(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0126431
(43) 공개일자 2019년11월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/336 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/336 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7031149
(22) 출원일자(국제) 2018년03월23일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년10월22일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2018/050277
(87) 국제공개번호 WO 2018/170559
국제공개일자 2018년09월27일
(30) 우선권주장
2017901027 2017년03월23일 오스트레일리아(AU)

(71) 출원인
큐바이오틱스 피티와이 리미티드
오스트레일리아 퀸즈랜드 4068 타링가 모길 로드 165 레벨 1 스위트 3에이
(72) 발명자
레벨 폴 워렌
오스트레일리아 퀸즈랜드 4884 영가버라 펜다 스트리트 7
컬렌 제이슨 킹슬리
오스트레일리아 퀸즈랜드 4159 쏜사이드 쏜사이드 로드 175-205 유닛 16
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리앤목특허법인

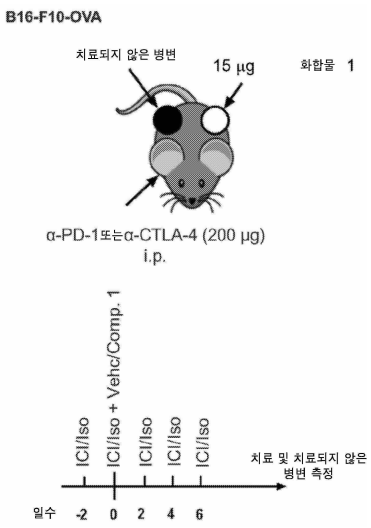
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **종양의 치료 또는 예방을 위한 병용 요법**

(57) 요 약

본 발명은 에폭시티글리안 화합물 및 면역 체크포인트 저해제의 투여를 포함하는 종양에 대한 병용 요법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 상기 요법에 의한 종양 치료 및/또는 하나 이상의 방관자 종양을 치료 또는 예방하는 방법이 있다. 또한 에폭시티글리안 화합물 및 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 약학적 조성물 및 키트가 개시되어 있다.

대 표 도 - 도7a



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
(72) 발명자
보일 글렌 매튜
오스트레일리아 퀸즈랜드 4068 타링가 힐스든 로드 65
파슨스 피터 고든
오스트레일리아 퀸즈랜드 4067 세인트 루시아 스완 로드 317
고든 빅토리아 앤
오스트레일리아 퀸즈랜드 4884 영가버라 펜다 스트리트 7

명 세 서

청구범위

청구항 1

에폭시티글리안 (epoxytigliane) 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 종양을 치료하는 방법.

청구항 2

에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하고; 상기 에폭시티글리안 화합물은 하나 이상의 방관자 종양 (bystander tumours) 이외의 종양에 국소 투여되는 것인 대상에서 하나 이상의 방관자 종양을 치료 또는 예방하는 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 상기 종양에 국소로 투여되는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 종양내 주사로 투여되는 것인 방법.

청구항 5

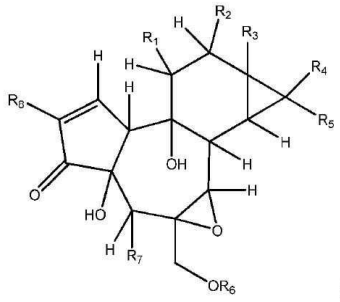
청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제는 전신으로 투여되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제는 비경구 주사로 투여되는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염인 것인 방법:



(I)

상기에서

R_1은 수소 또는 C_{1-6}알킬이고;

R_2는 -OH 또는 $-OR_9$이며;

R_3은 -OH 또는 $-OR_9$이고;

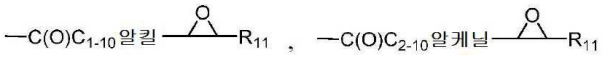
R_4 및 R_5는 독립적으로 수소 및 C_{1-6}알킬로부터 선택되며;

R_6은 수소 또는 $-R_{10}$이고;

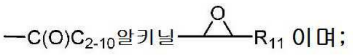
R_7은 히드록시 또는 OR_{10}이며;

R_8은 수소 또는 C_{1-6}알킬이고;

R_9는 $-C_{1-20}$알킬, $-C_{2-20}$알케닐, $-C_{2-20}$알키닐, $-C(O)C_{1-20}$알킬, $-C(O)C_{2-20}$알케닐, $-C(O)C_{2-20}$알키닐, $-C(O)$시클로알킬, $-C(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-C(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-C(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬, $-C(O)$아릴, $-C(O)C_{1-10}$알킬아릴, $-C(O)C_{2-10}$알케닐아릴, $-C(O)C_{2-10}$알키닐아릴, $-C(O)C_{1-10}$알킬$C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{1-10}$알킬$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{1-10}$알킬SR_{11}, $-C(O)C_{2-10}$알케닐SR_{11}, $-C(O)C_{2-10}$알키닐SR_{11}, $-C(O)C_{1-10}$알킬$C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{1-10}$알킬$C(O)SR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)SR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)SR_{11}$,



또는



R_{10}은 $-C_{1-6}$알킬, $-C_{2-6}$알케닐, $-C_{2-6}$알키닐, $-C(O)C_{1-6}$알킬, $-C(O)C_{2-6}$알케닐, $-C(O)C_{2-6}$알키닐, $-C(O)$아릴, $-C(O)C_{1-6}$알킬아릴, $-C(O)C_{2-6}$알케닐아릴, 또는 $-C(O)C_{2-6}$알키닐아릴이고;

R_{11}은 수소, $-C_{1-10}$알킬, $-C_{2-10}$알케닐, $-C_{2-10}$알키닐, 시클로알킬 또는 아릴이며;

상기 각 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬 또는 아릴기는 선택적으로 치환된다.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 R_1은 $-CH_3$인 것인 방법.

청구항 9

청구항 7 또는 8에 있어서, 상기 R_2 및 R_3은 독립적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐, $-OC(O)C_{2-20}$알키닐, $-OC(O)$시클로알킬, $-OC(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-OC(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬, $-OC(O)$아릴, $-OC(O)C_{1-10}$알킬아릴, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐아릴, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐아릴, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬SR_{11}, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐SR_{11}, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐SR_{11}, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)SR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)SR_{11}$ 및 $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)SR_{11}$로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 R_2 및 R_3은 독립적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐, $-OC(O)C_{2-20}$알키닐, $-OC(O)$시클로알킬, $-OC(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-OC(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬 및 $-OC(O)$아릴로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 11

청구항 9 또는 10에 있어서, 상기 R_2 및 R_3은 독립적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐 및 $-OC(O)C_{2-20}$알키닐로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 12

청구항 7 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R_4 및 R_5는 각각 독립적으로 H 및 $-CH_3$으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 13

청구항 7 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R_6은 수소, $-C(O)C_{1-6}$알킬, $-C(O)C_{2-6}$알케닐, $-C(O)C_{2-6}$알키닐 또는 -C(O)아릴인 것인 방법.

청구항 14

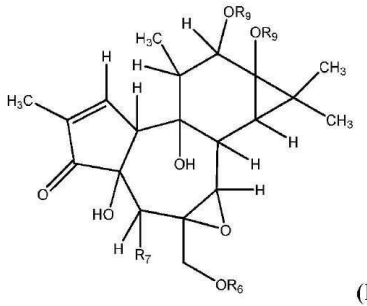
청구항 7 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R_7은 히드록실, $-OC(O)C_{1-6}$알킬, $-OC(O)C_{2-6}$알케닐 또는 $-OC(O)C_{2-6}$알키닐인 것인 방법.

청구항 15

청구항 7 내지 14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R_8은 H 또는 $-CH_3$인 것인 방법.

청구항 16

청구항 7에 있어서, 상기 화학식 (I)의 화합물은 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염인 것인 방법:



(II)

상기 R_6, R_7 및 R_9는 청구항 7에서 정의된 바와 같다.

청구항 17

청구항 7 내지 16 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화학식 (II)의 에폭시티글리안 화합물은 하기 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택되는 것인 방법:

12-티글로일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온;

12,13-디-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온;

12-헥사노일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온;

12,13-디헥사노일-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온;

12-미리스토일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온;

12-티글로일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13-펜타히드록시-20-아세틸옥시-1-티글리엔-3-온;

12-미리스토일-13-아세틸옥시-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온;

12-프로파노일-13-2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온; 12,13-디티글로일-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온; 및

12-(2-메틸부타노일)-13-티글로일-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제는 PD-1 (Programmed Death 1) 수용체,

세포독성 T-림프구-결합 단백질 4 (CTLA-4), 아데노신 A2A 수용체, B7-H3, B7-H4, 인돌아민 2,3-디옥시게나제, 살해-세포 면역글로불린-유사 수용체 (KIR), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG3), IG 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (TIGIT), T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3 (TIM-3), CD96 및 T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 억제인자 (VISTA)의 길항제인 것인 방법.

청구항 19

청구항 18에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제는 프로그램된 사멸 1 (PD-1) 수용체 또는 세포독성 T-림프구-결합 단백질 4 (CTLA-4)의 길항제인 것인 방법.

청구항 20

청구항 1 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제는 다회 용량 (multiple doses)으로 투여되는 것인 방법.

청구항 21

청구항 20에 있어서, 상기 다회 용량은 상기 에폭시티글리안 화합물 투여 전에, 동시에 및/또는 후속하여 투여되는 것인 방법.

청구항 22

청구항 21에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제의 제1 용량은 상기 에폭시티글리안 화합물 투여 전에 투여되는 것인 방법.

청구항 23

청구항 21 또는 22에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제의 용량은 상기 에폭시티글리안 화합물과 동시에 투여되는 것인 방법.

청구항 24

청구항 21 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 체크포인트 저해제의 1회 이상의 용량은 상기 에폭시티글리안 화합물 투여에 후속하여 투여되는 것인 방법.

청구항 25

에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제 및 선택적으로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 26

에폭시티글리안 화합물 함유 조성물 및 면역 체크포인트 저해제 함유 조성물을 포함하는 키트.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 1회 이상의 용량의 에폭시티글리안 화합물 및 1회 이상의 용량의 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 것인 키트.

청구항 28

청구항 26 또는 27에 있어서, 국소 투여용으로 제제화된 1회 이상의 용량의 에폭시티글리안 화합물 및 주사 투여용으로 제제화된 1회 이상의 용량의 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 것인 키트.

청구항 29

청구항 26 또는 27에 있어서, 종양내 주사용으로 제제화된 1회 용량의 에폭시티글리안 화합물 및 주사 투여용으로 제제화된 1회 이상의 용량의 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 것인 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에폭시티글리안 (epoxytigliane) 화합물 및 면역 체크포인트 저해제 (immune checkpoint inhibitor)의 투여를 포함하는 종양에 대한 병용 요법에 관한 것이다. 또한, 에폭시티글리안 화합물 및 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 약학적 조성물 및 키트가 개시되어 있다.

배 경 기 술

[0002] 에폭시티글리에논 (epoxytiglienone) 화합물은 강력한 항-종양 활성을 갖는다. 종양내로 (intra-tumourally) 투여될 때, 에폭시티글리에논은 종양 혈관구조를 직접 파괴하여 종양 덩어리의 빠른 출혈성 괴사를 일으킨다 (Boyle *et al*. 2014). 현재까지, 국소로 투여된 에폭시티글리에논 화합물이 방관자 종양 (bystander tumours) 또는 더 떨어져 있는 종양에 대해 전신 효과를 갖는다는 증거는 없으며, 종양내로 전달된 에폭시티글리에논 화합물은 치료 부위에서 주로 작용하는 것으로 여겨진다. 결과적으로, 각 종양은 개별적으로 치료되어야 한다.

[0003] 암 치료를 위한 면역요법이 클리닉에서 널리 수용되고 있다. 구체적으로, 면역 체크포인트 저해제 (ICI)는 진행성 전이 흑색종, 비-소세포 폐암, 신장암, 방광암 및 호지킨 림프종 (Hodgkin's lymphoma)을 포함하는 다양한 악성종양에서의 가능성을 나타내었다. 종양 세포가 숙주 면역계, 구체적으로 종양 항원에 특이적인 T 세포를 회피, 억제 또는 저항하게 하는 단백질의 작용을 차단하는 분자 (전형적으로 모노클로날 항체)가 ICI이다. 현재 승인된 T 세포 체크포인트 저해제는 명백하게 상이한 작용 기전을 통해 항-종양 면역 반응을 증강시킨다. 예를 들어, 세포독성 T-림프구-결합 항원 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4: CTLA4) 차단은 주로 면역 반응의 프라임 단계 (priming phase) 중에 T 세포 활성화를 증강시키는 반면에, 프로그램된 세포사멸 단백질 1 (programmed cell death protein 1: PD1) 차단은 소진되었지만 활성화된 이펙터 T 세포 집단을 방출하고 조절 T (Treg) 세포 기능을 감소시키는 것으로 나타났다.

[0004] ICI는 진행성 암 환자에서 현저하고 지속가능한 반응을 유발할 수 있지만, 이러한 양성 반응은 전체 환자 집단 중 작은 비율로 제한된다 (Hu-Lieskovan *et al*. 2017). 결과적으로, 숙주 면역 반응을 자극할 수 있는 다른 치료 방식 (예: 방사선 요법, 화학요법, 항암 바이러스, 암 백신)과 ICI를 조합하는 접근법은 암 면역요법에 대한 선천적 및 후천적 저항을 극복하고 잠재적으로 임상 성공을 더 넓은 범위의 환자에게로 확대하는 매력적이고 임상적으로 실행가능한 접근법을 제공한다 (Smyth *et al*. 2015).

[0005] 이러한 접근법 중 하나는 (1) 전체 종양 부담을 감소시키고, (2) 종양 괴사 중에 신생-항원을 노출시켜서 항-종양 반응을 강화시키며 및/또는 (3) 종양 기질 세포에 직접 영향을 주어 면역 반응을 조절할 수 있는 (전신 또는 종양내로 전달되는) 소분자 화학요법제와 ICI를 조합하는 것이다 (Adams *et al*. 2015; Mahoney *et al*. 2015; O'Brien *et al*. 2014).

[0006] 본 발명은 일부 에폭시티글리엔-3-온 화합물이 면역 체크포인트 차단제와 상승적으로 작용할 수 있는 면역 반응을 자극하여 치료되는 종양뿐만 아니라 치료되는 대상에 존재할 수 있는 다른 종양에 대한 요법을 제공할 수 있다는 발견에 적어도 일부 근거하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상에서, 본 발명은 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상에서 적어도 하나의 종양을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 양상에서, 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하고; 상기 에폭시티글리안 화합물은 방관자 종양 이외의 종양에 국소로 투여되는 것인 상기 대상에서 방관자 종양을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 다른 양상에서, 종양 치료용 약제의 제조에 있어서 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제의 용도를 제공한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 양상에서, 종양 치료용 약제의 제조에 있어서 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공하며, 상기 약제는 면역 체크포인트 저해제와 조합하여 투여하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 부가의 양상에서, 종양 치료용 약제의 제조에 있어서 면역 체크포인트 저해제의 용도를 제공하며, 상

기 약제는 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과 조합하여 투여하기 위한 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 양상에서, 방관자 종양의 치료 또는 예방용 약제의 제조에 있어서 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제의 용도를 제공한다.

[0013] 본 발명의 부가의 양상에서, 방관자 종양의 치료 또는 예방용 약제의 제조에 있어서 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공하며, 상기 약제는 면역 체크포인트 저해제와 조합하여 투여하기 위한 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 양상에서, 방관자 종양의 치료 또는 예방용 약제의 제조에 있어서 면역 체크포인트 저해제의 용도를 제공하며, 상기 약제는 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과 조합하여 투여하기 위한 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양상에서, 종양 치료 또는 방관자 종양의 치료 또는 예방을 위해 면역 체크포인트 저해제와 조합하는 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 양상에서, 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 함께, 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 부가의 양상에서, 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를 포함하는 키트를 제공한다.

과제의 해결 수단

발명의 효과

도면의 간단한 설명

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] ***정의***

[0019] 달리 정의하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련된 자가 일반적으로 이해하는 것과 같은 의미를 갖는다. 본원에 개시된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 수행 또는 시험에 사용될 수 있고, 바람직한 방법 및 물질이 개시되어 있다. 본 발명의 목적상, 다음 용어들이 이하에 정의되어 있다.

[0020] 본원에 사용된 단수 용어들은 물품의 하나 또는 하나보다 많은 (즉, 2개 이상) 문법적 대상을 의미한다. 한 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나보다 많은 요소를 의미한다.

[0021] 본원에 사용된, "약"이란 용어는 참조 수량, 수준, 값, 치수, 크기 또는 양에 대해 30%, 25%, 20%, 15% 또는 10% 만큼 다른 수량, 수준, 값, 치수, 크기 또는 양을 의미한다.

[0022] 본 명세서 전반에서, 문맥상 달리 요구하지 않는 한, "포함한다", "포함하고" 및 "포함하는"이란 용어는 진술한 단계 또는 요소 또는 단계들이나 요소들의 그룹의 내포를 암시하는 것으로 이해되어야 하지만, 임의의 다른 단계 또는 요소 또는 단계들이나 요소들의 그룹을 배제하는 것은 아니다.

[0023] 알킬"이란 용어는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 선택적으로 치환된 선형 및 분지형 탄화수소 기를 의미한다. 적당한 경우, 알킬기는 특정한 수의 탄소 원자를 보유할 수 있고, 예컨대 선형 또는 분지형 배열의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬기를 포함하는 $-C_1-C_6$ 알킬일 수 있다. 알킬기의 비제한적 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, *s*- 및 *t*-부틸, 펜틸, 2-메틸부틸, 3-메틸부틸, 헥실, 2-메틸펜틸, 3-메틸펜틸, 4-메틸펜틸, 2-에틸부틸, 3-에틸부틸, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 도데실, 트리데실, 테트라데실 및 펜타데실을 포함한다.

[0024] "알케닐"이란 용어는 2 내지 20개의 탄소 원자를 가지며 하나 이상의 이중 결합을 보유하는, 선택적으로

치환된, 불포화 선형 또는 분지형 탄화수소를 의미한다. 적당한 경우, 알케닐기는 특정한 수의 탄소 원자를 보유할 수 있고, 예컨대 선형 또는 분지형 배열의 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 알케닐기를 포함하는 C_2-C_6 알케닐일 수 있다. 알케닐기의 비제한적 예로는 에테닐, 프로페닐, 이소프로페닐, 부테닐, *s*- 및 *t*-부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 헵트-1,3-디엔, 헥스-1,3-디엔, 논-1,3,5-트리엔 및 이의 유사물을 포함한다.

[0025] "알키닐"이란 용어는 2 내지 20개의 탄소 원자를 가지며 하나 이상의 삼중 결합을 보유하는, 선택적으로 치환된 불포화 선형 또는 분지형 탄화수소를 의미한다. 적당한 경우, 알키닐기는 특정한 수의 탄소 원자를 보유할 수 있고, 예컨대 선형 또는 분지형 배열의 2, 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 알키닐기를 포함하는 C_2-C_6 알키닐일 수 있다. 비제한적 예로는 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐 및 헥시닐을 포함한다.

[0026] "시클로알킬" 및 "카르보시클릭 (carbocyclic)"이란 용어는 선택적으로 치환된 포화 또는 불포화 모노시클릭, 비시클릭 또는 트리시클릭 탄화수소 기를 의미한다. 적당한 경우, 시클로알킬기는 특정한 수의 탄소 원자를 보유할 수 있고, 예컨대 C_3-C_6 시클로알킬은 3, 4, 5 또는 6개의 탄소 원자를 갖는 카르보시클릭 기이다. 비제한적 예로는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로펜테닐, 시클로헥실, 시클로헥세닐, 시클로헥사디에닐 및 이의 유사물을 포함할 수 있다.

[0027] "아릴"은 각 고리에 7개 이하의 원자를 갖는 C_6-C_{14} 원성 (membered) 모노시클릭, 비시클릭 또는 트리시클릭 카르보시클릭 고리 시스템을 의미하며, 상기 적어도 하나의 고리는 방향족이다. 아릴기의 예로는 페닐, 나프틸, 테트라히드로나프틸, 인다닐 및 비페닐을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 아릴은 1 내지 3개의 벤젠 고리를 포함할 수 있다. 2개 또는 그 이상의 방향족 고리가 존재한다면, 상기 고리들은 함께 융합되어 인접 고리들이 공통 결합을 공유할 수 있다.

[0028] 각 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬 및 아릴은 개별 실재물 (entity)이든지 또는 더 큰 실재물의 일부로서, 하나 이상의 선택적 치환기로 선택적으로 치환될 수 있으며, 그 예로는 C_{1-6}알킬, C_{2-6}알케닐, C_{3-6}시클로알킬, 옥소 (=O), -OH, -SH, C_{1-6}알킬O-, C_{2-6}알케닐O-, C_{3-6}시클로알킬O-, C_{1-6}알킬S-, C_{2-6}알케닐S-, C_{3-6}시클로알킬S-, $-CO_2H$, $-CO_2C_{1-6}$알킬, $-NH_2$, $-NH(C_{1-6}$알킬), $-N(C_{1-6}$알킬$)_2$, -NH(페닐), $-N(페닐)_2$, -CN, $-NO_2$, -할로겐, $-CF_3$, $-OCF_3$, $-SCF_3$, $-CHF_2$, $-OCHF_2$, $-SCHF_2$, -페닐, $-C_{1-6}$알킬페닐, -O페닐, -C(O)페닐, $-C(O)C_{1-6}$알킬로 이루어진 그룹 중에서 선택된다. 적당한 치환기의 예로는 비제한적으로 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, *sec*-부틸, *tert*-부틸, 비닐, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 메틸티오, 에틸티오, 프로필티오, 이소프로필티오, 부틸티오, 히드록시, 히드록시메틸, 히드록시에틸, 히드록시프로필, 히드록시부틸, 플루오로, 클로로, 브로모, 요오도, 시아노, 니트로, $-CO_2H$, $-CO_2CH_3$, $-C(O)CH_3$, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메톡시, 트리플루오로메틸티오, 디플루오로메틸, 디플루오로메톡시, 디플루오로메틸티오, 모르폴리노, 아미노, 메틸아미노, 디메틸아미노, 페닐, 페녹시, 페닐카르보닐, 벤질 및 아세틸을 포함한다.

[0029] 상기 에폭시티글리안 화합물은 약학적으로 허용가능한 염 형태일 수 있다. 그러나, 비-약학적으로 허용가능한 염도 본 발명의 범위에 속하는 것으로 이해되어야 하며, 그 이유는 이들이 약학적으로 허용가능한 염의 제조에서 중간체로서 유용할 수 있거나, 또는 저장 또는 수송에 유용할 수 있기 때문이다. 적당한 약학적으로 허용가능한 염으로는 비제한적으로 약학적으로 허용가능한 무기산, 예컨대 염산, 황산, 인산, 질산, 탄산, 붕산, 술팜산 및 브롬화수소산의 염, 또는 약학적으로 허용가능한 유기산, 예컨대 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 타르타르산, 말레산, 히드록시말레산, 푸마르산, 말레산, 시트르산, 락트산, 뮤신산, 글루콘산, 벤조산, 숙신산, 옥살산, 페닐아세트산, 메탄술폰산, 톨루엔술폰산, 벤젠술폰산, 살리시클릭 술파닐산 (salicyclic sulphanilic acid), 아스파르트산, 글루탐산, 에데트산, 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 라우르산, 판토텐산, 탄닌산 (tannic acid), 아스코르브산 및 발레르산의 염을 포함한다.

[0030] 염기 염 (Base salts)으로는 비제한적으로 약학적으로 허용가능한 양이온, 예컨대 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 마그네슘, 암모늄 및 알킬암모늄으로 형성된 것을 포함한다.

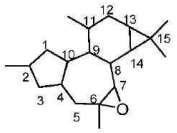
[0031] 염기성 질소-함유 기는 저급 알킬 할라이드, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 클로리드, 브로미드 및 요오디드; 디알킬 술페이트, 예컨대 디메틸 및 디에틸 술페이트 등과 같은 제제로 4차화될 수 있다.

[0032] 또한, 에폭시티글리안 화합물은 비대칭 중심을 보유할 수 있고, 그러므로 하나 초과의 입체이성질체 형태로 존재할 수 있다는 것도 인식할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명은 또한 하나 이상의 비대칭 중심에서 실질적으로 순수한 이성질체 형태, 예컨대 약 90% 초과 ee, 예컨대 약 95% 또는 97% ee 또는 99% 초과 ee인 화합물뿐만

아니라 이의 혼합물, 예컨대 라세미 혼합물에 관한 것이다. 이러한 이성질체는 천연 공급원에서 분리하거나, 예컨대 키랄 중간체를 사용하여 비대칭 합성하거나, 또는 키랄 분할하여 수득될 수 있다. 본 발명의 화합물은 기하학적 이성질체로서 존재할 수 있다. 또한, 본 발명은 실질적으로 순수한 *시스*(Z) 또는 *트란스*(E) 형태의 화합물 또는 이의 혼합물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 화합물은 식물 또는 식물의 일부로부터 분리하여 수득되거나, 또는 분리된 화합물을 유도체화하거나, 또는 관련 화합물을 유도체화하여 수득될 수 있다. 분리 절차 및 유도체화 절차는 WO 2007/070985 및 WO2014/169356에서 찾을 수 있다.

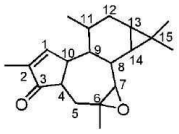
[0034] "에폭시티글리안 화합물"이란 용어는 다음과 같은 기본 탄소 시클릭 구조를 갖는 화합물을 의미한다:



[0035] .

[0036] 상기 화합물은 융합된 시클로프로판 고리가 6원 고리에 부착되어 있는 트리시클로[9.3.0.0]테트라데칸 시스템을 갖는다. 에폭시드는 6,7-위치에서 7원 고리에 융합되어 있다.

[0037] 에폭시티글리안 화합물의 한 예는 에폭시티글리엔-3-온 화합물이다. 상기 "에폭시티글리엔-3-온 화합물"이란 용어는 상기 정의한 에폭시-티글리안 구조를 보유하고, 5원 고리가 1,2-엔-3-온 구조를 갖는 하기 화합물을 의미한다:



[0038] .

[0039] 본원에 사용된 "방관자 종양"이란 용어는 에폭시티글리안 화합물로 치료되는 종양 이외의 종양을 의미한다. 상기 방관자 종양은 원발성 종양 또는 전이 종양일 수 있다.

[0040] 본원에 사용된 "조합하는"이란 용어는 에폭시티글리안 화합물 및 ICI가 단일 조성물로 또는 개별 조성물로, 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것을 의미한다. 상기 에폭시티글리안 화합물 및 ICI는 상이한 시점 및 상이한 빈도로 투여될 수 있지만, 조합 시에 이들은 동일한 시점에서 또는 겹쳐진 시점에서 생물학적 효과를 발휘한다. 예를 들어, 에폭시티글리안 화합물이 투여될 때 면역 반응에 영향을 주기 위해 ICI가 투여된다.

[0041] **치료 방법**

[0042] 본 발명은 방관자 종양을 포함하는 종양을 치료하는 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은 면역 체크포인트 저해제 (ICI)와 조합하여 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 또한 ICI와 조합하여 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 단계를 포함하는 방관자 종양을 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0043] 일부 구현예에서, 치료되는 종양은 에폭시티글리안 화합물이 상기 종양에 직접 국소 방식으로 전달될 수 있는 종양이다. 특정 구현예에서, 상기 종양은 피부 종양 또는 피하 종양 또는 체외로부터 접근가능한 종양, 예를 들어, 촉지성 (palpable) 종양이다. 다른 구현예에서, 상기 종양은 내부 종양이다. 일부 구현예에서, 상기 종양이 내부에 위치한 종양인 경우, 국소 전달은 수술 중에 상기 종양이 노출되어 에폭시티글리안 화합물이 주사될 수 있을 때 달성된다. 다른 구현예에서, 상기 종양은 내부에 위치하고, 상기 에폭시티글리안 화합물은 영상화 기법 (imaging technique), 예를 들어 내시경 초음파 (endoscopic ultrasound) 또는 정위적 영상법 (stereotactic imaging)에 의해 유도된 주사에 의해 전달된다.

[0044] 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 하나 이상의 종양에 전신으로 전달된다.

[0045] 일부 구현예에서, 상기 종양은 양성 (benign) 종양이다. 다른 구현예에서, 상기 종양은 악성 (malignant) 종양이다. 일부 구현예에서, 상기 종양은 원발성 종양이고, 다른 구현예에서, 상기 종양은 전이 종양이다. 피부 종양의 예로는 지루 각화증 (seborrheic keratosis), 광선 각화증 (actinic keratosis), 결절 BCC, 표재 BCC, 침윤성 BCC 및 미세결절 BCC 포함 기저 세포 암종 (basal cell carcinoma: BCC), 인-시투 (*in-situ*) 편평 세포 암종 및 침습 편평 세포 암종 포함 편평 세포 암종, 표재 확산 흑색종 (superficial spreading melanoma), 결

절 흑색종 (nodular melanoma), 악성 흑색점 흑색종 (lentigo maligna melanoma), 말단 흑색점 흑색종 (acral lentginous melanoma) 및 결합조직형성 (desmoplastic)/신경영양 (neutropic) 흑색종 포함 흑색종, 피부 B 세포 림프종 및 피부 T 세포 림프종을 포함한다. 피하 종양의 예로는 혈관각화종 (angiokeratoma), 화농 육아종 (pyogenic granuloma), 버찌 혈관종 (cherry angioma), 토리 종양 (glomus tumour), 혈관육종, 카포시 육종 (karposi sarcoma), 유잉 육종 (Ewings sarcoma), 악성 섬유 조직구종, 평활근육종, 횡문근육종, 지방육종, 윤활막 육종 (synovial sarcoma), 간질 육종 (stromal sarcoma), 위장관 간질 육종, 악성 말초 신경집 종양 (malignant peripheral nerve sheath tumour), 원시 신경외배엽 종양 (primitive neuroectodermal tumour), 신경섬유종, 메르켈 세포 암종 (Merkel cell carcinoma), 피부섬유종 (dermatofibroma), 섬유육종 (fibrosarcoma), 상피모양 육종 (epithelioid sarcoma) 및 비만세포종 (비만 세포 종양)을 포함한다.

[0046] 상기 내부 종양은 수술 중 주사 또는 유도 주사로 접근가능한 종양 또는 에폭시티글리안 전신 투여로 치료될 수 있는 종양일 수 있고, 뇌, 폐, 결장, 표피모양, 편평 세포, 방광, 위, 췌장, 유방, 두부 (head), 경부 (neck), 신장계, 콩팥 (kidney), 간, 난소, 전립선, 자궁, 식도, 고환, 자궁경부, 질, 갑상선 또는 피부 종양을 포함한다.

[0047] 상기 방관자 종양은 에폭시티글리안 화합물로 치료되는 종양 이외의 임의의 종양일 수 있다. 예를 들어, 상기 방관자 종양은 속발성 피부 또는 피하 종양일 수 있거나 또는 이는 다른 장기 또는 조직내 종양일 수 있다. 방관자 종양의 예로는 뇌, 폐, 결장, 표피모양, 편평 세포, 방광, 위, 췌장, 유방, 두부, 경부, 신장계, 콩팥, 간, 난소, 전립선, 자궁, 식도, 고환, 자궁경부, 질, 갑상선 또는 피부 종양을 포함한다.

[0048] 일부 구현예에서, 상기 방관자 종양은 추가의 원발성 종양이고, 다른 구현예에서, 상기 방관자 종양은 전이 종양이다.

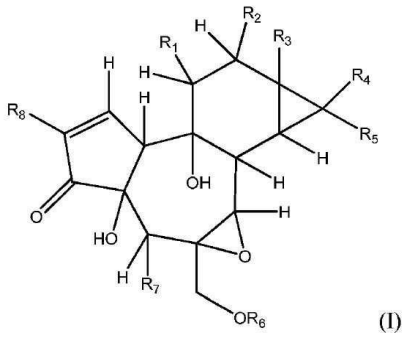
[0049] 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물로 치료되는 종양은 원발성 종양이고, 상기 방관자 종양은 전이 종양이다. 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물로 치료되는 종양은 전이 종양이고, 상기 방관자 종양은 원발성 종양이다. 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물로 치료되는 종양 및 방관자 종양 모두는 원발성 종양이다. 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물로 치료되는 종양 및 방관자 종양 모두는 전이 종양이다.

[0050] 일부 구현예에서, 상기 병용 요법으로 방관자 종양 발생을 방지하거나 또는 방관자 종양 발생을 지연시킨다. 일부 구현예에서, 상기 병용 요법으로 상기 방관자 종양 크기를 감소시킨다.

[0051] *에폭시티글리안 화합물*

[0052] 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 6,7-에폭시티글리안 화합물이다. 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 에폭시티글리-1,2-엔-3-온 화합물이다. 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 6,7-에폭시티글리-1,2-엔-3-온 화합물이다.

[0053] 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 그의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염이다:



(I)

[0054]

[0055] 상기에서

[0056] R_1은 수소 또는 C_{1-6}알킬이고;

[0057] R_2는 -OH 또는 $-OR_9$이며;

[0058] R_3은 -OH 또는 $-OR_9$이고;

[0059] R_4 및 R_5는 독립적으로 수소 및 C_{1-6}알킬로부터 선택되며;

[0060] R_6은 수소 또는 $-R_{10}$이고;

[0061] R_7은 히드록시 또는 $-OR_{10}$이며;

[0062] R_8은 수소 또는 C_{1-6}알킬이고;

[0063] R_9는 $-C_{1-20}$알킬, $-C_{2-20}$알케닐, $-C_{2-20}$알키닐, $-C(O)C_{1-20}$알킬, $-C(O)C_{2-20}$알케닐, $-C(O)C_{2-20}$알키닐, -C(O)시클로알킬, $-C(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-C(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-C(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬, -C(O)아릴, $-C(O)C_{1-10}$알킬아릴, $-C(O)C_{2-10}$알케닐아릴, $-C(O)C_{2-10}$알키닐아릴, $-C(O)C_{1-10}$알킬$C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)R_{11}$, $-C(O)C_{1-10}$알킬$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-C(O)C_{1-10}$알킬SR_{11}, $-C(O)C_{2-10}$알케닐SR_{11}, $-C(O)C_{2-10}$알키닐SR_{11}, $-C(O)C_{1-10}$알킬$C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)OR_{11}$, $-C(O)C_{1-10}$알킬$C(O)SR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)SR_{11}$, $-C(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)SR_{11}$,



또는

[0064] 

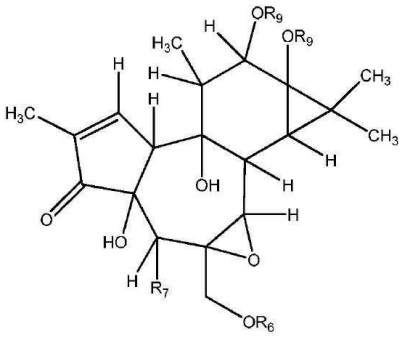
이며;

[0065] R_{10}은 $-C_{1-6}$알킬, $-C_{2-6}$알케닐, $-C_{2-6}$알키닐, $-C(O)C_{1-6}$알킬, $-C(O)C_{2-6}$알케닐, $-C(O)C_{2-6}$알키닐, -C(O)아릴, $-C(O)C_{1-6}$알킬아릴, $-C(O)C_{2-6}$알케닐아릴, $-C(O)C_{2-6}$알키닐아릴이고;

[0066] R_{11}은 수소, $-C_{1-10}$알킬, $-C_{2-10}$알케닐, $-C_{2-10}$알키닐, 시클로알킬 또는 아릴이며;

[0067] 상기 각 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬 또는 아릴기는 선택적으로 치환된다.

[0068] 일부 구현예에서, 상기 화학식 (I)의 에폭시티글리안 화합물은 하기 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 기하학적 이성질체 또는 입체이성질체 또는 약학적으로 허용가능한 염이다:

[0069] 

(II)

[0070] 상기 R_6, R_7 및 R_9는 화학식 (I)에서 정의된 바와 같다.

[0071] 상기 화학식 (I) 또는 (II)의 특정 구현예에서, 하기 중 하나 이상이 적용된다:

[0072] R_1은 $-C_{1-3}$알킬, 구체적으로 $-CH_3$이고;

[0073] R_2는 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐, $-OC(O)C_{2-20}$알키닐, -OC(O)시클로알킬, $-OC(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-OC(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬, -OC(O)아릴, $-OC(O)C_{1-10}$알킬아릴, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐아릴, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐아릴, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)R_{11}$,

$-OC(O)C_{1-10}$알킬$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬SR_{11}, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐SR_{11}, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐SR_{11}, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)SR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)SR_{11}$ 또는 $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)SR_{11}$; 구체적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐, $-OC(O)C_{2-20}$알키닐, $-OC(O)$시클로알킬, $-OC(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-OC(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬 또는 $-OC(O)$아릴; 보다 구체적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐 또는 $-OC(O)C_{2-20}$알키닐이며;

[0074] R_3은 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐, $-OC(O)C_{2-20}$알키닐, $-OC(O)$시클로알킬, $-OC(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-OC(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬, $-OC(O)$아릴, $-OC(O)C_{1-10}$알킬아릴, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐아릴, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐아릴, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)R_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$CH(OR_{11})(OR_{11})$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬SR_{11}, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐SR_{11}, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐SR_{11}, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)OR_{11}$, $-OC(O)C_{1-10}$알킬$C(O)SR_{11}$, $-OC(O)C_{2-10}$알케닐$C(O)SR_{11}$ 또는 $-OC(O)C_{2-10}$알키닐$C(O)SR_{11}$; 구체적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐, $-OC(O)C_{2-20}$알키닐, $-OC(O)$시클로알킬, $-OC(O)C_{1-10}$알킬시클로알킬; $-OC(O)C_{2-10}$알케닐시클로알킬, $-OC(O)C_{2-10}$알키닐시클로알킬 또는 $-OC(O)$아릴; 보다 구체적으로 $-OC(O)C_{1-20}$알킬, $-OC(O)C_{2-20}$알케닐 또는 $-OC(O)C_{2-20}$알키닐이고;

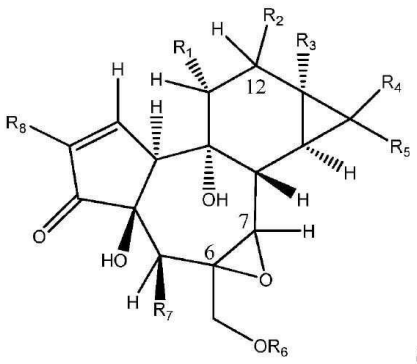
[0075] R_4 및 R_5는 독립적으로 $-C_{1-3}$알킬로부터 선택되고, 구체적으로 $-CH_3$이며;

[0076] R_6은 수소, $-C(O)C_{1-6}$알킬, $-C(O)C_{2-6}$알케닐, $-C(O)C_{2-6}$알키닐 또는 $-C(O)$아릴; 구체적으로 수소, $-C(O)C_{1-3}$알킬, $-C(O)C_{2-3}$알케닐 또는 $-C(O)C_{2-3}$알키닐, 보다 구체적으로 수소 또는 $-C(O)CH_3$이고;

[0077] R_7은 히드록실, $-OC(O)C_{1-6}$알킬, $-OC(O)C_{2-6}$알케닐 또는 $-OC(O)C_{2-6}$알키닐, 구체적으로 히드록실, $-OC(O)C_{1-3}$알킬, $-OC(O)C_{2-3}$알케닐 또는 $-OC(O)C_{2-3}$알키닐, 보다 구체적으로 히드록실 또는 $-OC(O)CH_3$이며;

[0078] R_8은 $-C_{1-3}$알킬, 구체적으로 $-CH_3$이다.

[0079] 일부 구현예에서, 상기 화학식 (I) 및/또는 (II)의 화합물은 하기 화학식 (III)에 개시된 바와 같은 입체화학을 갖는다:



(III)

[0080] .

[0081] 일부 구현예에서, 6,7-위치의 에폭시드는 고리 시스템의 평면 위에 있다. 다른 구현예에서, 6,7-위치의 에폭시드는 고리 시스템의 평면 아래에 있다. 일부 구현예에서, 12 위치의 R_2 기는 *S*이고, 다른 구현예에서, 12 위치의 R_2 기는 *R*이다.

[0082] 특정 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 하기로부터 선택된다:

[0083] 12-티글로일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 1);

[0084] 12,13-디-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 2);

[0085] 12-헥사노일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 3);

[0086] 12,13-디헥사노일-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 4);

[0087] 12-미리스토일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 5);

[0088] 12-티글로일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13-펜타히드록시-20-아세틸옥시-1-티글리엔-3-온 (화합물 6);

[0089] 12-미리스토일-13-아세틸옥시-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 7);

[0090] 12-프로파노일-13-(2-메틸부타노일)-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 8);

[0091] 12,13-디티글로일-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 9); 및

[0092] 12-(2-메틸부타노일)-13-티글로일-6,7-에폭시-4,5,9,12,13,20-헥사히드록시-1-티글리엔-3-온 (화합물 10).

[0093] *면역 체크포인트 저해제 (ICI)*

[0094] ICI는 면역 세포 또는 면역 세포에서 면역 반응을 차단하는 암 세포 단백질을 저해하는 임의의 분자일 수 있고, 구체적으로 상기 면역 세포는 T 세포 또는 자연 살해 세포 (NK 세포)이다. 면역 세포 및 종양 세포 단백질의 예로는 종양 세포의 PD-L1에 결합하여 종양 세포에 대한 T 세포의 면역 반응을 차단하는 T 세포 상의 프로그램된 사멸 1 (Programmed Death 1: PD-1) 및 암 세포 상의 B7-1/B7-2 단백질에 결합하여 종양 세포에 대한 T 세포의 면역 반응을 차단하는 T 세포 상의 세포독성 T-림프구-결합 단백질 4 (CTLA-4) 단백질을 포함한다. 그러므로, ICI는 PD-1과 PD-L1/PDL2 또는 CTLA-4와 B7-1/B7-2가 결합하거나 또는 이의 상호작용을 차단하는 분자를 포함한다. 면역 세포에서 면역 반응을 차단하고 그의 작용을 방지하도록 조절할 수 있는 다른 면역 세포 단백질로는 아데노신 A2A 수용체, B7-H3, B7-H4, 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO), 살해-세포 면역글로불린 유사 수용체 (KIR), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG3), IG 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체 (T cell immunoreceptor with IG and ITIM domains: TIGIT), T-세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3 (TIM-3), CD96 및 T 세포 활성화의 V-도메인 면역글로불린 억제인자 (VISTA)를 포함한다.

[0095] ICI의 예로는 이에 한정되는 것은 아니지만, PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, B7-1/B7-2 단백질, 아데노신 A2A 수용체, B7-H3, B7-H4, IDO, KIR, LAG3, TIM-3, TIGIT, CD96 및 VISTA의 길항제, 구체적으로 PD-1, PD-L1, CTLA-4 또는 B7-1/B7-2 단백질의 길항제, 보다 구체적으로 PD-1 또는 CTLA-4의 길항제를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 길항제는 면역 체크포인트 단백질에 대한 항체, 예를 들어 항-PD-1 항체 또는 항-CTLA-4 항체이다. 다른 구현예에서, 특정 길항제는 IDO의 길항제이다.

[0096] *조성물*

[0097] 상기 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 ICI는 니트 (neat)하게 투여될 수 있고, 이는 에폭시티글리안 화합물 및 ICI를, 각 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 및/또는 부형제와 함께 하나 이상의 약학적 조성물의 형태로 투여하는 것이 보다 편리할 수 있다.

[0098] 약학적 용도 및 조성물에 대한 제형 및 비율은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0099] 특정 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 치료되는 종양 상에 또는 종양 내로 직접 투여를 위해 제제화된다. 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 치료되는 종양 상에 직접 적용될 수 있는 겔, 연고, 로션, 크림 또는 경피 패치 형태의 국소 투여를 위해 제제화된다. 다른 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물은 주사용으로, 구체적으로 종양내 주사를 위해 제제화되고, 상기 화합물은 종양내 하나 이상의 위치에 주사된다.

[0100] 상기 ICI는 전신 또는 국소로 분자를 전달할 수 있는 임의의 수단으로 투여될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 ICI가 항체인 경우, 상기 분자는 주사로, 예를 들어 정맥내, 관절내, 근육내, 피부내, 피하 또는 복강내 주사로 편리하게 전달된다. 상기 ICI는 또한 주사, 예를 들어 종양내 주사에 의한 국소 전달용으로 제제화될 수 있다. 전신 또는 국소 투여를 위한 약학적으로 허용가능한 담체 및 허용가능한 담체는 또한 ICI의 조성물로 혼입될 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물 및 ICI는 개별적으로, 동시에 또는 순차적으로 전달된다. 다른 구현예에서, 상기 에폭시티글리안 화합물 및 ICI는 단일 조성물, 예를 들어 종양내 전달에 적합한 단일 조성물 또는 전신 전달용으로 제제화된 단일 조성물로 전달된다.

[0102] 본 발명의 다른 양상에서, 에폭시티글리안 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 및 면역 체크포인트 저해제를, 선택적으로 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0103] 적당하게, 상기 약학적 조성물(들)은 약학적으로 허용가능한 부형제 또는 허용가능한 부형제를 포함한다. "약학적으로 허용가능한 부형제"란, 안전하게 사용될 수 있는 고체 또는 액체 충전제, 희석제 또는 캡슐화 물질을 의미한다. 특정 투여 경로에 따라, 당업계에 잘 알려져 있는 다양한 담체가 사용될 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제는 당, 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 시클로덱스트린, 맥아, 젤라틴 또는 다른 겔화제, 폴리머, 탈크, 황산칼슘, 식물성 오일, 합성 오일, 알콜 및/또는 폴리올, 알긴산, 포스페이트 완충 용액, 유화제, 등장성 식염수 및 발열원 제거수를 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0104] 액체 형태의 제제는 용액, 현탁액 및 에멀젼, 예를 들어 수용액 또는 프로필렌 글리콜 수용액을 포함한다. 예를 들어, 비경구 주사용 액체 제제는 수성 1,2-프로판디올, 디메틸술폭시드 (DMSO), 감마 시클로덱스트린 또는 2-히드록시프로필-베타-시클로덱스트린의 수용액, 식염수 용액 또는 폴리에틸렌 글리콜 용액으로서, 완충액과 함께 또는 완충액 없이 제제화될 수 있다. 바람직한 pH 범위는 3.0 내지 4.5이다. 적당한 완충액은 제제를 pH 3.5 내지 4.5로 완충시키고, 비제한적으로 아세테이트 완충액 및 시트레이트 완충액을 포함한다.

[0105] 따라서, 에폭시티글리안 화합물 및/또는 ICI의 조성물은 비경구 투여 (예: 볼루스 (bolus) 주사 또는 연속 인퓨젼과 같은 주사)를 위해 제제화될 수 있고, 앰플, 사전충전된 주사기, 소용량 인퓨젼 또는 보존제가 첨가된 다중용량 용기 내에 단위 용량 형태로 제공될 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클에 현탁액, 용액, 겔 또는 에멀젼과 같은 형태일 수 있고, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산화제와 같은 제제화제 (formulatory agents)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 멸균 고체의 무균 분리에 의해 또는 용액으로부터 동결건조에 의해 수득되는 분말 형태로 존재할 수 있고, 사용 전에 적당한 비히클, 예컨대 멸균된 발열원 제거수에 의해 구성될 수 있다.

[0106] 투여에 적합한 에폭시티글리안 화합물 및/또는 ICI의 약학적 조성물은 본 발명의 하나 이상의 약학적으로 활성인 화합물 또는 추출물의 소정량을, 분말 또는 과립으로서, 또는 수성 액체, 시클로덱스트린 용액, 비-수성 액체, 수중유 에멀젼 또는 유중수 에멀젼 중의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 크림 또는 겔 중의 용액 또는 현탁액으로서, 또는 에폭시티글리안 화합물을 포함하는 마이크로입자 또는 나노입자, 예컨대 비제한적으로 실리카 또는 폴리락티드 마이크로입자 또는 나노입자의 현탁액으로서 주사기, 바이알, 튜브 또는 사세 (sachet)와 같은 분리 단위로 제공될 수 있다. 이러한 조성물은 임의의 제약 방법으로 제조될 수 있지만, 모든 방법은 본 발명의 하나 이상의 약학적으로 활성인 화합물을 하나 이상의 필수 성분들을 구성하는 담체와 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 상기 조성물은 본 발명의 활성제를 액체 담체 또는 미분형 고체 담체 또는 이들 모두와 균일하고 세밀하게 혼합하고, 그 다음에 필요하다면 산물을 원하는 형상으로 성형함으로써 제조된다.

[0107] 표피 또는 다른 장기에 국소 투여하기 위해서, 본 발명에 따른 화합물은 겔, 연고, 에멀젼, 페이스트, 크림 또는 로션으로, 또는 경피용 패치로 제제화될 수 있다. 겔은 적당한 증점제를 사용하고, 화합물의 수성/알콜성 조성물에 이를 첨가하여 제조될 수 있다. 적당한 증점제 또는 겔화제는 당해 기술분야에 알려져 있고, 예컨대 폴리비닐 카르복시 폴리머 Carbomer 940이 있다. 연고 및 크림은 예컨대 적당한 증점제 및/또는 겔화제를 첨가하여 수성 또는 유성 베이스로 제제화될 수 있다. 로션은 수성 또는 유성 베이스로 제제화될 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 유화제, 안정화제, 분산화제, 현탁화제, 증점제 또는 착색제를 함유할 것이다.

[0108] 또한, 국소 투여에 적합한 제제는 배스 (bath) 또는 침지 용액 또는 스프레이 형태로 국소로 투여될 수 있거나 또는 드레싱으로 흡수될 수 있는 용액 또는 현탁액을 포함한다.

[0109] 상기 ICI가 소분자일 때, 이는 약학 분야에 알려져 있는 바와 같이 경구, 국소, 직장, 비경구, 설하, 볼, 정맥내, 관절내, 근육내, 피부내, 피하, 흡입, 안구내, 복강내, 뇌실내, 경피 등을 포함하는 임의의 적당한 수단으로 전달될 수 있다.

[0110] *용량 용법*

[0111] 일부 구현예에서, 에폭시티글리안 화합물은 ICI와 동일한 조성물로 전달된다. 그러나, 특정 구현예에서, 상기 ICI는 상기 에폭시티글리안 화합물과 별도의 조성물로 투여된다.

[0112] 일부 구현예에서, 에폭시티글리안 화합물은 국소 투여 또는 종양내 주사와 같이 종양에 직접 투여된다.

[0113] 일부 구현예에서, 에폭시티글리안 화합물은 종양에 1회 투여된다. 다른 구현예에서, 치료된 종양은 모니터되고, 상기 종양이 상기 치료에 완전히 반응하지 않았다면 에폭시티글리안 화합물의 추가적 투여를 필요

로 할 수 있다. 상기 종양이 국소로 치료되는 구현예에서, 에폭시티글리안 화합물은 일정 기간에 걸쳐 수회, 예를 들어, 1주일 동안 매일, 또는 4 내지 10주 동안 주 1회로 투여될 수 있다. 치료되는 대상을 모니터링하는 당업자는 적절한 투여 일정을 결정할 수 있으며, 이는 치료에 대한 반응에 따라 변경될 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, ICI는 에폭시티글리안 화합물 투여 이전에 또는 동시에 또는 그 이후에 적어도 1회 투여된다. 특정 구현예에서, ICI의 다회 용량을 에폭시티글리안 화합물의 투여 전 또는 투여와 함께 시작하여 에폭시티글리안 화합물 투여 후 계속되는 기간에 걸쳐 투여된다.

[0115] 일부 구현예에서, ICI는 에폭시티글리안 화합물 투여 전 및 후에 1회 초과 및 정기적으로 투여된다. 특정 구현예에서, ICI는 에폭시티글리안 화합물 투여 전, 에폭시티글리안 화합물 투여와 순차적 또는 동시에, 및 에폭시티글리안 화합물 투여에 후속하여 적어도 1회 투여된다. 예를 들어, ICI는 에폭시티글리안 화합물 투여하기 1주 내지 1일 전, 구체적으로 에폭시티글리안 화합물 투여하기 1 내지 3일 전, 보다 구체적으로 약 2일 전에 투여될 수 있고, 그 다음에 ICI는 에폭시티글리안 화합물 투여 직전 또는 직후에 에폭시티글리안 화합물과 순차적 또는 동시에 투여되고, 그 다음에 ICI는 에폭시티글리안 화합물을 투여하고 다음 달에 걸쳐 1회 이상, 예를 들어, 매주 1회, 매 5일 1회, 매 4일 1회, 매 3일 1회, 매 2일 1회 또는 매일, 구체적으로 매 1 내지 3일 1회, 보다 구체적으로 매 2일 1회로 투여된다. ICI 후속 투여는, 에폭시티글리안 화합물 투여 후에 ICI가 1 내지 10회 용량, 구체적으로 1 내지 8회 용량, 1 내지 6회 용량, 1 내지 4회 용량, 1 내지 3회 용량 또는 1 내지 2회 용량이 투여되도록 계속될 수 있다.

[0116] 특정 구현예에서, ICI는 에폭시티글리안 화합물 투여 2일 전에, 에폭시티글리안 화합물과 순차적으로 (투여 직전 또는 직후), 그 다음에 에폭시티글리안 화합물 투여 후 6일 동안 2일 마다 투여된다.

[0117] 에폭시티글리안 화합물은 유효한 양으로 투여된다. "유효한 양"은 적어도 부분적으로 원하는 반응을 얻는데 필요한 양, 예컨대 종양 크기 감소 또는 전체 종양 파괴에 필요한 양을 의미한다. 이러한 양은 치료받는 개체의 건강 및 신체 상태, 치료받는 개체의 분류학적 그룹, 조성물의 제제, 종양 크기, 의학적 상황의 평가, 및 기타 관련 요인들에 따라 달라진다. 이러한 양은 통상의 실험들을 통해 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위에 속할 것으로 예상된다. 유효한 양은 예를 들어 투여량(dosage) 당 약 0.1 ng/체중 kg 내지 1 g/체중 kg 범위일 수 있다. 투여량은 투여량당 1 ㎍ 내지 0.5 g/체중 kg 범위, 예컨대 투여량당 0.1 ㎍ 내지 100 mg/체중 kg 범위인 것이 바람직하다. 일 구현예에서, 상기 투여량이 종양내로 투여되는 경우, 상기 투여량은 50 ng 내지 100 mg/체중 kg 범위, 예를 들어 0.1 mg 내지 5 mg/체중 kg 범위, 0.1 내지 1 mg/체중 kg 범위, 예컨대 0.25 mg/체중 kg이다. 다른 구현예에서, 투여량은 투여량당 0.001 mg 내지 20 mg, 예를 들어 투여량당 0.005 mg 내지 15 mg, 구체적으로 투여량당 0.05 내지 10 mg, 보다 구체적으로 약 0.1 내지 약 5 mg 범위이다. 용량 용법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 투여가 종양내인 경우, 에폭시티글리안 화합물은 1회 투여되고 치료 진행이 모니터된다. 일부 구현예에서, 종양이 완전히 분해되지 않거나 또는 종양이 재발되면, 제2 투여량이 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 투여가 국소인 경우, 국소용 화합물 제제는 겔, 크림, 연고 또는 로션의 형태로 종양 부위에 직접 투여될 수 있다. 치료 빈도는 종양, 그의 크기, 치료되는 대상 등에 의존할 것이다. 일부 구현예에서, 국소용 제제는 종양이 분해될 때까지 매주 적용될 수 있다. 다른 구현예에서, 치료는 단회 치료일 수 있고, 제2 치료는 종양이 완전히 분해되지 않은 경우에만 투여될 수 있다.

[0118] ICI는 또한 유효한 양으로 투여될 수 있다. 다시, 고려되는 ICI의 유효한 양은 치료되는 대상, 그의 건강 및 물리적 상태, 존재하는 방관자 종양의 수, 조성물 제제 및 의학적 상황 평가에 의존할 것이다. ICI 양은 비교적 넓은 범위의 양에 속할 것으로 예상된다. 유효한 양은 약 0.1 ng/체중 kg 내지 약 500 mg/체중 kg, 100 μg/체중 kg 내지 100 mg/체중 kg, 1 mg/체중 kg 내지 50 mg/체중 kg, 1 mg/체중 kg 내지 20 mg/체중 kg 범위에 있을 수 있다. 다른 구현예에서, 실제 투여량은 투여량당 1 μg 내지 1 g, 예를 들어 100 μg 내지 750 mg 범위에 있을 수 있다.

[0119] 병용 요법으로 치료될 수 있는 대상은 포유동물, 조류, 어류와 같은 수생 동물, 또는 파충류이다. 일부 구현예에서, 상기 대상은 사람, 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 실험실 동물, 개 또는 고양이와 같은 반려 동물, 말, 당나귀 등과 같은 농장 동물, 암소, 황소, 돼지, 양, 염소, 사슴, 라마, 알파카 등과 같은 가축, 또는 사자, 표범, 치타, 코끼리, 지브라, 영양, 기린, 코알라, 캥거루 및 악어, 도마뱀, 뱀 등과 같은 파충류, 조류, 구체적으로 작은 앵무새 (budgerigar) 또는 카나리아, 야생 앵무새 (cockatoo), 잉꼬, 마코앵무새 (macaw), 앵무새 (parrot) 등과 같은 포획한 조류, 또는 어류, 구체적으로 열대 어류 (지브라 피쉬, 구피, 샴 투어 (Siamese fighting fish), 크라운 피쉬 (clown fish), 카디날 테트라 (cardinal tetra) 등), 돌고래, 고래 등과 같은 포

획한 어류를 포함하는 동물원 또는 야생생태 공원의 동물과 같은 포획된 야생 동물이다. 특정 구현예에서, 상기 대상은 인간 또는 반려 동물이다.

[0120] *키트*

[0121] 에폭시티글리안 화합물 및 ICI의 조성물은 개별로 제제화 및 키트 또는 패키지로 함께 판매될 수 있다. 각 키트는 종양 치료를 달성하고 하나 이상의 방관자 종양을 치료 또는 예방하는 각 화합물의 투여량을 포함할 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, 에폭시티글리안 조성물은 겔, 로션, 크림 또는 연고와 같은 국소 투여용으로 제제화되거나 또는 드레싱으로 함침된다. 다른 구현예에서, 에폭시티글리안 화합물은 종양내 주사와 같은 주사용으로 제제화된다. 이러한 구현예에서, 에폭시티글리안 제제는 키트내에 주사기로 흡수될 준비가 된 액체, 주사 전에 담체에 용해될 수 있는 분말 또는 고체 제제로 존재할 수 있거나, 또는 키트내에 사전-충전된 주사기로 존재할 수 있다.

[0123] 각 키트는 에폭시티글리안 화합물을 1회 이상의 용량으로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 상기 키트는 종양내 주사에 적합한 제제 형태의 에폭시티글리안 화합물 단회 용량을 포함할 것이다. 다른 구현예에서, 상기 키트는 종양으로의 적용을 위한 다회 용량으로 포함하는 에폭시티글리안 화합물의 국소 제제를 포함할 것이다.

[0124] 일부 구현예에서, ICI는 단회 볼루스 용량 또는 다회 용량 형태로 비경구 투여를 위해 제제화된다. 예를 들어, 상기 키트는 사전-충전된 주사기 형태, 주사기에 흡수 준비된 바이알 중의 액체, 또는 주사기 내로 흡수되기 전에 용해 준비된 고체로서 ICI를 포함할 수 있다. 상기 액체 또는 고체 제제는 단회 용량 제제 또는 다회 용량 제제일 수 있다. 대안으로서 상기 키트는 사전-충전된 주사기 형태로, 주사기에 흡수 준비된 바이알 중의 액체 또는 주사기로 용해 및 흡수 준비된 고체로서 ICI의 다회 용량을 포함할 수 있다.

[0125] 키트는 필요에 따라 각 용량을 준비하는 방법, 각 투여량을 투여하는 방법 및 각 투여량을 투여하는 시기를 포함하는, 각 제제 사용에 대한 설명서를 포함하는 인서트 (insert)를 더 포함할 수 있다.

[0126] [도면의 간단한 설명]

[0127] 도 1은 하기를 제공한다. **1a**: 비히클 (Vehc.) 또는 500 nM 화합물 1 (Comp 1), 화합물 3 (Comp 3) 및 PMA 처리 후에 PKC-α, -βII, -γ, -δ 및 -Θ 전위의 이미지. 이들 이미지는 또한 1b에 도시된 정량화 (quantitation)를 위해 사용되었다. **1b**: 500, 50 및 5 nM 화합물 1 및 지시된 유사체에 반응하는 PKC 이소형 전위 프로파일을 나타내는 열지도 (-α, -βI, -βII, -γ, -δ, -Θ, -η 및 -ζ -는 원형질막에 대한 EGFP 전위를 나타내는 세포 %를 의미함). 생물학적 복제 당 >150개의 세포가 계수되었다. n = 3.

[0128] 도 2는 하기를 제공한다. **2a**: 실험 설계의 개략도. **2b**: 백혈구 모집 역할을 하는 숙주 시토킨/케모킨 선택은 화합물 1 처리 (30 μg)로 유도된다. 지시된 시토킨/케모킨의 유전자 발현에서 폴드 변화 (fold changes)가 도시되어 있다. **2c**: t=8 h에서 비히클 및 화합물 1 유전자 발현 프로파일 모두로부터의 세기 데이터를 비교 후에 열지도를 생성하였다. 후속 유전자 목록은 화합물 1 처리에 의해 영향을 받은 경로를 확인하기 위해 Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Qiagen)으로 분석되었다.

[0129] 도 3은 하기를 제공한다. **3a.** 화합물 1로 처리된 암 세포주로부터 방출된 LDH. A431, MM649 및 B16-OVA는 지시된 농도의 화합물 1 또는 비히클 단독 (Vehc.)으로 처리되고, 방출된 LDH는 Pierce LDH 세포독성 분석 키트를 사용하여 경시적으로 분석되었다. n=3. **3b.** 화합물 1은 세포내 ATP 수준의 유의한 감소를 유도하였다. 다시 세포는 화합물 1 또는 비히클 (Vehc.)로 처리되고, 세포내 ATP 수준은 CellTiter-Glo 2® 분석 키트를 사용하여 지시된 시점에서 분석되었다. n=3.

[0130] 도 4는 하기를 제공한다. **4a.** 화합물 1에 의한 처리에 반응하는 암 세포주로부터 ATP 방출의 결정. 세포는 화합물 1 또는 비히클 (Vehc.)로 지시된 시간 동안 처리되고, 세포 배양 상층액으로부터의 ATP 방출은 생체발광 기반 ATP 분석 키트를 사용하여 분석되었다. 평균 RLU 값 +/- S.D.가 결정되고, 시간에 대해 플로팅되었다. n=4. **4b.** 추가의 에폭시티글리안 유사체 (화합물 2: Bi, 화합물 3: Bii, 및 화합물 4: Biii)는 또한 A431, MM649 및 B16-OVA 세포주로부터 ATP 방출을 촉진하였다. **4c.** 화합물 1 및 에폭시티글리안 유사체로 처리된 암 세포주로부터의 HMGB1 방출의 결정. 에폭시티글리안 또는 비히클 (Vehc.) 처리된 A431 (Ci), MM649 (Cii) 또는 B16-OVA (Ciii)로부터의 세포 배양물 상층액은 ELISA를 통해 HMGB1 방출에 대해 분석되었다. 화합물 1로 처리된 세포로부터의 값을 비히클 처리된 세포에 대해 정규화하여 HMGB1 방출의 폴드 증가를 결정하였다. A431 및 MM649에 대해 n=2, 반면에 B16-OVA에 대해 n=3. (Civ) HMGB1 방출은 또한 화합물 2, 3 및 4에 의한 처리에

반응하여 발생되었다. n=3. **4d.** 화합물 1은 다양한 암 세포주에서 칼레티쿨린 외부화 (calreticulin externalisation)를 촉진한다. A431 (Di), MM649 (Dii) 및 B16-OVA (Diii)를 지시된 시간 동안 화합물 1 또는 비히클 (Vehc.) 단독으로 처리하고, 그 다음에 항-칼레티쿨린/항-토끼 Alexa 488로 염색하고 유세포 측정법을 수행하였다. 평균 형광 세기 값 (Ex:488nm, Em: 530/530nm) +/- S.D.는 각 시점에 대해 표시되었다.

[0131] 도 5는 하기를 제공한다. **5a 및 5b.** 에폭시티글리안 처리된 세포를 $CD11c^+$ BMDC로 인 비트로에서 처리하였다. 화합물 1 또는 비히클 (Vehc.)로 처리된 CMFDA 표지된 B16-OVA 세포를 미성숙 BMDC와 4시간 동안 인큐베이션하고, 그 다음에 항-CD11c-APC로 염색하고, 유세포 측정법을 수행하였다. 실선 회색 박스 - $CD11c^+$ BMDC 세포. 대시선 검정색 박스 - 죽어가는 B16-OVA 세포 단편을 취한 $CD11c^+$ BMDC ($CD11c^+$ $CMFDA_{mid}$). $CD11c^+$ $CMFDA_{mid}$ 세포의 퍼센트는 도 5a에 나타내었고, 4개의 생물학적 복제물로부터의 데이터는 도 5b에 도시하였다. n=4. **5c.** 에폭시티글리안 유사체는 또한 $CD11c^+$ BMDC에 의해 B16-OVA 세포 흡수를 유도한다. 화합물 2, 3 및 4의 사용으로부터 획득된 데이터가 도시되어 있다. n=3.

[0132] 도 6은 하기를 제공한다. **6a:** 화합물 1 및 ICI 조합에 대한 실험적 접근법의 개략도. 모든 종양에 15/30 μg 화합물 1 또는 비히클 (Vehc.)을 주사하였다. ICI 치료의 용량 용법도 또한 개시되어 있다. **6b 및 6c.** 항-PD-1 (도 6b) 또는 항-CTLA-4 (도 6c)와, ICI에 의한 구별되는 치료 조건 하에 크기 100 mm^3 이하로 유지되는 치료된 종양의 %를 나타내는 Kaplan-Meier 플롯. 조합에 반응하는 마우스 생존을 또한 도시하였다.

[0133] 도 7은 하기를 제공한다. **7a:** 병용 요법 접근법의 개략도: 지표 및 방관자 종양이 용량 용법과 함께 도시되어 있고; **7b:** 병용 요법 결과 (종양 부피)의 그래픽 표현. 치료된 종양 (흰색 원) 및 방관자 종양 (검정색 원)에서 이소타입 항체 + 화합물 1 (점선), 항-PD-1 항체 또는 항-CTLA-4 항체 + 비히클 (대시선) 및 항-PD-1 항체 또는 항-CTLA-4 항체 + 화합물 1 (실선).

[0134] 도 8은 wt 및 GCSF 녹아웃 배경에서 화합물 1의 최적하 (sub-optimal) 용량 (15 μg)이 주사된 종양 (% 종양 < 100 mm^3)의 부피 (좌측 패널) 및 Kaplan-Meier (우측 패널) 기반 분석 모두를 제공한다.

[0135] **실시예**

[0136] 본 발명의 화합물은 식물 또는 식물의 일부로부터 분리에 의해, 또는 분리된 화합물의 유도체화에 의해, 또는 관련 화합물의 유도체화에 의해 수득될 수 있다. 분리 절차 및 유도체화 절차는 WO 2007/070985 및 WO2014/169356에서 찾을 수 있다.

[0137] 화합물 6인, 화합물 1의 20-아세틸 유도체는 디클로로메탄 중 트리에틸아민의 존재하에 아세트산 무수물 (1 당량)과의 아세틸화에 의해 화합물 1로부터 제조될 수 있다. 이러한 조건은 2차 히드록시기의 아세틸화 없이 C-20 히드록시기의 선택적 아세틸화를 가능하게 한다.

[0138] WO2014/169356에서 특별히 합성되지 않은 화합물 10은 WO2014/169356의 페이지 64 내지 70의 실시예 1에 개시된 비대칭 에스테르를 수득하기 위한 일반적인 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0139] **실시예 1: 에폭시티글리안 유사체는 PKC 이소형을 활성화시킴**

[0140] 단백질 키나제 C는 세린/트레오닌 잔기에서 기질을 특이적으로 인산화하는 신호전달 경로에 관여하는 주요 효소 패밀리이다. PKC에 의한 인산화는 증식 및 유전자 발현의 조절과 같은 다양한 세포 사건을 조절하는데 중요하다. PKC 이소형 (-Θ, -η, -α, -β, -δ, -ε)는 면역 세포 반응에 직접 관여하고, 또한 주요 면역 유전자의 발현을 촉진할 수 있다. 그러나, 상기 PKC 이소형 각각의 발현 패턴 및 수준은 세포-타입 및 상황 (context) 특이적이다 (Lim *et al*. 2015; Anel *et al*. 2012; Pfeifhofer *et al*. 2006).

[0141] 에폭시티글리안 화합물의 특정 PKC 이소형 활성화 프로파일 (특이성 및 효능)을 확인하기 위해, Boyle *et al*. 2014에 개시된 방법에 따라 리포펙타민 (Lipofectamine) 2000 (Invitrogen)을 사용하여 선택된 PKC-EGFP 벡터 (자체 생성한 PKC-α, PKC-βI, PKC-βII, PKC-γ, PKC-δ, PK-CΘ, PKC-η, PKC-ζ)로 HeLa 세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 0.16 μg PKC-EGFP 및 0.48 μL 리포펙타민에 해당하는 부피를 25 μl Opti-MEM 배지 (Invitrogen)와 혼합하고, RT에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 상기 용액들을 조합하고, RT에서 또 다른 20분 동안 인큐베이션하였다 (DNA:리포펙타민 2000의 1:3 비율). 상기 복합물 (50 μl)을 각 웰에 부가하고, 37 ℃에서 3시간 인큐베이션한 후에, 또 다른 50 μl RPMI-1640, 10 % FCS를 웰 당 총 부피 100 μl로 부가하였다. 37 ℃에서 24시간 인큐베이션한 후에, 세포를 포스페이트-완충된 식염수 (PBS)로 세척하고, 500, 50 및 5 nM의

에폭시티글리안으로 처리하였다. 3개의 화합물은 96-웰 플레이트에 대해 시험될 수 있다. 실험 수행당 5개의 96-웰 플레이트를 필요로 한다. 1시간 처리 후에, 상기 세포를 100 μl PBS로 2회 세척하고, PBS 중 2 % 포름알데히드 / 0.2 % 글루테르알데히드 50 μl로 10분 동안 고정시켰다. 후속하여 상기 고정된 세포를 100 μl PBS로 2회 세척하였다. 핵을 염색하기 위해, Hoechst 3342를 1:10000으로 희석하여 사용하였다. 암실에서 7분 인큐베이션 후에, Hoechst를 제거하고, 세포를 PBS로 세척하였다. 마지막으로 상기 세포를 100 μl PBS로 덮고, 이미지화될 때까지 4 ℃ 암실에서 보관하였다. 이미지화는 GE InCell Analyzer 2000을 사용하여 수행되었다. 원형질 막 또는 다른 세포하 (subcellular) 위치에 대한 PKC 전위는 Adobe Photoshop CS6을 사용하여 수동으로 계수하였다.

[0142] 에폭시티글리안 화합물인 화합물 1, 화합물 3뿐만 아니라 PMA (포르볼-12-미리스테이트-13-아세테이트)의 존재하에 선택된 PKC 이소형 -α, -βII, -γ, -δ 및 -Θ의 세포막에 대한 전위를 나타내는 이미지는 도 1a에 도시되어 있다. 이들 이미지는 상이한 에폭시티글리안 화합물들이 상이한 PKC 이소형을 활성화시킬 수 있음을 나타내었다.

[0143] 화합물 1 내지 10뿐만 아니라 포지티브 대조군 PMA의 원형질 막 전위를 나타내는 세포의 퍼센트를 각 화합물 500, 50 및 5 nM에 반응하는 PKC 이소형 전위 프로파일을 나타내는 열지도로 변환시켰다. 열지도는 도 1b에 도시되어 있다.

[0144] 결과는 화합물 1 내지 7 모두가 T- 및 NK-세포 활성화 및 Treg 발생 억제에 관여하는 것으로 알려져 있는 PKC 이소형인 PKC-Θ를 (상이한 정도로) 활성화시키는 것을 보여주었다 (Brezar *et al.*, 2015; Anel *et al.*, 2012). 모든 에폭시-티글리안 화합물은 PKC-β를 활성화시키고, 이는 B 세포 수용체 신호전달 및 항원 제시에서 중요하다 (예: Kang *et al.* 2001; Lim *et al.* 2015). 상기 에폭시티글리안의 일부 또는 전부에 의해 보다 약하게 활성화되는 3개의 다른 PKC 이소형 (-η, -α, -δ)은 또한 면역 세포 반응에 직접 관여하였다 (Lim *et al.* 2015; Pfeifhofer *et al.* 2006)

[0145] **실시예 2: 마우스 종양 기질에서 유전자 발현 변화는 면역 세포 모집 및 Th-1/M1-유사 항-종양 면역 반응 유도와 일치함**

[0146] *항-종양 면역에서 Th1/M-1 유사 반응.* Th1/M1-유사 면역 반응은 직접 종양파괴 (tumouricidal) 활성, 항-종양 시토킨 반응의 변형 및 장기 면역학적 기억 강화를 포함하는 다양한 기전을 통한 항-종양 세포 면역 유도와 관련이 있다. 예를 들어, Th1 면역의 동인 (drivers)인 $CD4^+$ T 헬퍼 타입 1 (Th1) 세포는 인터페론-γ (IFN-γ), 인터루킨-2 (IL-2), 및 종양 괴사 인자-α (TNF-α)를 포함하는 다양한 시토킨의 분비를 통해 종양 세포의 청소 (clearance) 지원을 도울 수 있다는 것을 보여주는 몇가지 증거가 있다 (Knutson *et al.* 2005; DeNardo *et al.* 2010; Burkholder *et al.* 2014). 이들 시토킨은 항원 제시 세포 (APCs), 세포독성 T 세포, NK 세포, 및 다양한 선천성 면역 세포 서브타입을 포함하는 몇가지 세포 타입의 활성을 촉진한다 (예: Cohen *et al.* 2000; Bos & Sherman 2010). IFN-γ 및 TNF는 또한 종양 세포 생존에서 직접적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Sugarman *et al.* 1985; Bayaert *et al.* 1994). IL-1 및 IL-6 (M1 마크로파지에 의해 생성)은 종양 발생과 관련이 있지만, 보다 최근의 증거는 이들이 사실상 급성 항-종양 면역 반응의 결정적 구성요소임을 시사하였다 (Haabeth *et al.* 2011; Gabrilovich *et al.* 2012; Haabeth *et al.* 2016). 이들은 B 세포 증식 및 항체 생성을 증강시키고, 항원-제시 세포 (APC)의 활성을 증가시키며, 항원 특이적 세포독성 세포 타입의 증식을 자극하고, Th1 세포 분화를 촉진하는 것으로 나타났다 (Haabeth *et al.* 2011; Burkholder *et al.* 2014). Th1과 M1 시토킨 사이의 조합은 또한 종양 면역감시 (immunosurveillance)에서 중요한 것으로 나타났다. 예를 들어, IL-1 및 IFN-γ 모두는 상승작용하여 마크로파지의 종양파괴 활성을 활성화시킨다 (Hori *et al.* 1989; Haabeth *et al.* 2016). 중요하게도, 종양에서 M1 마크로파지 및 Th1 림프구의 발생은 많은 암에서 개선된 예후 및 생존 시간과 긍정적으로 관련되어 있다 (Pages *et al.* 2010; Fridman *et al.* 2012; Senovilla *et al.* 2012). 실제로, 항암 면역요법 기반 접근법을 유의하게 개선시키기 위해 Th1/M1-타입 염증을 유도하는 것이 제시되었다 (Haabeth *et al.* 2012). 이종이식 마우스 모델의 기질에서 Th1/M1 유사 항-종양 면역 반응을 촉진하는데 있어서 화합물 1의 효과를 하기에 개시하였다.

[0147] *마우스 유래 인간 종양 이종이식편의 마우스 기질.* SK-MEL-28 인간 흑색종 세포주를 각 BALB/c *Foxn1nu* 마우스 옆구리 2 부위에 피하로 (s.c) 주사하고 (부위당 2백만 개의 세포), 대략 7 mm 직경으로 성장하도록 하였다. 그 다음에 각 종양에, 30 μg 화합물 1 함유 20% 프로필렌 글리콜 50 μl 또는 20% 프로필렌 글리콜 50 μl를 주사하였다. 주사 후에 상이한 시점에서, 마우스를 안락사시키고, 종양을 수확하고, 피부 커버를 제거하고, 온전한 종양을 -80℃에서 보관하였다.

[0148] *RNA 추출.* RNA를 제조자의 지침에 따라 Qiagen RNeasy Plus Mini Kit를 사용하여 동결된 종양 30 mg으로부터 추출하고, 그 다음에 NanoDrop 기기로 정량화하고, 1 kb DNA 마커를 보유하는 변성 아가로스 겔에서 완전성 (integrity)을 확인하고, 에티디움 브로미드 (ethidium bromide)로 염색하였다.

[0149] *RNA 증폭 및 라벨링.* 대략 500 ng의 전체 표지되지 않은 RNA를 뉴클레아제-제거 수로 최종 부피를 11 μl로 조정하였다. 상기 RNA를 9 μl의 역전사효소 마스터 믹스 (1 μl의 T7 올리고 (dT) 프라이머, 2 μl의 10x 제1 가닥 버퍼, 4 μl의 dNTP 믹스, 1 μl의 RNase 저해제 및 1 μl의 ArrayScript)와 42 ℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 제2 가닥 cDNA 합성 단계를 수행하고, 이는 80 μl의 제2 가닥 마스터 믹스 (63 μL 뉴클레아제-제거 수, 10 μl 10X 제2 가닥 버퍼, 4 μl dNTP 믹스, 2 μl DNA 폴리머라제 및 1 μl RNase H)와 16 ℃에서 2시간 동안 추가의 인큐베이션을 포함하였다. 상기 cDNA를 키트에 제공된 cDNA 필터 카트리지를 통해 250 μl의 cDNA 결합 버퍼로 여과하고, 500 μl의 세척 버퍼로 세척하여 정제하였다. 정제된 cDNA를 20 μl의 55 ℃ 뉴클레아제-제거 수로 용출시켰다. 각 cDNA 시료를 7.5 μl의 IVT 마스터 믹스 (2.5 μl의 T7 10X 반응 버퍼, 2.5 μl의 T7 효소 믹스 및 2.5 μl 비오틴-NTP 믹스)와 37 ℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 75 μl의 뉴클레아제-제거 수를 각 cRNA 시료에 첨가하여 상기 반응을 종료시켰다. 상기 비오티닐화, 증폭된 RNA를 필터에 로딩하기 전에 함께 혼합된 350 μL의 cRNA 결합 버퍼 및 250 μl의 100 % 에탄올로 cRNA 필터 카트리지를 통해 cRNA 시료를 여과하여 정제하였다. 그 다음에 RNA가 부착된 cRNA 필터 카트리지를 650 μl의 세척 버퍼로 세척하고, 그 다음에 정제된 cRNA를 200 μl의 55 ℃ 뉴클레아제-제거 수로 용출시켰다.

[0150] *Illumina Expression BeadChip 혼성화.* cRNA 시료를 65℃에서 5분 동안 가열하고, 펄스 원심분리로 수집하였다. 65℃에서 5분 동안 가열한 후에, 대략 750 ng의 cRNA 시료를 개별 튜브에 분취하고, 여기에 ~ 5 μl의 RNase-제거 수 및 10 μl의 Hyb 믹스를 첨가하였다. 대략 15 μl의 제조된 cRNA 믹스를 Illumina Expression BeadChip에 로딩하였다. 후속하는 혼성화 및 세척 단계는 Illumina에 의해 제공되는 Whole-Genome Gene Expression Direct Hybridization Assay Guide에 따라 수행되었다. HumanHT-12 v4 Expression BeadChip은 인간 전사물 (transcriptome)에 걸쳐 47,000개 이상의 전사체 (transcripts) 및 알려져 있는 스플라이스 변이체 (splice variants)를 포괄한다. MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChip은 19,000개 이상의 고유 유전자를 포함하는, 대략 25,600개의 주석이 달린 (well-annotated) RefSeq (참조 서열) 전사체를 포괄한다.

[0151] *데이터 분석.* BeadChip은 iScan System으로 판독되고, GenomeStudio를 통해 GeneSpring GX v12.5 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 전달되었다. 발현 값 (expression values)은 디폴트 세팅 (default settings)을 구비한 권타일 정규화 (quantile normalization)를 사용하여 정규화되었다. GenomeStudio에 의해 산출된 검출 점수에 기반하여 실재물을 필터하고, 여기서 $p \leq 0.05$는 유의한 것으로 간주되었다.

[0152] 결과는 도 2에 도시되어 있다. 도 2a는 면역 세포의 모집/활성화에 중요한 몇가지 숙주 시토킨/케모킨이 화합물 1 처리에 반응하여 종양 부위에서 상향조절되는 것을 보여주었다. 주목할 점은, 화합물 1에 의해 크게 상향조절되는 Cxcl1은 호중구 모집을 촉진하고 후속하여 잔류하는 암 세포를 살해하는 것으로 알려져 있다 (Garg *et al.* 2017). 또한, 도 2b는 화합물 1이 Th-1/M-유사 반응 즉, IFN-γ, TNF, IL-6 및 IL-1β 유도의 발생과 관련이 있는 숙주에서 유전자 발현 변화를 유도하는 것을 보여주었다. 상기 데이터는 또한 알려져 있는 면역억제 신호전달 경로인 (Neuzillet *et al.* 2015), TGF 베타 신호전달의 하향조절이 있을 수 있음을 시사하였다 (도 2c).

[0153] **실시예 3: 화합물 1 및 다른 에폭시티글리안의 치료적 농도가 세포 종양병증을 유도한다는 것을 입증**

[0154] 종양병증 (Oncosis)은 삼투 균형을 유지하는 ATP-구동 이온 펌프 활성의 부분적 손실로 인해, 세포하 소기관의 팽창 및 파열과 후속하여 원형질막의 투과성을 특징으로 하는 괴사성 세포 사멸의 형태이다. 종양병증은 본질적으로 면역원성인 것으로 나타났으며, 일부 항암 바이러스 및 항암제로 개발된 소분자의 효능과 관련이 있다 (예: Dyer *et al.* 2016).

[0155] *세포주, 시약 및 배지.* A431 (인간 표피모양 암종), MM649 (인간 흑색종), B16-OVA (닭 난알부민으로 안정하게 형질감염시킨 B16-F10 마우스 흑색종 세포주), MM415 (인간 흑색종) 및 FaDu (인간 하인두 암종) 세포를 습윤 인큐베이터에서 37℃, 5 % CO_2로 RPMI-1640, 10 % FCS (완전 배지) 중에서 배양하였다. 본 연구에 사용된 모든 세포주는 MycoAlert (Lonza)을 사용하여 미코플라스마 음성 (mycoplasma negative)으로 확인되었다. STR 프로파일링은 또한 사용된 인간 세포주의 동일성을 확인하기 위해 수행되었다.

[0156] *IncuCyte 세포독성 분석.* 4개의 암 세포주 (A431, MM649 (인간 흑색종), FaDu (HNSCC) 및 MM415 (인간 흑색종))를 에폭시티글리안 처리에 대한 이들의 반응에 대해 평가하였다. 세포를 웰 당 10,000개 세포의 밀도

로 (100 μl의 완전 배지) 투명 바닥 블랙 96-웰 플레이트 (Corning, #3603)로 플레이팅하였다. 24시간 인큐베이션 후에, 각 웰 내의 배지를 흡인하고, 1 μg/ml 프로피디움 요오디드 (propidium iodide: PI)를 포함하는 신선한 배지 50 μl로 대체하였다. 4개의 에폭시티글리안 (화합물 1, 2, 3 및 4)의 스톡 용액 (에탄올 중 20 mg/ml)을 동일한 배지에서 2X 최종 분석 농도 (1 mM)로 희석시키고, 수송을 위한 제조에서 U-바닥 96 웰 플레이트로 삽입하였다. 50 μl의 희석물을 필요로 하는 웰에 부가하고, 결과의 플레이트를 이미지화를 위한 제조에서 Essen Biosciences IncuCyte로 삽입하였다. 이미지는 전체 24시간 동안 다양한 시점 (30분, 1시간 및 매 시간 간격)에서 획득하였다.

[0157] *락테이트 데히드로게나제 (LDH) 방출 분석*. LDH 방출을 측정하는 것은 원형질 막 투과성을 평가하고, 괴사에 의한 세포 사멸을 검출하는 잘 알려져 있는 분석법이다 (Chan et al. 2013). 3개의 세포주 (A431, MM649 및 B16-OVA)를 상기 분석에 사용하였다. 세포를 웰 당 10,000개 세포의 밀도로 투명 96-웰 플레이트 (Corning, #3595; 100 μl의 완전 배지)로 플레이팅하고, 결과의 플레이트를 이미 상세히 기재한 바와 같이 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 배지를 각 웰로부터 흡인하고, 50 μl의 신선한 배지를 삽입하였다. 화합물 1의 스톡 용액을 2X 최종 분석 농도 (1 mM 및 600 μM)로 희석하고, 이러한 희석물 50 μl를 필요로 하는 웰에 부가하였다. 에탄올 단독 대조군 용액을 또한 편성하고 투여하였다. 지시된 시점에서, 50 μl의 배지를 제거하고, Pierce LDH 세포독성 분석 키트 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 LDH 방출을 분석하였다. OD490nm 및 OD690nm 판독은 Hybrid Synergy H4 플레이트 리더 (plate reader)를 사용하여 각 시료에 대해 기록하였다. 약물 처리된 시료로부터의 흡광도 판독값은 디터전트 (detergent) 처리된 대조군에 대해 정규화되어 웰 당 LDH 방출 %를 결정하였다.

[0158] *세포내 ATP 분석*. 세포에 존재하는 ATP 양을 정량화하는 발광 기반 분석법인 CellTiter-Glo® 2.0 분석 키트 (Promega Corporation)를 사용하여, 화합물 1의 2가지 농도 (300 μM 및 500 μM)에 노출된 A431 및 MM649 배양물에서 세포내 ATP 수준을 결정하였다. 다시, 세포를 웰 당 10,000개 세포의 밀도로 투명 바닥 블랙 96-웰 플레이트 (100 μl의 완전 배지 중)로 플레이팅하고, 37℃, 5% CO_2에서 밤새 인큐베이션하였다. 분석 시에, 배지를 각 웰로부터 흡인하고, 50 μl의 신선한 배지를 삽입하였다. 화합물 1의 스톡 용액을 2X 최종 분석 농도 (1 mM 및 600 μM)로 희석하고, 상기 희석물 50 μl를 필요로 하는 웰에 첨가하였다. 에탄올 단독 대조군 용액을 또한 편성하고 투여하였다. 지시된 시점에서, 배지를 온화하게 제거하여 세포를 방해하지 않도록 하고 100 μl의 CellTiter-Glo® 2.0 시약을 부가하였다. 결과의 플레이트를 오비탈 진탕기 (orbital shaker)에서 2분 동안 혼합하여 세포 용해를 유도하고, 이 후에 이를 어두운 곳에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 이후에, 각 웰의 발광 신호를 결정하였다. 화합물 처리된 웰로부터의 발광 신호를 비히클 처리된 웰에 대해 정규화하고 시간에 대한 세포내 ATP %로 나타내었다.

[0159] IncuCyte로부터 획득한 이미지는 500 μM의 화합물 1, 2, 3 및 4로 처리된 모두 4개의 세포주 (A431, FaDu, MM649 및 MM415)의 대부분의 세포에서 120분 후에 적색으로 강하게 염색된 것을 나타내었다. 비히클 단독으로 처리된 세포는 염색되지 않았고, 이는 원형질 막 완전성 손실이 화합물 1로 처리된 세포에 국한되었음을 확인하였다. 또한, 유의한 세포질 팽창 및 '블리스터링 (blistering)'이 또한 화합물 1, 2, 3 및 4로 처리된 모든 세포에서, 개시 (onset)의 상이한 키네틱 및 상이한 정도로 관찰되었다.

[0160] LDH 방출을 평가하고 세포내 ATP 수준을 평가하는 분석으로부터의 결과를 각각 도 3a 및 3b에 도시하였다. 대조군과 비교하여, 테스트된 화합물 1의 두 농도 (300 μM 및 500 μM)로 처리된 모두 3개의 암 세포주로부터 LDH가 유의하게 방출되었다 (도 3a). 세포내 ATP 수준은 500 μM의 화합물 1로 처리한 후에 매우 빠르게 감소되고, 60분 후에는 거의 검출되지 않았다 (도 3b). 300 μM의 화합물 1에서, 세포내 ATP는 화합물 1의 500 μM 농도에 대해서 보다 더 천천히, 덜 파멸적으로 (catastrophically) 감소되고, 120분 후에 사전-처리 수준의 대략 50% 이었다 (도 3b). ATP 고갈은 이전에 종양병증 유도와 관련이 있었다 (Kim *et al*. 2003).

[0161] 이러한 결과는 에폭시티글리안 화합물이 치료적으로 관련된 농도 (즉 인 비보에서 출혈성 괴사를 유도하는데 효과적인 농도)에서 종양병증을 유도한다는 것을 입증하였다.

[0162] **실시예 4: 화합물 1 및 다른 에폭시티글리안으로 유도된 종양병증은 면역원성 세포 사멸의 특성을 나타냄**

[0163] 면역원성 세포 사멸 (ICD)은 손상 관련 분자 패턴 (damage associated molecular patterns: DAMPs)으로 불리우는 매개체의 방출 또는 외부화를 초래하는 조절된 세포 사멸의 특정 유형이며, 이는 수지상 세포/마크로파지에 의해 발현된 수용체와 상호작용하여 그들의 모집을 촉진하고 T 세포에 대한 종양 항원의 흡수/제시를 자극하였다. ICD는 암에 대한 면역계 활성화를 위한 중요한 경로이다. ICD의 생화학적 특징으로는 죽어가는 세포의 표면에서 칼레티쿨린 (CALR) 및 다른 소포체/미토콘드리아 단백질의 노출, 및 다량의 ATP 및 고-이동성 그룹 박스

1 (high-mobility group box 1: HMGB1)을 세포외 환경으로의 방출을 포함한다 (Kroemer *et al.* 2013). 이러한 파라미터는 ICD를 유도하는 화학요법 약물 (독소루비신 (doxorubicin), 미톡산트론 (mitoxantrone), 옥살리플라틴 (oxaliplatin) 및 보르테조밉 (bortezomib) 포함)의 능력에 대한 정확한 예측을 위해 사용되었다 (Kroemer *et al.* 2013; Galluzzi *et al.* 2017). 이러한 특성을 유도하는 에폭시티글리안의 역량이 하기에 상세히 기재되어 있다.

[0164] *세포주, 시약 및 배지.* A431 (인간 표피모양 암종), MM649 (인간 흑색종) 및 B16-OVA (닭 난알부민으로 안정하게 형질감염된 B16-F10 마우스 흑색종 세포주)를 습윤 인큐베이터에서 37℃, 5 % CO_2로 RPMI-1640, 10 % FCS (완전 배지)에서 배양하였다. BMDC를 R10 배지 (RPMI, 10 % FCS, 2 mM 글루타민, 50 μM 베타-메르캅토에탄올, Pen/Strep)에서 배양하였다. 본 연구에서 사용된 모든 세포주는 MycoAlert (Lonza)을 사용하여 미코플라스마 음성으로서 확인되었다. STR 프로파일링은 또한 사용된 인간 세포주와 동일성을 확인하기 위해 수행되었다.

[0165] *ATP 방출 분석.* 세포주를 웰 당 10,000개 세포의 밀도로 투명 96-웰 플레이트 (Corning, #3595; 100 μl의 완전 배지)로 플레이팅하고, 결과의 플레이트를 상기에서 상세하게 기재한 바와 같이 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 배지를 각 웰로부터 흡인하고, 50 μl의 신선한 배지를 삽입하였다. 화합물 1, 2, 3 및 4의 스톡 용액을 2X 최종 분석 농도 (1 mM 및 600 μM)로 희석하고, 이러한 희석물 50 μl를 필요로 하는 웰로 첨가하였다. 에탄올 단독 대조군 용액을 또한 편성하고 투여하였다. 지시된 시점에서, 80 μl의 배지를 제거하고, 1,200 rpm에서 4분 동안 원심분리하여 세포 조직파편 (debris)을 펠렛화하고, ATP 분석을 위해 50 μl를 생체발광 기반 ATP 분석 키트 (FLAA, Sigma-Aldrich)에 사용하였다. 상대 발광 유닛은 Hybrid Synergy H4 플레이트 리더 (BioTek)를 사용하여 각 시료에 대해 기록하였다.

[0166] *HMGB1 방출 분석.* 세포주 (A431, MM649 및 B16-OVA)를 10 ml의 완전 배지 중에 T75 cm^2 플라스크 (Nunc)로 플레이팅하고, 이들이 90% 컨플루언시 (confluency)에 도달할 때까지 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 화합물 1, 2, 3 및 4를 5 ml의 동일한 배지에서 최종 농도 500 및 300 μM로 희석하고, 그 다음에 세포에 투여하였다. 약물 치료에 반응하여 HMGB1 방출 키네틱 곡선이 수립될 수 있도록 몇 개의 플라스크를 준비하였다. 에탄올 단독 대조군을 또한 생성하였다. 요구된 시점에서, 배지를 상기 플라스크로부터 10 ml 폴리프로필렌 튜브로 옮기고, 이를 5분 동안 얼음 상에 두었다. 세포 배양물 상등액을 1,200 rpm에서 4분 동안 원심분리하여 세포 조직파편을 제거하고, 그 후에 4.5 ml의 상등액을 농축기 스핀 컬럼 (concentrator spin column) (Amicon® Ultra 50 kDa 커트-오프 멤브레인, Merck)으로 삽입하여 FCS를 제거하였다. 그 다음에 이러한 컬럼을 통과한 유출물 (flow)을 또 다른 농축기 컬럼 (Amicon® Ultra 10 kDa 커트-오프 멤브레인, Merck)에 삽입하고, 3,500 rpm으로 원심분리하여 HMGB1를 농축하고, 그 후 ELISA (SEA399Hu/SEA399Mu, Cloud-Clone Corp)를 통해 분석하였다. OD450nm 값은 Hybrid Synergy H4 플레이트 리더 (BioTek)를 사용하여 결정되었다. 약물 처리된 시료로부터의 흡광도 값은 비히클 처리된 시료에 대해 정규화되어 에폭시티글리안 처리에 반응하는 HMGB1 방출의 폴드 증가를 결정하였다.

[0167] *칼레티쿨린 외부화 분석.* 칼레티쿨린 외부화는 이전에 상세히 기재한 바와 같이 결정되었다 (Gomez-Cadena *et al.* 2016). 간단하게, 37℃, 5% CO_2에서 완전 배지 중에 배양된 세포 (A431, MM649, B16-OVA)를 트립신화 (trypsinisation)를 통해 박리시키고, 1,200 rpm으로 원심분리하고, 신선한 배지로 X2회 세척하였다. 추가의 원심분리 라운드 후에, 결과의 세포 펠렛을 $1X10^6$ 세포/ml 농도로 재현탁하고, 그 후에 에폭시티글리안을 최종 농도 500 또는 300 μM로 첨가하였다. 에탄올 단독 대조군을 또한 수행하였다. 세포 현탁액을 37℃, 5 % CO_2에서 인큐베이션하고, 지시된 시점에서 200 μl의 시료를 꺼내고, LIVE/DEAD 고정가능한 far red 염색으로 5분 동안 얼음상에서 인큐베이션하였다. 이 후에, 세포를 1,200 rpm으로 4분 동안 펠렛화하고, PBS로 X1회 세척하였다. 그 다음에 500 μl의 PBS, 0.25% 포름알데히드를 각 펠렛으로 부가하여 원형질 막 완전성을 손상하지 않고 가볍게 고정을 수행하였다. 이 후에, 상기 세포를 PBS로 X1회 세척하고, 100 μl의 PBS, 1 % BSA, 항-칼레티쿨린 (ab2907, Abcam; 1:50 희석) 함유 2 mM EDTA (FACs 버퍼)를 부가하였다. 실온에서 1시간 인큐베이션 후에, 세포를 1,200 rpm으로 4분 동안 원심분리하고, FACs 버퍼로 X1회 세척하고, 그 후에 1:750으로 항-토끼 Alexa488 함유 FACs 버퍼 100 μl와 추가 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 세포를 다시 펠렛화하고, 그 다음에 유세포 측정을 위한 제조에서 500 μl의 FACs 버퍼에 재현탁시켰다.

[0168] 시료를 FSC-H v FSC-A로 먼저 게이트하여 (gated) 단일 세포를 확인한 후에, LIVE/DEAD 염색 (Ex: 640 nm, Em: 670/14) 음성 (온전한 세포) 개체군을 그린 형광 (Ex: 488 nm, Em: 530/30; 칼레티쿨린 외부화)에 대해 분석하

였다. 후속하여 평균 형광 세기 값을 결정하고, 시간에 대해 그래프를 그렸다.

[0169] 결과는 에폭시티글리안 화합물에 의해 유도된 급성 종양병증이 또한 ATP (도 4a 및 4b), HMBG1 (도 4c) 및 칼레티쿨린 (도 4d)을 포함하는 중요한 DAMP의 방출/외부화와 함께 면역원성 세포 사멸의 특성을 유도하는 것을 보여주었다. 화합물 1 (도 4a)과, 화합물 2, 3 및 4 (도 4b)의 농도 모두로 처리된 모두 3개의 암 세포주에서 60분내에 ATP의 유의한 방출이 있었다. 이러한 화합물은 또한 암 세포주로부터 HMGB1 방출을 촉진하였다. ELISA 분석 후에, 처리된 세포에 대한 값을 비히클 처리된 세포에 대한 값으로 정규화하여 폴드 증가를 결정하고, 화합물 1은 120분내에 HMBG1 방출이 A341 및 MM649 세포에 대해 최대 40% (도 4ci 및 4cii), 및 B16-OVA 세포에 대해 3배 초과 (도 4ciii)로 증가하는 것을 보여주었다. 화합물 2, 3 및 4가 또한 B16-OVA 세포에서 분석되고, 120분 후에 상기 세포주로부터 HMBG1 방출이 최소 2-배 증가하는 것을 보여주었다 (도 4civ). 3개의 세포주를 화합물 1로 처리한 후에 칼레티쿨린 외부화에 대한 데이터는 처리 60분 내에 평균 형광 세기의 유의한 증가를 보였다 (도 4d). 이러한 DAMP 방출/외부화는 항원 제시 세포의 모집을 촉진하고, 암 세포 관련 항원의 효과적인 흡수를 자극하며, T 세포 서브세트에 대한 제시를 자극하는 것이 알려져 있다 (Kolaczkowska & Kubes, 2013)

[0170] **실시예 5: 에폭시티글리안 처리된 암 세포로부터의 단편은 $CD11c^+$ 골수 유래 세포 개체군에 의해 섭취됨**

[0171] CD11c는 DC/마크로파지의 잘 설명된 마커이다 (Merad *et al.* 2013). 항암제 (및 이들이 유발하는 관련된 사멸 과정)가 면역원성 반응 발생을 촉진하는지에 대한 가능성을 조사하는 한가지 방법으로는 이들이 $CD11c^+$ 수지상 세포/마크로파지에 의해 세포 성분을 흡수하고 후속하여 진정한 항원 제시 세포 (APCs)로의 성숙을 유도하는지 여부를 결정하는 것이다 (Guermonprez *et al.* 2002). 본원에서 본 발명자는 화합물 1 및 관련된 에폭시티글리안에 의해 유도된 종양병증이 이러한 세포에 의해 죽어가는 암 세포 성분의 흡수를 유도하는 것을 입증하였다.

[0172] *골수 유래 세포 (BMDC)의 단리 및 배양.* 4마리의 7-8 주령 C57Bl/6 마우스로부터의 경골 (tibias) 및 피비아스 (fibias)를 먼저 멸균 조건하에 외과적으로 제거하였다. 상기 골수를 10 ml의 빙냉한 R10 배지 (27G 바늘/주사기를 사용하여 50 ml 폴리프로필렌 튜브로)로 골강 (bone cavity)으로부터 플러싱하였다 (flushed). 세포를 1,500 rpm으로 5분 동안 펠렛화하고, 빙냉한 R10 배지로 X2회 세척하였다. 10 ml의 빙냉한 R10 배지로 상기 펠렛을 재현탁한 후에, 개선된 혈구계 (haemocytometer)를 사용하여 세포를 계수하고, 20 ng/ml 뮤린 (murine) GM-CSF가 보충된 R10 10 ml 중에 플레이트 (페트리디쉬) 당 $2X10^6$ 세포 밀도로 플레이팅하였다. 모든 플레이트를 37℃, 5 % CO_2에서 인큐베이션하고, 3일 차에 20 ng/ml GM-CSF를 갖는 R10 10 ml을 추가로 첨가하였다. 세포를 6일 차에 다시 공급하고, 7일 차에 다운스트림 분석 (downstream assays)에 사용하였다.

[0173] *BMDC 흡수 실험.* BMDC와 동시-인큐베이션 전에, B16-OVA 세포를 트립신화하고, 1,200 rpm으로 4분 동안 원심분리하여 세포를 펠렛화하고, 완전 배지로 X2회 세척하였다. 그 다음에 세포를 완전 배지 중 2 μM 셀 트래커 그린 (Cell Tracker Green)으로 45분 동안 염색하고, 그 후에 이들을 펠렛화하고 상기에서와 같이 X2회 세척하였다. 후속하여 표지된 B16-OVA 세포를 30 및 60분 동안 $1X10^6$ 세포/ml 밀도로 배지 중 화합물 1, 2, 3 및 4의 2가지 농도 (500 또는 300 μM)로 처리하고, 그 후에 상기 세포를 원심분리를 통해 펠렛화하고, 상등액을 흡인을 통해 제거하고, 세포 펠렛을 완전 배지로 X1회 세척하였다. 세척 후에, 처리된 세포를 R10 배지에 재현탁하고, 6-웰 플레이트 (Corning, #3471. Ultra low attachment surface)의 웰로 삽입하고, BMDC를 첨가하였다. 동시-배양물 (Co-cultures)을 4시간 동안 인큐베이션하고, 그 후에 세포 현탁액을 마이크로퍼지 튜브 (microfuge tube)로 옮기고, 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 펠렛을 항-CD11c-APC 함유 100 μl FACs 버퍼에 재현탁하고, 10분 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 세포를 다시 펠렛화하고, FACs 버퍼로 X1회 세척하고, 그 다음에 PBS, 1 % 포름알데히드를 사용하여 10분 동안 고정하였다. 원심분리하고 상등액을 제거한 후에, 세포를 유세포 측정을 위한 제조에서 500 μl FACs 버퍼에 재현탁하였다.

[0174] 시료를 먼저 FSC-H v FSC-A, 그 다음에 SSC-H v SS-A로 게이트하여 단일 세포를 동정하였다. 그 다음에 $CD11c^+$ 세포 (Ex: 640nm, Em: 670/14)와 $CMFDA_{mid}$ (Ex: 488nm, Em: 530/30)의 비율을 처리된 세포와 미처리된 세포에 대해 모든 $CD11c^+$ 세포의 퍼센트로서 결정하였다.

[0175] 결과 (도 5a 및 5b)는 화합물 1에 의해 유도된 종양병증이 $CD11c^+$ 수지상 세포/마크로파지에 의해 죽어가는 암 세포 단편의 흡수 (즉 효과적인 섭취)를 촉진하는 것을 보여주었다. 이러한 섭취는 화합물 1 농도 및 처리 시간 모두에 의존하는 것으로 나타났고, 500 μM의 화합물 1에서 300 μM 사용과 비교하여 더 짧은 처리 시간 후에 보다 큰 정도로 항원 흡수가 나타났다. 이는 실시예 3에서 관찰된 종양병증의 키네틱스와 일치한다. 도 5c는

화합물 2, 3 및 4가 또한 인 비트로에서 면역원성인, 즉 $CD11c^+$ BMDC에 의한 흡수를 촉진하는 세포 사멸 반응을 유도할 수 있음을 입증하였다.

[0176] **실시예 6: 화합물 1과 면역 체크포인트 저해제의 조합**

[0177] 면역 체크포인트 저해제 요법, 구체적으로 T 세포 면역억제에 관여하는 수용체 (예: 세포독성 T-림프구-결합 단백질 4 (CTLA-4) 또는 프로그램된 사멸 1 (PD-1) 및 그의 리간드 PD-L1)를 표적으로 하는 요법은 흑색종, 신장 세포 암종, 방광암 및 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)을 포함하는 몇 가지 유형의 말기 암에서 환자 결과가 크게 향상되었다 (Msaouel & Massarelli 2016; Sharma & Allison 2015). 그러나, 이러한 ICI 약물에 대한 1차 및 데 노보 (de novo) 저항은 상당한 임상적 문제가 있다. 또한, 광범위한 임상적 추적 관찰에 따르면 일부 흑색종 환자는 치료에 대한 저항성이 발생하여 질병 재발이 진행되고 있음을 보여주었다 (O'Donnell *et al.*, 2017). 면역원성 세포 사멸을 촉진하여 (구체적으로 종양 실질 (paracheyma) 및 항원 흡수/제시로 증가된 면역 세포 침윤을 초래하여) 아쥬반트로서 작용할 수 있는 화합물과 ICI를 조합하는 요법은 ICI의 일부 한계를 극복하고 전체 임상적 결과를 향상시킬 수 있는 가능성을 가지고 있다 (Workenhe *et al.* 2014; Ribas *et al.* 2017). 본원에서 그리고 실시예 7에서, 데이터는 화합물 1의 병변내 주사 및 ICI의 조합을 조사하였다.

[0178] 상기 실험적 접근법의 개략도는 도 6a에서 볼 수 있다. 간단하게, 6-7주령 C57BL/6 마우스에게 양쪽 옆구리에 B16-F10-OVA 마우스 흑색종 세포를 피하로 (s.c.) 주사하였다 (100 μl의 부위 당 $2X10^5$ 세포). 종양을 대략 5-50 mm^3으로 성장하도록 하고, 그 후에 200 μg의 항-PD-1 (RMP1-14, BioXCell), 항-CTLA-4 (9H10, BioXCell) 또는 이소타입 대조군 항체 (2A3 및 Syrian Hamster IgG, BioXCell)를 마우스에 대해 i.p.로 주사하였다 (-2일 차). 0일 차에, 모든 종양에 화합물 1 (50 μL 중 15 μg) 또는 비히클 (Vehc.) 단독을 I.T.로 주사하였다. 각 마우스에게 -2일차에 투여된 것과 동일한 항체를 추가로 i.p. 주사하였다 (다시, 200 μg). 항체를 2일 마다 i.p. 주사를 통해 추가 3회 투여하였다. 처리된 종양의 부피는 이전에 상세히 기재한 바와 같이 캘리퍼 (calipers)를 사용하여 측정하고 (Boyle *et al.* 2014), 마우스 생존을 경시적으로 결정하였다.

[0179] 도 6b 및 6c에 나타낸 결과는 화합물 1이 항-PD-1 및 항-CTLA-4와 조합하여 단일 활성제 처리보다 더 큰 정도로 종양 성장을 억제하고 마우스 생존을 향상시키는 것을 보여주었다. 이러한 효과는 각 화합물 1/ICI 조합에 대해 농도 의존적인 것으로 보였다. 예를 들어, 30 μg의 화합물 1을 항-PD-1과 함께 주사하면 30 μg의 화합물 1 단독과 비교할 때 향상된 생존/감소된 종양 성장을 유도하였다 (도 6biii, iv). 이는 15 μg의 화합물 1이 동일한 조합으로 사용될 때 관찰되지 않았으며, 즉 생존 또는 종양 성장에서의 개선을 나타내지 않았다 (도 6bi, ii). 이러한 상황은 항-CTLA4가 사용될 때 역전되었으며, 병용 치료에서 15 μg의 화합물 1 (도 6ci, ii)은 최적의 반응을 주었지만, 30 μg의 화합물 1은 그렇지 않았다 (도 6ciii, iv).

[0180] **실시예 7: 면역 체크포인트 저해제와 조합하여 화합물 1을 사용할 때 압스코팔 효과 (Abscopal Effects) 관찰**

[0181] 실험적 접근법의 개략도를 도 7a에서 볼 수 있다. 간단하게, 6-7 주령 C57BL/6 마우스에게 양쪽 옆구리에 B16-F10-OVA 마우스 흑색종 세포 (100 μl의 부위 당 $2X10^5$ 세포)를 s.c.로 주사하였다. 종양을 대략 5-50 mm^3으로 성장하도록 하고, 그 후에 200 μg의 항-PD-1 (RMP1-14, BioXCell), 항-CTLA-4 (9H10, BioXCell) 또는 이소타입 대조군 항체 (2A3, BioXCell)를 마우스에 대해 i.p.로 주사하였다 (-2일 차). 0일 차에, 가장 큰 2개의 종양 (대략 50-75 mm^3)에 화합물 1 (50 μL 중 15 μg) 또는 비히클 (Vehc.) 단독으로 I.T.로 주사하였다. 나머지 종양은 처리하지 않고 두고, 각 마우스에게 -2일 차에 투여된 것과 동일한 항체를 추가로 i.p. 주사하였다 (다시, 200 μg). 항체를 2일 마다 i.p. 주사로 추가 3회 투여하였다. 처리된 종양과 미처리된 종양 모두의 부피는 이전에 상세히 기재된 바와 같이 실험 과정 중에 측정되었다.

[0182] 결과는 도 7b에 도시되어 있다. 결과는 항체와 화합물 1의 조합으로 처리된 종양이 효과적으로 절제될 뿐만 아니라 일부 미처리된 인접 종양이 활성제 단독으로는 관찰되지 않았지만 병용 요법에는 반응하는 것으로 나타났다.

[0183] **실시예 8: 골수 유래 억제인자 세포는 화합물 1의 저용량 효능에 영향을 줄 수 있음**

[0184] 골수 유래 억제인자 세포 (Myeloid derived suppressor cells: MDSCs)는 다수의 경로를 통해 종양에 대한 숙주 면역 반응을 억제할 수 있는 미성숙 골수 세포이다 (Qu *et al.* 2016). 본 발명자는 과립구 콜로니-자극 인자 (granulocyte colony-stimulating factor: GCSF) 녹아웃 C57BL/6 마우스를 사용하여, MDSC 모집 및 기능과 관련된 단백질 (예: 인돌아민 2,3-디옥시게나제 (IDO))을 저해 또는 차단하는 분자와 화합물 1을 포함하는 가능한

병용 요법에 대한 미래 잠재력을 평가하는 모델을 제공하였다. 호중구 생산 및 트래픽킹 (trafficking)의 필수 조절인자인 GCSF는 또한 MDSC의 이동 및 증식에서 중요한 역할을 하였다 (Li *et al*. 2016). 이들 GCSFR 녹아웃 모델을 사용하여, MC38 결장직장 선암종에 대한 화합물 1의 단일요법 효능을 제한하는데 있어서 과립구 유래 MSDC의 가능한 역할을 조사하였다.

[0185] 간단하게, 6-7 주령 wt C57BL/6 및 $gcsfr^{-/-}$ 마우스의 양쪽 옆구리에 MC38 마우스 결장직장 암 세포 (100 μl의 부위 당 $1X10^{6}$ 세포)를 s.c.로 주사하였다. 종양을 대략 5-50 mm^{3}로 성장하도록 하고, 그 후에 15 μg의 화합물 1 또는 비히클 (Vehc.)을 I.T. (50 μl) 주사하였다. 처리된 종양의 부피는 이전에 실시예 6 및 7에서 상세히 기재된 바와 같이 수행되었다. 야생형 (wt) 및 GCSFR 녹아웃 마우스에서 화합물 1 주사된 종양들 사이에서 종양 크기 및 생존 비교는 도 8에서 볼 수 있다.

[0186] 과립구 모집에서 GCSFR의 역할을 고려하여, 이들 데이터는 이러한 면역 세포 침윤이 알려져 있는 최적하 용량 (15 μg)으로 화합물 1의 항암 효능을 제한할 수 있음을 시사하였다. 그러므로 이러한 면역억제 세포 집단의 발생을 방지하는 화합물 (예: IDO 저해제)과 화합물 1 또는 유사체의 조합으로 보다 우수한 항암 효능을 유도하고 환자 생존을 향상시킬 수 있다.

[0187] 본 발명의 기술 분야의 당업자라면 다수의 변경이 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있음을 이해할 것이다.

참고문헌

It is to be understood that, if any prior art publication is referred to herein, such reference does not constitute an admission that the publication forms a part of the common general knowledge in the art, in Australia or any other country.

Adams *et al*. 2015. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. Nature Reviews Drug Discovery 14, 603-622.

Anel *et al*. 2012. Protein kinase C θ (PKCθ) in natural killer cell function and anti-tumour immunity. Frontiers in Immunology 3, 187.

Beyaert R, & Fiers W. 1994. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. FEBS Letters 340:9-16.

Bos & Sherman. 2010. CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes. Cancer Research 70: 8368–8377.

Boyle *et al*. 2014. Intralesional injection of the novel PKC activator EBC-46 rapidly ablates tumours in mouse models. PLoS One 9, e108777.

Brezar *et al*. 2015. PKC-Theta in regulatory and effector T-cell functions. Frontiers in Immunology 6, 530.

Burkholder *et al*. 2014. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. BBA-Reviews on Cancer. 1845: 182–201.

Chan *et al*. 2013. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. Methods Molecular Biology 979: 65-70.

Cohen *et al*. 2000. CD4+ T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. Critical Reviews Immunolology 2: 85–95.

DeNardo *et al*. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. Cancer and Metastasis Reviews 29: 309–316.

Dyer *et al*. 2016. Oncolytic group B enadenotucirev mediates non-apoptotic cell death with membrane disruption and release of inflammatory mediators. Molecular Therapy Oncolytics. 4: 18-30.

Fridman *et al*. 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nature Reviews Cancer 12: 298-306.

[0188]

Gabrilovic et al. 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nature Reviews Immunology 12: 253-268.

Galluzzi *et al.* 2017. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. Nature Reviews Immunology 17: 97-111.

Garg *et al.* 2017. Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing. Cell Death Differentiation. Advance online publication 24 February 2017.

Gomez-Cadena *et al.* 2016. Immune-system-dependent anti-tumour activity of a plant-derived polyphenol rich fraction in a melanoma mouse model. Cell Death and Disease 7: e2243.

Guermonprez *et al.* 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annual Review of Immunology 20: 621-667.

Haabeth *et al.* 2011. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. Nature Communications 2: 240.

Haabeth *et al.* 2016. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. Oncoimmunology 5 (1): e1039763.

Haabeth OA & Corthnay A. 2012. A model for cancer-suppressive inflammation. Oncoimmunology. 1 (7): 1146-1155.

Hori *et al.* 1989. Role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in gamma-interferon-promoted activation of mouse tumoricidal macrophages. Cancer Research 49:2606-2614.

Hu-Lieskovan *et al.* 2017. New combination strategies using Programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 checkpoint inhibitors as a backbone. The Cancer Journal 23, 10-22.

Kang *et al.* 2001. PKCβ modulates antigen receptor signaling via regulation of Btk membrane localisation. EMBO J 20, 5692-5702.

Kim *et al.* 2003. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. Biochemical Biophysical Research Communications 304: 463-470.

Knutson KL & Disis ML. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 54:721-728.

Kolaczkowska E & Kubes P 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Reviews Immunology 13: 159–175.

[0189]

Kroemer *et al.* 2013. Immunogenic cell death in cancer therapy. Annual Reviews Immunology 31: 51-72.

Li *et al.* 2016. G-CSF is a key modulator of MSC and could be a potential therapeutic target in colitis-associated colorectal cancers. Protein Cell 7: 130-140.

Lim *et al.* 2015. Protein kinase C in the immune system: from signaling to chromatin regulation. Immunology 146, 508-522.

Mahoney *et al.* 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. Nature Reviews Drug Discovery 14, 561-585.

Merad *et al.* 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. Annual Review of Immunology 31: 563-604.

Msaouel P & Massarelli E 2016. Immune Checkpoint Therapy in Head and Neck Cancers. The Cancer Journal. 22: 108-116.

Neuzillet *et al.* 2015. Targeting the TGFβ pathway for cancer therapy. Pharmacology & Therapeutics 147: 22–31.

O'Brien *et al.* 2014. Local ablative therapies: Opportunities for maximising immune engagement and activation. BBA Reviews Cancer 1846: 510-523.

O'Donnell *et al.* 2017. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. Cancer Treatment Reviews 52: 71-81.

Pages *et al.* 2010. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. Oncogene, 29: 1093-1102.

Pfeifhofer *et al.* 2006. PKCα is expressed in T-cells and knockout mice have T-cell activation and immunity defects. Journal of Immunology 176, 6004-6011.

Qu *et al.* 2016. Expansion and functions of myeloid derived suppressor cells in the tumour microenvironment. Cancer Letters 380: 253-256.

Ribas *et al.* 2017. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. Cell 170(6):1109-19.e10.

Senovilla *et al.* 2012. Trial watch: prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. Oncoimmunology 1: 1323-1343.

Sharma P & Allison JP 2015. The future of immune checkpoint therapy. Science. 348(6230):56-61.

Smyth *et al.* 2015. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. Nature Reviews Clinical Oncology 13, 143-158.

Sugarman *et al.* 1985. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. Science 230:943–945.

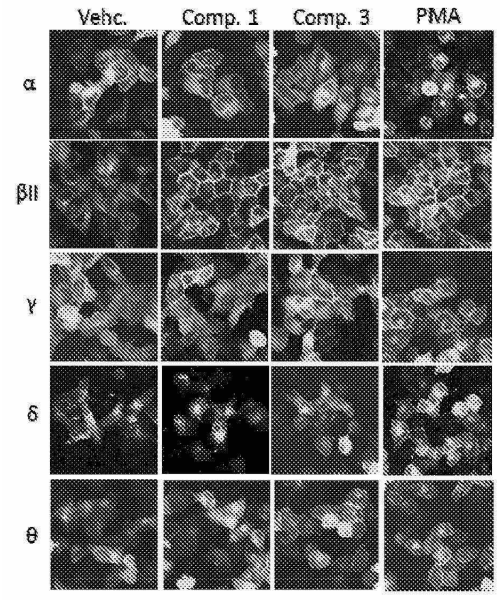
Workenhe *et al.* 2014. Immunogenic HSV-mediated oncolysis shapes the antitumor immune response and contributes to therapeutic efficacy. Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy. 22: 123-31.

[0190]

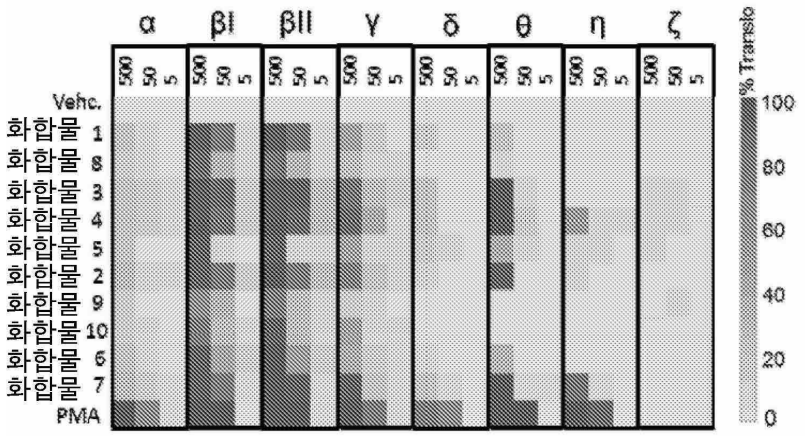
[0191]

도면

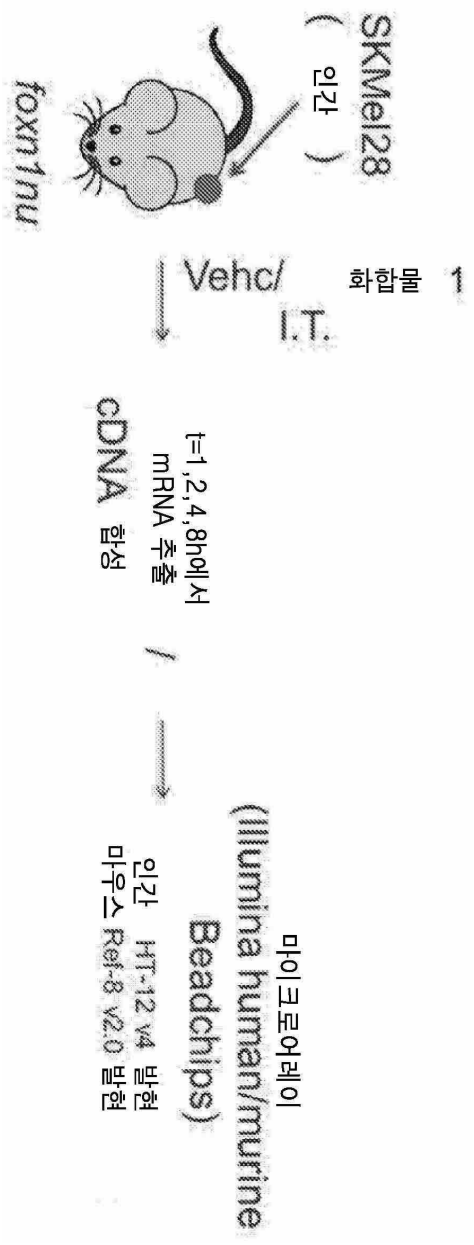
도면1a


Vehc.
Comp. 1
Comp. 3
PMA
α
βII
γ
δ
θ

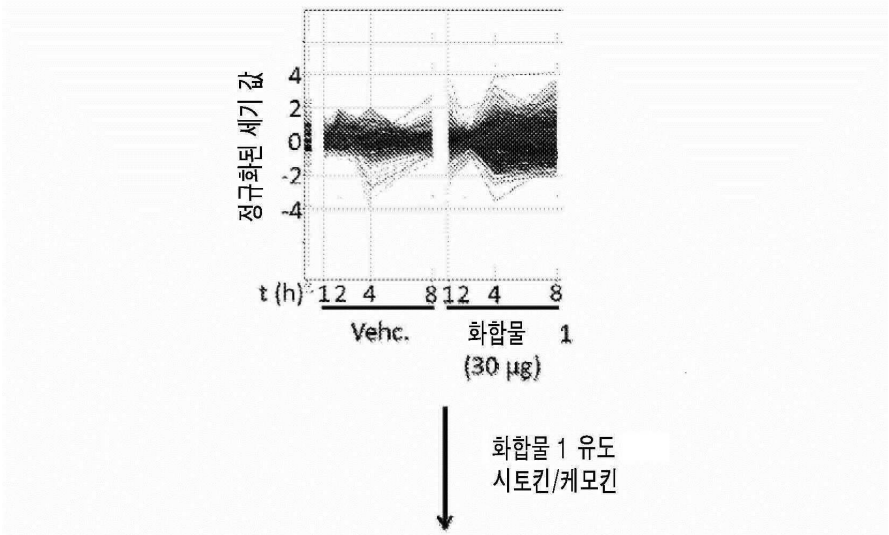
도면1b


α
βI
βII
γ
δ
θ
η
ζ
500
50
5
Vehc.
화합물 1
화합물 8
화합물 3
화합물 4
화합물 5
화합물 2
화합물 9
화합물 10
화합물 6
화합물 7
PMA
% Transio
100
80
60
40
20
0

도면2a

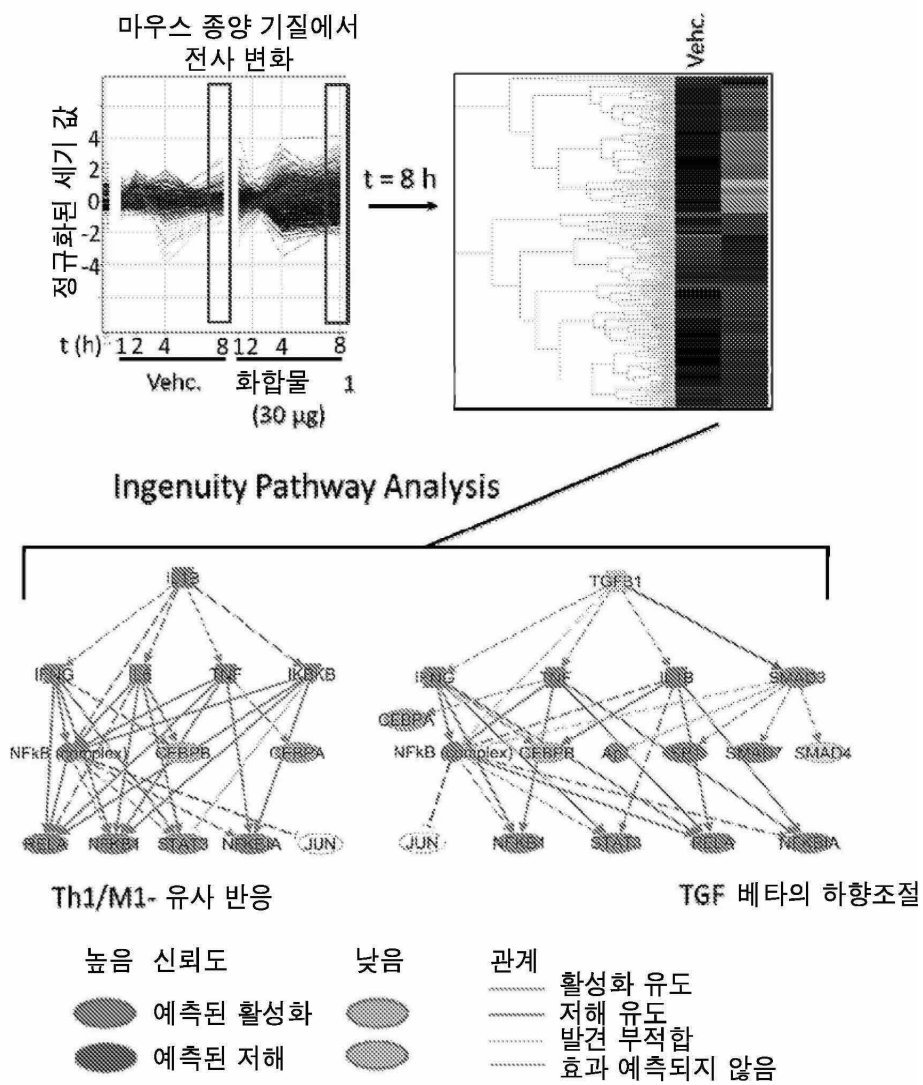

SKMel28
(인간)
foxn1nu
Vehc/
I.T.
화합물 1
t=1,2,4,8h에서
mRNA 추출
/
cDNA 합성
마이크로어레이
(Illumina human/murine
Beadchips)
인간 HT-12 v4 발현
마우스 Ref-8 v2.0 발현

도면2b

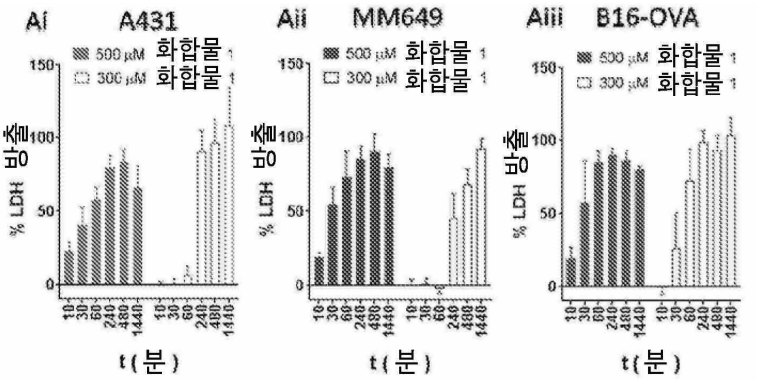


	4 h	8 h	기능?
Cxcl1	↑12.5x	↑20.7x	호중구,단핵구 인력
Ccl4	↑3.2x	↑5.8x	NK, 단핵구 인력
Ccl27	↑2.4x		T 세포 인력
Ccl9	↑2.2x		수지상 세포 인력
Ccl21a	↑2.1x		림프 기관을 표적으로 하는 B/T/수지상 세포
Il-6		↑3.9x	T_{reg} 억제 및 T 세포 이동

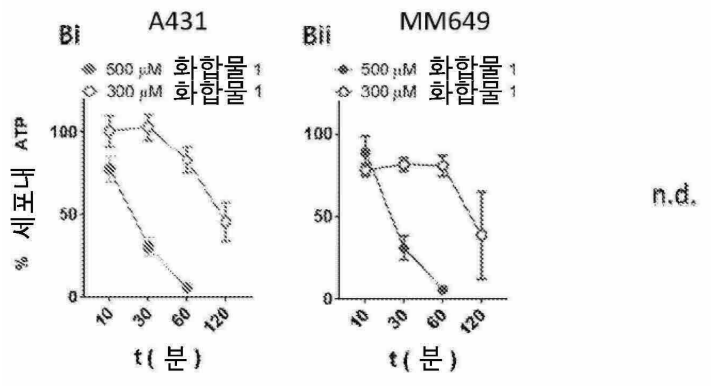
도면2c


마우스 종양 기질에서
전사 변화
정규화된 세기 값
t (h) 1 2 4 8 1 2 4 8
Vehc.
화합물 1
(30 μg)
t = 8 h
Vehc.
Ingenuity Pathway Analysis
TGFB1
NFkB (complex)
CEBPB
CEBPA
JUN
SMAD4
Th1/M1- 유사 반응
TGF 베타의 하향조절
높음 신뢰도
낮음
관계
예측된 활성화
예측된 저해
활성화 유도
저해 유도
발견 부적합
효과 예측되지 않음

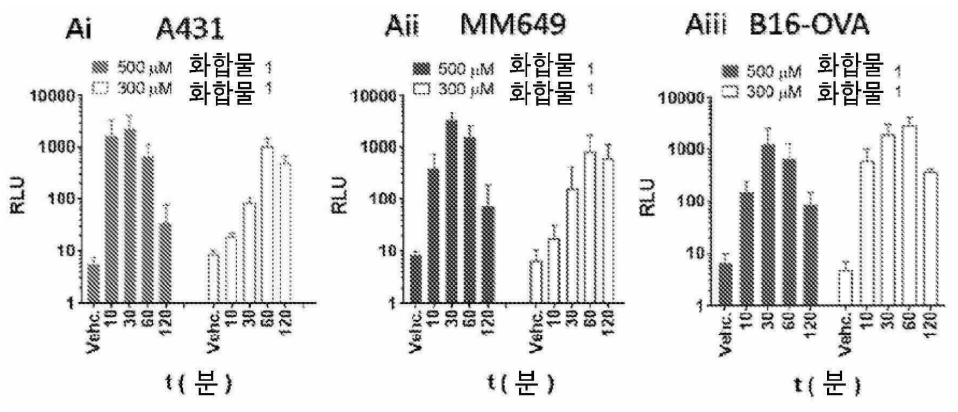
도면3a


Ai
A431
Aii
MM649
Aiii
B16-OVA
500 μM 화합물 1
300 μM 화합물 1
% LDH 방출
t (분)

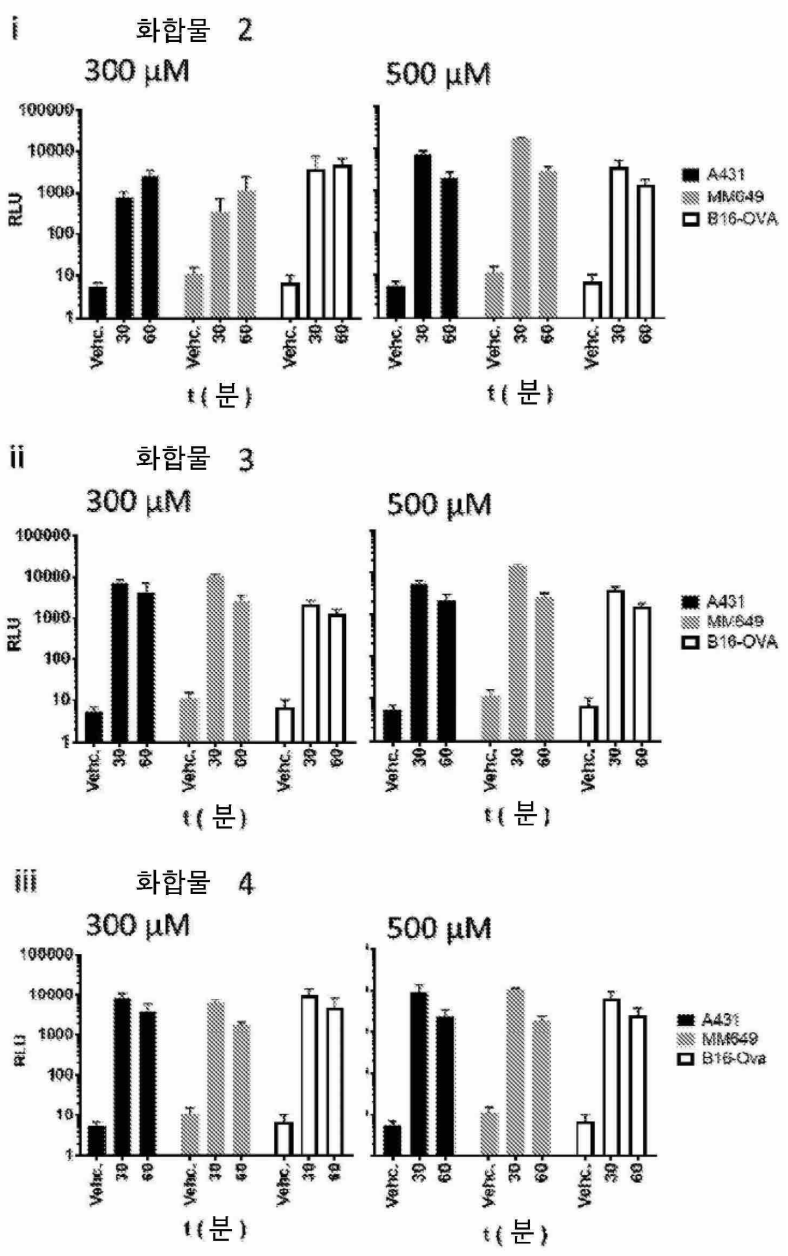
도면3b


Bi
A431
Bii
MM649
500 μM 화합물 1
300 μM 화합물 1
% 세포내 ATP
100
50
0
10
30
60
120
t (분)
n.d.

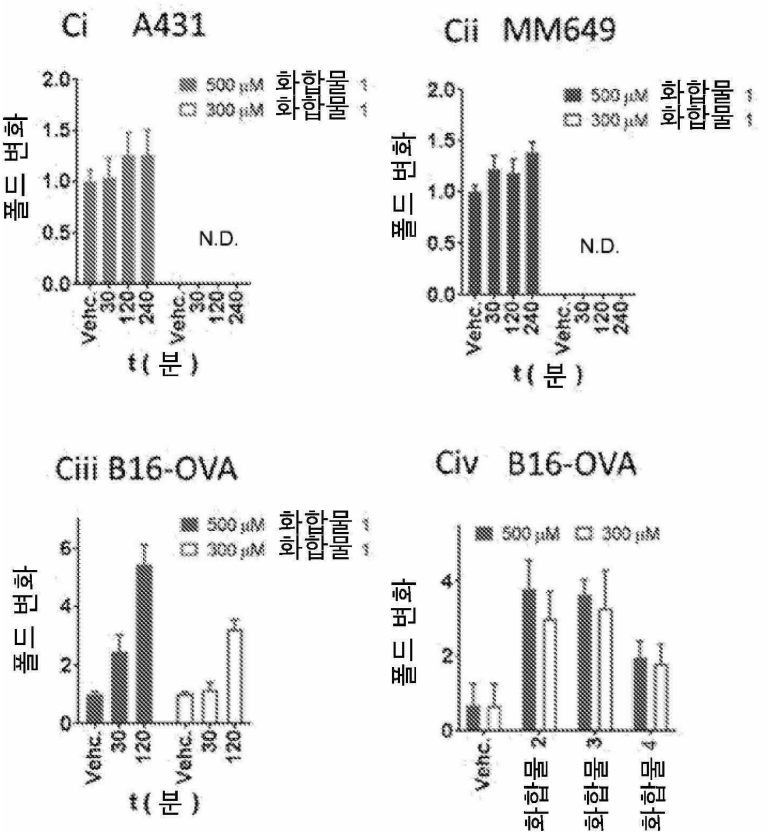
도면4a


Ai
A431
Aii
MM649
Aiii
B16-OVA
500 μM 화합물 1
300 μM 화합물 1
RLU
10000
1000
100
10
1
Vehc.
10
30
60
120
t (분)

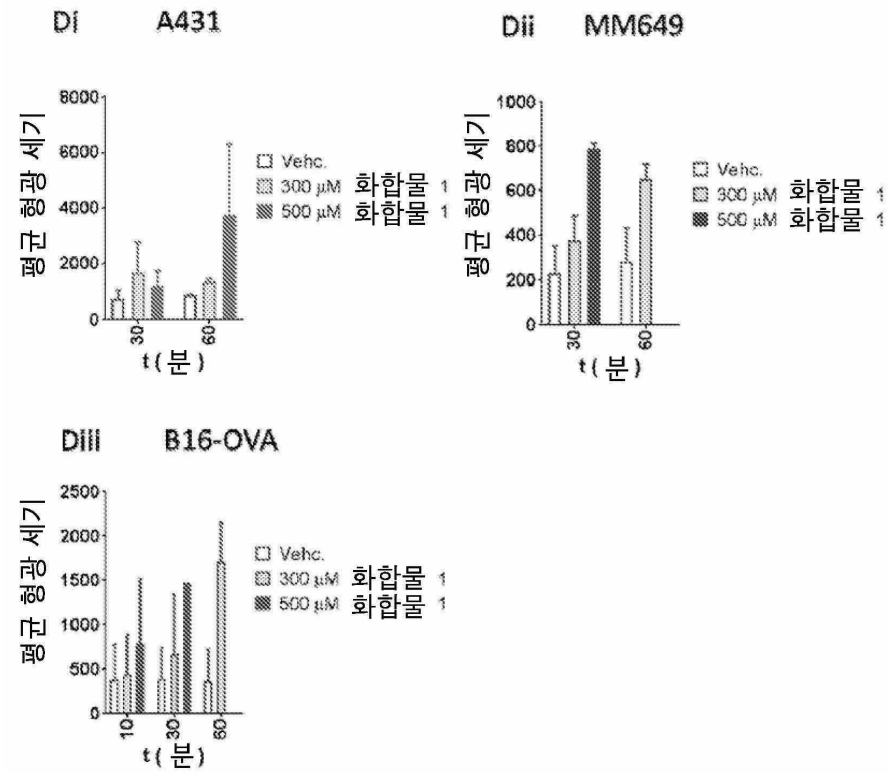
도면4b


i
화합물 2
300 μM
500 μM
RLU
100000
10000
1000
100
10
1
Vehc.
30
60
t (분)
A431
MM649
B16-OVA
ii
화합물 3
300 μM
500 μM
RLU
t (분)
A431
MM649
B16-OVA
iii
화합물 4
300 μM
500 μM
RLU
t (분)
A431
MM649
B16-Ova

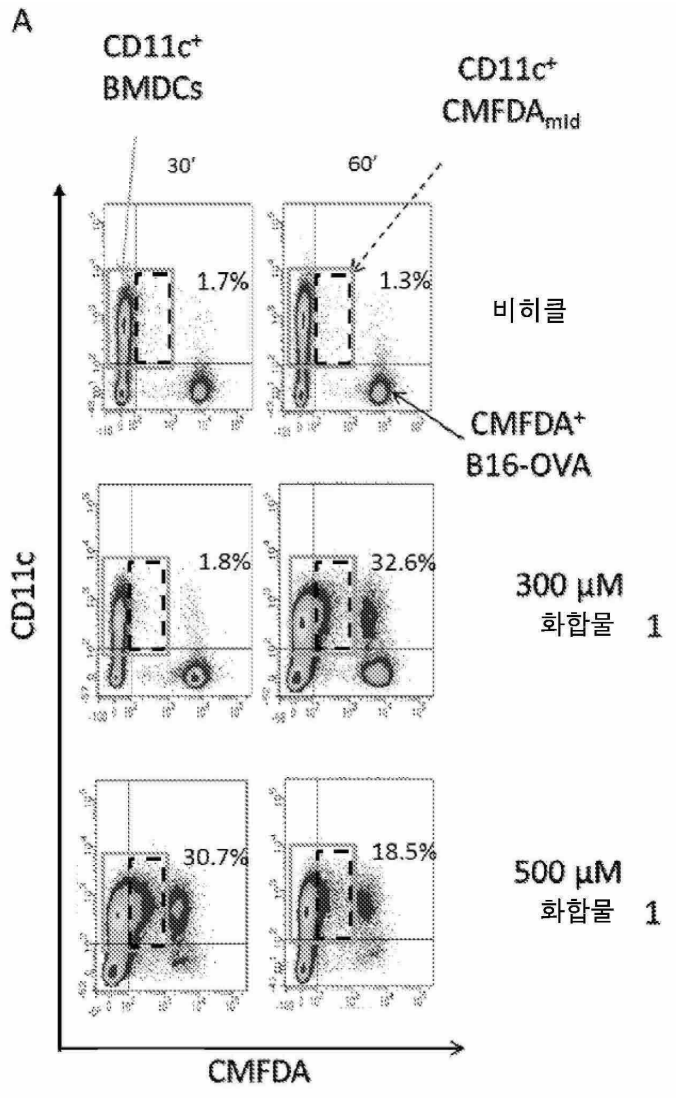
도면4c


Ci A431
Cii MM649
Ciii B16-OVA
Civ B16-OVA
폴드 변화
500 μM 화합물 1
300 μM 화합물 1
N.D.
Vehc.
30
120
240
t (분)
화합물 2
화합물 3
화합물 4

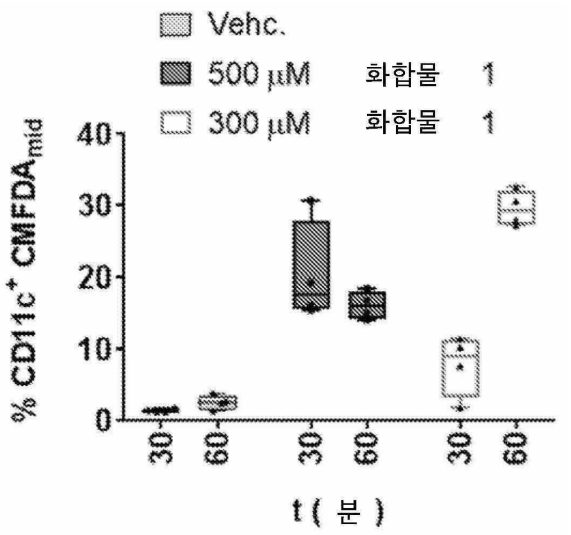
도면4d


Di A431
Dii MM649
Diii B16-OVA
평균 형광 세기
Vehc.
300 μM 화합물 1
500 μM 화합물 1
10
30
60
t (분)

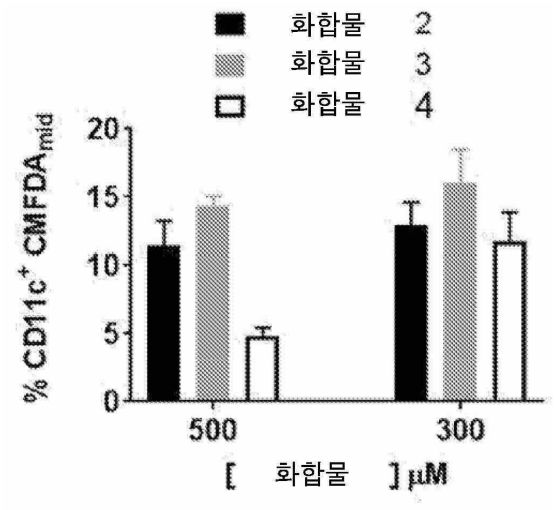
도면5a


A
CD11c+
BMDCs
CD11c+
CMFDAmid
30′
60′
1.7%
1.3%
비히클
CMFDA+
B16-OVA
1.8%
32.6%
300 μM
화합물 1
30.7%
18.5%
500 μM
화합물 1
CD11c
CMFDA

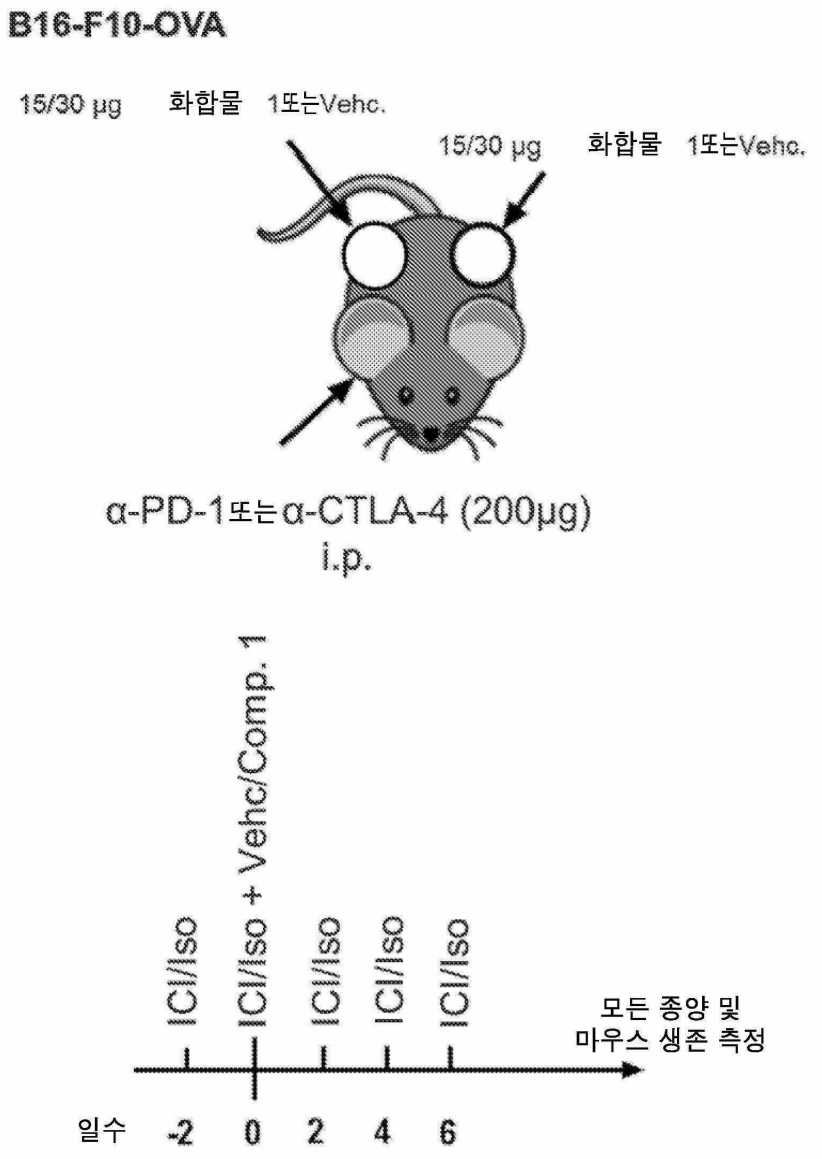
도면5b


Vehc.
500 μM 화합물 1
300 μM 화합물 1
% CD11c+ CMFDAmid
40
30
20
10
0
30
60
30
60
30
60
t (분)

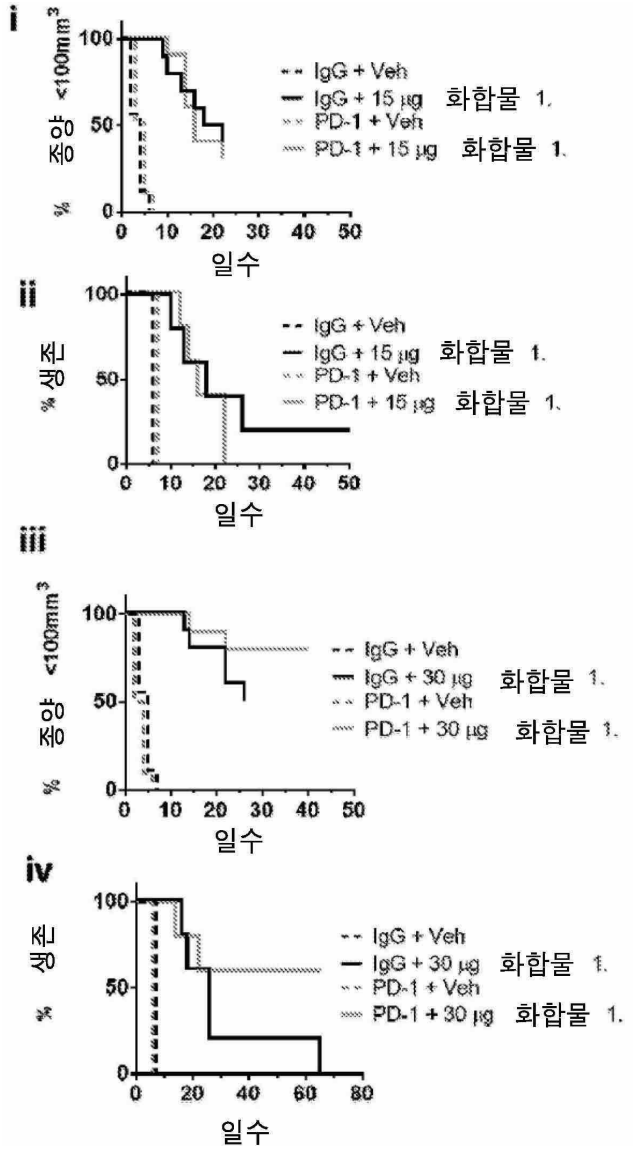
도면5c


화합물 2
화합물 3
화합물 4
% CD11c+ CMFDAmid
20
15
10
5
0
500
300
[화합물] μM

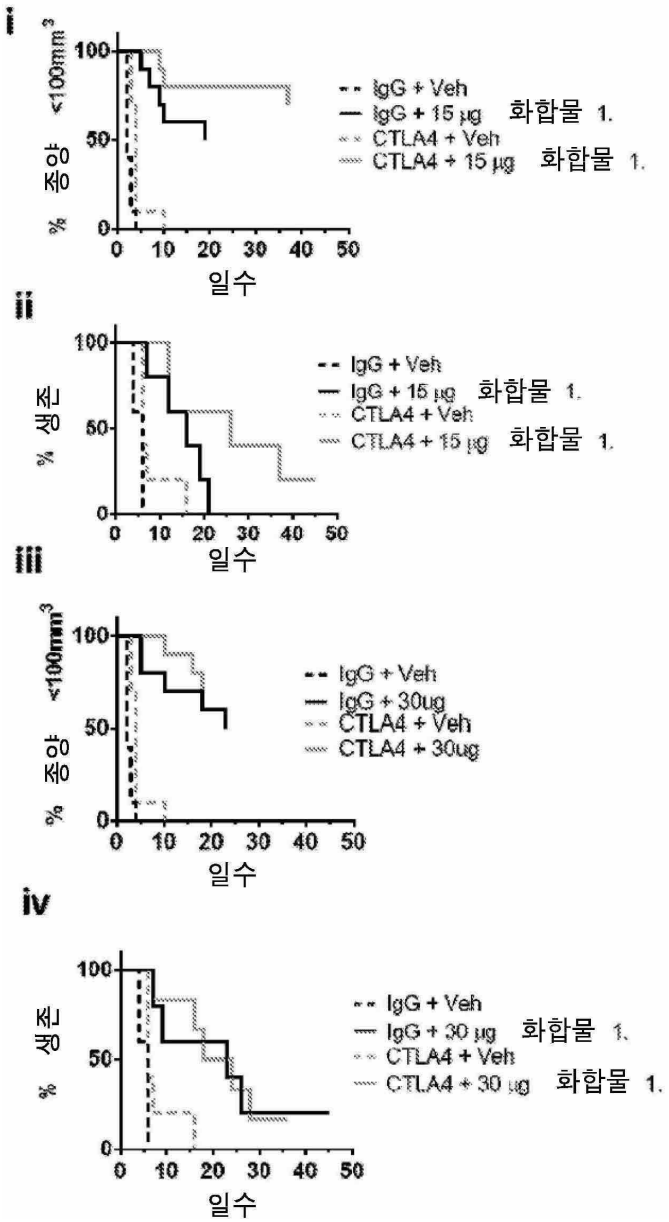
도면6a


B16-F10-OVA
15/30 μg 화합물 1또는Vehc.
15/30 μg 화합물 1또는Vehc.
α-PD-1또는α-CTLA-4 (200μg)
i.p.
ICI/Iso
ICI/Iso + Vehc/Comp. 1
ICI/Iso
ICI/Iso
ICI/Iso
모든 종양 및
마우스 생존 측정
일수 -2 0 2 4 6

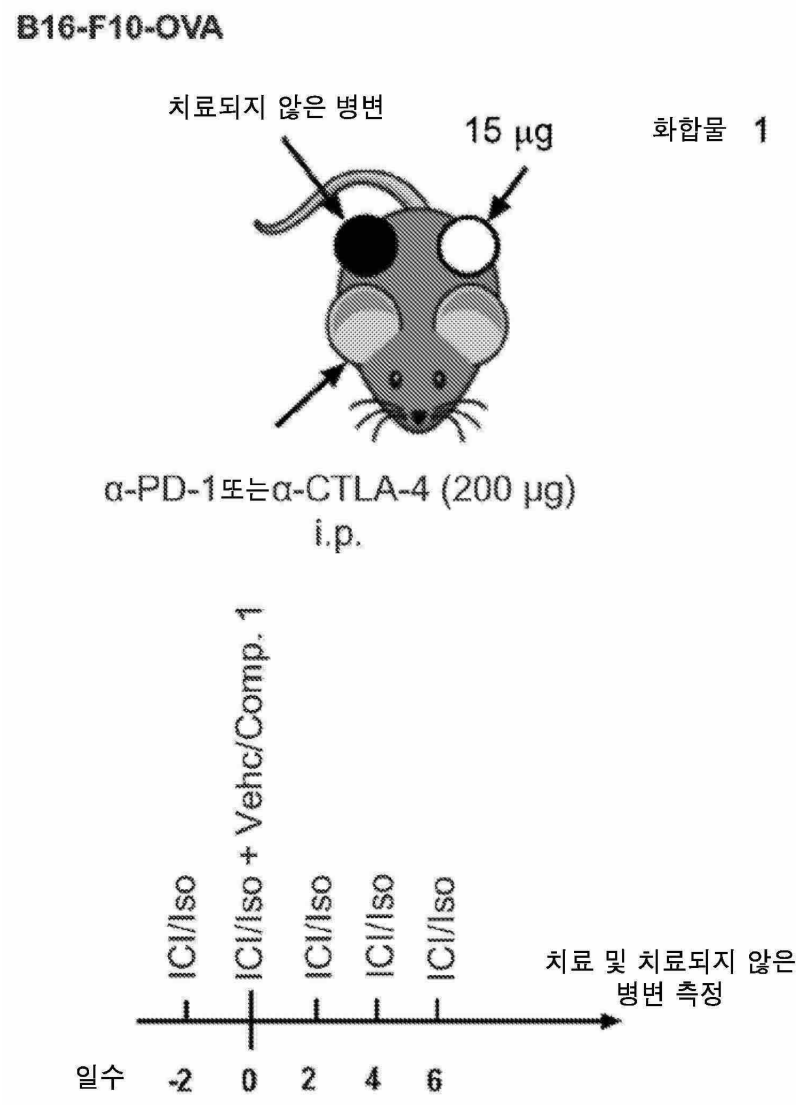
도면6b


i
종양 <100mm3 %
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 15 μg 화합물 1.
PD-1 + Veh
PD-1 + 15 μg 화합물 1.
ii
% 생존
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 15 μg 화합물 1.
PD-1 + Veh
PD-1 + 15 μg 화합물 1.
iii
종양 <100mm3 %
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 30 μg 화합물 1.
PD-1 + Veh
PD-1 + 30 μg 화합물 1.
iv
% 생존
100
50
0
0 20 40 60 80
일수
IgG + Veh
IgG + 30 μg 화합물 1.
PD-1 + Veh
PD-1 + 30 μg 화합물 1.

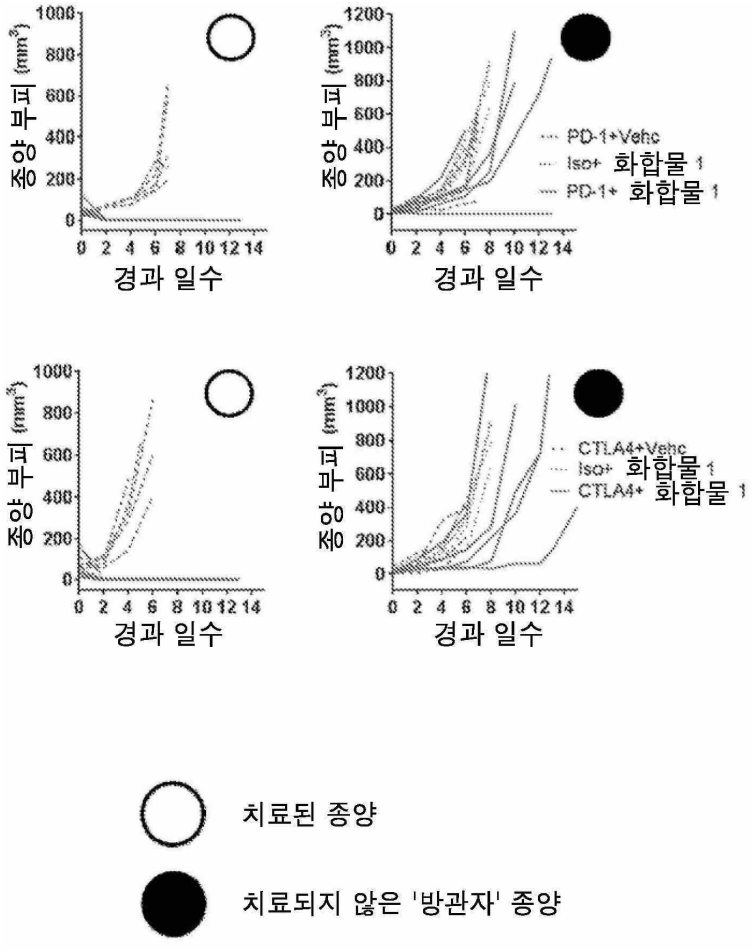
도면6c


i
<100mm³
%
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 15 μg 화합물 1.
CTLA4 + Veh
CTLA4 + 15 μg 화합물 1.
ii
%
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 15 μg 화합물 1.
CTLA4 + Veh
CTLA4 + 15 μg 화합물 1.
iii
<100mm³
%
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 30ug
CTLA4 + Veh
CTLA4 + 30ug
iv
%
100
50
0
0 10 20 30 40 50
일수
IgG + Veh
IgG + 30 μg 화합물 1.
CTLA4 + Veh
CTLA4 + 30 μg 화합물 1.

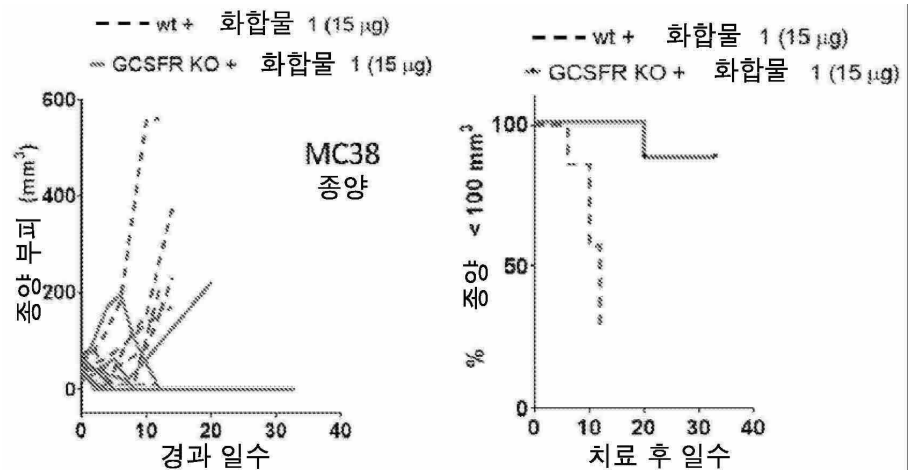
도면7a


B16-F10-OVA
치료되지 않은 병변
15 μg
화합물 1
α-PD-1또는α-CTLA-4 (200 μg)
i.p.
ICI/Iso
ICI/Iso + Vehc/Comp. 1
ICI/Iso
ICI/Iso
ICI/Iso
치료 및 치료되지 않은
병변 측정
일수
-2
0
2
4
6

도면7b


종양 부피 (mm³)
경과 일수
PD-1+Vehc
Iso+ 화합물 1
PD-1+ 화합물 1
CTLA4+Vehc
Iso+ 화합물 1
CTLA4+ 화합물 1
치료된 종양
치료되지 않은 '방관자' 종양

도면8


wt + 화합물 1 (15 μg)
GCSFR KO + 화합물 1 (15 μg)
MC38 종양
종양 부피 (mm³)
경과 일수
% 종양 < 100 mm³
치료 후 일수