) 및 기타 FDA-승인된 화학요법제는 종양을 갖는 마우스 및 인간 모두에서 MDSC의 양을 선별적으로 감소시키는 것으로 나타났다 (Le et al., 2009; Suzuki et al., 2005; Vincent et al., 2010). 그러나 암의 진행의 지연에도 불구하고, 이들 약물 중 어느 것도 전이까지의 시간 및 환자의 생존을 상당히 증가시키지 못하는 것으로 나타났다 (예를 들면 췌장암의 치료에서).

[0009] 일반적으로 광역학 요법(PDT) 및 특히 신규한 박테리오클로로필 유도체(이하 Bchl-D)을 사용하는 혈관 표적 PDT(VTP)은 상이한 표적에서 국소적 고휘도 중량을 선택적으로 제거하는 것으로 나타났다 (WO 00/33833; WO 2004/045492). 특히 WST11로 명명된 Bchl-D를 이용한 VTP는 성공적인 임상시험 후 (Azzouzi et al., 2013, 2017; Eymerit-Morin et al., 2013), 최근 초기 단계의 전립선암의 치료에의 사용이 허가되어 졌다.

[0010] 원래 혈관신생을 억제하는 것으로 디자인된 메트로논 화학요법은 긴 휴약기간 없이 저용량의 화학요법제를 빈번한 규칙적인 스케줄에 따라 투여하여 심각한 독성을 최소화하는 것을 포함한다 (Ge et al., 2012; Ghiringhelli et al., 2007). 이러한 치료는 특히, 특이적 세포 집단 방식으로 항(pro)-종양 면역 세포 증식에 영향을 주는 것으로 나타났다.

발명의 내용

[0011] 발명의 요약

[0012] 한 양태에서 본원은 항-골수-유래 억제세포 제제(이하 본원에서 "항-MDSC 제제(agent)") 및 박테리오클로로필 유도체 (이하 본원에서 "Bchl-D")를 암 치료의 병용요법에 사용하는 용도를 제공하며, 여기에서 상기 항-MDSC 제제 및 Bchl-D는 순차적(sequentially)으로 투여되며, 상기 Bchl-D의 투여 후에는 광역학 요법 (PDT)이 뒤따른다.

[0013] 다른 양태에서, 본원은 병용 요법(combination therapy)에 의한 암치료 방법으로, 상기 방법은 암 치료가 필요한 환자에게 (i) 치료적 유효량의 항-골수-유래 억제세포 제제(MDSCs)(이하, "항-MDSC 제제") 및 (ii) 치료적 유효량의 박테리오클로로필 유도체 (Bchl-D)를 투여한 후 광역학 요법 (PDT) (이하 "Bchl-D PDT")을 수행하는 것은 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 본 특허 또는 출원은 하나 이상의 칼라 도면을 포함한다. 칼라 도면이 포함된 이 특허 또는 특허출원의 사본은 요청하면 필요한 비용을 지불하고 미국 특허상표청에서 제공받을 수 있다.

도 1A는 4T1 유방 종양을 갖는 마우스에서 STL-6014 (윗열) 및 STL-7012 (아랫열)의 인비보 추적 및 제거를 보여준다. **도 1B**는 투여 후 16시간에 상이한 기관 및 종양에서 STL-6014의 추적 및/또는 유지를 보여준다.

도 2는 다음과 같다: **(2A)** PDT 전 2일 (파란색 화살표) 또는 PDT 후 1일 (오렌지 화살표)에 시작하는 STL-6014 PDT와 젬자르(Gemzar)의 조합 투여를 이용한 유방(mammary) 패드에 4T1 종양이 있는 마우스의 치료 계획 (scheme) 1; **(2B)** STL-6014의 볼루스 주사 후 6시간에 조사된 종양; **(2C)** 원발성 및 전이 종양을 갖는 마우스 (좌측), 원발 종양만을 갖는 마우스 (중간) 및 치유된 마우스 (우측)의 루시페린 생체발광.

도 3은 다섯 가지 치료 요법 중 하나로 처치된 후 7일째(블랙) 및 30일째(흑색)에 동소 4T1 종양이 없는 동물의 백분율을 나타낸다. STL-6014 PDT 치료는 유방 패드에 4T1 이식 후 7일째에 적용되었고 Gemzar (GEM) 투여는 도 2에 기재된 치료 계획 1을 따랐다. 다음 요법이 적용되었다: (1) 치료 없음 (대조군, N=18); (2) STL-6014 PDT (PDT, N=29); (3) 이식 후 5일째 메트로놈 Gemzar 시작 (GEM, N=11); (4) STL-6014 PDT (N=19) 후 1일 째에 메트로놈 Gemzar 시작 PDT는 STL-6014 주사 후 6h에 적용); 및 (5) STL-6014 PDT (N=20, STL-6014 주사 후 6h PDT) 수행 2일 전에 메트로놈 Gemzar 시작

도 4는 동소 4T1 종양을 갖는 도 3에 기재된 상이한 치료 요법에 의해 처치된 Balb/C 마우스에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선을 나타낸다. 대조군 (N=18) (◆) - 처치 없음; STL-6014 (N=29) (■)-STL-6014 PDT 단일요법은 실험재료 및 방법에 기재된 바와 같이 종양 이식 후 7일째에 적용된다; Gem (▲)(N=11) - 1st Gemzar 투여는 단일요법으로 종양 이식 후 5일째에 적용된다; PDT 6h 플러스 GEM (N=19)- PDT는 PDT 1일 후에 시작하여 Gemzar 투여와 병용한 STL-6014 투여 후 6시간에 및 이후 5주 동안 매주 더 적용한다; PDT 6h 플러스 GEM 시작 -2 (N=20) (●)-PDT는 PDT 전 2일째에 시작하는 Gemzar 투여와 병용한 STL-6014 투여 후 6시간째에 5회 및 그 후 매주 5주 동안 더 적용된다.

도 5는 Gemzar와 병용된 STL-6014 PDT의 2가지 상이한 요법에 따라 처치된 동물의 희생 당일의 4T1 폐전이 발견된 동물의 백분율을 보여주는 파이 차트이다. (5A) STL-6014-PDT는 STL-6014-PDT 적용 하루 후에 시작하는 Gemzar 투여와 병용 된다 (N=20). (5B) STL-6014-PDT는 STL-6014-PDT 적용 2일 전에 시작하는 Gemzar 투여와 병용된다 (N=19).

도 6은 PDT 2일 전에 투여된 Gemzar와 병용된 STL-6014 PDT에 의한 4T1 종양 치료 후 2×10^5 4T1 세포의 제 2 동소 이식에 의해 재차 도전 된 Balb/C 마우스에서의 4T1 종양 진행을 나타낸다. 재-도전은 첫 번째 치유 후 120 일 (첫 번째 종양 이식 후 240일)에 수행되었다. (6A) 종양이 없는 동물 (naive)에서 4T1 종양의 이식 후 개별 동물 (N=10) 생존커브로 각 커브는 동물 한마리를 나타낸다. (6B) 첫 번째 종양 이식 후 처치되어 치유된 동물에서 4T1 이식 후 개별 동물 (N=15) 생존 그래프. 각 커브는 동물 한 마리를 나타내고, 다만 오렌지/그린 커브는 10마리를 나타낸다. 처치 후 50일째에, 이들 10/15 동물들은 원발 및 전이 종양이 없었다.

도 7은 MB49 (방광) 종양을 갖는 마우스에 대한 WST11 VTP 및 Gemzar 병용 요법을 위한 치료 계획 2를 나타낸다. MB49 암세포 (10⁶)는 -15일에 Balb/C 마우스의 뒷다리에 이식되었다. 먼저 Gemzar 투여 (50mg/kg)는 -3일에 수행되었고 이어 4일에 수행되었고 2회/주, 3주/달의 사이클로 계속되어 총 12회 처치/90일이 수행되었다. WST11 VTP는 종양 이식 후 15일에 수행되었다. WST11 (9mg/kg)는 i.v.로 5분간 주입되었고, 이어 120mW/cm²에서 Modulight 레이저를 사용하여 753nm로 10분간 조사하였다.

도 8은 치료 계획 2 (도 7)에 기초한 상이한 치료 요법에 대한 MB49 종양 이식 된 마우스의 반응을 나타낸다. (8A) 평균(Mean) 종양 성장(에러바- SEM). 흑색-대조군 (0/17 치유됨, p<0.0001 vs VTP+Gemzar); 청색-Gemzar 단독 (0/19 치유됨, p<0.0001 vs VTP+Gemzar); 적색-VTP 단독 (3/19 치유됨, p<0.0005 vs VTP+Gemzar); 녹색-VTP+Gemzar (11/17 치유됨). P 값 계산은 two way Anova 테스트를 기초로 한 것이다. (8B) 상기 WST11 VTP 병용 처치를 받은 개별 마우스 뒷다리의 종양 성장. 윗쪽 패널 왼쪽-대조군, 0/17 치유; 윗쪽 패널 오른쪽-Gemzar 단독, 0/19 치유됨; 아래 패널 왼쪽-VTP 단독, 3/19 치유됨; 아래 패널 오른쪽-VTP+Gemzar, 11/17 치유됨. (8C) 처치 개시 후 25일째 생체발광으로 나타난 것과 같이 폐 전이의 예방: 윗쪽 패널 - 개별 마우스의 폐에서 평균 빛 (* p<0.005, ** p<0.0001); 아래 패널 윗줄- 대조군 및 Gemzar단독으로 처치된 동물의 이미지; 아래 패널 아래 줄- 치유된 동물의 이미지. (8D) 상이한 치료요법에 따른 전반적인 동물의 생존.

도 9는 상이한 치료 요법에 따른 전신적인(systemic) 항 종양 반응의 발달을 보여준다. MB49 암세포를 Balb/C 마우스의 오른쪽 뒷다리에 -15일에 이식 하였다. (9A) 먼저 Gemzar 투여 (50mg/kg)를 -3일에, 그리고 4일에 수행하였고, 3주 동안 2회/주의 주기로 계속 투여했다. 이어 다음 1주일 쉬고, 다시 3주 주기로 투여 총 12회 처치/90일을 수행하였다. WST11 VTP는 이식 후 15일째 WST11를 9mg/kg으로 i.v.로 5분 동안 주입한 후 Modulight 레이저를 120mW/cm²로 사용하여 753 nm에서 10분간 조사하였다. 두 번째 종양은 VTP 후 1일째에 뒷다리에 이식되었다. (9B) WST11 VTP 후 1일째 왼쪽 뒷다리에서 이식 된 두 번째 종양의 개별 동물에서 종양 성장: 상단 패널 왼쪽-대조군 (14/20 동물에서 성장), 상단 패널 오른쪽 - Gemzar (15/20 동물에서 성장), 하단 패널 왼쪽 - WST11 VTP 단독 (12/19 성장), 하단 패널, 오른쪽 - VTP+Gemzar (5/17 성장). (9C) PDT에 의해 MB49가 치유되고 이어 MB49 세포가 꼬리 정맥으로 주사된 동물에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선.

도 10은 T 세포 및 B 세포 집단의 결여가 MB49 종양에서 VTP, 잼시타빈 및 이들의 조합의 치료 효과를 감소 시킨다는 것을 보여준다. (10A) WST11 VTP로 처리된 면역능이 있는 (WT N=19) 마우스와 비교하여 면역 손상 (Rag1KO, n=22) 마우스의 전반적인 생존율에서 통계적으로 유의한 감소를 보이는 Kaplan-Meier 곡선 ($p < 0.0001$). (10B) Gemzar 단독으로 처리된 마우스의 전반적인 생존율 (WT N=10, Rag1KO N=10, $p < 0.05$). (10C) 조합으로 처리 한 마우스의 전반적 생존 (WT N=10, Rag1KO N=7, $p < 0.005$).

도 11은 비-처리 (대조군) 4T1-보유 마우스의 비장에서 면역 세포 집단의 대표적인 다이어그램을 제공한다 : (11A) 과립구/단핵구 골수-유래 억제세포 (G/M-MDSC) 및 호중구; (11B) 수지상 세포 (DC); (11C) 종양 회합 대식세포 (TAMs); (11D) CD4 & CD8 T 세포; (11E) T 조절 세포(Tregs) 게이팅(gating).

도 12는 처리 후 1 - 3주에 4T1 보유 마우스의 체장 면역 세포 집단에 대한 치료 계획 1 (도 2에 기재됨)에 기재된 바와 같이 Gemzar 투여와 병용 된 STL-6014-PDT의 치료 영향을 나타낸다. (12A) G/M-MDSCs (블랭크), TAMs (흑색). (12B) DC (블랭크), CD8 (흑색); (12C) Tregs.

도 13은 STL-6014 PDT 단독 투여, Gemzar 단독 투여 및 병용에 의한 이식 후 7일째에 치료에서 종양 보유 동물을 처리하지 않은 후 1 및 3주에 4T1 암세포로 동소이식 된 동물의 비장 중량 변화를 나타낸다. 치료 계획은 도 2에 나와있다.

도 14는 뒷다리에 MB49 종양이 이식되고 처치를 받지 않은 동물 (대조군) 및 2개의 Gemzar 치료 요법 중 하나와 WST11 VTP가 병용 처리된 동물의 비장에서 선천적 면역 세포 집단을 나타낸다. (14A) VTP 후 6일째 비장에서 CD11b+의 면역조직화학 (IHC) 염색(4x Bar 200 μ m). (14B) WST11 VTP 후 9일째에 호중구/G-MDSC (CD11b+Ly6G+, 중간 그래프) 및 단핵구/M-MDSC (CD11b+Ly6C+, 가장 오른쪽 그래프). FACS 분석을 위해 선택된 동물에게 저용량 (60mg/kg, 적색) 또는 고용량 (120mg/kg, 녹색)으로 -3일, 1일, 4일, 7일에 Gemzar 투약 (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

도 15는 MB49 종양을 보유한 마우스의 상이한 치료 요법에 대한 적응성 면역 반응을 나타낸다. 왼쪽-배액 림프절, 중간-비장, 오른쪽-혈액; (15A) 상단 패널-CD8⁺ 세포, 하단 패널-CD8⁺/Treg. 녹색-120mg/Kg으로 Gemzar 처리와 조합된 처리 또는 대조군; 청색-처리 또는 Gemzar 처리가 없는 대조군. 도 7 (계획 2)에 기술된 바와 같이 처리 후 6일째 종양, 혈액 및 비장에서 CD8⁺ 및 CD8⁺/Treg에 미치는, 고투여량 (120mg/kg)으로 Gemzar 투여와 병용된 WST11 VTP의 영향(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). (15B) 상단 패널-6일째, 청색-Gemzar 비처리, 녹색-120 mg/kg로 Gemzar 처리; 하단 패널-9일; 청색-Gemzar 비처리, 적색- 75 mg/kg로 Gemzar 처리; 녹색-120 mg/kg로 Gemzar 처리; 좌측 컬럼-Treg, 중간 컬럼-Teff/Treg, 우측 컬럼-Tcm (활성화된 CD8 T 세포).

도 16은 뒷다리에 4T1 종양이 있는 마우스에서 VTP 3일전에 투여 된 사이클로포스파마이드(CTX)에 의한 면역조절이 있거나 그리고 없이, 종양 이식 후 7일째에 실행된 WST11 VTP 처리 계획을 나타낸다.

도 17은 상이한 광도 (mW/cm^2) 및 CTX 투약량하에서 고정 투여량 9.0 mg/kg의 WST11으로 처리되는 상이한 치료 요법에 대한, 뒷다리에 4T1 종양을 갖는 개별 Balb/c 마우스의 국소 반응을 나타낸다. 상단 줄: 비-처리 마우스 (좌측: N=5), 50 mg/kg CTX (중간, N=4) 처리, 150 mg/kg CTX (우측, N=6) 처리. 중간 줄: 100mW (왼쪽, N=8) 또는 150mW (오른쪽, N=7)에서 WST11 VTP로 처리. 하단 줄: 50 mg/kg CTX+VTP 100mW (왼쪽, N=10), 150 mg/kg CTX+VTP 100mW (중간, N=7), 50 mg/kg CTX+VTP 150mW (오른쪽, N=7) 병합 처리.

도 18은 4T1-luc 유방 종양이 뒷다리에 피하 (s.c.)이식 된 Balb/c 마우스에 대한 Kaplan-Meier 생존 곡선으로 상기 마우스는 저광도 ($100 mW/cm^2$) (18A, 18B), 또는 고풍도 ($150 mW/cm^2$) (18C, 18D)를 이용한 WST11 VTP 단독 처리 또는 VTP 3일 전에 단회 CTX (CY) (150 또는 50 mg/kg) 투여와 병용 처리되었다. 처리 결과는 처리된 모든 마우스 (18A, 18C, 18D) 또는 일차 종양의 비가역적인 완전 제거술을 받고 90일 (18D)에 전이가 없이 생존한 동물에 대한 것이다.

도 19는 뒷다리에 4T1-luc 유방 종양이 s.c.로 이식된 Balb/c 마우스에서 폐 전이가 있는 동물의 백분율에 대한 상이한 치료 요법의 영향을 나타낸다. (19A). 뒷다리의 4T1-luc 유방암 세포 이식 7일 후 Balb/c 마우스의 폐에서 분리된 세포로부터 생겨난 4T1-luc 콜로니를 보여주는 페트리디쉬 (WST11 VTP의 당일). (19B). CTX (50 mg/kg) + VTP 저광도 (N=10) 또는 고풍도 (N=5) 처리, 또는 VTP 단독으로 저광도 (N=4) 또는 고풍도 (N=5) 처리 후 90일째 완전한 원발 종양 제거 후 전이가 없는 동물의 백분율.

도 20은 4T1-luc 종양에 대한 Foxp3 양성 세포 (Treg 세포)의 침윤을 보여준다. CTX 또는 식염수 투여 후,

Balb/C 마우스의 뒷다리에서 이식된 4T1 종양이 30-60 mm³에 도달하면 표시된 시간에 절제하여, 포르말린-고정 및 파라핀 포매되었다. 절편을 준비하고 Foxp3 발현에 대하여 염색 하였다. 양성 세포의 수는 피지(Fiji) 소프트웨어를 사용하여 측정되었다. 도 20A는 비치치 대조군의 종양 이식 후 7일째 및 정량화의 대표적 도면을 나타내고, 도 20B는 CTX에 의해 처치된 동물의 대표적인 결과를 나타낸다. 도 20C는 비치치 동물, 처치 후 24시간에 CTX로 처치된 동물 및 처치 후 72시간에 CTX로 처치 된 동물에서의 Foxp3 (Treg 세포)의 백분율을 나타낸다.

도 21은 4T1-luc 종양을 갖는 마우스의 배액(drainage) 림프절 및 비장에서 T 세포 집단에 대한, WST11 VTP 투여 3일전에 투여된 저투여량 CTX 영향을 나타낸다. 도 21A. 배액 림프절 (LN, 왼쪽)과 비장 (오른쪽)의 총 세포 수. LN과 비장은 도 16에 나타낸 바와 같이 치료 계획 4에 따라 CTX의 투여 (흑색)와 함께 및 투여가 없이 (블랭크) WST11 VTP후에 표시된 시간에 수확되었다. 세포를 분리하고 항 CD4, CD8 및 Foxp3 항체로 유세포 분석을 위해 염색 하였다. 적혈구 고갈 후의 비장 총 세포 수를 세었다. 도 21B. VTP 3일전에 CTX로 처치되거나 (흑색) 또는 처치없이 (블랭크) WST11 VTP 후 상이한 시간에 배액 LN에서 CD8⁺ (왼쪽), CD4⁺ (중간) 및 Foxp3 (Treg, 오른쪽) 백분율 (* p<0.001, ** p<0.05); 도 21C. VTP의 3일전에 CTX로 처치되거나 (흑색) 또는 처치없는 (블랭크) WST11 VTP 후 상이한 시간에 비장에 있는 CD8⁺ (왼쪽), CD4⁺ (중간) 및 Foxp3 (Treg, 오른쪽) 백분율 (*p<0.001, **p<0.001, ***p<0.05).

도 22는 이식 후 7일에 (VTP 당일) 뒷다리에 s.c. T1-luc 종양을 갖는 마우스의 종양 및 비장에서 골수 세포 집단에 대한 저용량 CTX 투여의 효과를 나타낸다. 왼쪽-종양; 오른쪽-비장.

도 23A는 WST11 VTP 단독 (이식 후 7일째, 종양의 직경이 5-7 mm에 도달 할 때)을 사용하여 유방 패드에서 4T1 종양을 갖는 마우스의 병합 치료에 대한 치료 계획 5를 나타낸다; VTP 3일전에 시작하고 3회 추가 투여되는 메트로놈 CTX 투여와 조합된 WST11 VTP (검은색 화살표)(CTX 2); VTP WST11 투여 1일 전에 CTX 1회 투여 (CTX 1) 및 3회 추가투여와 조합된 WST11 VTP (적색 화살표); VTP 이틀 전 (청색) 또는 하루 (노란색) 전에 시작하고 그리고 5일의 간격으로 3회 추가 투여가 계속되는 메트로놈Gemzar 투여와 조합한 VTP. 90일까지 계속된, 처치되거나 또는 종양 부담으로 인해 희생될 때까지 동물의 추적 관찰. 도 23B는 CTX 또는 Gemza와 WST11 VTP의 조합의 상이한 프로토콜에 의한 처치 후 유방에 4T1-luc 종양을 갖는 동물의 생존을 설명하는 카플란-마이어 곡선을 나타낸다. 도 23C는 상이한 치료 요법 후 90일째, 유방 패드에 4T1 종양을 갖는 마우스에서 완전히 치유된 마우스의 백분율 (블랭크), 일차 종양은 치유되었으나 전이된 마우스의 백분율 (사선) 및 일차 종양의 재발 및 전이 발생 모두가 나타난 마우스의 백분율 (흑색)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 특정 구현예에서, 본 발명은 박테리오클로로필 기반 광역학 치료 (PDT) 또는 혈관-표적 PDT (VTP) 및 면역세포, 특히 골수-유래 억제세포 (MDSC), 원발(primary)종양의 제거 및 암의 퍼짐을 예방하는 조절제를 사용한 병용 치료법에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에서는 원발 종양의 제거에 효과적인 것으로 밝혀진 상이한 박테리오클로로필 유도체와 항-MDSC 활성 효과를 갖는 것으로 밝혀진 제제를 조합으로 사용하여, 가장 가능하게는 원격 마이크로전이의 전멸을 통해 전이성 종양의 진행의 예방이 수반되는 원발 종양의 제거가 달성된다는 것을 발견하였다.
- [0017] 특정 구현예에서, 본 발명은 국소 고형 종양의 비-열 제거 및 이들의 원격 마이크로 전이의 제거에 관한 것이다.
- [0018] 한 양태에서, 본 발명은 암의 병용 치료요법에 사용되는 항-골수-유래 억제세포 제제(agent) (이하 “항-MDSC 제”) 및 박테리오클로로필 유도체 (이하 “Bchl-D”)를 제공하며, 여기에서 상기 항-MDSC 제제 및 Bchl-D를 순차적으로 투여하고, Bchl-D의 투여 후에 광역학 요법 (PDT)을 수행한다.
- [0019] 본 발명의 병용 요법은 항-MDSC 제제 또는 Bchl-D 후 PDT 각각이 단독 투여되었을때의 각각의 단독 효과에 비해 향상된 치료 효과를 갖는다. 특정 구현예에서, 이러한 향상된 치료 효과는 상승 작용 치료 효과, 즉 개별 치료 모델러티의 부가적인 치료 효과보다 훨씬 강하다.
- [0020] 본 발명에 따라 사용되는 항-MDSC 제제는, 이로 제한하는 것은 아니나, 젤시타빈, 5-플루오로우라실(5-FU), 스피롤라틴, 파클리탁셀, 싸이클로포스파마이드(CTX, CY), 수니티닙, 예컨대 SC-58236 및 SC-58125와 같은 싸이클로옥시게나제 2(COX-2) 억제제, 예컨대 졸레드론 산과 같은 비스포스포네이트 또는 예컨대 알렌드로네이트와 같은 아미노비스포스포네이트, 울-트랜스 레티노 산(ATRA), 비타민 D3, 비타민 A, KIT- 특이적 항체, 니트로아스

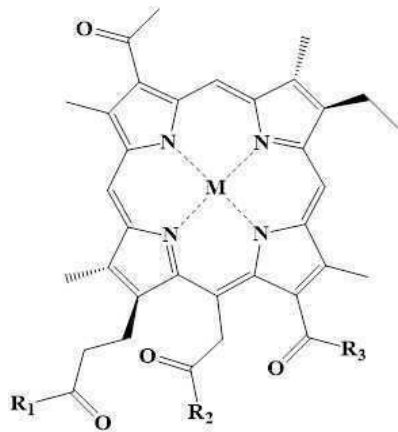
피린 유도체, 예컨대 바르독솔론 메틸(CDDO-Me로 공지 됨)과 같은 합성 트리테르페노이드 유도체, 및 예컨대 실데나필 및 탈라다필과 같은 포스포디에스테라제-5 (PDE-5) 억제제일 수 있다.

[0021] 특정 구현예에서 상기 항-MDSC 제제는 쥘시타빈 또는 싸이클로포스파마이드다.

[0022] 종양을 제거할 수 있다고 밝혀진 임의의 Bchl-D는 본 발명에 따라 사용될 수 있다.

[0023] 특정 구현예에서, 본 발명에 따라 사용되는 Bchl-D는 바람직하게는 수용성의 음이온 박테리오클로로필 유도체 선택적으로는 RGD-함유 펩타이드 또는 RGD-펩티도모방체(peptidomimetic) 잔기와 컨주게이트된 것이다.

[0024] 특정 구현예에서, 상기 Bchl-D는 하기 화학식 I의 음이온성 Bchl-D 및 그 약학적으로 허용가능한 염 및 그 광학 이성질체이다:



[0025] (I)

[0026] 상기 식에서,

[0027] M은 2H 또는 Pd를 나타내고;

[0028] R₁은 O-R₄ 또는 -NHR₅ 이고, 여기에서 R₄는 H, H⁺, 암모늄기 또는 예컨대 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 일가의 금속 양이온 이고, 그리고 R₅는 RGD-함유 펩타이드 또는 RGD 펩티도모방체 잔기이고;

[0029] R₂는 -O-C₁-C₆ 알킬, 바람직하게는 메틸이고;

[0030] R₃는 -NH-(CH₂)_n-SO₃⁻ R₆⁺ 이고, 여기에서 n은 2 또는 3 이고, 그리고 R₆⁺는 Na⁺ 또는 K⁺와 같은 일가의 금속 양이온이다.

[0031] 특정 구현예에서, 본 발명에서 사용을 위한 음이온성 Bchl-D는 화학식 I을 가지며, 여기에서 위치 17³의 R₁은 OR₄ 이며, 즉, 이는 예컨대 이로 제한되지 않으나, 본원에서 WST11 및 STL-7012로 명명된 Bchl-D와 같은 RGD-포함 펩타이드 또는 RGD 펩티도모방체 잔기에 컨주게이트되지 않는다 (이하 본원에서 “비-컨주게이션된 Bchl-D”).

[0032] WST11, 로도박테리오클로린 유도체 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸)아마이드 다이포타슘 염은 본 출원의 공동 발명자인 와이즈만 과학 연구소(레호보트, 이스라엘)의 아비그도르 쉬레즈(Avigdor Scherz) 교수의 연구실에서 합성되었고 WO 2004/045492에 개시되었다. 성공적인 임상 시험 후, WST11는 최근 초기 단계 전립선암 치료용으로 승인되었다.

[0033] STL-7012는 비-금속화 Bchl-D 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸)아마이드 다이포타슘 염 (WO 2008/023378에 개시, 이하 부록의 화학식).

[0034] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 다른 음이온성 Bchl-D는 WO 2004/045492에 개시된 하기 화합물을 포함한다: 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(3-설포프로필)아마이드 다이포타슘 염; 3¹-옥소-

15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸) 아마이드 다이포타슘 염; 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(3-설포프로필) 아마이드 다이포타슘 염; 및 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸) 아마이드 포타슘 염.

- [0036] 본 발명에서 비-컨쥬게이션된 Bchl-D이 사용될 때, PDT는 혈관-표적 PDT (VTP)이고 그리고 치료될 국소 부위는 상기 비-컨쥬게이션된 상기 Bchl-D의 투여가 종료된 후에 단기간 조사된다. 이러한 기간은 보통 0-30분, 예를 들면 0, 10, 15, 20, 25 또는 30분 이다.
- [0037] 특정 구현예에서 본 발명에서 사용을 위한 Bchl-D는 RGD-포함 펩타이드 또는 RGD 펩티도모방체 잔기에 컨쥬게이션된 화학식 I의 Bchl- D 이다. 이는 17³ 위치의 R₁이 NH-R₅인 화학식 I을 가지며, 즉, C에 컨쥬게이션된다 (이하 “컨쥬게이션된 Bchl-D”). 상기 RGD-포함 펩타이드 또는 RGD 펩티도모방체 잔기는 비-환형 또는 환형 펩타이드 일 수 있다.
- [0038] 특정 구현예에서, 본 발명에서 사용을 위한 컨쥬게이션된 Bchl-D는 환형 RGD-포함 펩타이드 또는 RGD 펩티도모방체 잔기에 컨쥬게이션된다. 본 발명에 사용을 위한 환형 RGD-포함 펩타이드 또는 RGD 펩티도모방체 잔기와 컨쥬게이션된 Bchl-D의 예로는, 이로 제한하는 것은 아니나, 본원에서 STL-6014, STL-6033, STL-6038, 및 STL-6068 (구조는 이하 부록에 개시됨)로 명명된 Bchl-D와 같은 WO 2008/023378 및 WO 2010/046900에 개시된 것을 포함한다.
- [0039] 특정 구현예에서, 상기 컨쥬게이션된 Bchl-D는 WO 2008/023378에 개시된 STL-6014, 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸)아마이드-17³-(씨클로RGDfK) 아마이드 포타슘 염이고, 여기에서 f는 D-Phe를 나타냄.
- [0040] 기타 WO 2008/023378에 개시된 본 발명에 따라 사용될 수 있는 컨쥬게이션된 Bchl-D는 다음을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다:
- [0041] 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸)아마이드-17³-(씨클로RGDfK) 아마이드 포타슘 염
- [0042] 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸)아마이드-17³-(씨클로RADfK) 아마이드 포타슘 염
- [0043] 25. 팔라듐 3¹-옥소-15-메톡시카르보닐메틸-로도박테리오클로린 13¹-(2-설포에틸)아마이드-17³-(씨클로RGDf-N(Me)K)아마이드 포타슘 염
- [0044] 컨쥬게이션된 Bchl-D이 본 발명에 따라 사용될 때 PDT는 조직-표적되고, 치료를 위한 국소부위는 일정 시간에 조사되어 상기 표적 부위에 상기 컨쥬게이션된 Bchl-D이 축적되고, 적절한 농도가 되도록 한다. 이러한 시간은 컨쥬게이션된 Bchl-D의 투여 종료 후, 최소 4h, 바람직하게는 6h 일 수 있다.
- [0045] 본 발명에 따라 사용되는 항-MDSC 제제 및 Bchl-D는 수개의 상이한 요법(regime)에 따라 순차적(sequentially)으로 투여된다. 일반적으로, 원발 종양 또는 전이된 종양의 제거를 위한 치료 세션에서 PDT 또는 VTP 치료는 Bchl-D 단독 투여 후에 처치된 국소 부위의 조사를 포함하고, 그리고 항-MDSC 처치는 다양한 소정의 시간 간격으로 상기 항-MDSC 제제를 수회(several) 투여하는 것을 포함한다. 필요한 경우, 상기 세션은 만약 새로운 전이가 후에 발견된다면, 또는 새로운 전이가 발견되었을 때 일회 이상 반복될 수 있다.
- [0046] 하나의 요법 계획에 따르면, 상기 항-MDSC 제제는 PDT 또는 VTP 치료 전 한번 투여되고, 그리고 그 후 소정의 시간 간격으로 수회 투여된다.
- [0047] 다른 요법 계획에 따르면, 상기 항-MDSC 제제는 PDT 또는 VTP 치료 후에 소정의 시간 간격으로 수회 투여된다.
- [0048] 특정 구현예에서, 항-MDSC 처치는 5 내지 12일 이상의 소정의 시간 간격으로 항-MDSC 제제의 4 내지 12회 이상 투여를 포함할 수 있다. 예를 들면 항-MDSC 제제 처치는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12 일 이상의 소정의 시간 간격으로 항-MDSC 제제의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12회 이상 투여를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 수치는 본원에 개시된 동물 실험 결과를 근거로 한 것으로, 인간 치료에 대해서는 제한적이지 않는 것임을

주의하여야 한다. 치료되는 암의 유형에 따라서, 환자의 면역 시스템의 상태에 따라서 그리고 환자의 치료에 대한 반응에 따라서, 치료 프로토콜은 항-MDSC 투여 횟수 및/또는 항-MDSC 투여 사이의 소정의 시간 간격의 일 수를 변경하는 방식으로 의사에 의해 변형될 수 있다. 예를 들면, 의사는 치료에 휴지(pause)를 결정할 수 있고 치료 동안에 정해진 간격보다 더 긴 간격을 제공하고 그 후 상기 휴지 후에 원래 프로토콜을 개시할 지에 대하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 상기 치료 프로토콜이 항-MDSC 제제 투여 사이에 5일의 간격을 결정하였다면, 의사는 2차 또는 3차 투여 후에 10 내지 20일 이상의 휴지 기간을 갖고, 이어 이후 투여에서는 상기 결정된 5일 간격으로 돌아가도록 결정할 수 있다. 이러한 휴지 간격은 항상 결정된 프로토콜 간격보다 길다.

- [0050] 특정 구현예에서, 항-MDSC 제제는 켈시타빈이고 PDT는 Bcl1-D STL-6014와 수행된다. 18. 다른 구현예에서, 항-MDSC 제제는 켈시타빈이고 VTP는 Bcl1-D WST11와 수행된다.
- [0051] 특정 다른 구현예에서, 항-MDSC 제제는 싸이클로포스파마이드이고 VTP는 Bcl1-D WST11과 수행된다.
- [0052] 본 발명의 특정 구현예에 따라, 항-MDSC 제제는 통상의 단일화학치료법에 사용되는 통상의 투여량보다 예컨대 3 또는 4배 더 낮은 저 투여량으로 투여된다. 이는 장기간의 휴지 기간 없이 정규 스케줄대로 자주 투여되는 저 투여량의 화학요법제를 포함하며 심한 독성을 최소화하는 메트로놈 화학요법의 개념에 따른 것이다.
- [0053] 다수 유형의 암, 흑색종, 신장세포암, 결장암, 유방암, 폐암, 전립선암, 방광암, 뇌암, 췌장 선암 또는 두경부 암을 포함하지만 이에 한정되지 않는 원발 암 고형 종양 및 전이 종양 모두 본 발명에 따라 치료 될 수 있다.
- [0054] 본 발명은 또한 암 치료를 위한 Bcl1-D와의 병용 요법에 사용하기 위한 항 -MDSC 제제에 관한 것이며, 여기서 항 -MDSC 제제 및 Bcl1-D는 순차적으로 투여되고, 상기 Bcl1-D의 투여 후에는 광역학 요법(PDT)이 뒤따른다.
- [0055] 본 발명은 또한 암 치료를 위한 항-MDSC 제제와의 병용 요법에 사용하기 위한 Bcl1-D에 관한 것이며, 여기서 항 -MDSC 제제 및 Bcl1-D는 순차적으로 투여되고, Bcl1-D의 투여는 광역학 요법(PDT)이 뒤따른다.
- [0056] 두 경우 모두, 병용 요법은 항-MDSC 제제 또는 Bcl1-D후 PDT가 각각 단독으로 투여 될 때의 효과와 비교하여 향상된 치료 효과를 갖는다. 이러한 향상된 치료 효과는 상승적인 치료 효과 일 수 있다.
- [0057] 다른 측면에서, 본 발명은 병용 요법에 의한 암치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 암의 치료가 필요한 대상체에게 (i) 치료적 유효량의 항-골수-유래 억제 세포 (anti-myeloid-derived suppressor cell, MDSCs) 제제 (이하, "항-MDSC 제제"); 및 (ii) 광역학 요법(PDT)이 뒤따르는 치료적 유효량의 박테리오클로필 유도체 (Bcl1-D) (이하 "Bcl1-D PDT")를 투여하는 것을 포함한다.
- [0058] 특정 구현예에서, 본 발명의 방법의 병용 요법은 항 -MDSC 제제 또는 Bcl1-D PDT가 각각 단독으로 투여되는 것과 비교하여 향상된 치료 효과를 제공한다. 이 향상된 효과는 시너지 효과가 있는 치료 효과 일 수 있다.
- [0059] 일부 구현예에서, 본 발명은 항-MDSC로서 작용하는 화학요법제의 투여를 박테리오클로필(Bcl1-D)의 상이한 화학 유도체를 사용한 혈관-표적 광역학 요법(VTP) 또는 세포/조직-특이적 광역학 요법(PDT)과 싱크로나이즈한다. 치료 받는 환자에게 소정의 시간 간격으로 저용량의 화학요법제의 수 회 투여에 의해 MDSC 로드(load)가 감소된다. 일부 구현예에서, 제1 화학요법제의 투여 후 선택된 시간 간격에, Bcl1-D를 사용한 PDT 또는 VTP는 일차 종양 또는 관찰된 전이를 제거하기 위해 적용된다. 일부 제제의 경우, 메트로놈 적용 (저용량을 매주 적용)은 이후 수 주 동안 계속된다. 치료 효능은 이로 한정하는 것은 아니지만, 상이한 이미징 기술 (예를 들면 MRI, 초음파), 조직학 (예를 들면 생검), 혈액의 MDSC 수치의 감소, 전이암 성장의 제거 또는 성장의 지연 및 환자의 연장된 생존기간을 사용한 원발 종양 제거의 추적 관찰에 의해 모니터링된다. 상기 처치는 후에 환자에서 전이가 새로 발견된 경우에 반복될 수 있다.
- [0060] 일부 구현예에서, 본 발명은 암을 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 암의 치료가 필요한 환자에게 : (i) 치료적으로 유효한 양의 항-골수-유래 억제 세포(MDSCs) 제제 (이하 "항-MDSC 제제"); 및 (ii) 상기 항-MDSC 제제 또는 Bcl1-D PDT를 각각 단독으로 투여한 것의 효과와 비교하여 향상된 치료 효과를 나타내는 병용 요법을 제공하기 위해 광역학 요법(PDT) (이하 "Bcl1-D PDT") 또는 혈관-표적 PDT (이하 "Bcl1-D VTP")가 뒤따르는 유효한 양의 박테리오클로필 유도체(Bcl1-D)를 투여하는 것을 포함한다.
- [0061] 본원에서 용어 "치료하는 또는 처치하는" 또는 "치료 또는 처치" 또는 부사구 "치료하기 위한 (to treat) 또는 처치하기 위한" 은, 환자의 상태(예를 들면 하나 이상의 증상)의 개선, 상태의 진행의 지연, 생존기간의 연장 등을 포함하는, 암에 걸린 환자에게 유익한 효과를 제공하는 임의의 치료 유형을 언급한다.
- [0062] 본원에서 항-MDSC 제제와 관련하여 사용된 용어 "치료적으로 유효한 양" 은 병용 요법에 그리고 본 발명에 따라

반복적 투여에 사용될 때 상기 정의된 바와 같이 암의 치료에 치료적으로 유효한 양을 언급하는 것이다. 본원에서 Bcl-1-D 와 관련하여 사용된 용어 “치료적으로 유효한 양” 은 PDT 또는 VTP 수행 후에 전이 또는 종양의 제거를 야기하는 능을 언급한다.

[0063] 종양 재발의 경우, 예를 들면 새로운 전이의 형태로 종양이 재발한 경우, 새로운 전이된 암은 일차 종양과 비교하여 상이한 클론에 의한 새로운 마이크로전이가 발생한 것을 나타낼 수 있기 때문에, 면역 조절된 Bcl-1-D PDT 또는 VTP는 반복될 수 있다.

[0064] 도면 및 본원에 개시된 연구는 제시된, 두 가지 치료 모달리티의 병용은 이들의 영향에 상승작용을 가져와 공격적이고 전이성 암을 갖는 40-50%의 동물에서 후속적 전이 형성 및 마이크로전이의 후퇴 및 제거가 수반되는 일차 종양의 제거로 이어진다는 것을 보여준다. 이러한 연구 및 발전된 프로토콜은 복잡하지 않게 임상에 적용될 수 있다.

[0065] 본 발명은 이제 하기의 비제한적 실시예에 의해 설명된다.

[0066] **실시예**

[0067] **실험재료 및 실험방법**

[0068] **실험재료**

[0069] (i) **박테리오클로로필 유도체** - Bcl 유도체 및 이의 RGD-컨쥬게이트는 Steba Biotech(Rehovot, Israel)에서 공급되었다. STL-6014는 분말 형태의 암모늄 염으로 공급되었으며 분말을 DDW(1mg/ml)에 용해하고 pH를 KOH 1N 을 추가하여 8로 맞추어 K⁺ 염으로 전환하였고, 상기 용액은 액화질소에 냉동하고, 동결건조하여 STL-6014 K⁺ 염을 수득하였다. 실험용액(Working solution)은 STL-6014 K⁺ 염을 5% 만니톨 용액 (1mg/ml)에 용해시켜 제조하고, 5% 만니톨에 트리스 완충액 (0.15%)을 첨가하여 용액의 pH를 8로 조정하고, 상기 용액은 실험에 사용되는 필요량에 따라 수 개의 시험관에 분배, 냉도 및 동결건조되어 제형화된 STL-6014 K⁺ 염을 수득하였다. 농도는 분광 광도계 측정법으로 확인하였다. STL-7012는 디칼륨염으로 제공되었다. 실험용액은 5% 만니톨 용액 (1mg/ml)에 STL-7012 K⁺ 염을 용해시켜 제조하였다. pH의 조정, 분배액의 준비 및 농도 확인을 STL-6014와 같이 수행하였다. WST11은 분말 형태로 공급되었으며 -20℃에서 어두운 곳에 보관되었다. 5% 글루코오스 및 0.67% 만니톨을 함유하는 DDW에 WST11을 용해시키고, 분액하고 동결 건조시킴으로써 스톡을 제조하였다. 실험 용액을 DDW로 재구성하고 용액의 농도를 분광 광도계로 확인하였다. 대안적으로 임상적 WST11 (배치: P00611 및 10-130611)는 동결 건조 제형으로 제공되었다. 물질을 5% 텍스트로스에 용해시키고, 분액하고 -20℃에서 저장하였다. 처치 당일, 분액을 해동하고, 여과하고, 용액의 농도를 분광 광도계로 확인하였다.

[0070] (ii) **화학요법 약물 준비 및 보관** - 젠티타빈 (Gemcitabine) (GEM, Gemzar[®], Lilly)은 분말의 형태로 지역 약국에서 구입하여 38 mg/ml 농도로 염수에 녹이고 나누어서 -20℃에 보관하였다. 분액(aliquot)은 녹인 후 목적하는 농도로 희석하여 같은 날에 75mg/kg의 투여량으로 사용되었다. 싸이클로포스파마이드 (Cyclophosphamide, CTX, Endoxan[®], Baxter Oncology GmbH, Germany)는 지역 약국에서 구매하였다. 0.9% NaCl에 녹여 20 mg/ml 스톡 용액을 만들고, 나누어 -20℃에 보관하였다. 분액을 녹인 후 필요한 경우 목적하는 농도를 얻기 위해 염수로 희석하고, 제시된 투여량으로 같은 날에 사용되었다.

[0071] (iii) **마우스 세포주** - 포유류(Mammary) 루시페라제(luc)-표지된 4T1 세포주 (4T1-Luc)는 Dr. Zvi Granot(Faculty of Medicine, The Hebrew University of Jerusalem, Israel)로부터 수득하였다; 흑색종 B16-F10 세포주는 Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 수득하였다; 방광 MB49 세포는 James Allison(MSKCC, New York, USA)로부터 수득하였고, luc-labeled MB49-세포는 뮤린 줄기 세포 바이러스(MSCV)-퓨로마이신-luc-GFP 구축물(Dr. Emily Cheng (Human Oncology and Pathogenesis Program, MSKCC)으로부터 수득)을 사용하여 확립되었다. 1 mmol/L 소듐 과이투베이트, 10% 소태아혈청 (FCS), 250 μg/ml 하이그로마이신, 0.06 mg/ml 페니실린 및 0.1 mg/ml 스트렙토마이신이 보충된, RPMI 배지에서 B16-F10 세포 및 DMEM 배지에서 4T1 및 MB49 세포를 유지하였다. 상기 세포는 가슴 대기 (5% CO₂, 95% air)에서 37℃에서 단층으로 성장시켰다.

[0072] (iv) **마우스 종양 모델** - 암컷, Balb/c 마우스(6-8 주령)에 50 또는 100 μl PBS에 현탁된 1x10⁶ 4T1 세포를 오

른쪽 뒷다리 또는 동소에 피하(s.c.) 이식하였다. 재이식(rechallenge) 연구를 위해, 2×10^5 4T1 세포를 동소에 이식하였다. 방광암 모델의 경우, MB49 또는 MB49-루시페라제 세포주 5×10^4 개를 VTP 치료 15일 전에 C57B/6 수컷 마우스(7-8 주령, Taconic, Hudson, NY)의 우측 옆구리에 s.c. 주사하였다. 면역이 약화(immune compromised)된 마우스에서 VTP 효능 연구의 경우, 동일 한 개수의 MB49 세포를 C57B/6 수컷 마우스(7-8 주령, Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) 또는 C57B/6 배경의 Rag^{-/-} 마우스의 옆구리에 주사하였다. MB49 세포의 양측 모델의 경우, 동물에게 각각 -15 및 +1일에 5×10^4 개 MB49 세포를 오른쪽 옆구리에 그리고 5×10^4 세포를 왼쪽 옆구리에 주사하였다. 모든 실험 절차는 와이즈만 과학 연구소(Rehovot, Israel) 및 메모리얼 슬로안 케터링 암센터(MSKCC, New York, USA)의 동물사육 및 사용에 관한 기관 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

[0073] **방법**

[0074] **(v) 전신 형광 촬영 (PDT 연구):** 7.5 mg/kg STL-6014 또는 STL-7012을 정맥 (i.v.) 주사 한 후, 종양 조직 및 정상 기관의 전신 근적외선 형광 이미지를 1초의 인테그레이션 시간에서 각각 여기 및 방출을 위한 847/875 nm 필터를 구비한 In Vivo Optical Imaging System (IVIS®Spectrum, Caliper LifeScience., Alameda, CA)을 이용하여 기록하였다. 루시페라제-전달이입된 종양 및 전이의 전신 영상은 D-루시페린을 75mg Kg⁻¹로 복강 주사 후에 상응하는 필터셋을 사용하여 5분 기록하였다.

[0075] **(vi) PDT 치료 프로토콜:** 4T1-Luc 세포를 Balb/c 마우스의 유방 패드에 이식하였다. 일차 종양이 ~50mm³에 달했을 때, 마우스에 7.5 mg/kg STL-6014를 i.v. 주사하고, 흐릿한 광 조건에서 6h 두었고, 그 후 종양을 포함하는 1 cm² 면적 부분을 정면(frontal face) 광섬유(Medlight SA, Switzerland)를 통하여 753 nm 레이저를 200 mW/cm²로 조사하였다. 처음 이틀 후-처치 일(first two post-treatment days) 동안에, 마우스를 마취하였다 (2.5 mg/kg 플루넥신 하루 한번). 일차 종양의 제거는 IVIS를 이용하여, 종양의 루시페라제 매개된 생체발광 신호의 이미징을 통해 매 7일마다 평가되었다. 종양의 직경이 15mm가 달했을 때 또는 IVIS 전신 형광으로 조사한 결과 마우스에서 전이가 발생된 경우, 마우스를 희생(와이즈만 과학 연구소의 가이드라인에 따름) 하였다.

[0076] **(vii) VTP 치료 프로토콜:** s.c. 종양 처치의 경우: 종양을 갖는 마우스를 각각 체중 kg당 100 mg/10 mg 농도의 Ketamine/Xylazine 혼합 용액으로 i.p. 주사하여 마취하였다. WST11는 이어 꼬리 정맥으로 5분 일정 속도로 9 mg/kg의 투여량으로 i.v. 투여되었다. 주입 완료 후 즉시, 10분 동안 100 또는 150 mW/cm²의 속도(flucy rate)로 정면 광 확산기가 구비된 4W, 755 nm 다이오드 레이저(Ceramoptec, Germany)를 사용하여 조사가 개시되었다. 종양이 노출되도록 마우스를 왼편에 두고 불투명한 재질로 덮어 정상 조직을 보호하였다. 유방 종양 처치의 경우: 마우스는 앞에서와 같이 마취하였다. WST11 투여량은 5분 주입에 의한 9 mg/kg 이었다. 마우스를 등으로 두고, 종양을 클립으로 들어올려 종양을 몸체로부터 분리하고 동물은 흑색 재질로 가려서 중요한 기관의 손상을 방지하였다. 주입 완료 후 즉시 200 mW/cm²의 속도(flucy rate)로 15분 동안 정면 광 확산기가 구비된 4W, 755 nm 다이오드 레이저(Modulight, Finland)를 사용하여 조사가 개시되었다.

[0077] **(viii) PDT 및 저용량 Gemzar™ (GEM)을 함께 (in tandem with) 사용하는 것을 포함하는 병용 요법:** 4T1-luc 세포 이식 6일 후 (원발 종양이 ~50mm³에 달했을 때), 마우스에게 7.5 mg/kg STL-6014을 i.v. 주사하였다. 약물 투여 후 6시간째 종양을 753 nm (200 mW/cm²)로 15분 동안 조사하였다. GEM-공(co)-처치에 대한 두 가지 프로토콜을 적용하였다: (1) 75mg/kg GEM (100 μl 염수에 용해)은 PDT 이틀 전, 그 다음 날 그리고 그 후 매 5일 마다, 33일째까지 i.p. 투여, 또는 (2) 75mg/kg GEM 투여량을 PDT 한 다음날 그리고 그 후 33일째까지 매 5일마다 투여. 전이 진행/감퇴는 루시페라제 생체발광의 전신 촬영에 의해 120일 동안 추적하였다.

[0078] **(ix) VTP 및 저용량 GEM을 포함하는 병용 요법:** GEM을 75mg/kg 투여량으로 i.p. 투여하였다. 치료 요법은 다음과 같다: (i) (-1) 일에 투여 시작하고 VTP 후 1, 6 및 11일에 3회의 후속적 투여; (ii) (-2) 일에 투여 시작하고, 3, 8 및 13일에 3회 투여. 대안적으로 3주 주기의 임상 스케줄상에서 50 mg/kg, 3번째 주는 쉬거나 또는 각 실험 당 제시된 바와 같은 주2회 (BIW) 스케줄로 120 mg/kg 투여하고, 첫번째 투여는 VTP 치료 3일 전에 개시됨.

[0079] **(x) VTP 및 싸이클로포스파마이드 (CTX)를 포함하는 병용 요법:** s.c. 종양 치료의 경우, CTX를 VTP 수행 3일 전

에 150mg/kg 또는 50mg/kg (후자 스톱 용액은 부피 범위를 유지하기 위해 0.9% NaCl로 1:3으로 새롭게 희석되었다)의 단일 투여량으로 i.p. 투여하였다. 대조군은 0.9% NaCl을 주사하였다. 유방 종양 처치의 경우, 50mg/kg을 하기 요법에 따라 투여하였다: (i) (-1)일에 시작하고 VTP 후 1, 6 및 11일에 3회의 후속 투여; (ii) (-3)일에 시작하고 3, 10 및 17일에 3회 투여.

[0080] **(xi) 일차 종양 및 폐 전이에 대한 VTP 결과의 인비보 추적:** 국소 종양 반응은 생체발광 이미징 (BLI) 및 칼리퍼 측정으로 평가되었다. 종양의 부피는 종전에 개시된 바와 같이 계산되었다 (Preise et al, 2003). BLI 평가의 경우, 종양을 갖고 있는 마우스를 마취하고 루시페린 (1.2 µg/mouse, Regis, USA)을 i.p. 주사하였다. 이어 마우스를 Xenogen IVIS Spectrum Imaging System (Caliper LifeSciences, MA, USA)에 넣고, ~10분 추적 후 60초 동안 영상을 획득하였다. s.c. 종양의 경우, 일차 종양 이미징을 위해 마우스를 옆으로 눕히고 전이 평가를 위해 등으로 눕혔다. 바로 누운 자세를 사용하여 일차 종양 및 폐 전이 영상이 유방 모델에서 모두 가능하도록 하였다. 일차 종양 부피가 종양의 큰 직경이 15mm을 초과하거나 전이가 발견된 경우, 동물이 고통받아 죽는 것을 방지하기 위해 조기에 희생하였다.

[0081] **(xii)조직학:** 마우스를 와이즈만 연구소(IACUC, Rehovot, Israel)의 동물 사육 및 실험 위원회의 가이드라인에 따라 희생하였다. 조직을 제거하고 조직을 4%/10% 완충 포르말린에서 48h 동안 고정하였다. 이어 조직학 유니트에서 표준 방법에 따라 시료를 파라핀에 포매하고, 박편으로 잘라 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다. Foxp3, CD4, CD8, CD11b 및 Ki67 항체에 대한 면역 염색은 자동화 절차에 의해 메모리얼 슬로안 케터링에서 수행되었다.

[0082] **(xiii) Ly6G 염색 (PDT 연구):** 두 부위 (오른쪽 및 왼쪽 유방 지방 패드)에 동소 4T1-Luc 종양을 갖는 마우스의 한 부위에만 제2 GEM 치료 프로토콜과 조합으로, PDT를 수행하였다. 종양을 PDT 24h, 3일 및 3주 후에 잘라내고, 고정한 후 Ly6G에 대해 염색하였다. 오프라인 분석을 위해 슬라이드 스캐너를 이용하여 영상을 획득하였다.

[0083] **(xiv) 플로우 사이토메트리 (FACS분석):** 비장을 윤리적으로 희생된 동물로부터 잘라내어, 70 µm 메쉬에 걸렀다. 적혈구를 암모늄클로라이드 라이시스 용액(ACK)으로 용혈하고 세포 개수를 세어 염색에 맞게 조정하였다. 림프절을 PBS에서 갈아, 세척하고 염색에 맞게 조정하였다. 종양을 작은 편으로 잘라 1% BSA를 포함하는 PBS 1ml 당 2.5mg Collagenase II, 2.5mg Collagenase IV 및 0.5mg DNAase 혼합물에서 교반하면서 37°C에서 30분 동안 배양하였다. 세포 현탁액(종양 또는 비장)을 70 µm 필터를 통해 가압하고, FACS 완충액으로 2회 세척하고 PBS (1:1000)로 희석된 고정가능한 세포생존성(viability) 염료 eFluor 450, (eBioscience, San Diego, CA)로 얼음 위에서 30분 동안 배양(표시된 경우에 한하여) 하였다. 1-5x10⁶ 세포를 100 µl PBS에 현탁하고 래트 항-마우스 CD16/CD32 (0.5 µg eBioscience, San Diego, CA)로 4°C에서 15분 동안 배양하여 비특이적 항체 결합을 방지하였다. 상이한 실험에 따르면, 세포는 후속적으로 RT에서 percp-cy5.5/APC-Cy7-CD11b, PE/PerCP-Cy5-Ly6G, PE-cy7-Ly6C, APC-F4/80, Alexa488/PE-CD11c, eVolve655/v450-MHCII, percp-cy5.5-CD3, APC/v450-CD4, Alexa488-CD8, PE-cy7-Foxp3, CD4-APC, Alexa488/PerCP-Cy5/PE-Texas Red-CD8 및 PE/APC-Foxp3, Alexa 700/FITC-CD45, FITC-Ki67, APC-Cy7-CD25, PE Texas Red-Granzyme B, PE-CD62L, PE-Cy7-CD44, 및 APC-CD86 (상기 항체는 eBioScience(San Diego, CA and from BioLegend, San Diego, CA)로부터 수득)을 포함하는 형광 항체와 30분간 배양되었다. 데이터 수득은 맞춤형 LSRII flow cytometer(BD Bioscience, San Jose, CA)을 사용하여 수행되었고 FlowJo software(Tree Star, Ashland, OR)로 분석되었다.

[0084] **(xv) 전이성 세포 분리 및 클로니 형성 분석:** 마우스에 4T1-luc 세포를 이식하였다. 7일 후에, 멸균된 얼음 냉각 PBS로 관류된 후 마취된 마우스에서 폐를 분리하였다. 그 후 마우스는 안락사되었다. 폐를 PBS에서 갈고, 세척하고 100 µm 메쉬에 걸렀다. 상기 조직을 이어 5mg/ml collagenase A로 45분 동안 37°C에서 소화하고, 세척한 후, 미지근한 완전 배지에 재현탁하였다. 현탁액을 70 µm를 통과시키고 조직 배양 인큐베이터에 플레이팅하였다. 7일 후에, 배양의 생체 발광의 퍼짐(propagation)을 루시페린을 추가한 후에 IVIS Imaging System을 사용하여 검출하였다.

[0085] **(xvi)통계분석:** 데이터는 Microsoft Excel에서 two-tailed Student's unpaired t-test 또는 two-way ANOVA test(GraphPad, San Diego, CA, USA)로 분석되었다. 0.05 미만의 p-값이 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 생존 커브는 log-rank test(GraphPad Prism 6, San Diego, CA, USA)를 사용하여 비교되었다.

[0086] **실시예 1. 4T1 종양을 갖는 마우스에서 일차 종양 및 전이 종양에 의한 STL-6014의 약물동력학 및 흡수(uptake)**

[0087] 예비 실험에서 동소 4T1-Luc 유방 종양을 갖는 암컷의 Balb/c 마우스에게 STL-6014 (7.5 mg/kg) 또는 STL-7012

(9.5 mg/kg)를 정맥 주사하였다. 근적외선 (NIR) 형광 이미지는 종양에서 STL-6014의 선택적 축적을 증명하였다 (도 1A, 위쪽 줄). 상기 종양은 투여 후에 ~2h에 명확하게 되었으나, 상당히 강한 신호는 클리어런스 장기(예를 들면 방광)에서 관찰되었다. 투여 다음 날에, STL-6014는, 복부 클리어런스 장기에서는 상당히 낮은 농도로 축적되었고, 주변의 조직에 비해 상대적으로, 종양에 현저하게 축적되었다 (도 1B, 위쪽 줄), STL-7012은 종양에 축적되지 않았고 (도 1A, 아래 패널) 주사 후 수 시간 내에 간을 통해 제거되었다 (도 1A, 아래 패널). WST11의 경우에도 동일한 현상이 나타났다 (데이터는 나타내지 않음). 클리어런스 장기에서의 축적이 수반되는 종양 및 폐전이 종양에서 축적은 도 1B에 있다. 위쪽 패널- 종양을 갖는 마우스에서 상이한 조직의 생체발광; 아래 패널- 이러한 장기에서 STL-6014의 형광.

[0088] **실시예 2. 계획 1에 따른 STL-6014 및 Gemzar를 이용한 4T1을 갖는 동물의 치료**

[0089] Balb/c 마우스의 유방 지방 패드에 1×10^6 4T1-Luc 세포를 접종하였다. 이식 후 7일째, 종양의 직경이 5-7mm에 달했을 때, 4T1-Luc를 갖는 마우스는 치료 계획 1(도 2A)에 기술된 바와 같이 다음과 같은 수개의 치료 옵션 중 하나로 처치될 수 있었다:

[0090] (i) 치료 모델러티로 단지 광역학 요법(PDT)를 사용하는 경우, 동물은 7.5 mg/kg STL-6014를 i.v.로 볼루스 주사 (3분) 되었다. 주사 후 6h에, 종양을 200 mW/cm² (Modulight Inc., Finland)로 10분 동안 753 nm에서 조사하였다.

[0091] (ii) 켈자르 만을 처치방법에 사용하는 경우, 종양 이식 후 5일 (청색) 또는 8일 (오렌지색)에 75 mg/kg의 켈자르를 종양을 갖는 마우스에게 i.p.로 투여를 시작하였고, 이어 치료 계획 1에 기술된 바와 같이 5일 간격으로 6회 더 투여 하였다.

[0092] (iii) 병용 용법의 경우, 동물에게 (a) 75mg/kg 켈자르를 5일째 i.p. 투여한 후 STL-6014 PDT를 7일째 처치하고 이어 6회 켈자르 추가 투여; 또는 (b) STL-6014 PDT를 7일째 처치하고 이어 8일째 켈자르 투여하고 그 후 6회 켈자르 추가 투여. 종양의 진행 및 퍼짐은 120일까지 일주일에 한번 또는 종양 부근으로 인한 동물의 희생까지 일주일에 한 번 IVIS (Oxygen)에 의해 기록되는 루시페린 생체발광 신호를 사용하여 모니터링되었다.

[0093] **실시예 3. STL-6014 PDT 및 켈자르 처치에 대한 4T1을 갖는 동물에서 원발 종양의 반응**

[0094] 4T1 종양을 갖는 Balb/c 마우스를 5개의 군으로 나누었다: (1) 비-처치군(대조군); (2) STL-6014 PDT 처치군; (3) 메트로놈 켈자르 처치군; (4) STL-6014 PDT 및 PDT 후 1일째 시작되는 메트로놈 켈자르 처치군; 및 (5) STL-6014 PDT 및 PDT 처치 2일 전에 시작하는 메트로놈 켈자르 처치군. 도 3은 STL-6014 PDT 단독 치료 후 또는 치료 계획 1에서 기술된 바와 같이 두 가지 치료 모델러티 중 하나로 제공된 켈자르와 조합 치료 후 7일 (백색) 및 30일 (흑색)에서 일차 종양의 반응을 나타낸다. 원발 종양은 STL-6014 PDT 단독으로 처치된 마우스 또는 처치 후 7일째에 켈자르와 병용 처치된 마우스의 70-80%에서 관찰되지 않았다. 그러나, 처치 후 30일째, STL-6014 PDT 단독으로 처치된 동물의 82%에서 원발 종양이 다시 자랐으나, 이와 비교하여 STL-6014 PDT+Gemzar 병용 처치에서는 단지 30-40% 이었다. 대조군 동물 (처치되지 않거나 또는 켈자르만으로 처치)에서는 어떤 동물도 종양이 치유된 것으로 나타나지 않았다 (0%).

[0095] **실시예 4. STL-6014 PDT 및 켈자르 처치에 대한 4T1 종양을 갖는 마우스의 생존**

[0096] 도 4는 상이한 치료 요법에 따라 치료를 받은 4T1-Luc를 갖는 마우스 및 대조군을 120일에 걸쳐 추적한 Kaplan-Meier 생존 커브를 보여준다. STL-6014 PDT (N=29) 처치는 대조군 (N=18)과 비교하여 생존에 있어 유의한 차이를 보여주지 않았다. 연장된 마우스 생존은 켈자르-치료된 마우스에서 관찰되었으나 일차 종양 치료는 되지 않았다 (N=11). PDT (N=19) 후 1일에 투여된 켈자르 및 STL-6014 PDT 병용 요법 후, 4T1 이식 동물의 32%는 생존한 반면, 켈자르가 STL-6014 PDT (N=20) 2일 전에 투여된 후, 50%의 마우스가 치유되었다 (120 일간 생존).

[0097] **실시예 5. STL-6014 PDT 및 켈자르 치료에 대한 폐 마이크로전이 반응**

[0098] 도 5A-B는 두 개의 파이 차트로 동물을 희생한 당일 켈자르와 병용된 STL-6014 PDT에 의한 상이한 치료 요법 후 4T1 폐 전이가 나타난 동물의 백분율을 나타낸다. PDT 2일 전에 투여된 켈자르와 조합으로 STL-6014 PDT 치료를 받은 79%의 마우스 (N=20)는 전이가 없었으며 (5B), 반면 PDT 하루 후에 투여된 켈자르와 조합으로 STL-6014 PDT로 치료를 받은 동물의 61% (N=19)가 전이가 없었다 (5A). 이러한 차이는 통계적으로 유의한 것으로 ($p < .01$) 이는 PDT 전에 켈자르 투여의 가능한 장점을 증명하는 것이다.

[0099] **실시예 6. STL-6014 PDT 및 켈자르에 의해 처치된 4T1 보유 마우스의 생존**

- [0100] 도 6B은 첫 번째 이식 후 120일째에 4T1 세포의 생체발광의 결여로 증명된 첫 번째 이식된 종양이 완전히 치유된 후, 120일째에 마우스에게 2×10^5 4T1 세포의 2차 이식으로 재도전된 개별 동물의 생존을 나타낸다. 비교를 위해 도 6A는 처음으로 2×10^5 개 4T1 세포로 이식된 나이브 마우스의 생존을 나타낸다. 67%의 동물이 4T1 종양을 거부하였고 (노랑-초록 커브, N=10), 그리고 15마리 중 5마리는 지연된 종양 성장을 나타냈고, 반면 동시에 이식된 나이브 10마리 마우스 중 10마리에서 종양이 발생하였다. 이러한 결과는 PD/젠티신 병용 요법은 처치된 동물에서 장기간의 적응성 면역을 제공하였음을 나타내는 것이다.
- [0101] 실시예 7. WST11 VTP 및 젠티신을 이용한 MB49 마우스 방광 암 모델의 처치를 위한 계획 2.
- [0102] 도 7은 오른쪽 뒷다리에 2×10^5 개 MB49 세포 이식 15일째에 종양이 직경 약 4-7 mm에 도달 했을 때 MB49 MB49를 보유한 Balb/C 마우스 (마우스 방광암)에 적용된 제 2 치료 계획을 나타낸다. 상기 치료 계획은 WST11 VTP 단독 적용, 또는 이식 12일 후에 50mg/kg 젠티신 i.p. 투여 후 각주 1일 및 7일에 젠티신을 투여하는 3주 사이클 투여, 그 후 각 달 4주에 투여 없음을 포함한다. 종합하면, 동물은 젠티신을 12회 투여 받았다. VTP 치료에서, 9.0 mg/kg WST11는 5분 동안 i.v. 주입된 후 Modulight 레이저를 사용하여 753nm에서 120 mW/cm^2 로 10분 조사하였다.
- [0103] 실시예 8. WST11 VTP 및 젠티신으로 처치된 상이한 치료 요법에 대한 MB49 종양이 이식된 마우스의 반응
- [0104] 도 8A-D는 도 7에 기술된 바와 같이 상이한 치료 요법에 대한 MB49 종양이 이식된 Balb/C 마우스의 반응을 나타낸다. 도 8A-8B는 상기 WST11 VTP/Gemzar 조합 (에러바, SEM 대조군 vs 병용 요법 $p < 0.0001$, 젠티신 vs 병용 요법 $p < 0.0001$, VTP vs 병용 요법 $p < 0.0005$ (Two way Anova test)) 처치 후 마우스 뒷다리에서, 각각 평균 및 개별 MB49 종양 성장을 나타낸다. 모든 대조군 동물은 이식 20-25일 후에 종양으로 인한 부담으로 인해 희생되어야만 했다. 젠티신 또는 WST11 VTP 단일 투여 모델러티는 종양의 진행을 약간 지연시켰고, 각각 0 (젠티신 vs 병용 요법 $p < 0.0001$) 및 16% (VTP vs 병용 요법 $p < 0.001$) 치유를 나타냈다. 그러나, 병용 요법은 종양 이식 후 100일째 65%의 동물이 질환이 없는 것으로 나타났다. 도 8C는 IVIS 생체발광 이미징으로 매주 모니터링 한, 비-처리 (대조군) 및 상이한 치료 요법 (Gemzar, VTP 또는 VTP+Gemzar)에 의한 처치에 반응한 25일째의 폐 원거리 전이 (이미징, A103+A112)의 예방을 나타낸다. 4개의 처치군의 동물 유래의 대표적 루미네스스 이미지가 아래 패널에 개시되어 있고, VTP 후 25일째 전이 종양 부위 유래의 평균 루미네스스 강도를 정량한 결과는 위 패널에 플롯되어 있다. 도 8D에 나타난 병용 코호트에서 전반적 생존의 향상은 통계적으로 유의하였다 (VTP vs 병용 요법, $p < 0.001$; Gemzar vs 병용 요법, $p < 0.0001$). 전반적 생존(OS)은 카플란-마이어 커브로 플롯되었으며, 로그-랭크 테스트를 사용하여 통계분석을 하였다. 마우스는 다리 종양이 2500 mm^3 에 달했을 때 안락사되었으며, 죽은 것으로 계산되었다. 모든 데이터는 두 개의 개별적 실험을 조합한 것이다.
- [0105] 실시예 9. WST11 VTP 및 젠티신에 의해 처치된 동물에서 전이 발생 및 재도전 성공으로 반영된 적응성 항-종양 면역의 발달
- [0106] 젠티신과 함께 또는 젠티신 없이 상이한 WST11 VTP 투여 요법 후 MB49 세포를 갖는 동물에서 전이 항-종양 반응의 발달을 조사하는 것을 목적으로 하는 동물 모델 및 치료 계획은 도 9에 기재된 바와 같이 시험되었다. 도 9A는 치료 계획 3을 나타낸다. VTP는 이식 후 15일째, 종양의 직경이 4-7mm에 달했을 때 (0일) 수행되었다. 마우스는 다음 날 VTP 제거 후 왼쪽 뒷다리에 MB49의 두 번째 주입으로 재도전되었다. 젠티신은 매주 젠티신 및 병용 코호트에게 50 mg/kg로 VTP 전 3일째에 시작하여 90일까지 투여되었다 (3주 사이클, 3번째주는 투여하지 않음). 도 9B는 양측 모델에서 개별 동물의 제2 종양 성장에 관한 것이다. 4개의 패널은 비-처리 마우스 (대조군) 또는 젠티신, WST11 VTP 또는 그 병용 요법으로 처치된 마우스에서 종양 성장을 나타내며, 이는 병용 코호트의 71%의 마우스가 종양이 없는 것을 보여준다. 도 9C는 VTP 치료 후 125일째에 MB49 세포주의 꼬리 정맥 주사를 통해 재도전된 마우스의 카플란-마이어 생존 마우스를 나타낸다 (마지막 젠티신은 90일에 투여되었음). 모든 비처리된 나이브 마우스는 MB49 세포 주입 후 35일까지 죽었으며, 반면 WST11 VTP 또는 WST11 VTP/젠티신 처치 후 생존한 70% 마우스는 종양 세포를 거부하였다.
- [0107] 실시예 10. 종양 보유 마우스의 WST11 VTP 및 젠티신으로의 처치에 대한 반응에 미치는 T 및 B 세포 결핍의 영향
- [0108] 도 10은 T 세포 및 B 세포 집단의 결핍이 MB49 종양 보유 Balb/C 마우스에서 WST11 VTP, 젠티신 및 그 병용 요법의 치료 효과를 감소시킨다는 것을 나타낸다. 숙주 면역 시스템의 치료 효능에 미치는 효과를 WT C57B/6 (WT, 실선) 마우스와 백그라운드가 매칭되는 면역 약화 (누드) Rag1 KO 마우스 (KO, 점선)를 사용하여 평가하였다.

도 10A의 캐플란-마이어 커브는 WST11 VTP로 처치된 WT 마우스와 비교하여 면역 약화된 마우스의 전반적 생존이 통계적으로 유의하게 감소하였음을 나타낸다(WT n=19, Rag1KO n=22, p<0.0001). 켈시타빈 (Gemzar) 단독으로 처치된 마우스의 전반적 생존율에서도 비슷한 차이가 나타났다 (도 10B) (WT n=10, Rag1KO n=10, p<0.05). 이 실험에서 병용 치료에 의해 30%의 면역성이 있는(immune competent) 마우스가 치료된 반면 (도 10C), 면역이 약화된 마우스는 120 mg/kg 또는 60 mg/kg의 켈자르 및 WST11 VTP (p<0.24) (WT n=10, Rag1KO n=7, p<0.005) 병용 요법에도 치유되지 않았다. 모든 3가지 치료 모델러티의 효과는 Rag1 KO 마우스에 감소하였으며, 이는 T 세포 집단이 VTP, 켈자르 또는 그 병용 요법의 치료 효과를 매개하는 것을 나타낸다.

[0109] 하기 실시예 11-18은 본원에 기술된 상이한 처치 프로토콜에 대한 종양 보유 동물의 선천 및 면역 반응에 대한 직관(insight)을 제공한다.

[0110] **실시예 11: 비-처치된 Balb/C 마우스의 비장에서 면역 세포 집단**

[0111] 대조군 (처치 없음) 4T1-보유 마우스의 비장에서 면역 세포 집단의 FACS 분석은 전술한 물질 및 방법에 기재된 바와 같이 수행되었다. 결과는 도 11에 개시된다: (A) 과립구성/단핵구성 골수-유래 억제세포 (G/M-MDSCs) 및 호중구; (B) 수지상 세포 (DC); (C) 종양회합 대식세포 (TAMs); (D) CD4 & CD8 T 세포; (E) T 조절 세포 (Tregs).

[0112] **실시예 12: 4T1 보유 마우스의 비장의 면역 세포 프로파일에 미치는 켈자르 투여와 병용 된 STL-6014-PDT의 치료 효과**

[0113] 도 12는 4T1 보유 마우스의 비장에서 면역 세포 프로파일에 미치는 켈자(Gemzar) 투여와 병용된 STL-6014-PDT의 치료 영향을 나타낸다. 비장 세포 집단의 프로파일은 다음 3가지 치료 요법으로 평가되었다: STL-6014 PDT, STL-6014 PDT와 켈자르 (PDT 2일 전에 시작), 및 Gemzar 단독. 처치군은 종양을 갖는 대조군과 비교되었다. 치료에 대해 양호한 반응을 갖는 동물 (처치 후 1, 2 및 3주에 일차 종양 제거로 판단)을 분석에 사용하였다. 비장 세포는 선천 및 적응성 면역 마커에 대해 염색되었고 LSRII 유세포 분석기(BD Bioscience, San Jose, CA)로 분석되었고 그리고 FlowJo 소프트웨어(Tree Star, Ashland, OR)로 분석되었다. 치료 후 첫번째 주에, PDT 및 켈자르 단독 모두 대조군과 비교하여 G-MDSC/호중구 및 M-MDSC의 백분율이 유의하게 감소되었다. 그러나 병용 요법 모델러티의 효과가 훨씬 강한 것으로 보였다. 치료 후 2번째 주에, 대조군 대비 켈자르 단독 효과는 감소하였으며, 반면 PDT의 효과는 매우 유의하였으며, 그리고 병용 요법의 효과는 매우 강하였다. 세 번째 주에, MDSC는 대조군과 비교하여 단지 병용 요법으로 치료된 동물에서만 약화되었다. MDSC 프로파일에 대한 병용 요법의 지속가능성은 적응성 면역의 발달에 걸리는 시간과 매우 잘 연관되었다(Fisher et al., 2017; Nowak et al., 2003; Pitt et al., 2016). 보완적으로, 병용 치료는 대조군과 비교하여, 수지상 세포 집단을 현저히 증가시켰으며, 특히 첫 2주에 그리고 치료 후 3주에 걸쳐 CD8 세포의 그것을 증가시켰다. 대조군과 비교하여 세 가지의 모든 치료 모델러티의 경우 Treg 집단에 대하여 관찰된 효과는 훨씬 적은 것이었다.

[0114] **실시예 13: WST11 VTP 및 켈자르의 치료된 동물의 비장에 미치는 효과**

[0115] 도 13은 4T1 암세포로 동소 이식된 동물 및 비처치 (대조군) 동물의 비장 무게의 변화를 켈자르 처치, WST11 VTP 처치 또는 이들의 병용 처치를 받은 종양 보유 동물의 비장 무게의 변화와 비교하였다. 비-처치 동물에서 발견된 비장 무게 변화에 있어 6배 증가는 VTP 및 VTP+켈자르에 의해 완전히 예방되고, 그리고 켈자르 단독에 의해 거의 완전히 예방된다. 도 11 및 도 12에 제시된 결과와 조합하면 비장 무게의 증가는 주로, VTP+켈자르 처치에 의해 크게 감소되는 과립구 및 단핵구 집단의 증가때문이다.

[0116] **실시예 14: 켈자르 투여와 병용된 WST11 VTP가 49MB 종양 보유 마우스에서 항-종양 선천성 면역의 발생에 미치는 영향**

[0117] MB49 종양이 있는 마우스의 상이한 치료 요법에 대한 선천성 면역 반응은 도 14에 기술되어있다. (A) 비장의 CD11b⁺에 대한 면역조직화학(IHC) 염색은 VTP 및 켈시타빈 단독 모두 비장의 CD11b⁺ 세포를 고갈시키나, 병용 요법은 훨씬 강한 효과를 갖는 것을 나타낸다. (B) 처치된 동물의 비장세포에 대한 FACS 분석결과, 치료 후 9일째에 WST11 VTP 단독 또는 켈시타빈 치료에 의해 전신적으로 호중구/G-MDSC 및 단핵구/M-MDSC이 고갈되었음을 나타낸다. 여기에서, 병용 요법은 골수 집단을 낮추지 않았는데, 이는 VTP 및 켈자르가 동일한 세포 집단을 표적으로 할 수도 있음을 암시한다. 플로우를 위한 켈자르의 투여 스케줄은 저용량 (60mg/kg) 또는 고용량 (120mg/kg)으로 -3, 1, 4, 7일 이었다. 중요하게도, 4T1 마우스 모델에서 병용 요법은 개별 치료 모델러티 각각의 것과 비교하여 더욱 증대한 효과를 나타냈다.

[0118] **실시예 15: 켈자르 투여와 병용한 WST11 VTP의 항-종양 적응성 면역의 발달에 미치는 영향**

[0119] VTP 및 VTP+켈자르를 이용한 MB49 종양을 갖는 동물의 치료로 인해 치료 후 6일째에 비장, 혈액 및 배액 림프절에서 CD8 세포 집단이 유의하게 상승하였다. 흥미롭게도, 상기 기간에 Treg 집단에서는 유의한 효과가 관찰되지 않았다. 그러나 종양에서 거의 완전한 Treg 집단의 고갈은 병용 요법 후 6일째에 관찰되었다 (도 15B). WST11-VTP/켈자르 조합은 VTP 후 6일째 혈액, 비장, 림프절(LN)에서 Teff 및 세포독성 T세포 집단(CD8)을 증가시켰으며, (** p<0.01, * p<0.05), VTP 단독은 CD8 Tcell/Treg 비에 증가를 나타내지 않았으나 VTP/켈자르 조합은 강력한 효과를 나타냈다. VTP/Gem 조합은 종양의 Treg 집단을 감소시켰으며 Teff 집단을 유의하게 증가시켰다. Teff/ Treg 값의 향상은 치료 후 9일째도 유지되었다. 종양 메모리 T 세포 (T_{CM})의 농도는 VTP 후 6 및 9일에 종양에서 병용에 의해 증가되었다. 이러한 집단은 T_{EM} 세포와 비교하여 수 개의 상이한 모델 시스템에서 암으로부터 월등히 우수한 보호 효과를 부여하는 것으로 보고되었다.

[0120] **실시예 16: 저용량 사이클로포스파마이드(CTX) 적용과 병용된 WST11 VTP 병용 치료 계획**

[0121] 도 16은 4T1 종양 보유 마우스의 치료를 위한 면역 조절제로서 저용량의 사이클로포스파마이드(CTX)와 조합된 WST11 VTP의 치료 계획을 예시한다. 사이클로포스파마이드 (예를 들면 50/150mg/kg)는 동물의 뒷다리에 1x10⁶ 암 세포 이식 4일 후 ip로 투여한다. 3일 후에, 종양의 직경이 4-7 mm에 달하면, 동물에게 WST11 (9.5 mk/Kg)을 10분동안 주입하고, 그 후 즉시 753 nm (120-200 mW/cm²)로 10-15분 동안 동물에게 조사한다.

[0122] **실시예 17. 마우스 뒷다리에 이식된 피하(s.c.) 4T1-luc 유방 종양의 WST11 VTP 매개 제거에 대한 저용량 및 고용량 사이클로포스파마이드(CTX) 투여의 영향**

[0123] 도 17 및 도 18은 마우스 뒷다리에 이식 된 피하(s.c.) 4T1-luc 유방 종양의 WST11 VTP 매개 제거에 대한 저용량 및 고용량 사이클로포스파마이드(CTX) 투여의 영향을 나타낸다. 뒷다리에 4T1-luc 유방 종양을 갖는 마우스는 처치되지 않거나 또는 일회 CTX 단독 투여를 받았고(상부 패널); WST11 VTP(낮거나 높은 광도)(중간 패널)로 처치되거나; 또는 VTP 3일전에 단회 투여 CTX (50 또는 150 mg/kg)와 조합된 WST11 (9.0 mg WST11/kg) VTP(하부 패널)로 처치되었다. 개별 동물의 질병 진행에 대한 상이한 치료 프로토콜의 효과가 도 17에 기술되어있다.

[0124] 두 가지 투여량에서의 CTX 투여에 의한 모노치료 요법 및 저 광도에서 WST11 VTP는 일차 종양 성장을 억제할 수 없는 것으로 보였다. 고 광 투여량의 WST11 VTP는 종양이 다시 자라기까지의 시간이 두 배가 되었다. CTX와 WST11 VTP 병용은 종양 성장을 현저하게 억제하여 일차 종양의 ~60%가 완전히 제거되었다. 상이한 치료 프로토콜 후 누적적 마우스 생존은 도 18에 기술되어 있다. 여기에서, 뒷 다리에 s.c. 이식된 4T1-luc 유방 종양을 갖는 Balb/c 마우스를 저광도(상부 패널) 또는 고휘도(하부 패널)를 사용한 WST11 VTP 단독 또는 VTP 3일 전에 단회 CTX 투여 (50 또는 50 mg/kg)와 조합으로 치료하였다. 치료 결과는 모든 치료된 마우스(도 18 A, C)에서 또는 비-가역적으로 완전한 일차 종양이 제거된 동물(도 18B,D)에서 캡슐-마이어 커브로 도식화하였다. 저용량 (50mg/kg) CTX와 조합한 WST11 VTP 치료는 현저하게 마우스 생존을 향상시켜 90일의 추적 조사 후 30%의 마우스에서 암이 완전히 치유되었다. 다른 치료 요법, 즉, 고휘도의 VTP 또는 고용량의 CTX 투여는 생존 기간의 연장에 실패하였으며 국소적 재발 및 그 뒤 폐로의 전이 발생이 초래되었다. 일차 종양이 완전히 제거된 마우스 군 내에서, 단지 병용 조합 처치만이 처치된 마우스에서 상당한 비율로 폐 전이로부터 보호를 유발하였다 (VTP 프로토콜에 따라 60-80%).

[0125] **실시예 18: s.c. 4T1-luc 유방 종양을 보유하는 Balb/c 마우스에서 폐 전이가 있는 동물의 백분율에 대한 상이한 치료 요법의 영향.**

[0126] 마우스의 뒷다리에서 4T1 암세포로 이식 된 Balb/C는 도 19A에서 콜로니 분석에 의해 기술된 바와 같이 폐에 암 세포를 나타냈다. CTX 투여 (도 16에 기재된 바와 같은 치료계획 4)와 조합 된 WST11 VTP에 의한 종양 보유 동물의 처치는 고 광 투여량 및 낮은 CTX 투여량을 적용했을 때 이식 후 90일째에 폐 전이의 완전한 결여가 초래되었다 (도 19B). 대조적으로, VTP 단독으로 처치 된 대부분의 마우스는 원발 종양이 완전히 제거 된때에도 폐 전이를 나타내었다.

[0127] **실시예 19: 이식된 종양에서 조절성 T 세포 (Treg) 집단에 미치는 CTX의 영향**

[0128] CTX는 이전에 메트로놈 요법하에 낮은 용량으로 환자에게 제공되었을 때 Treg 집단을 약화시키는 것으로 나타났다. 따라서 WST11 VTP의 결과에 대한 이의 시너지 효과는 항종양(protumoric) Tregs의 상대적 비율을 줄임으로써 세포 독성 T 세포 활성의 증진으로 인한 것일 수 있다. 실제로 Balb/C 마우스의 뒷다리에 이식된 4T1-luc 종

양에 대한 Foxp3 양성 세포 침윤이 도 20에 묘사되어있다. 여기서 4T1 종양은 CTX 또는 식염수 투여 후 30-60 mm³에 도달 할 때 지정된 시간에 절제되어, 포르말린 고정 및 파라핀 포매되었다. 절편을 준비하고 Foxp3 발현에 대하여 염색 하였다. 양성 세포의 수는 피지(Fiji) 소프트웨어를 사용하여 측정되었다. VTP 당일의 대표적 그림 및 정량 결과는 도 19A, B에 개시된다. CTX 투여는 3일 후 조절 Foxp3 + T 세포에 의한 종양 침윤을 상당히 감소시킨다 (도 19C). 이것은 종양의 면역억제 미세환경을 완화시켜 VTP 후 항-종양 면역 반응이 발달되도록 한다.

[0129] 실시예 20: 4T1-luc 종양이 있는 마우스의 배액 림프절과 비장에서 T 세포 집단에 대한 WST11 VTP 3일 전 투여된 저용량 CTX 투여 효과.

[0130] 도 20은 WST11 VTP 3일 전에 투여된 저용량 CTX가 VTP 당일에 종양 보유 마우스의 배액 림프절 및 비장의 세포수를 감소 시켰다는 것을 보여준다. 세포수의 감소를 나타내는 VTP만을 받은 동물과 비교하여, CTX 처치 동물에서 총 세포 수의 현저한 증가가 관찰되었다. 이 발견은 CTX가 매개한 면역 세포의 고갈 및 뒤이은 나이브 면역 세포의 재 축적(repopulation)을 암시한다. 보다 구체적으로, VTP 단독 처치된 동물과 비교하여 CTX 투여는 VTP 후 림프절과 비장 모두에서 조절성 Foxp3 + T 세포의 수를 감소시켰다. 비장에서 CD8 + 세포 독성 T 세포는 적지만 유의하게 증가하였고 이는 항-종양 면역 발달에 이로운 면역 활성화 상태로의 전반적 이동을 나타낸다.

[0131] 실시예 21: 뒷 옆구리에 s.c. 4T1-luc 종양을 갖는 마우스의 종양 및 비장에서 골수 세포 집단에 대한 저용량 CTX 투여의 효과

[0132] CTX 투여 3일 후 (VTP 당일) 종양 및 비장을 채취하여 항-CD11b, Ly6G 및 Ly6C 항체로 유세포 분석을 위해 세포를 분리하고 염색 하였다.

[0133] 도 21은 저용량 CTX가 종양 미세환경에서 항-종양 면역 반응을 억제하는 것으로 알려진 G-MDSC/호중구를 감소시킴으로써 VTP 후 면역 반응이 보다 효율적으로 일어나게 할 수 있음을 보여준다.

[0134] 실시예 20 및 21에 따라, 결론은 WST11 VTP 이전의 CTX 투여의 치료학적 이점은 Treg 및 MDSC 모두의 약화를 반영하며, 동물에게서 선천성 면역계 및 적응 면역계 모두의 효과를 증진 시킨다는 것이다.

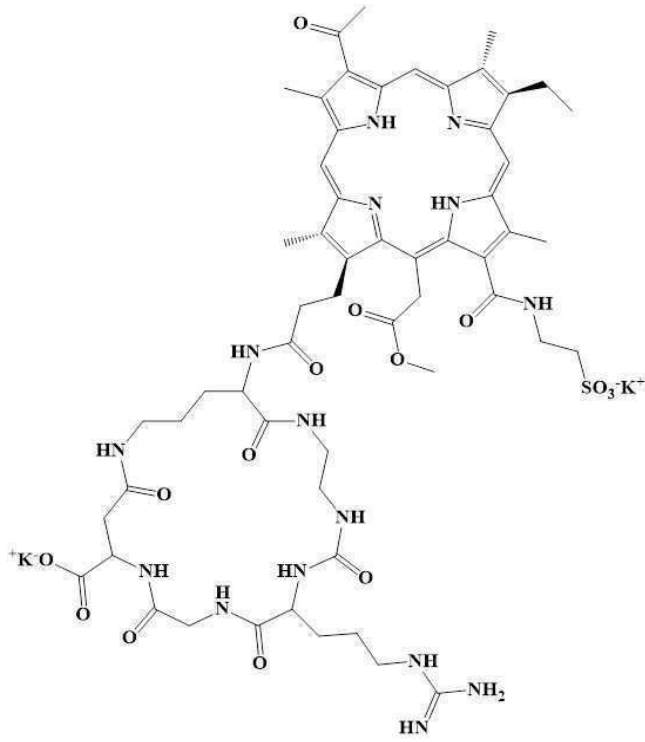
[0135] 실시예 22: 상이한 치료 요법 후 유방패드에 s.c. 4T1-luc 종양을 갖는 Balb/C 마우스의 생존.

[0136] CTX 투여 (도 23A, 검정, 50mg/kg)와 조합된 WST11 VTP 후 동물 생존은 쥘자르 (도 23A, 청색, 75mg/kg)와 조합된 WST11 VTP로 처치된 동물의 생존과 비교되었다.

[0137] 9mg/kg WST11 VTP를 200mW/cm²에서 15분 동안 조사하는 VTP 단독 처치는 대부분의 마우스에서 국소 재발 및 폐전이 발생하고 생존율이 매우 제한적이었다 (도 23B-녹색). VTP 하루 전부터 시작하여 VTP 후 1, 6, 11일에 계속한 CTX와 VTP병용은 치료 결과를 크게 개선하지 못했지만 (도 23B-적색), 반면 동일한 프로토콜에 따라 VTP와 쥘자르 투여는 마우스의 ~20%가 치유되었다 (도 23B, 황색). 프로토콜 No.2 (-2일에 시작하고 그 후 매 5일마다 3회의 추가 투여)에 따른 VTP 및 쥘자르 병용 요법은 30% 넘게 생존률을 증가시켰다 (도 23B-청색). 가장 성공적인 결과는 -3, 3, 8 및 13일에 투여된 CTX 로 얻어진 결과로서 거의 60% 동물이 치유되었다 (도 23B-회색). 이러한 결과의 차트 요약은 도 23C에 있으며, CTX가 WST11 VTP와 병용된 쥘자르 치료에 잇점을 가질 수도 있음을 나타낼 수 있다. 여전히 WST11 VTP와 병용될 때 쥘자르의 메트로놈 요법의 연장은, 상기 MB49로부터 증명된 바와 같이, CTX1 및 WST11 VTP 병용과 유사한 치료율에 달할 수 있다.

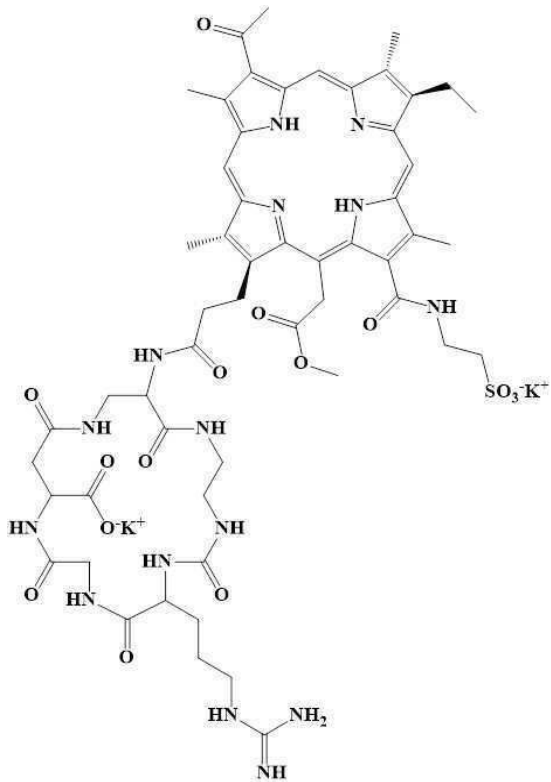
[0138] 부록

[0139] STL-6038



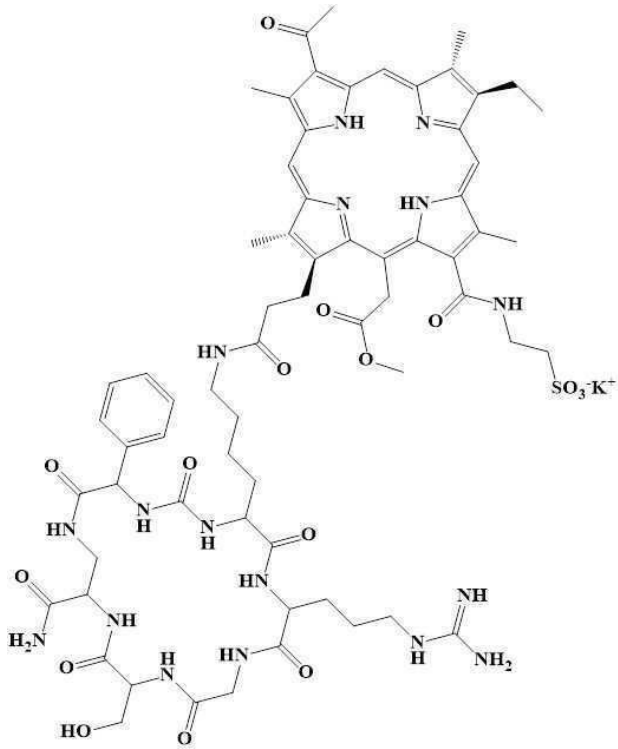
[0140]

[0141] STL-6033



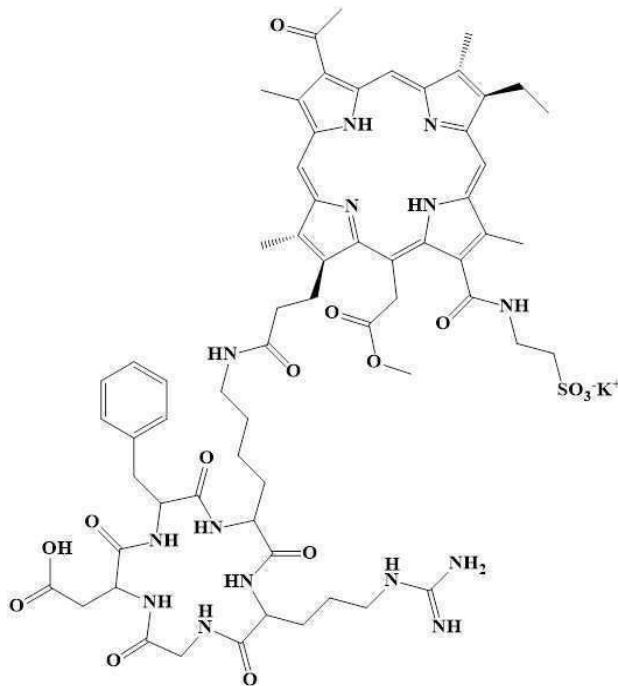
[0142]

[0143] STL-6068



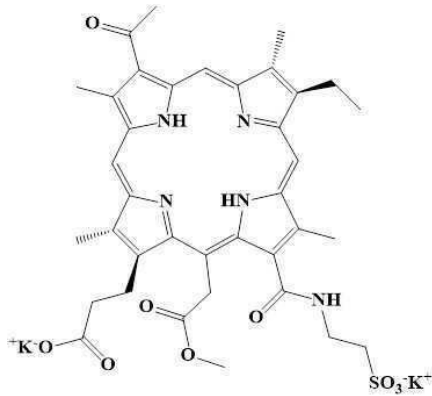
[0144]

[0145] STL-6014



[0146]

[0147] STL-7012



[0148]

[0149] 참고문헌

- [0150] Barbon, C.M., *et al.*, 2010, Consecutive low doses of cyclophosphamide preferentially target Tregs and potentiate T cell responses induced by DNA PLG microparticle immunization. *Cell. Immunol.* **262**(2): 150-161.
- [0151] Castano, A.P., *et al.*, 2008, Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**(14):5495-5500.
- [0152] Gabrilovich D.I., 2017, Myeloid-Derived Suppressor Cells, *Cancer Immunol. Res.* **5**(1):3-8.
- [0153] Ge, Y., *et al.*, 2012, Metronomic cyclophosphamide treatment in metastasized breast cancer patients: immunological effects and clinical outcome. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**(3):353-362.
- [0154] Ghiringhelli F., *et al.*, 2007, Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**(5):641-648.
- [0155] Goldshaid L., Rubinstein E., Brandis A., Segal D., Leshem N., Brenner O., Kalchenko V., Eren D., Yecheskel T., Salitra Y., Salomon Y. and Scherz A., 2010, Novel design principles enable specific targeting of imaging and therapeutic agents to necrotic domains in breast tumors. *Breast Cancer Research* **12**:R29.
- [0156] Le H.K., Graham L., Cha E., Morales J. K., Manjili M. H., and Bear H.D., 2009, Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *International Immunopharmacology* **9**:900-909.
- [0157] Levy M.Y., *et al.*, 2009, Cyclophosphamide unmasks an antimetastatic effect of local tumor cryoablation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**(2):596-601.
- [0158] Madondo M.T., *et al.*, 2016, Low dose cyclophosphamide: Mechanisms of T cell modulation. *Cancer Treat. Rev.* **42**: 3-9.
- [0159] Marvel D., and Gabrilovich D.I., 2015, Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. *J. Clin. Invest.* **125**(9):3356-64.
- [0160] Mroz P., *et al.*, 2010, Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response. *PLoS One* **5**(12): e15194.
- [0161] Najjar Y.G., and Finke J.H., 2013, Clinical perspectives on targeting of myeloid derived suppressor cells in the treatment of cancer. *Front Oncol.* **15**(3):49.
- [0162] Ramachandran I., Youn J.I., Gabrilovich D.I., and Condamine T., 2015, Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells, *Annu. Rev. Med.* **66**:97-110.
- [0163] Reginato, E., *et al.*, 2013, Photodynamic therapy plus regulatory T-cell depletion produces immunity

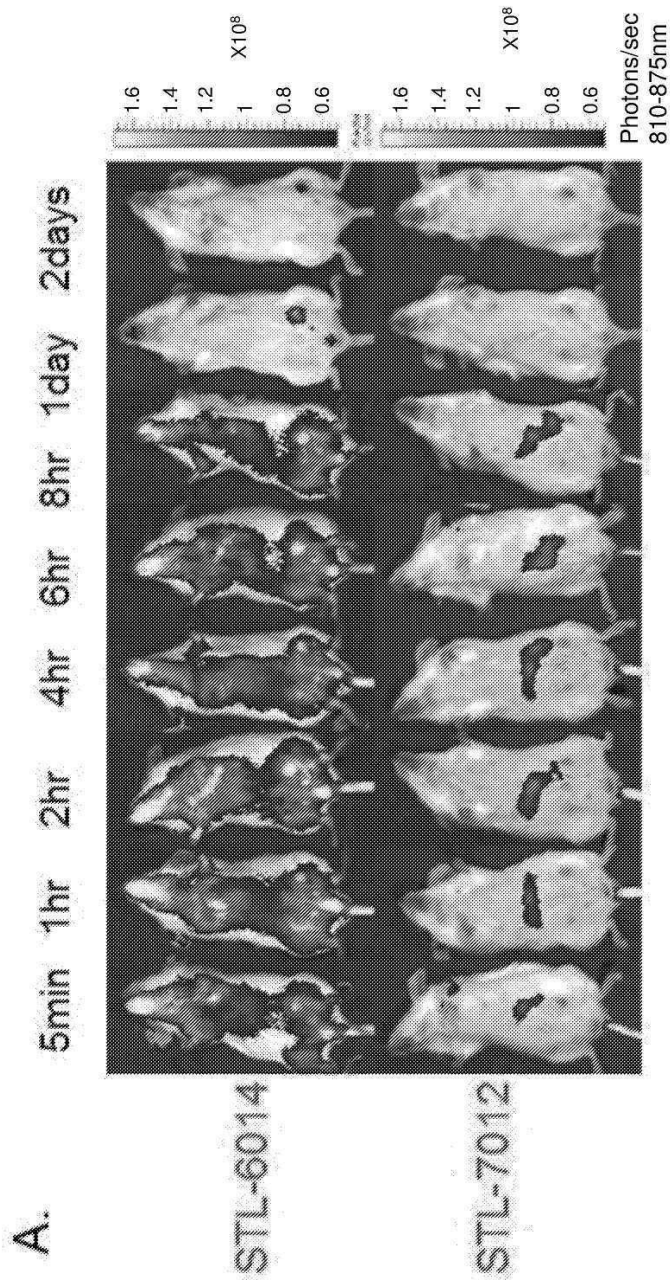
against a mouse tumour that expresses a self-antigen. *Br. J. Cancer* **109**(8):2167-2174.

[0164] Suzuki E., Kapoor V., Jassar A.S., Kaiser L.R., and Albelda S.M., 2005, Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin. Cancer Res.* **11**(18): 6713-21.

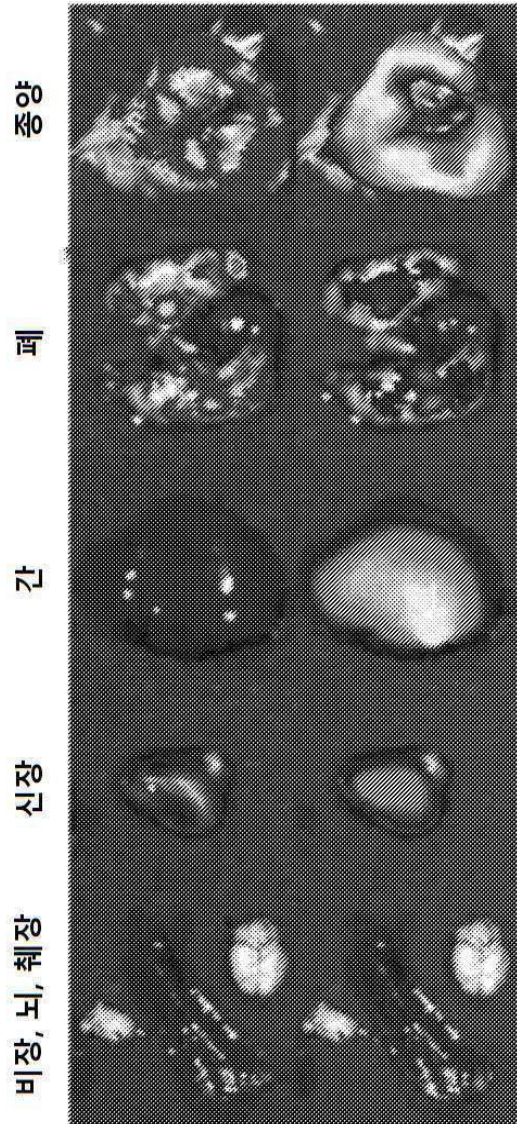
[0165] Xia, Y., *et al.*, 2014, CpG oligodeoxynucleotide as immune adjuvant enhances photodynamic therapy response in murine metastatic breast cancer. *J. Biophotonics* **7**(11-12): 897-905.

도면

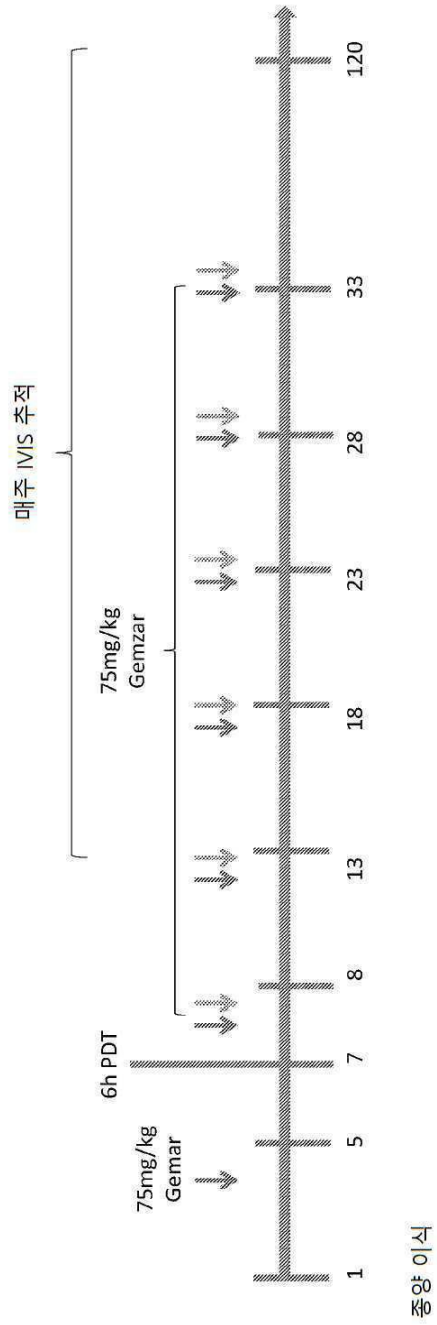
도면1a



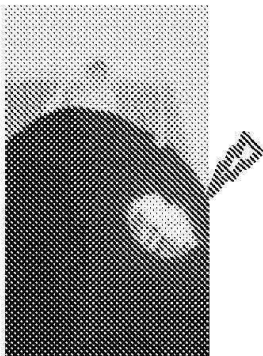
도면1b



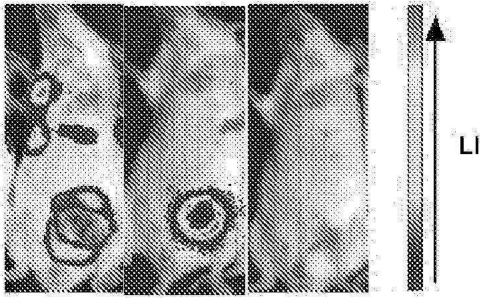
도면2a



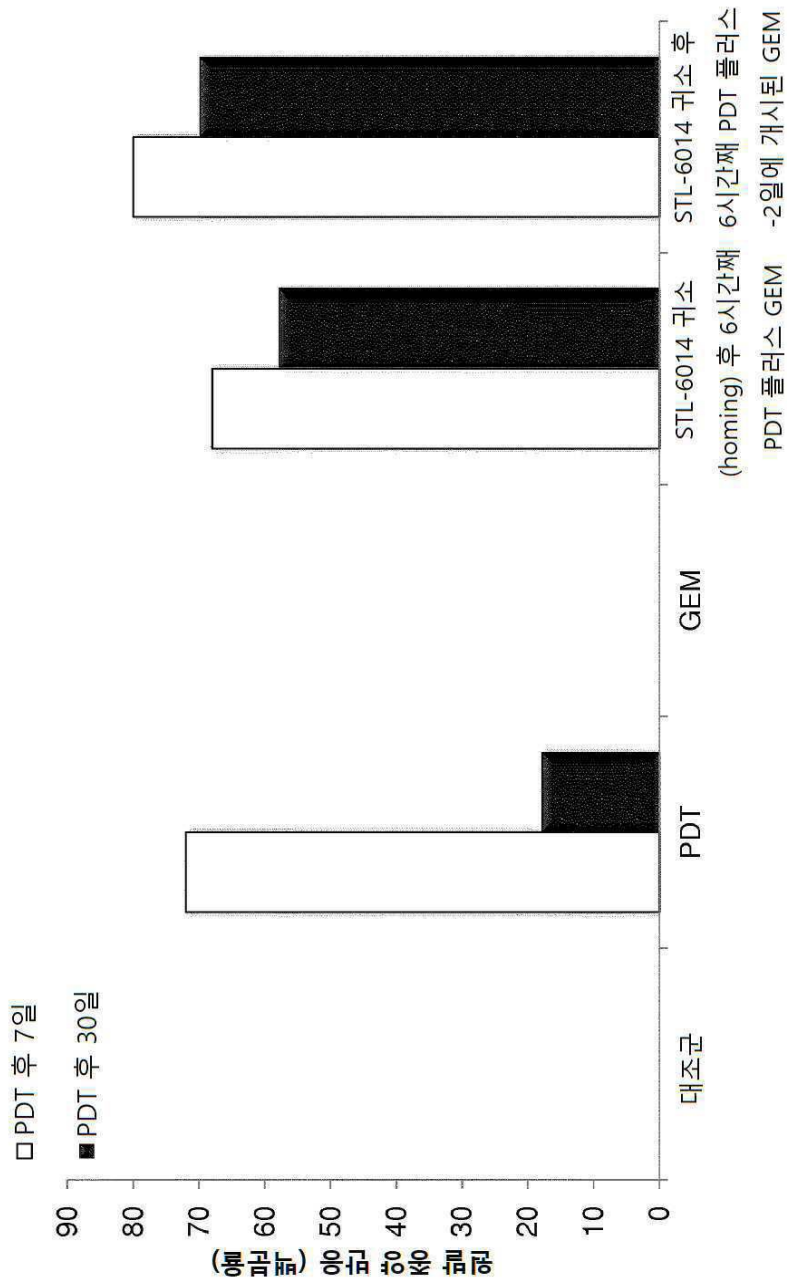
도면2b



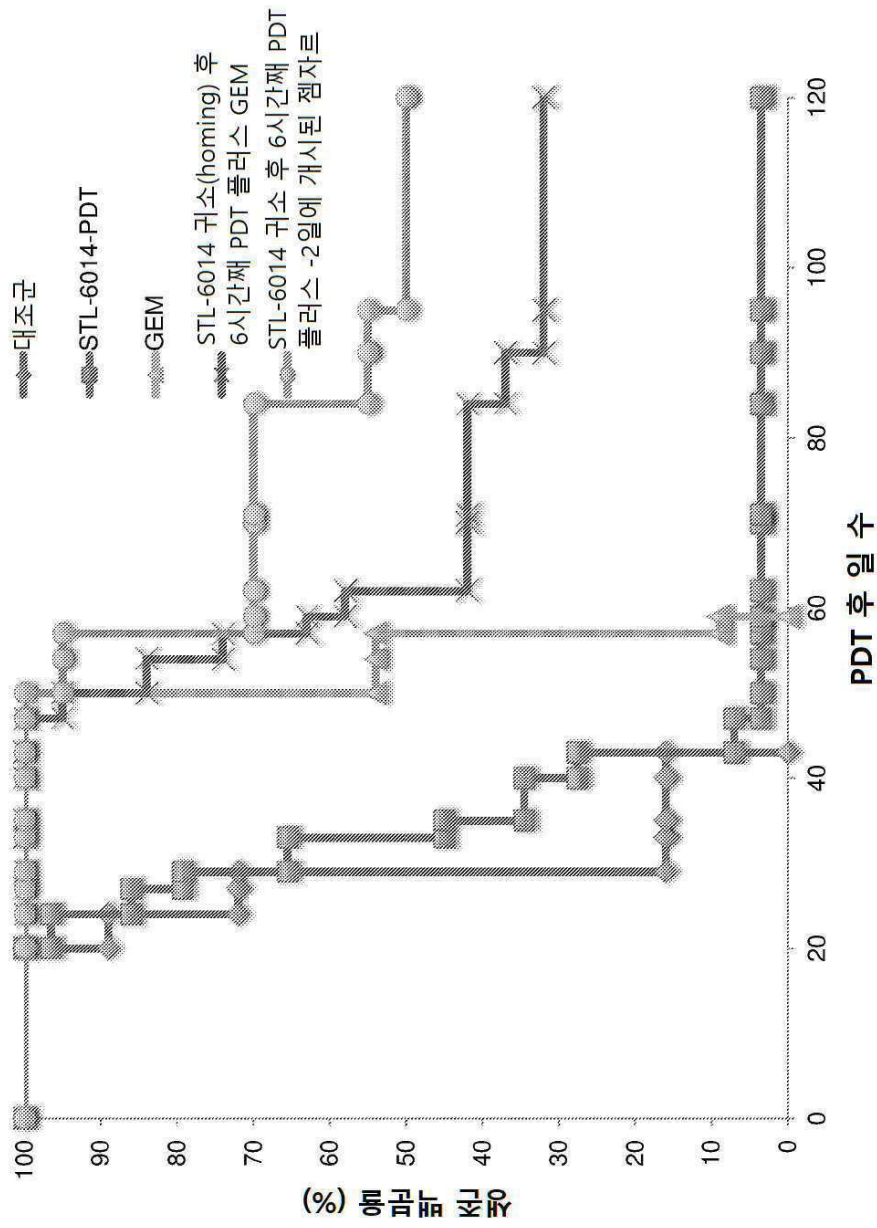
도면2c



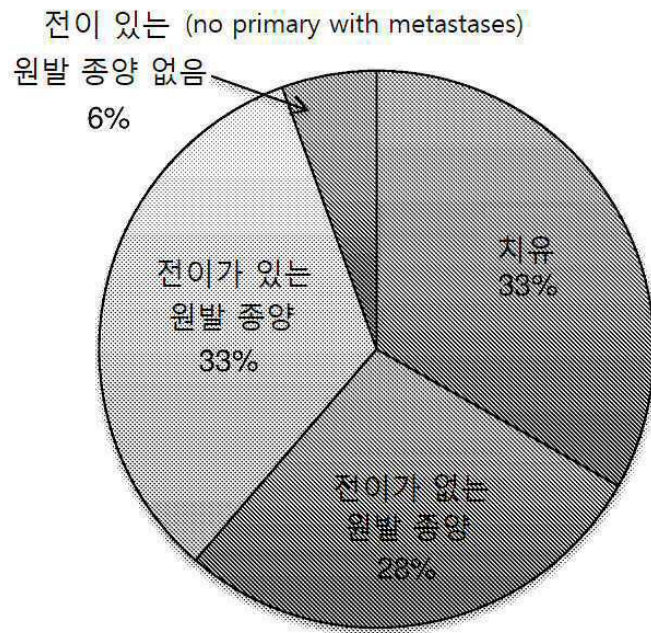
도면3



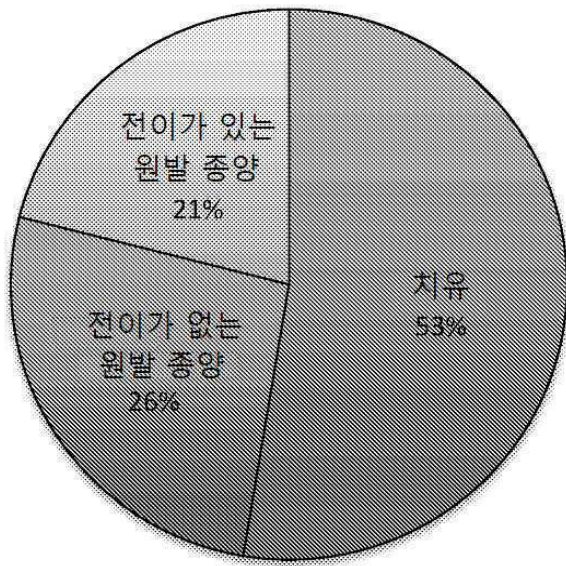
도면4



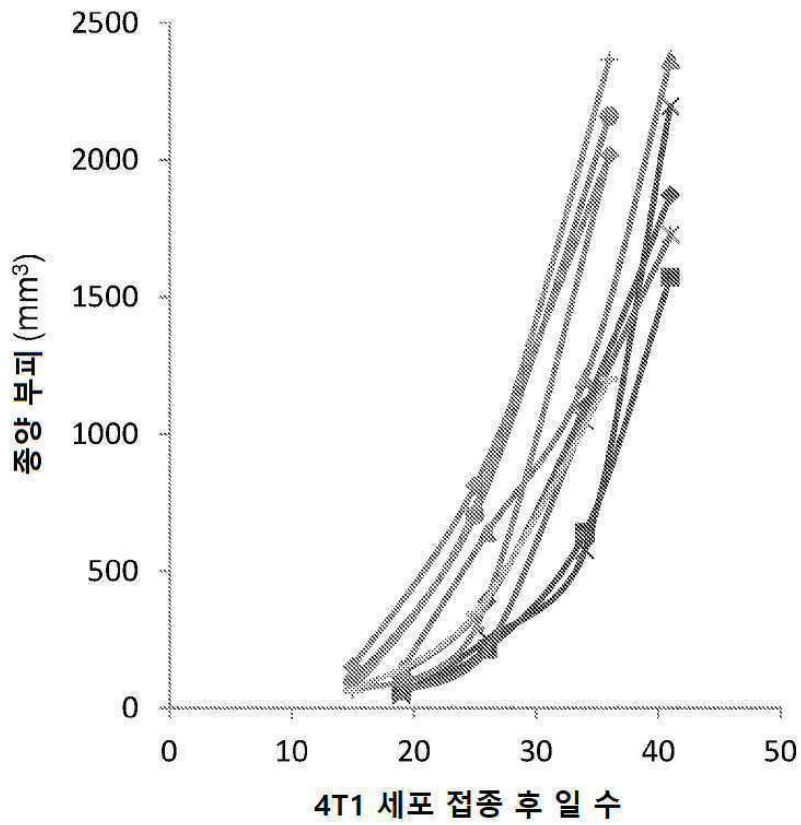
도면5a



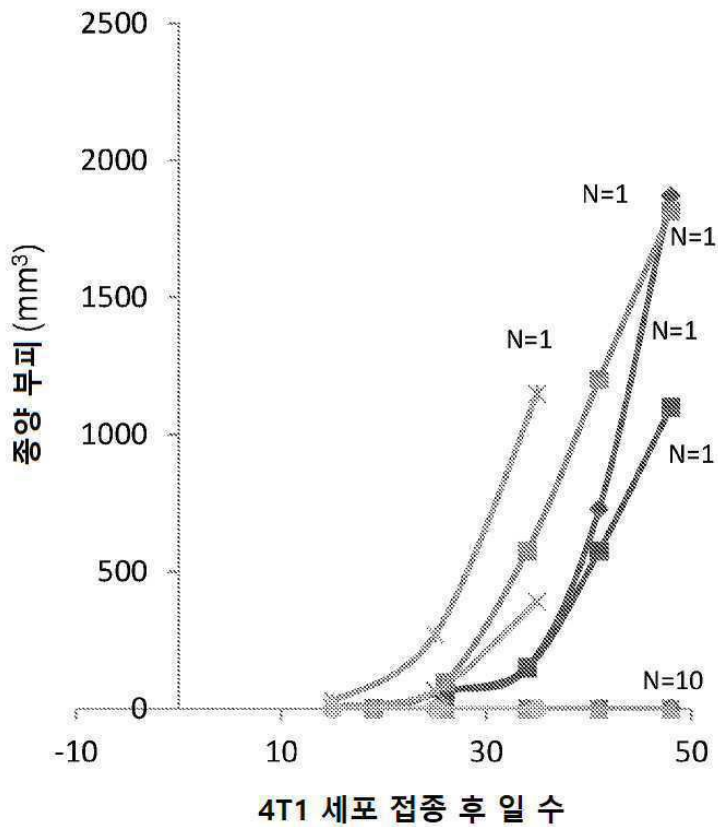
도면5b



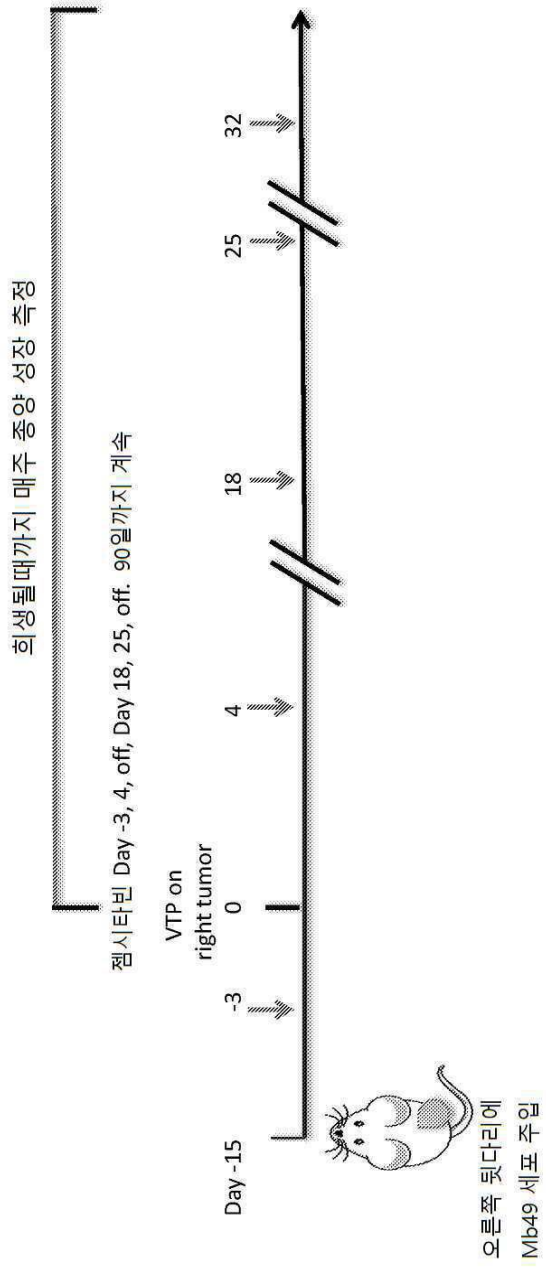
도면6a



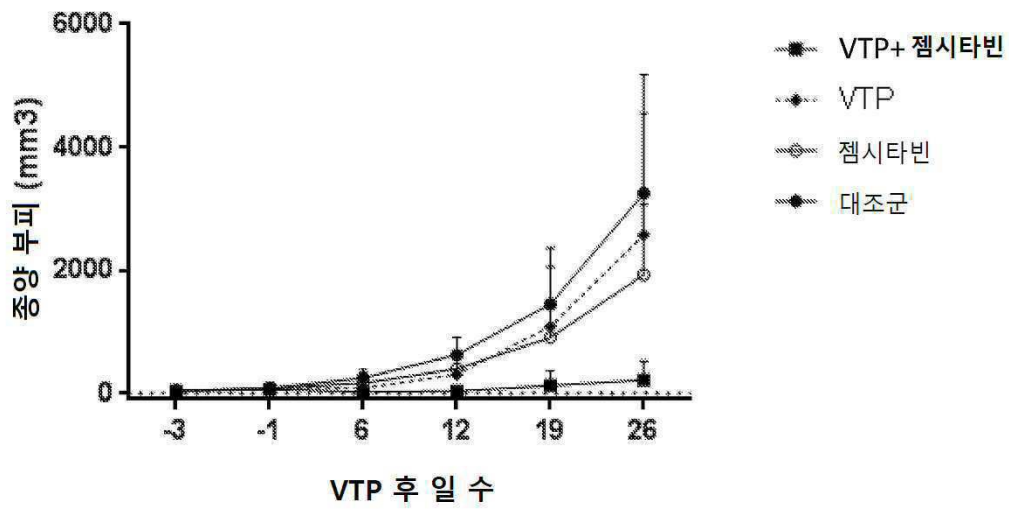
도면6b



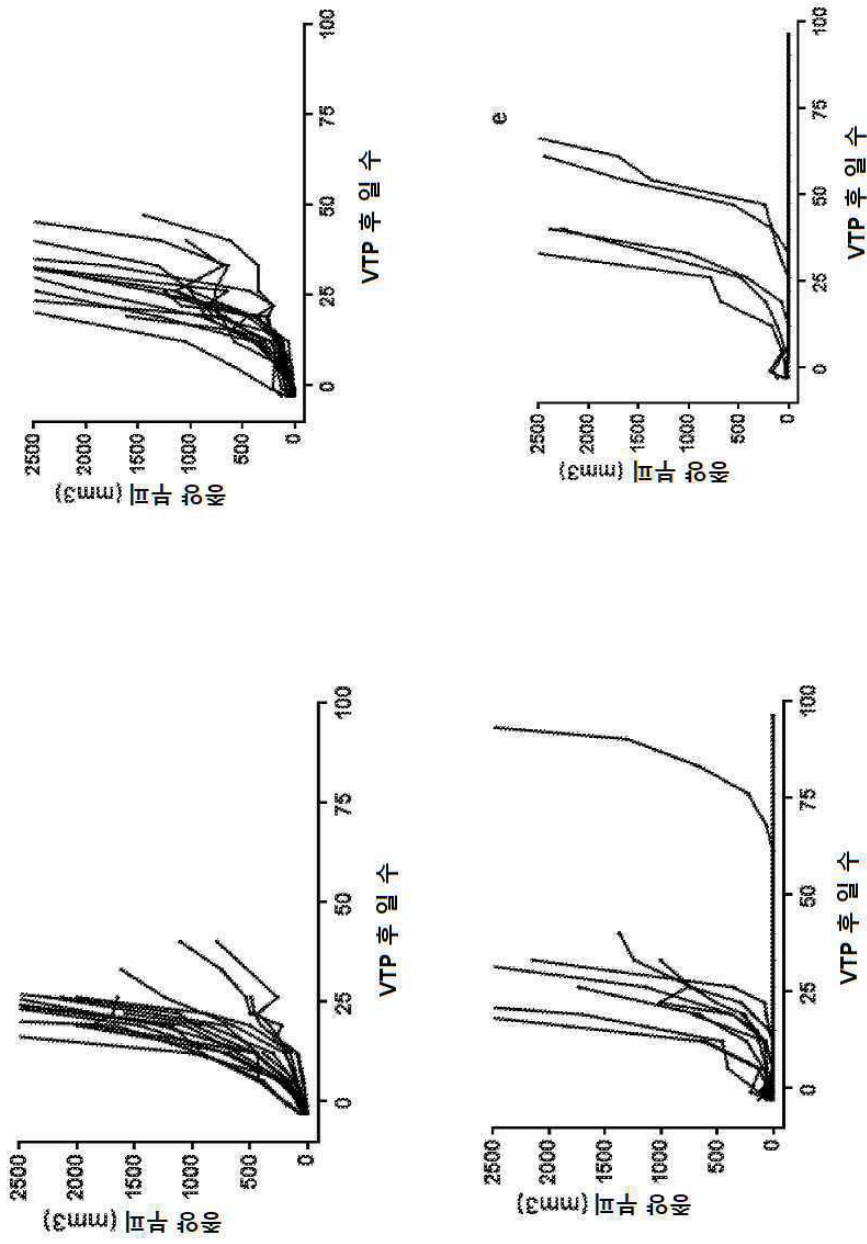
도면7



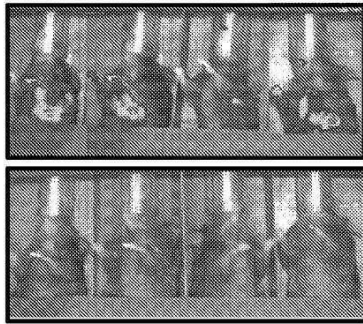
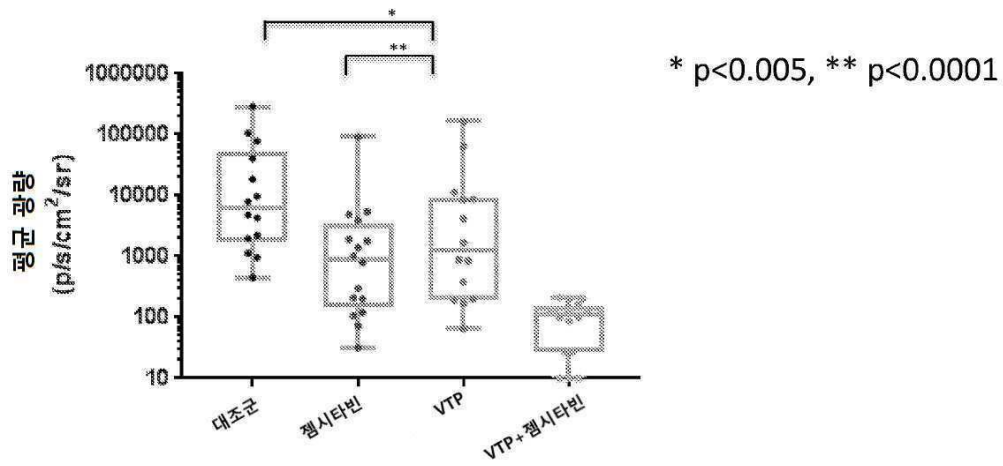
도면 8a



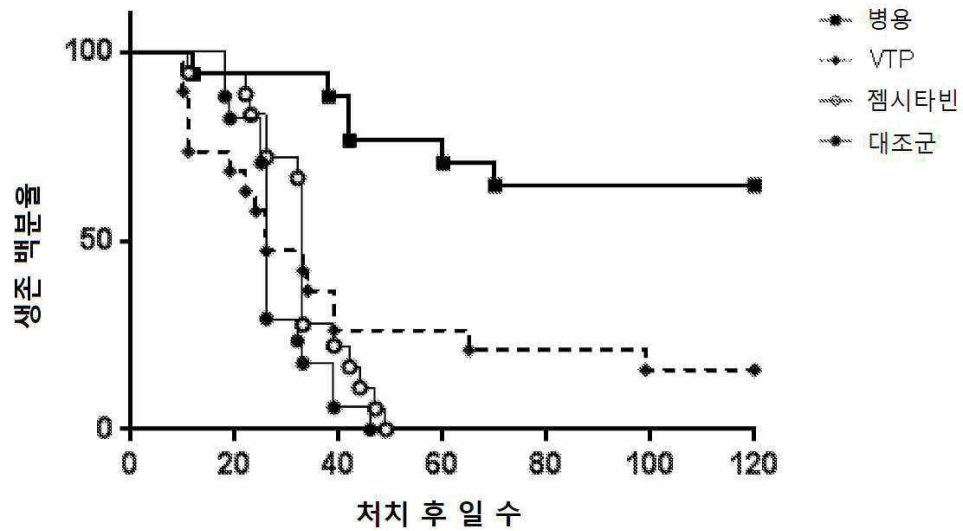
도면8b



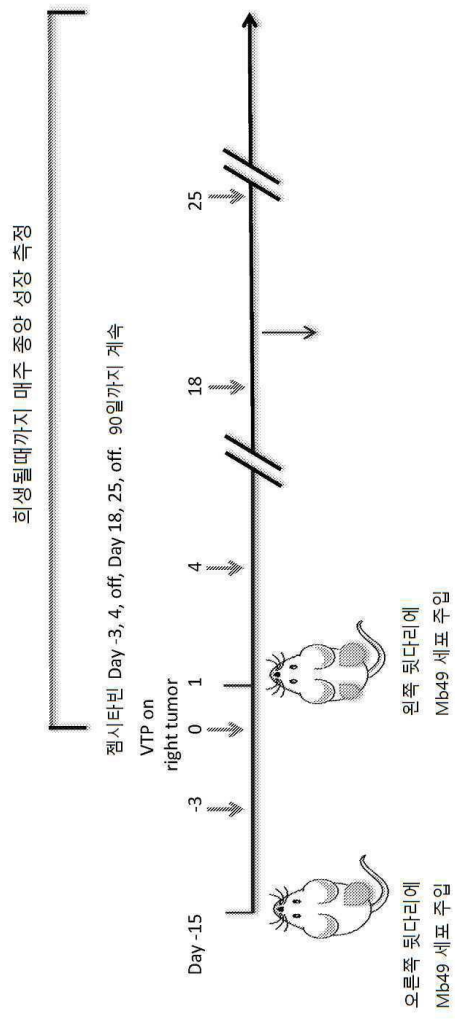
도면8c



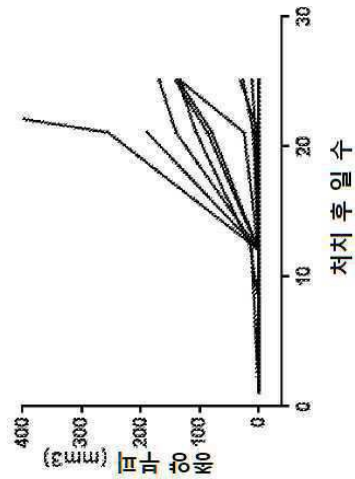
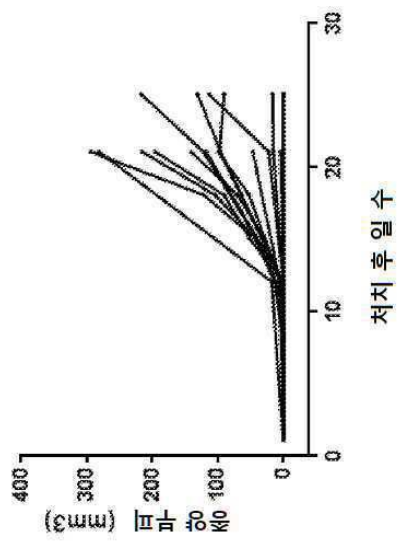
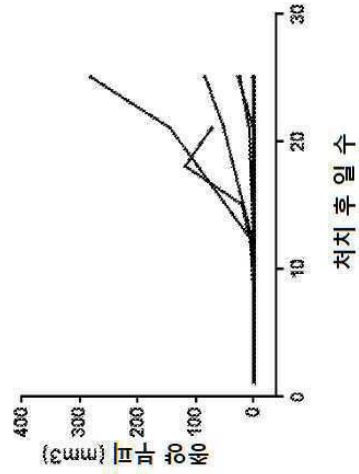
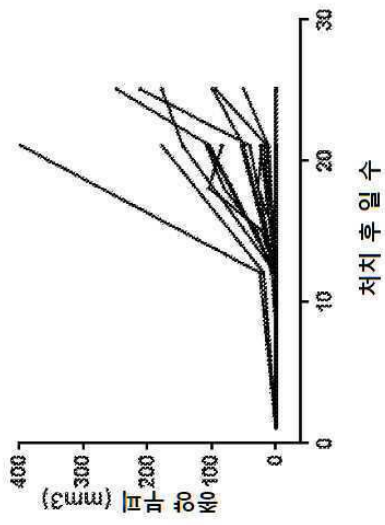
도면8d



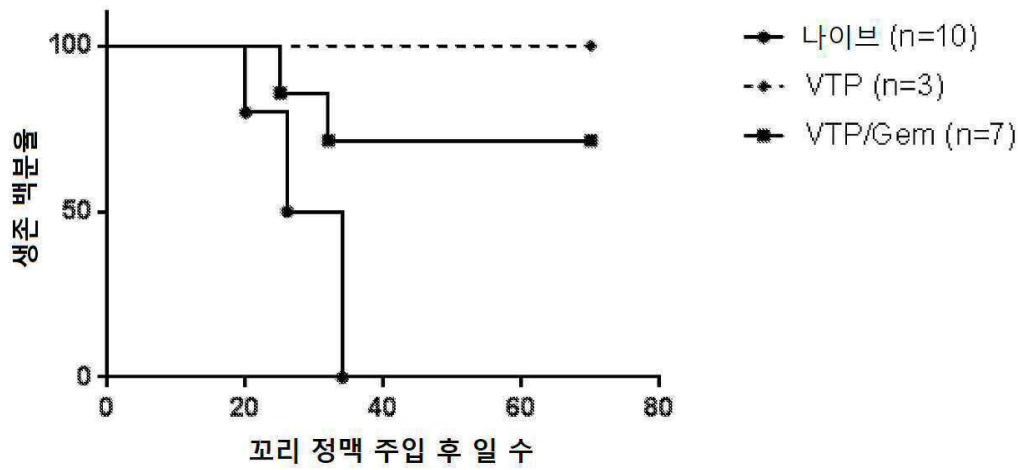
도면9a



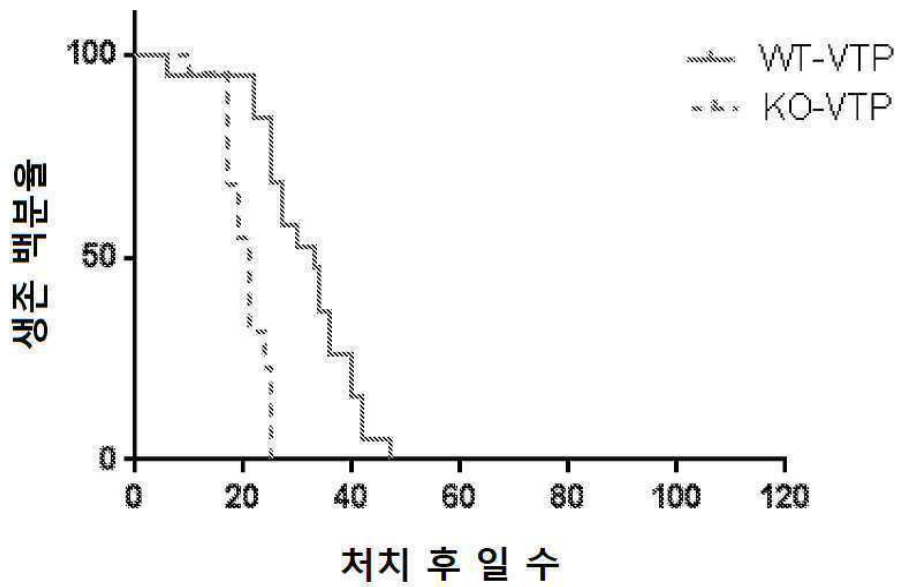
도면9b



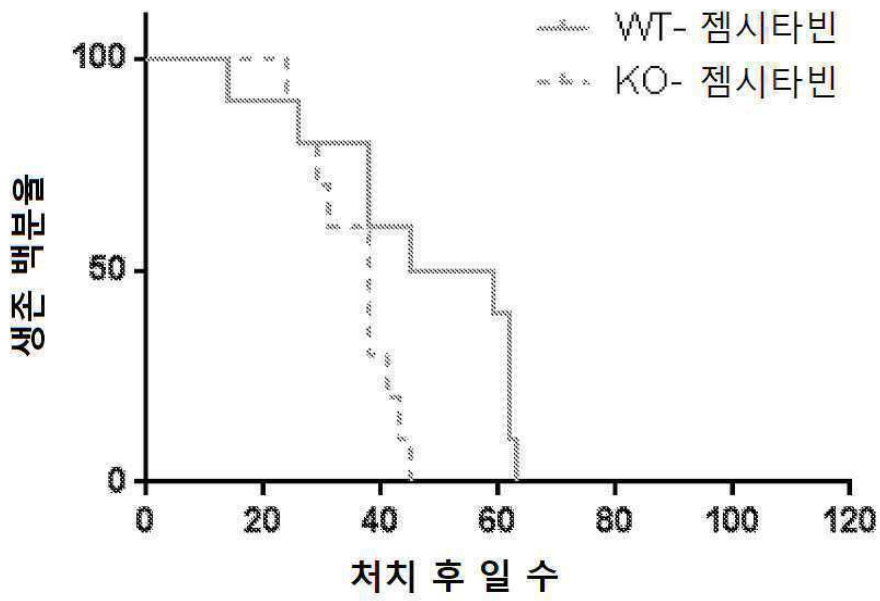
도면9c



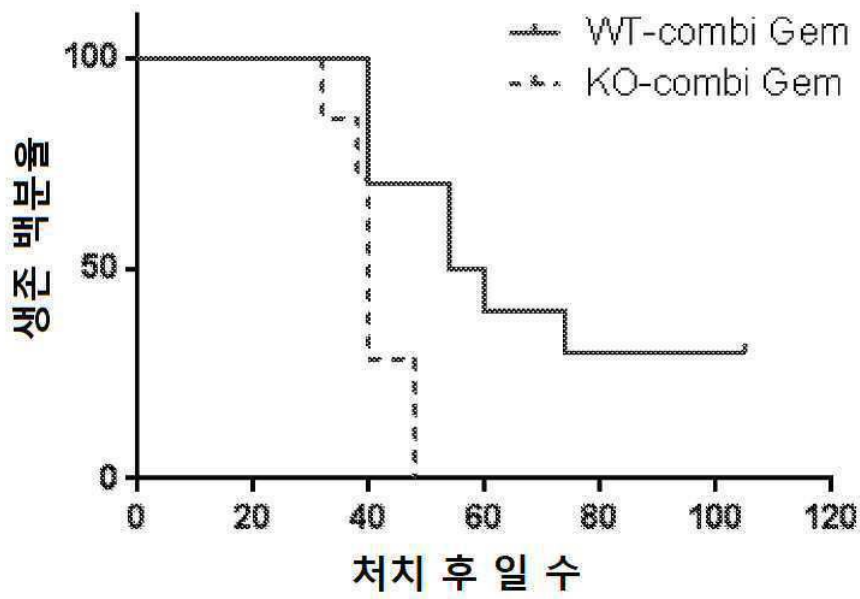
도면10a



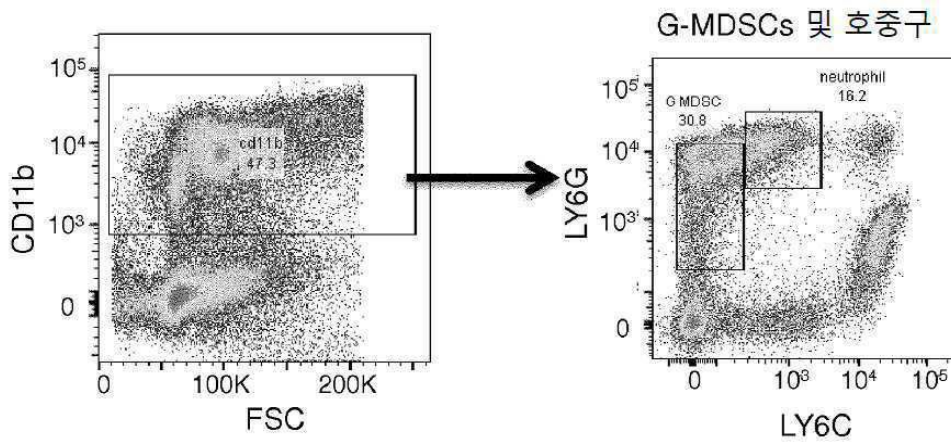
도면10b



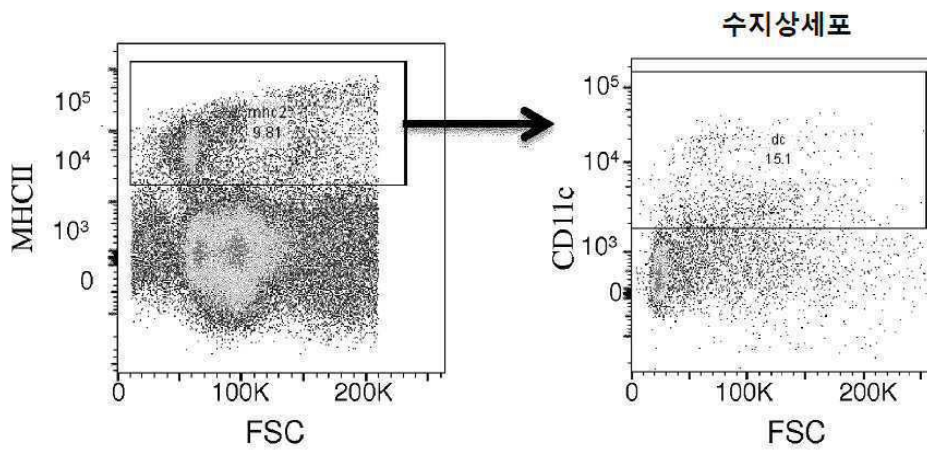
도면10c



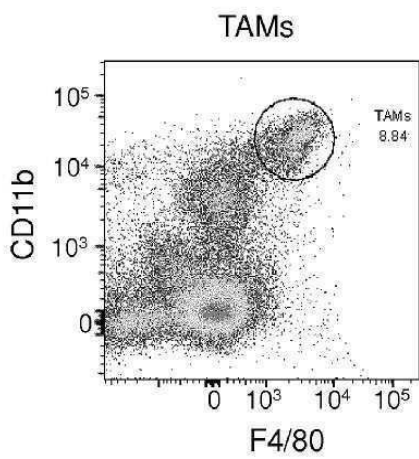
도면11a



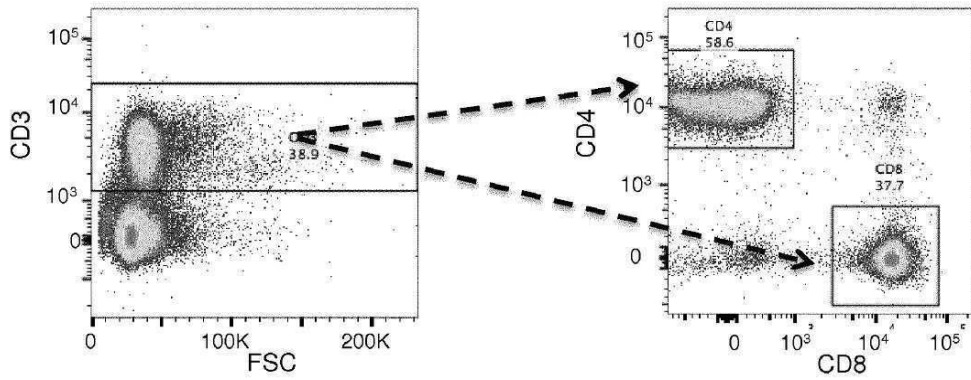
도면11b



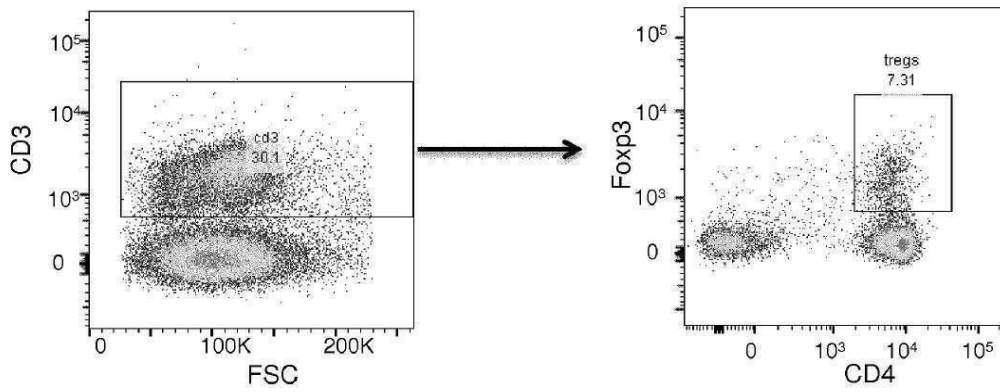
도면11c



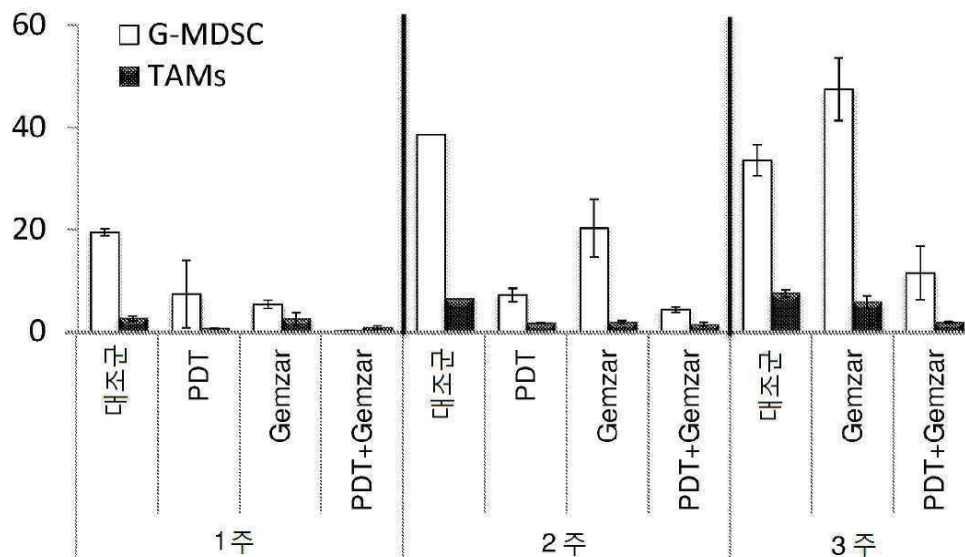
도면11d



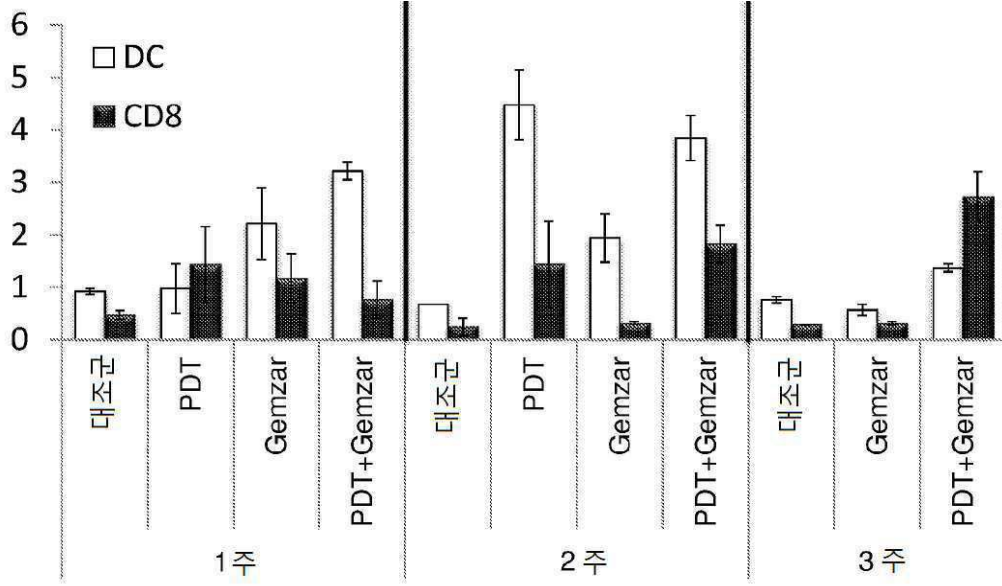
도면11e



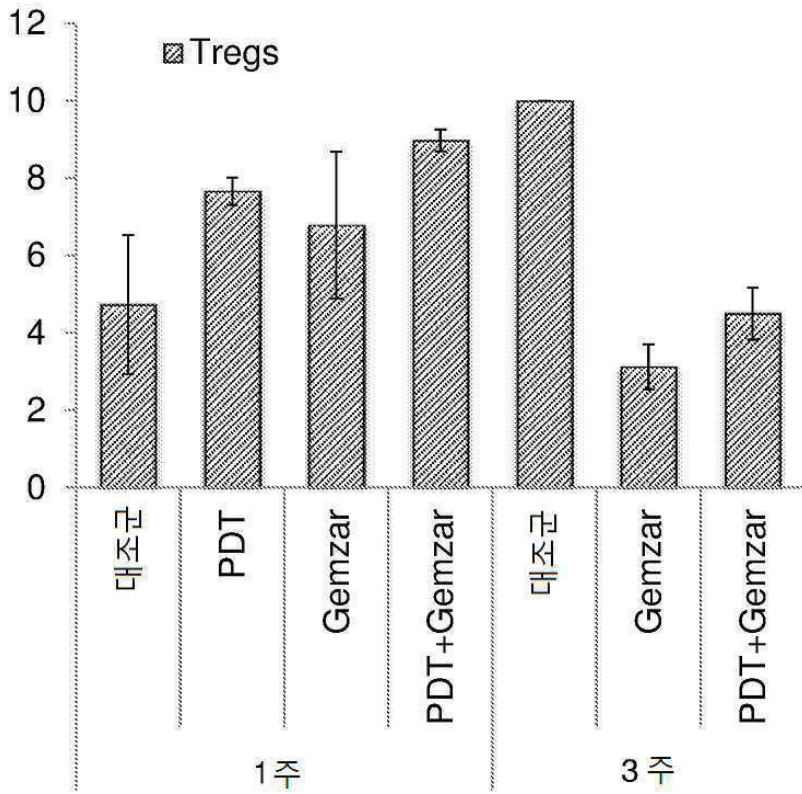
도면12a



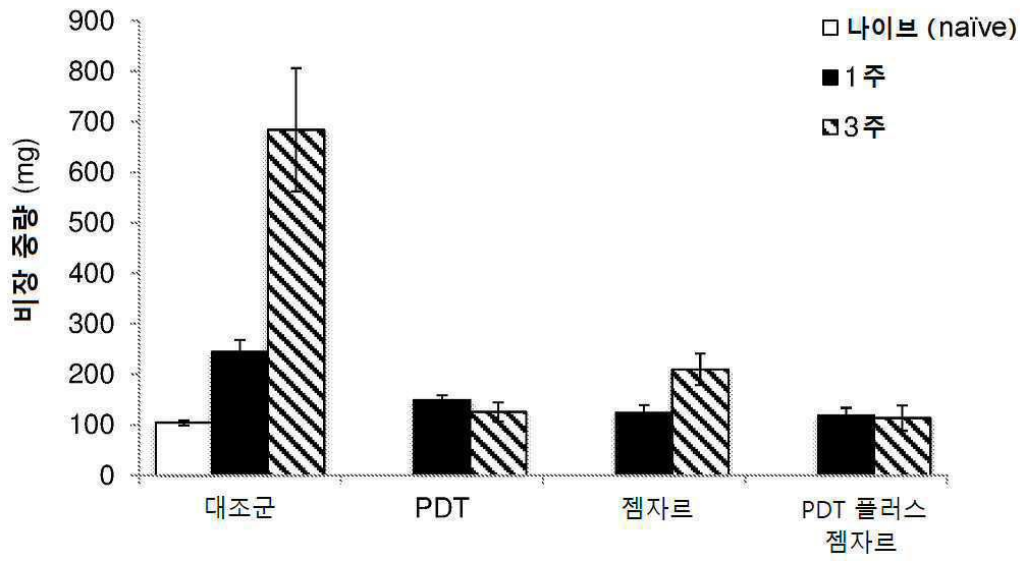
도면12b



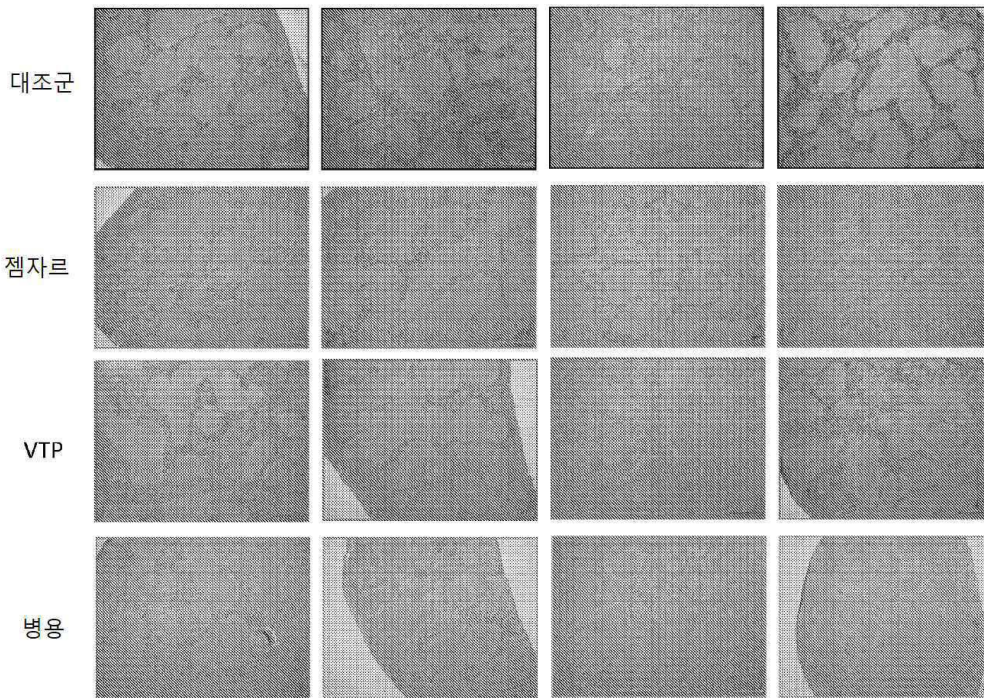
도면12c



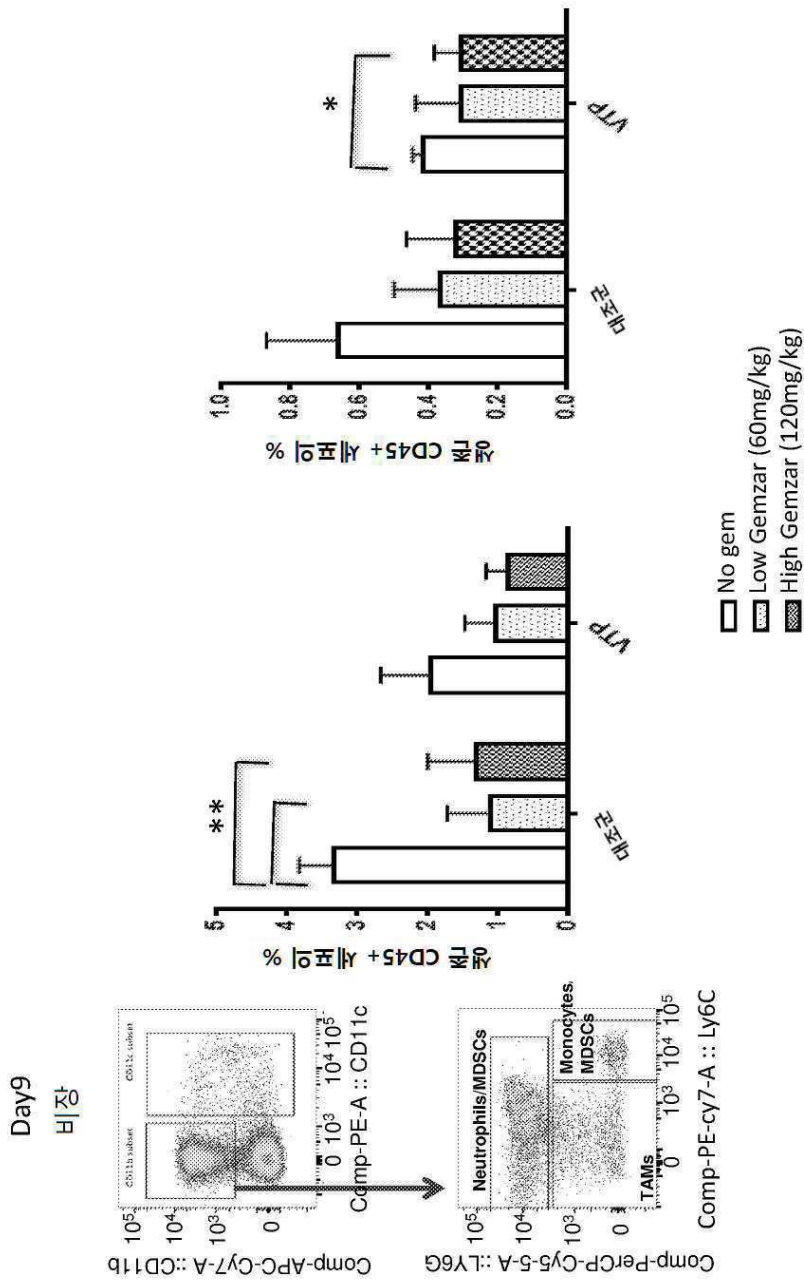
도면13



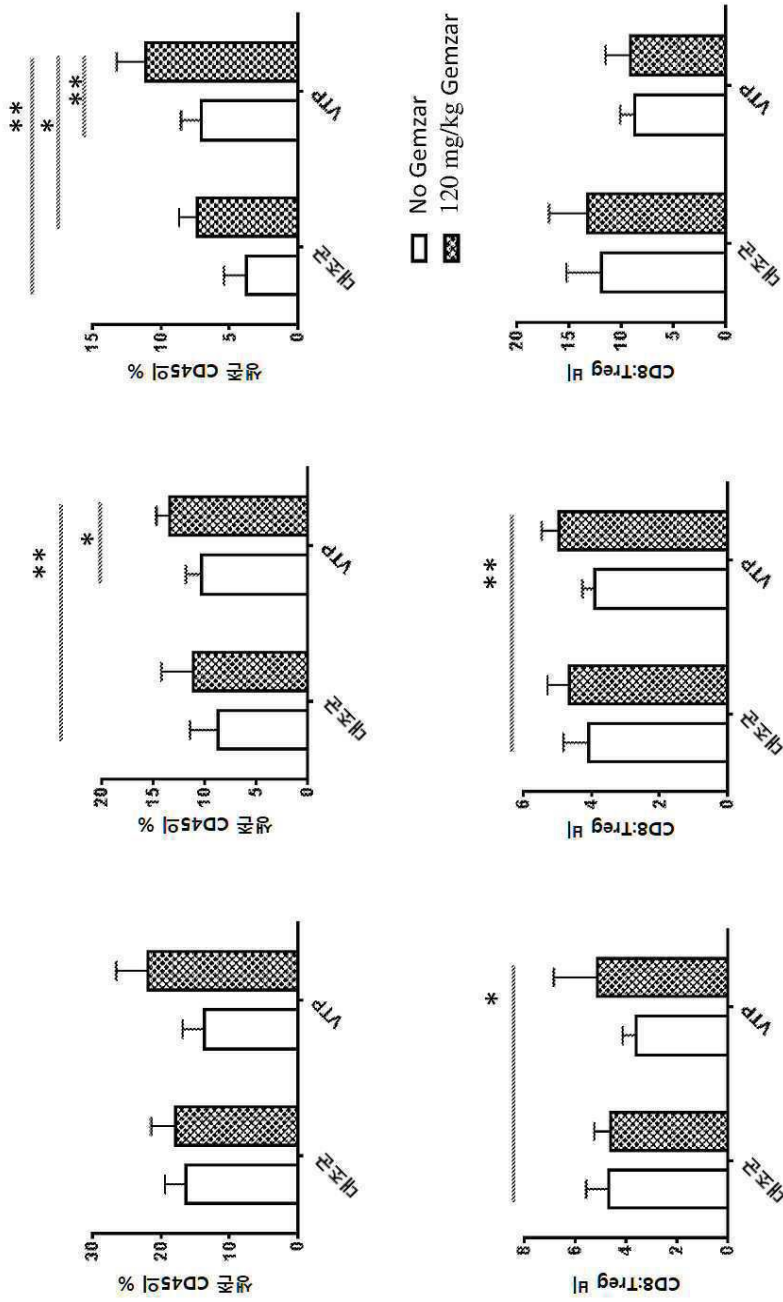
도면14a



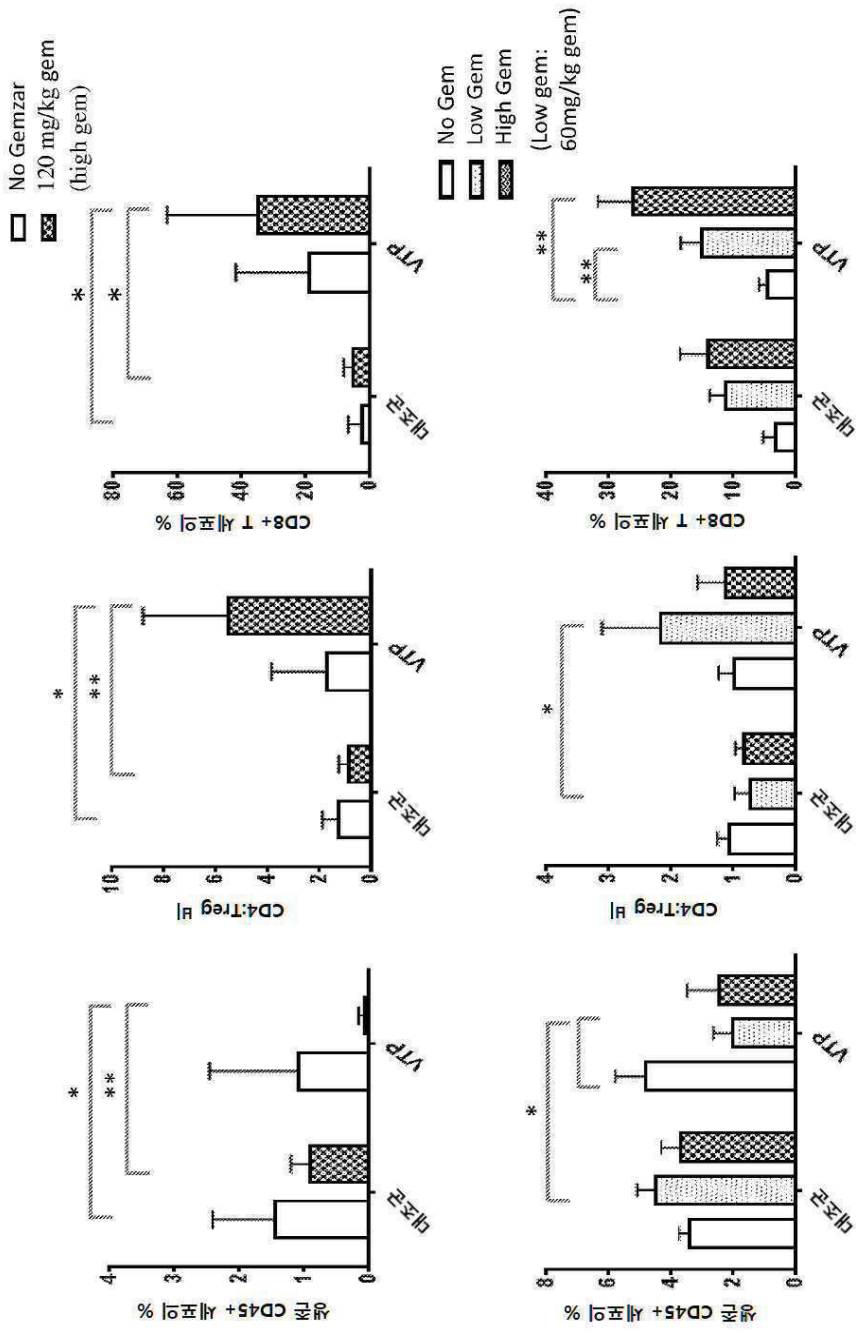
도면14b



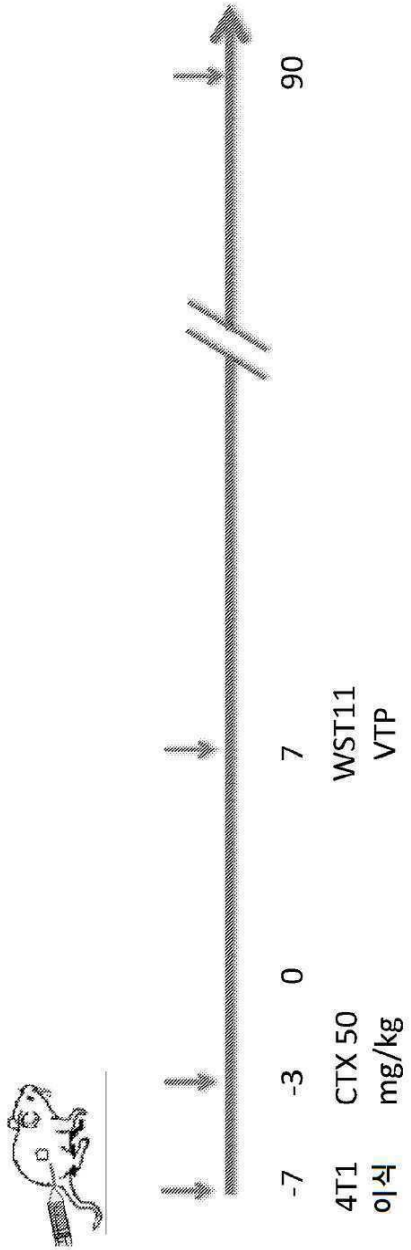
도면15a



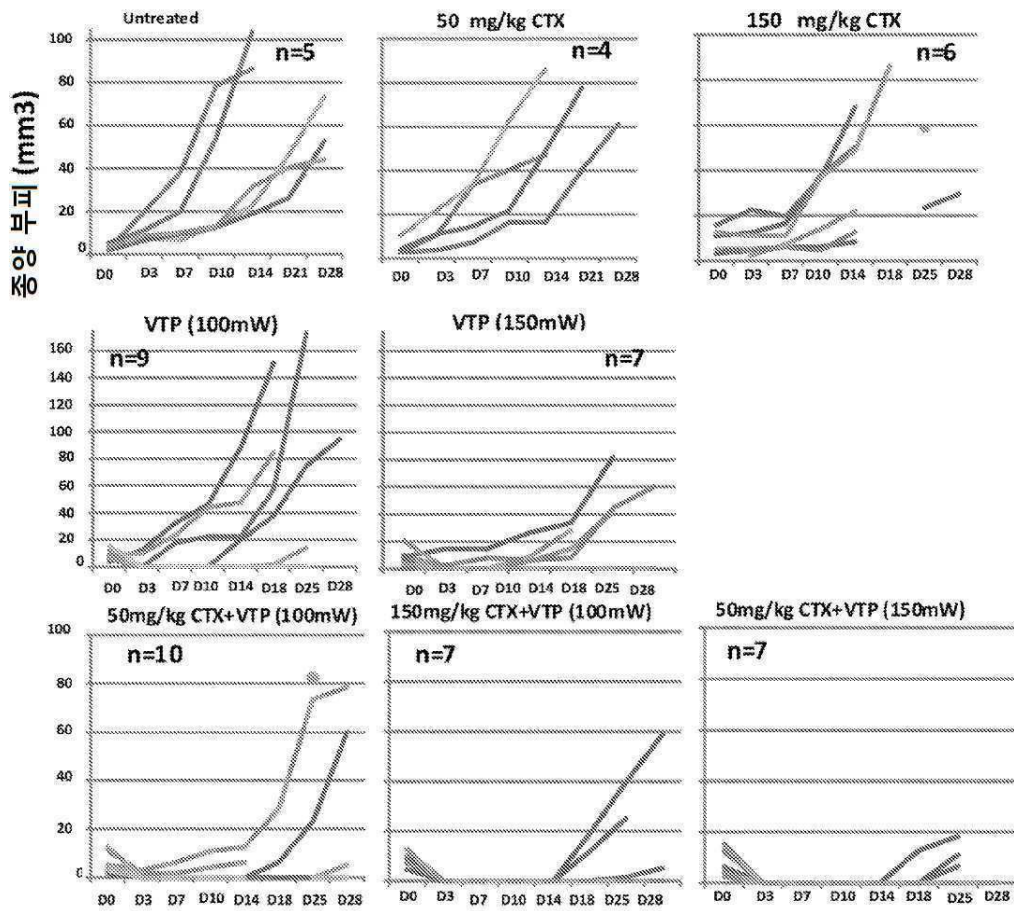
도면15b



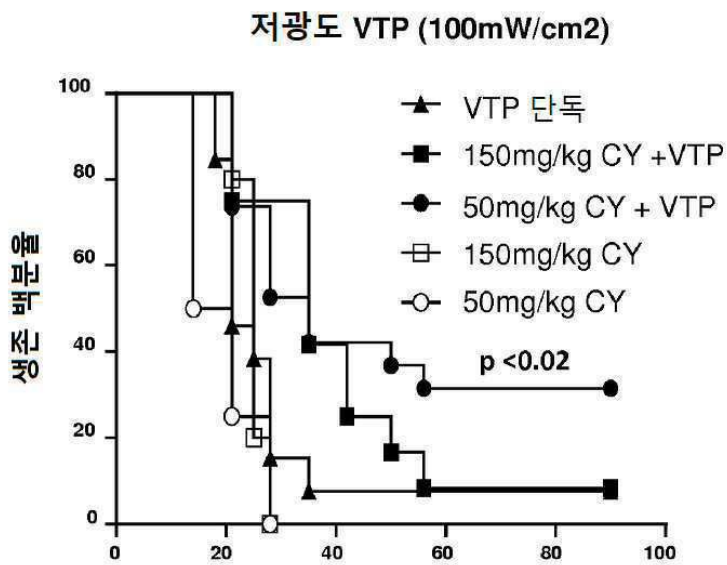
도면16



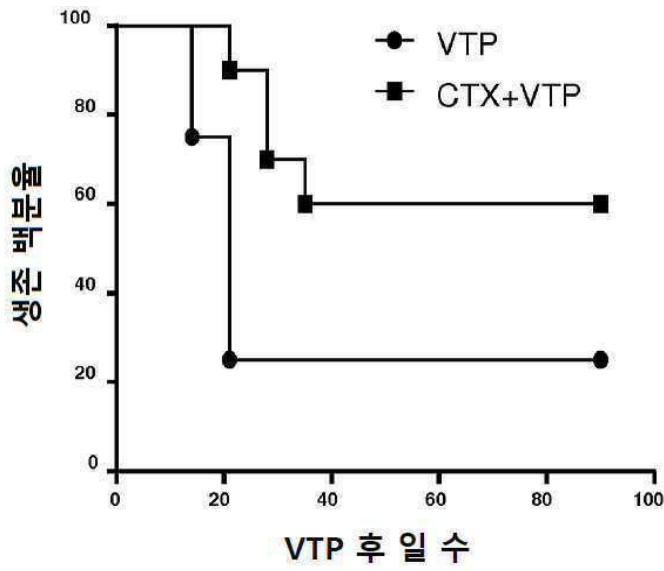
도면17



도면18a

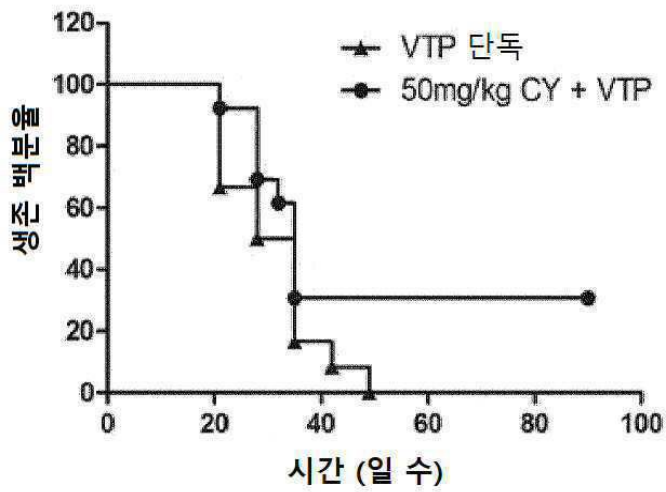


도면18b

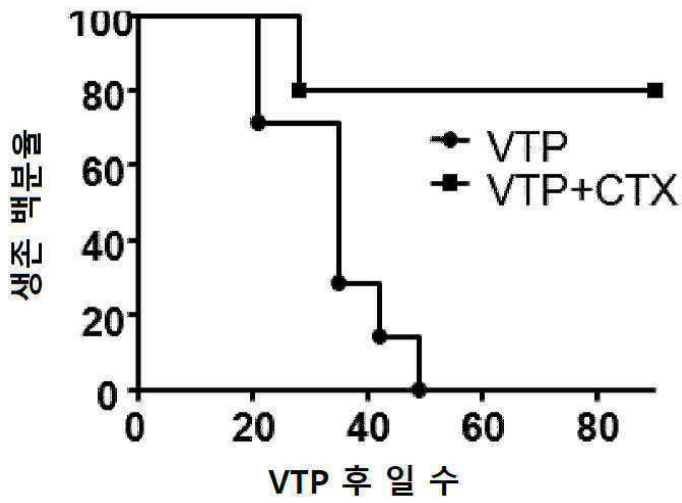


도면18c

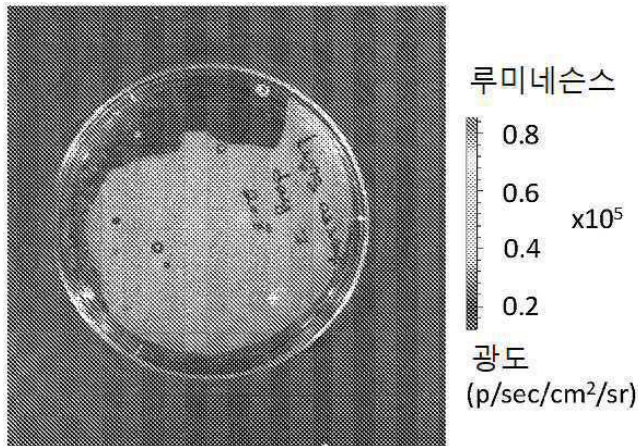
고광도 VTP (150mW/cm²)



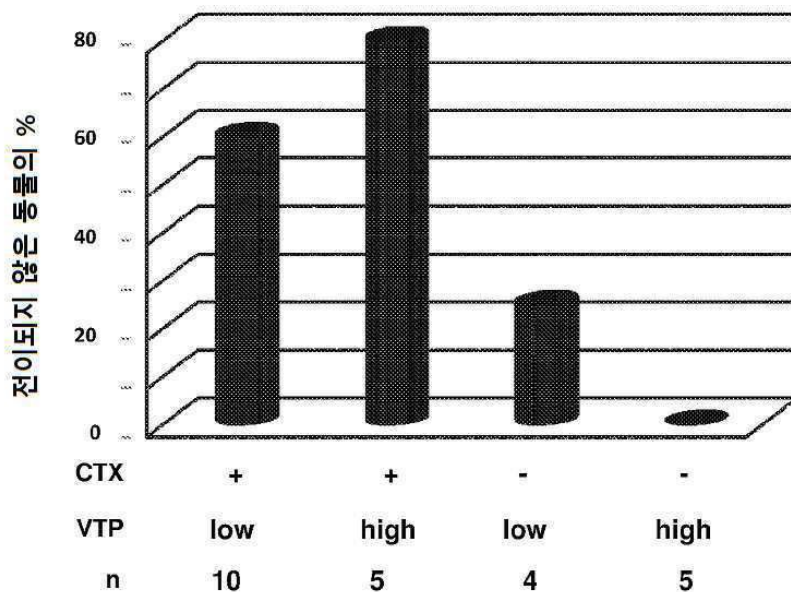
도면18d



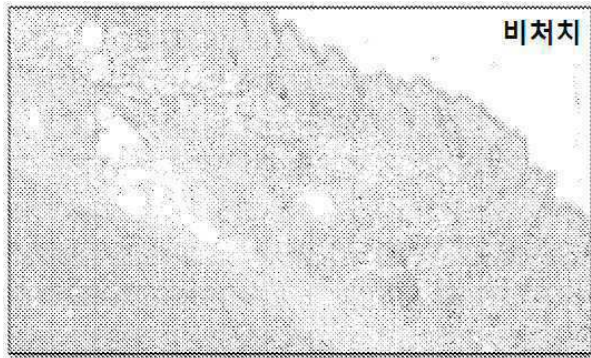
도면19a



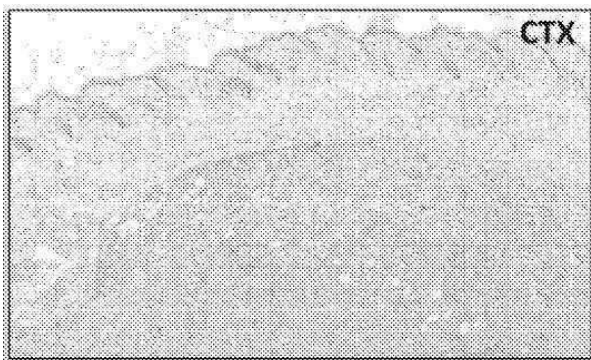
도면19b



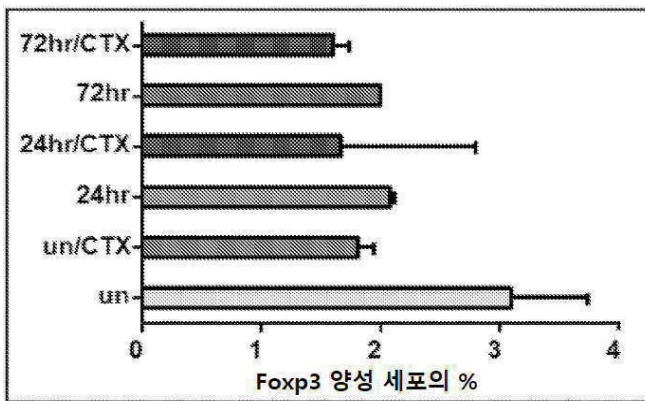
도면20a



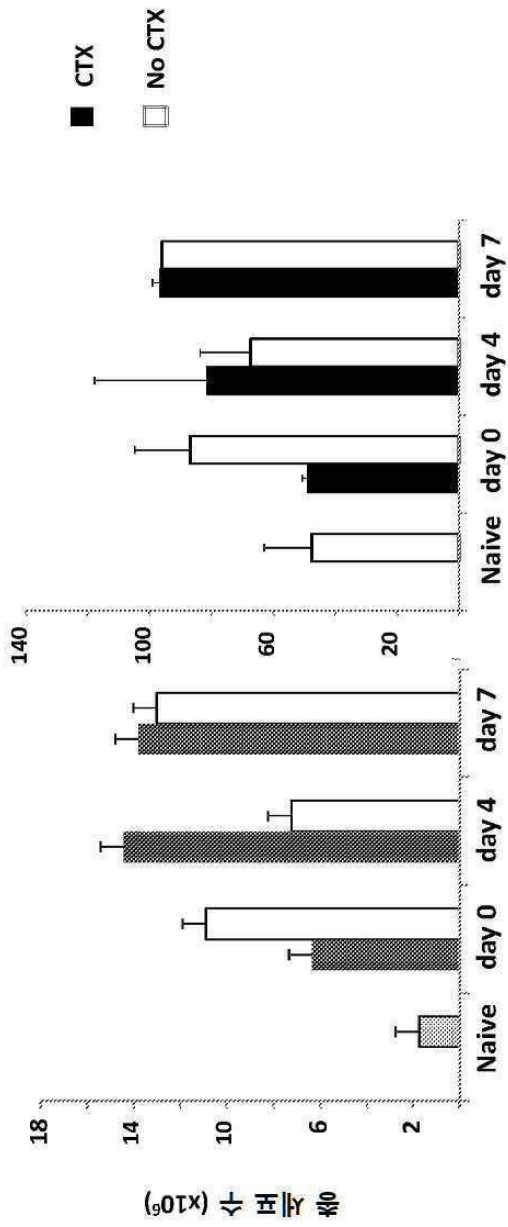
도면20b



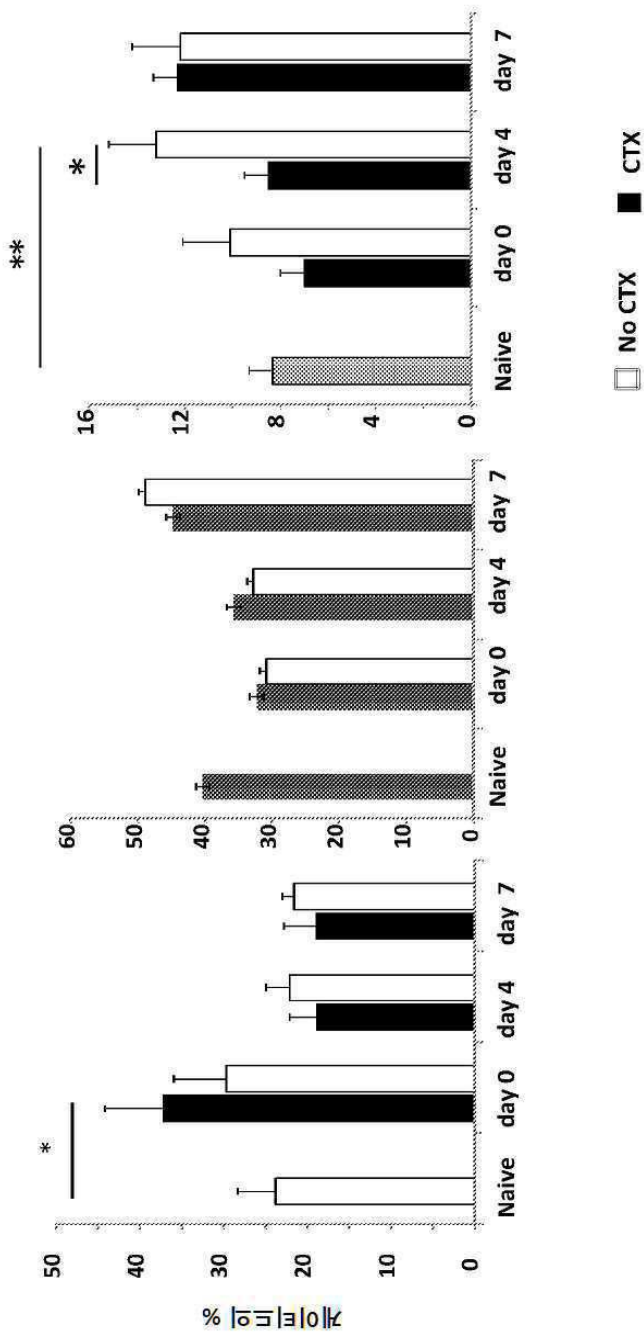
도면20c



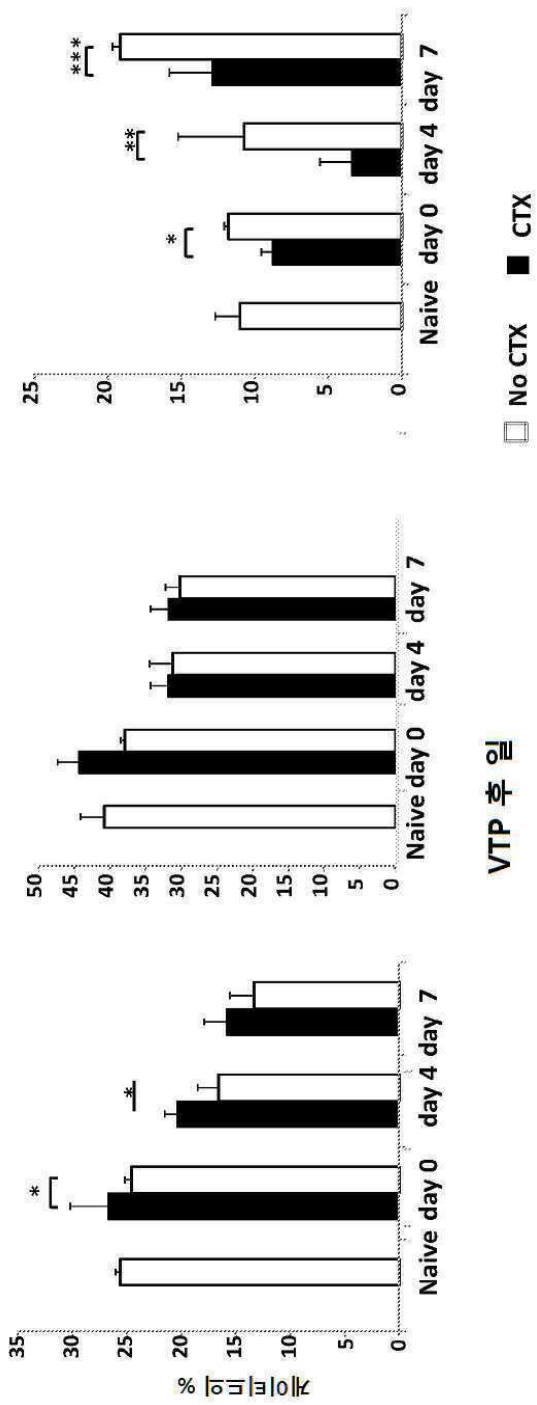
도면21a



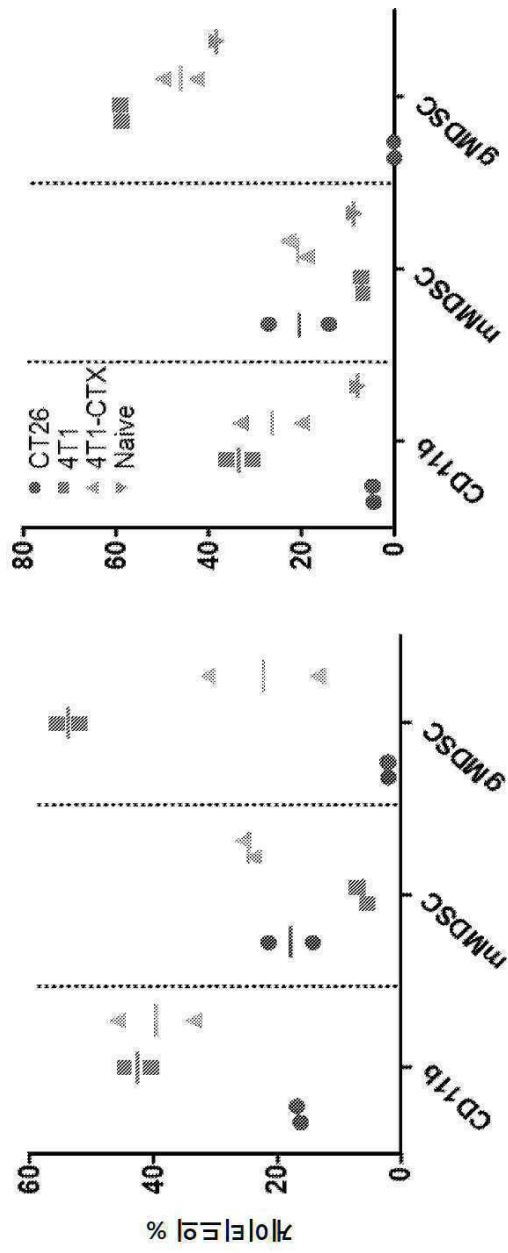
도면21b



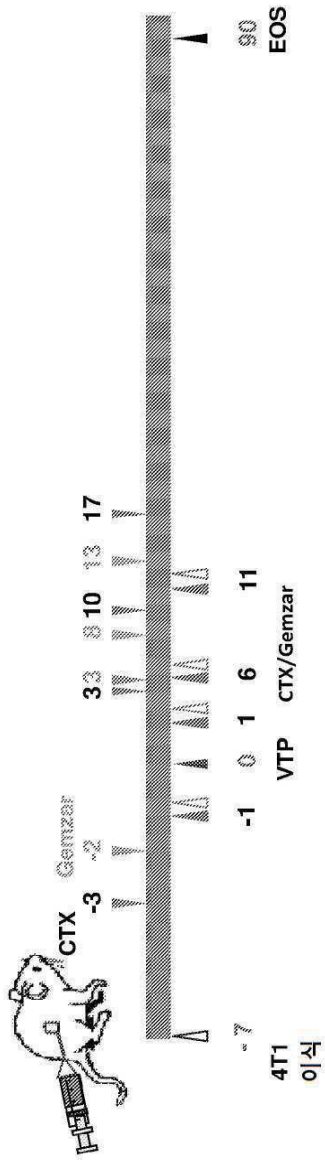
도면21c



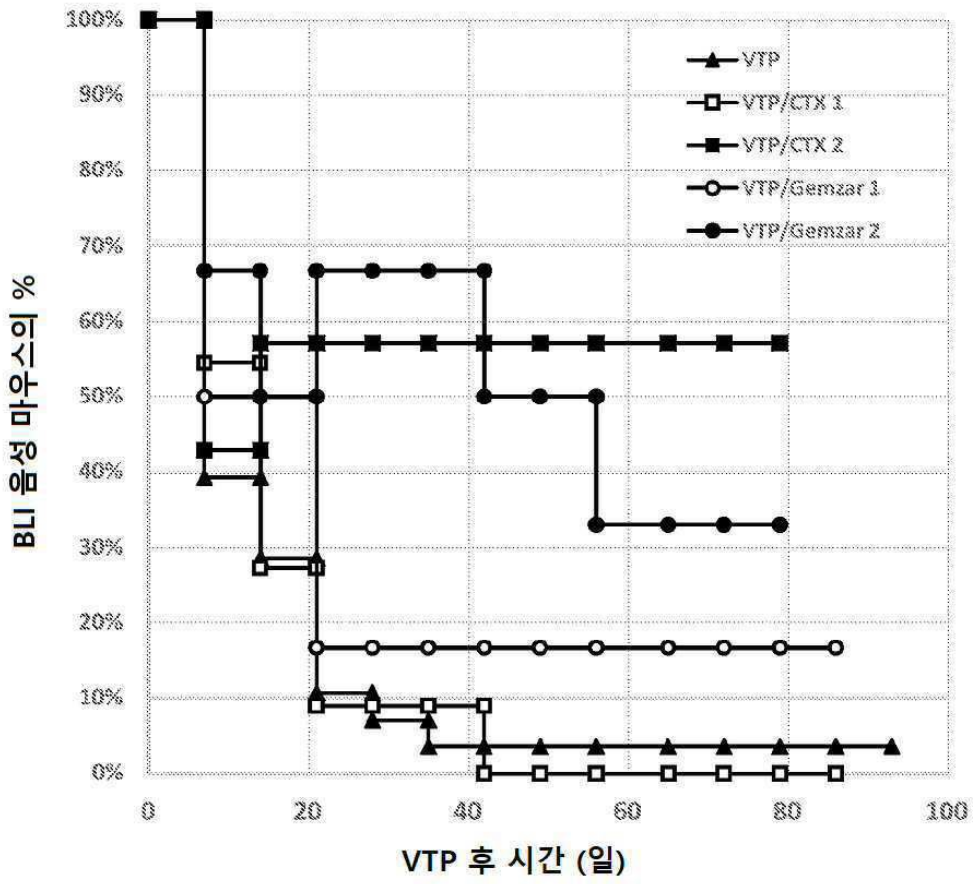
도면22



도면23a



도면23b



도면23c

