(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월03일
(11) 등록번호 10-2463617
(24) 등록일자 2022년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/55 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/55 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7036486
(22) 출원일자(국제) 2017년05월16일
심사청구일자 2020년05월15일
(85) 번역문제출일자 2018년12월17일
(65) 공개번호 10-2019-0008913
(43) 공개일자 2019년01월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/032790
(87) 국제공개번호 WO 2017/200969
국제공개일자 2017년11월23일
(30) 우선권주장
62/339,363 2016년05월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
LIPSON, Evan J. et al., Clinical Cancer Research, 2013.01.15., vol 19, Issue 2, pp. 462-468
JP2014527042 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
일라이 릴리 앤드 캄파니
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포레이트 센터
(72) 발명자
벤더, 마크 하라쓰
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
가오, 홍
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
파텔, 바빈 쿠마르
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
(74) 대리인
장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 신영신

(54) 발명의 명칭 **Notch 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 이용한 조합 요법**

(57) 요 약

본 발명은 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 이용하는 조합 요법을 포함하는, 환자에서 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 또는 선양 낭성 암종을 치료하는 데 사용하기 위한 의약, 및 그를 치료하는 방법을 제공한다.

(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

유효량의, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로 이루어진 군으부터 선택되는 PD-L1 억제제와 조합으로 암의 치료에 사용하기 위한, 유효량의 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물을 포함하는 제약 조성물이며, 여기서 암은 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 및 선양 낭성 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 2

유효량의
4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물과 조합으로 암의 치료에 사용하기 위한, 유효량의, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 PD-L1 억제제를 포함하는 제약 조성물이며, 여기서 암은 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 및 선양 낭성 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 암이 결장직장암인 제약 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 암의 치료는 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 PD-L1 억제제의 동시, 별개, 또는 순차적 투여에 의한 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물의 양이 2.5 mg 내지 75 mg인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물의 양이 10 mg 내지 50 mg인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 5일간의 기간에 걸쳐 격일마다 1일 1회, 이어서 2일 동안 투약하지 않도록 (T.I.W.) 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 1일 1회 (QD), 1일 2회 (B.I.D.), 격일마다 1일 1회 (Q2D), 또는 매 3일마다 1회

(Q3D) 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물이 경구 투여용으로 제제화된 것인 제약 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, PD-L1 억제제가 1 mg/kg 내지 3 mg/kg으로 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, PD-L1 억제제가 매 14 내지 21일마다 1회 사용하기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, PD-L1 억제제가 비경구 투여용으로 제제화된 것인 제약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 비경구 투여가 정맥내 주입인 제약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물 (화합물 A) 및 프로그램화된 사멸 수용체 1 (PD-1) 억제제, 또는 프로그램화된 사멸 수용체 리간드 1 (PD-L1) 억제제를 이용한 암 요법, 및 암을 치료하기 위하여 조합을 이용하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물은 Notch 경로 신호전달 억제제 화합물이다. Notch 신호전달은 발생 및 조직 항상성 동안 중요한 역할을 한다. 리간드 및/또는 수용체의 돌연변이, 증폭, 또는 과다발현에 기인한 Notch 신호전달의 조절장애가 다수의 악성 종양과 연루되어 있다. Notch 신호전달 억제가 암 치료제 개발을 위한 잠재적인 표적이 된다. T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 편평 세포 암종 (구강), 피부암 및 수모세포종 치료를 위한 것을 비롯한 화합물 A 및 상기 화합물을 제조 및 사용하는 방법은 WO 2013/016081에 개시되어 있고, 평활근육종 치료를 위한 것을 비롯한 화합물 A 및 상기 화합물을 제조 및 사용하는 방법은 PCT/US2016/026119에 개시되어 있다. 화합물 A는 1상 임상 시험 및 정의된 분자 경로 변경, 또는 조직 기반 악성 종양을 가지는 확대 코호트에서, 및 Notch 경로 신호전달과 관련된 돌연변이, 증폭, 또는 유전자 발현 변경을 보이는 언급된 종양 유형에 대한 구체적으로 확인된 다른 항암제와 조합하여, 및 T 세포 급성 림프모구성 백혈병 또는 T 세포 림프모구성 림프종 (T-ALL/T-LBL) 환자에서의 임상 시험에서 연구되고 있다.

[0003] 종양 세포는 다양한 기전을 통해 면역계에 의한 검출 및 제거를 회피한다. 내생적으로, 면역 체크포인트 경로는 자기-관용 유지 및 T 세포 활성화 제어에서 사용된다. T 세포 상에서 발견된 PD-1 수용체에의 PD-1 리간드인 PD-L1 및 PD-L2의 결합이 T 세포 증식 및 시토카인 생산을 억제시킨다. 일부 종양에서는 PD-1 리간드의 상향조절이 발생하고, 상기 경로를 통한 신호전달은 종양의 활성 T 세포 면역 감시의 억제에 기여한다. PD-1 또는 PD-L1 억제가 종양의 면역 매개 파괴를 회복시키는 것으로 밝혀졌다. 임상 연구 결과, 길항제 항체를 이용하여 PD-1 또는 PD-L1을 표적화하는 것이 항종양 반응을 비롯한, 면역 반응의 PD-1 경로 매개 억제를 해제시키는 것으로 나타났다.

[0004] Notch 경로 신호전달은 활성화된 $CD8^+$ T 세포에 의한 PD-1 발현의 조절인자인 것으로 보고되고 있다 (문헌

[Mathieu et al., *Immunology and Cell Biology*, 2013, 91: 82-88]). 암 환자를 위한 기존 치료 옵션에도 불구하고, 효능이 증진되고, 독성이 저하된 것, 이 둘 중 하나, 또는 그 둘 모두를 제공하는, 신규하고, 상이한 요법이 계속 요구되고 있다. 현행 면역요법은 암 유형 중 서브세트에서 및 오직 환자 서브세트에서만 유익한 것으로 나타났다. 특정 암에 대한 전체 반응을 개선시키거나, 또는 이들 치료를, 현재 어느 한 작용제 단독인 것에 대해서는 더 작은 반응을 보일 수 있는 암으로 확장시키는 것을 촉진시키는 신규한 요법 또는 조합 전략법이 요구되고 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 어느 한 작용제 단독인 것에 의해 제공되는 치료 효과와 비교하여, T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 및 선양 낭성 암종에 대하여 화합물 A 및 항-PD-1 또는 PD-L1 모노클로날 항체 억제제 활성의 조합 활성으로부터 유익한 치료적 효과를 제공한다고 간주된다.

[0006] 본 발명의 한 측면은 환자에서 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 또는 선양 낭성 암종을 치료하는 방법이며, 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 유효량의, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0007] 본 발명의 추가 측면은 환자에서 결장직장암을 치료하는 방법이며, 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 유효량의, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 측면은 환자에서 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 또는 선양 낭성 암종을 치료하는 방법이며, 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 유효량의, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 측면은 환자에서 결장직장암을 치료하는 방법이며, 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 유효량의, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 동시에, 별개로, 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 추가 측면은 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 또는 선양 낭성 암종 치료에서 동시, 별개, 또는 순차적 사용을 위한, 화합물 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물; 및 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또

는 PD-L1 억제제를 제공한다.

[0011] 본 발명의 또 다른 측면은 결장직장암 치료에서 동시, 별개, 또는 순차적 사용을 위한, 화합물 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물; 및 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 제공한다.

[0012] 본 발명의 추가 측면은 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 또는 선양 낭성 암종의 동시, 별개, 또는 순차적 치료를 위한,

[0013] 의약의 제조를 위한 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물의 용도; 및

[0014] 의약의 제조를 위한, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제의 용도를 제공한다.

[0015] 본 발명의 추가 측면은 결장직장암의 동시, 별개, 또는 순차적 치료를 위한,

[0016] 의약의 제조를 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물의 용도; 및

[0017] 의약의 제조를 위한, 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 아테졸리주맙, 더발루맙, 및 아벨루맙으로부터 선택되는 PD-1 또는 PD-L1 억제제의 용도를 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면은 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 또는 선양 낭성 암종 치료에서 사용하기 위한, 동시, 별개, 또는 순차적 투여에 관한 설명서와 함께 각 치료제의 별개의 조성물을 포함하는 상업적 패키지이다.

[0019] 본 발명의 추가의 또 다른 측면은 결장직장암 치료에서 사용하기 위한, 동시, 별개, 또는 순차적 투여에 관한 설명서와 함께 각 치료제의 별개의 조성물을 포함하는 상업적 패키지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 화합물 4,4,4-트리플루오로-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-7H-피리도[2,3-d][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소-에틸]부탄아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물 (화합물 A)의 CAS 등록 번호는 142138-81-4이다. 대안적으로, 화합물은 N-[(1S)-2-[[(7S)-6,7-디히드로-5-(2-히드록시에틸)-6-옥소-5H-피리도[3,2-a][3]벤자제핀-7-일]아미노]-1-메틸-2-옥소에틸]-4,4,4-트리플루오로부탄아미드로 명명될 수 있다. 화합물 A를 명확하게 식별하기 위하여 다른 명칭이 사용될 수 있다.

[0021] 본원에서 사용되는 바, "PD-1 억제제" 및 PD-L1 억제제"라는 용어는 완전 인간, 또는 인간화 IgG, 임의적으로 최적화된 모노클로날 항체를 의미한다.

[0022] PD-1 억제제로는 니볼루맙 및 펨브롤리주맙을 포함한다. 니볼루맙 (옵디보(Opdivo)®)은 또한 iMDX-1106, MDX-1106-04, ONO-4538, 또는 BMS-936558로서 공지되어 있고, 그의 CAS 등록 번호는 946414-94-4이다. 니볼루맙은, PD-1을 특이적으로 차단하는 완전 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 니볼루맙 (클론 5C4) 및 PD-1에 특이적으로 결합하는 다른 인간 모노클로날 항체는 US 8,008,449 및 WO2006/121168에 개시되어 있다. 머크 (Merck) 3745, MK-3475 또는 SCH-900475로도 또한 공지되어 있는 펨브롤리주맙 (키트루다(Keytruda)®) (이전 람브롤리주맙)은 PD-1에 결합하는 인간화 IgG4 모노클로날 항체이다. 펨브롤리주맙은 문헌 [Hamid, O. et al., *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(2): 134-44]; WO2009/114335; 및 US 8,354,509에 개시되어 있다. 다른 항-PD-1 항체는 US 8,609,089; US 2010028330; 및/또는 US 20120114649에 개시되어 있다.

[0023] PD-L1 억제제로는 YW243.55.S70, MPDL3280A, MEDI-4736, MSB-0010718C, 및 MDX-1105를 포함한다.

YW243.55.S70은 WO2010/077634 및 US20100203056에 기술되어 있는 항-PD-L1 항체이다. (RG7446, RO5541267, 아테졸리주맙, 티쎈트릭(Tecentriq)™으로도 공지되어 있는) MDPL3280A는 PD-L1에 결합하는 완전 인간화 Fc 최적화된 IgG1 모노클로날 항체이다. MPDL3280A 및 PD-L1에 대한 다른 인간 모노클로날 항체는 US 7,943,743 및 US 20120039906에 개시되어 있다. (더발루맙으로도 공지되어 있는) MEDI-4736은 PD-L1에 대한 Fc 최적화된 IgG1 모노클로날 항체이고, WO2011/066389에 기술되어 있다. (아벨루맙으로도 공지되어 있는) MSB-0010718C는 PD-L1에 대한 완전 인간 IgG1 모노클로날 항체이고, WO2013/079174에 기술되어 있다. BMS-936559로도 공지되어 있는 MDX-1105는 WO2007/005874에 기술되어 있는, 완전 인간 IgG4 모노클로날 항-PD-L1 항체이다.

[0024] 본원에서 사용되는 바, "환자"라는 용어는 포유동물, 바람직하게, 인간을 지칭한다.

[0025] "치료학상 유효량" 또는 "유효량"이란, 환자에서 종양 세포 성장을 억제시키고, 암을 제거하거나, 또는 그의 진행을 저속화시키거나, 정지시키는 데 필요한, 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 또는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물을 함유하는 제약 조성물의 투여량, 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제, 또는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 함유하는 제약 조성물의 투여량을 의미한다. 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물의 투여량은 5일간의 기간 동안에 걸쳐 격일마다 1일 1회로 2.5 mg/환자 내지 75 mg/환자 범위, 이어서, 2일 동안 투약하지 않는 것 (T.I.W.)이다. 라벨에 달리 명시되지 않는 한, PD-1 또는 PD-L1 억제제의 투여량은 매 14-21일마다 한 번씩 30 내지 60분 동안에 걸쳐 1-3 mg/kg 범위로 정맥내 주입하는 것이다. 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물의 바람직한 투여량은 10 mg 내지 50 mg 범위 T.I.W.이다. 환자를 치료하는 데 요구되는 정확한 투여량 및 치료 기간은 질환의 병기 및 중증도 뿐만 아니라, 개별 환자의 구체적 요구 사항 및 반응을 고려하여 의사에 의해 결정될 것이다. 투약 투여는 환자에게 더욱 최적인 치료상의 이익을 제공하기 위해 및 임의의 약물과 관련된 독성을 관리 또는 호전시키기 위해 조정될 수 있다. 대안적 투약 스케줄, 예컨대, 1일 1회 (QD), 1일 2회 (B.I.D.), 1일 3회 (T.I.D.); 격일마다 (Q2D); 또는 매 3일마다 (Q3D) 1일 1회 투약하는 것이 화합물 A의 경우에 적절할 수 있다. PD-1 또는 PD-L1 억제제의 경우, 약물과 관련된 독성을 관리 또는 호전시키기 위해 투약을 보류하거나, 또는 추가 투약을 영구적으로 중단하는 것을 비롯하여, 투약 투여는 조정될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조합 요법은 치료를 필요로 하는 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 및 선양낭성 암종, 바람직하게, 연조직 육종 환자에게 유효량의 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물을 28일 사이클 동안에 걸쳐 매주 (7일) 5일 동안에 걸쳐 격일마다 1일 1회 및 투약하지 않고 2일, 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 매 14-21일마다 한 번씩 30-60분 동안에 걸쳐 1-3 mg/kg으로 투여함으로써 수행된다.

[0027] "치료," "치료하다," 및 "치료하는"이라는 용어는 증상 중 하나 이상의 것을 경감시키거나, 저속화시키거나, 중단시키거나, 또는 역저시키기 위해, 및 비록 암이 실제로 제거되지는 않더라도 암의 진행을 지연시키거나, 중단시키거나, 또는 역전시키기 위해, 예컨대, 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 투여하는 것과 같이, 환자가 앓고 있는 암에 대한 전 범위의 개입을 포함하는 것으로 의미된다.

[0028] 화합물 A 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물은 바람직하게 제약상 허용되는 담체를 사용하여 제약 조성물로서 제제화되고, 다양한 경로에 의해 투여된다. 바람직하게, 상기 조성물은 경구 투여용이다. PD-1 또는 PD-L1 억제제는 바람직하게 제약상 허용되는 담체를 사용하여 제약 조성물로서 제제화되고, 비경구적 경로에 의해, 바람직하게, 정맥내 주입에 의해 투여된다. 바람직하게, 상기 조성물은 동결건조된 분제 또는 액체 조성물일 수 있다. 투여량을 투여하기 위한 준비를 위한 재구성 또는 희석은 라벨에 따라 또는 관련 기술분야의 통상의 기술에 의해 이루어진다. 상기 제약 조성물 및 그를 제조하는 프로세스는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 5th edition, Rowe et al., Eds., Pharmaceutical Press (2006)]; 및 [REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (Troy, *et al.*, Eds., 21st edition, Lippincott Williams & Wilkins (2006)]을 참조한다.

[0029] 화합물 A는 다수의 무기 및 유기 카운터이온과 반응하여 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 상기 제약상 허용되는 염 및 그를 제조하는 일반 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002)]; [S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts, " *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1,

January 1977]을 참조한다.

[0030] 본 발명의 조합 치료의 효능은 종양 퇴행, 종양 중량 또는 크기 위축, 질병 진행까지의 시간, 전체 생존, 무진행 생존, 전체 반응률, 반응 지속기간, 종양 퇴행 없이 전이성 확산의 억제 및 PET/CT 영상화를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 암 치료를 평가하는 데 보편적으로 사용되는 다양한 종점에 의해 측정될 수 있다.

[0031] "조합," "치료적 조합" 및 "제약 조합"이라는 용어는, 개별 치료제, 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 수화물, 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제가 동시에, 또는 치료제들이 협력적인 효과를 발휘할 수 있도록 하는 시간 간격 내에서 별개로 투여될 수 있는 경우의, 임의적으로 조합 투여에 관한 설명서와 함께 패키징된, 비고정 용량의 조합을 지칭한다.

[0032] "동시" 투여라는 용어는 각각의 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 환자에게 단일 작업으로 투여하는 것, 예컨대, 각각의 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 독립적으로 실질적으로 동시간에, 또는 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제가 협력적인 치료 효과를 보일 수 있도록 하는 시간 간격 내에서 별개로 투여하는 것을 의미한다.

[0033] "별개" 투여라는 용어는 비고정 용량의 투여 형태로부터 각각의 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 환자에게 동시에, 실질적으로 공동으로, 또는 임의 순서로 순차적으로 투여하는 것을 의미한다. 각각의 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제의 투여를 위해 명시된 시간 간격이 존재할 수 있거나, 또는 존재하지 않을 수도 있다.

[0034] "순차적" 투여라는 용어는 비고정 (별개의) 투여 형태로부터 각각의 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 환자에게 별개의 작업으로 투여하는 것을 의미한다. 2번의 투여 작업은 명시된 시간 간격에 의해 연결될 수 있거나, 또는 그렇지 않을 수도 있다. 예를 들어, 화합물 A를 T.I.W.로 투여하고, 명시된 시간 동안에 걸쳐, 예컨대, 매 14 내지 21일마다 한 번씩 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 투여하는 경우가 있다.

[0035] "~와 함께 조합하여"라는 어구는 치료를 필요로 하는 암 환자, 특히, 결장직장암 환자에게 각각의 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 동시에, 별개로, 및 순차적으로 투여하는 것을 포함한다.

[0036] "공동 투여" 또는 "조합 투여"라는 용어는 단일 환자에게 치료제를 투여하는 것을 포함하고, 이는 치료제가 상이한 투여 경로에 의해 또는 상이한 시점에 투여될 수 있는 치료 요법을 포함한다.

[0037] 단일 환자에서 단독으로 투여된 각 치료제의 단순 상가 효과보다 더 큰 효과를 일으키는 두 치료제의 유익한 작용은 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법, 예컨대, 시그모이드-Emax 방정식(Sigmoid-Emax equation) (Holford and Scheiner, *Clin. Pharmacokinet.*, 1981, 6: 429-453), 로에베 가산 방정식(equation of Loewe additivity) (Loewe and Muischenk, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1926, 114: 313-326), 중간 효과 방정식 (Chou and Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, 1984, 22: 27-55), 및 블리스 독립 방법(Bliss Independence method), 또는 공지된 등가 방법을 사용하여 계산될 수 있다. 각 방정식을 실험 데이터에 적용시켜 상응하는 그래프를 작성함으로써 약물 조합의 효과를 상가적, 생물학적으로 관련하여 상가 범위 이내, 상가적인 것보다 작은 것, 또는 상가적인 것보다 더 큰 것으로 사정하는 것을 지원할 수 있다.

[0038] Notch의 종양원성 역할은 Notch1 세포내 도메인을 T 세포 수용체-β 프로모터 영역으로 전위시켜 Notch1 세포내 도메인을 과다발현시키는 것을 포함하는 인간 T 세포 백혈병에서 최초로 보고되었다 (Grabher et al. Nature Review Cancer, 2006(6):347-359; Weng et al. Science, 2004(306):269-271). 마우스의 조혈 전구 세포에서의 Notch1 세포내 도메인의 과다발현은 마우스가 인간과 유사한 T 세포 급성 림프모구성 백혈병을 나타내도록 하였다. T 세포 급성 림프모구성 백혈병 이외에도, Notch 신호가 수용체 증폭 및 리간드 및/또는 수용체의 과다발현을 비롯한 다중의 기전을 통해, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병 (Rosati et al., Blood, 2009(113): 856-865), 급성 골수 백혈병 (Sliwa et al. Int J Clin Exp Pathol, 2014(7(3)): 882-889), 만성 골수 백혈병 (Nakahara et al. Blood, 2010(115(14)): 2872-2881), 및 적백혈병 (Robert-Moreno et al., Leukemia, 2007(21): 1496-1503)을 비롯한 다른 암에서도 종양원성이라는 증거가 증가하고 있다. 리간드 및/또는 수용체의 돌연변이 또는 과다발현에 기인한, 비정상적인 구성적 Notch 신호전달은 또한 삼중 음성 유방암 (Stoeck et al., Cancer Discovery, 2014(4): 1154-1167), 유방암, 난소암 (Park et al. Cancer Research, 2006(66):6312-6318), 흑색종 (Gast et al. Genes, Chromosomes & Cancer, 2010(49):733-745), 폐암, 비소세포 폐암 (Westhoff et al. PNAS, 2009(106):22293-22298), 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 편평 세포 암종 (구강), 피부암 및 수모세포종 (Rangathan et al., Nature Review Cancer, 2011(11):338-351 and Supplementary information S1 (table))을 비롯한, 다수의 고형 종양 악성 종양에 연루되어 있다. 리간드 및/또는 수용체의 돌연변이 또는 과다발현에 기인한, 비정상적인 구성적 Notch 신호

전달은 또한 혈관육종 (Ravi et al., J Clin Oncol, 2007, (25(18S, June 20 Supplement)): Abstract 10030), 횡문근육종 (Belyea et al., Clin Cancer Res, 2011(17(23)): 7324-7336; Roma et al., Clin Cancer Res, 2011(17(3)): 505-513), 지방육종 (J Clin Oncol, 2009, (27(15S, Supplement)): Abstract 10526), 악성 섬유조직구종 (Wang et al., Cancer Res, 2012, (72): 1013-1022), 간세포 암종 (Villanueva et al., Gastroenterology, 2012, (143): 1660-1669), 간내 및 간외 담관암종 (Wu et al., Int J Exp Pathol, 2014, (7(6)): 3272-3279; Sekiya et al., J Clin Invest, 2012, (122(11)): 3914-3918; Yoon et al., World J Gastroenterol, 2011, (17(35)): 4023-4030), 및 선양 낭성 암종 (Bell et al., Annals of Diagnostic Pathology, 2014, (18): 10-13; Stoeck et al., Cancer Discov, 2014, (4): 1154-1167)에 연루되어 있다.

[0039] 암의 성질은 다인성을 띤다. 적절한 환경하에서, 작용 기전이 상이한 치료제들이 조합될 수 있다. 그러나, 단지 작용 모드가 상이한 치료제들의 조합이 반드시 이로운 효과를 일으키는 것은 아니라는 점만은 고려한다. 치료제들 중 단 하나로 이루어진 단일요법과 비교하여 입증된 유익한 효과 (치료적 효과, 예컨대, 효능 증진 및/또는 독성 저하)를 제공하는 특정 치료제가 바람직하다.

[0040] 본 발명의 조합은 T 세포 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 적백혈병, 삼중 음성 유방암, 유방암, 난소암, 흑색종, 폐암, 비소세포 폐암, 췌장암, 교모세포종, 결장직장암, 두경부암, 자궁경부암, 전립선암, 간암, 구강 편평 세포 암종, 피부암, 수모세포종, 간세포 암종, 간내 및 간외 담관암종, 데스모이드 종양, 연조직 육종, 및 선양 낭성 암종 치료에 적합한 것으로, 및 특히, 표준 요법으로 실패한, 연조직 육종 환자 치료에 적합한 것으로 간주된다. 이는 단일요법에 대해 내성을 보이거나, 또는 본 발명의 것과 상이한 조합에 대해 내성을 보이는 암 환자를 포함한다.

[0041] "완전 관해" (CR), "부분 관해" (PR), "진행 병변" (PD), "안정 병변" (SD), "객관적 반응" (OR)이라는 용어는 문헌 [RECIST v1.1, Eisenhauer et al., *European Journal of Cancer*, 2009, 45, 228-247]에 따른 정의와 일관되게 사용된다.

[0042] "질병 진행까지의 시간" (TTP)이라는 용어는 초기 치료 시점부터, 연구시 가장 작은 총합을 기준으로서 간주하면서 (이는 본 해당 총합이 연구시 가장 작은 값일 경우에는 기준선 총합을 포함한다), 표적 병변의 직경의 총합이 적어도 20% 증가한 암이 진행할 때까지의 (진행 병변에 관하여 RECIST v1.1 정의 참조), 일반적으로 주 또는 개월 단위로 측정되는 시간을 지칭한다. 20%라는 상대적 증가 이외에도, 총합은 또한 적어도 5 mm라는 절대적 증가도 입증하여야 한다. 하나 이상의 새로운 병변의 출현 또한 진행인 것으로 간주된다. 상기 진행은 숙련된 임상의에 의해 평가된다.

[0043] "TTP 연장"이라는 용어는 i) 치료받지 않은 환자, 또는 ii) 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제, 둘 모두보다 적은 것으로 치료받은 환자와 비교하여 치료받은 환자에서의 질병 진행까지의 시간 증가를 지칭한다.

[0044] "생존"이라는 용어는 환자가 살아있는 것을 지칭하며, 이는 전체 생존 뿐만 아니라, 무진행 생존도 포함한다.

[0045] "전체 생존"이라는 용어는 환자가 진단 시점 또는 치료 시점부터 예컨대, 1년, 5년 등의 정의된 기간 동안 살아있는 것을 지칭한다.

[0046] "무진행 생존"이라는 용어는 환자가 암 진행 없이 살아있는 것을 지칭한다.

[0047] 본원에서 사용되는 바, "생존 연장"이라는 용어는 i) 치료받지 않은 환자, ii) 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제, 둘 모두보다 적은 것으로 치료받은 환자, 또는 iii) 대조군 치료 프로토콜과 비교하여 치료받은 환자에서의 전체 또는 무진행 생존 증가를 의미한다. 생존은 치료 개시 이후, 또는 암 초기 진단 이후에 예컨대, 1개월, 6개월, 1년, 5년, 또는 10년 등의 정의된 기간 동안 모니터링된다.

[0048] "원발성 종양" 또는 "원발성 병변"이라는 용어는, 또 다른 조직, 기관, 또는 환자 신체 중의 부위에 위치하는 전이성 종양 또는 병변이 아니라, 원래의 암을 의미한다.

[0049] 한 실시양태에서, 화합물 A의 용량은 최대 내약 투여량에 도달할 때까지 단계적으로 증량되고, 본 발명의 PD-1 또는 PD-L1 억제제는 고정 용량으로 투여된다. 대안적으로, 화합물 A는 고정 용량으로 투여될 수 있고, PD-1 또는 PD-L1 억제제의 용량은 단계적으로 증량될 수 있다. 각 환자는 화합물 A 및/또는 PD-1 또는 PD-L1 억제제를 매일 또는 간헐적으로 투약받을 수 있다. 상기 연구에서 치료 효능은 예컨대, 12, 18 또는 24주 후에 매 6주마다 증상 점수 평가에 의해 측정될 수 있다.

[0050] 화합물 A는 WO 2013/016081에 기술된 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0051] PD-1 또는 PD-L1 억제제는 US 8,008,449 및 WO2006/121168; 문헌 [Hamid, O. et al., *New England Journal of Medicine*, 2013, 369 (2): 134-44]; WO2009/114335, 및 US 8,354,509; US 8,609,089, US 2010028330, 및/또는 US 20120114649; WO2010/077634; US2010203056; US 7,943,743; US 20120039906; WO2011/066389; WO2013/079174; 및 WO2007/005874에 기술된 방법에 의해; 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되고, 그에 의해 통상 사용되는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0052] 하기 실시예는 각각 화합물 A 단독, PD-1 억제제 단독, 또는 PD-L1 억제제 단독, 및 화합물 A 및 PD-1 또는 PD-L1 억제제의 조합의 활성을 예시하는 것이다.

[0053] 생물학적 실시예 1

[0054] **생체내 연구:**

[0055] 생체내 연구를 위해, 0.2 mL 행크스 균형 염 용액(Hank's Balanced Salt Solution: HBSS) 중의 1 x 10^6개의 CT26 세포 (ATCC® CRL2639™)인 결장직장암 세포주를 6-8주령된 BALB/C 암컷 마우스 (할란 라보라토리즈(Harlan Laboratories))의 뒷다리에의 피하 주사에 의해서 이식한다. 마우스에 일반 사료를 임의 공급한다. 종양 이식 6일째에 0.25% 트윈(Tween)® 80 중 1% 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 (Na-CMC) 중의 화합물 A의 경구적 투여 (위관영양), 또는 포스페이트 완충처리된 염수 (PBS) 중 마우스 항 PD-L1 항체 (10F.9G2, 바이오X셀(BioXcell) 카탈로그 번호: BE0101)의 복강내 주사 또는 PBS 중 마우스 항 PD-1 (CD279) 항체 (클론: RMP1-14, 바이오X셀#: BP0146-R) 또는 0.2 mL 부피의 그의 각 비히클의 복강내 주사에 의해 치료를 개시한다. 화합물 A는 2주 동안 월요일, 수요일 및 금요일 스케줄로 8 mg/kg씩 투여하고, 10F.9G2 및 RMP1-14는 2주 동안 월요일 및 목요일 스케줄로 250 μg/용량/동물로 투여한다.

[0056] 시간 경과에 따라 종양 성장 및 체중을 모니터링하여 효능 및 독성 징후를 평가한다. 주 2회에 걸쳐 종양을 2차원적으로 측정하고, 종양 부피는 하기 공식: (종양 부피) = [(L) x (W2) x (Π/6)] (여기서, L은 중간축 길이이고, W는 중간축 너비이다)에 기초하여 계산한다. 종양 부피 데이터를 로그 스케일로 변환시켜 시간 및 처리군 간의 분산을 균등하게 한다. SAS™ 소프트웨어 (버전 8.2)에서 MIXED™ 방법을 사용하여 시간 및 처리에 의한 2원 반복 측정 분산 분석으로 로그 부피 데이터를 분석한다. 반복 측정에 대한 상관성 모델은 공간 검정이다. 종양 부피 스케일로 역로그화된, 반복 측정 분석으로부터의 최소 제곱 평균이 하기 표 1에 제시되어 있다. 20일째의 연구에서 각 쌍의 군들을 비교하기 위한 P 값은 하기 표 2에 제시되어 있다. 시험군은 하기와 같다:

[0057] 1: 1% CMC/0.25% 트윈® 80/0.05% 소포제, 월요일-수요일-금요일 x2, PO/PBS 월요일-목요일 x2, IP

[0058] 2: 화합물 A, 8 mg/kg, 월요일-수요일-금요일 x2, PO

[0059] 3: 화합물 B (PD-L1), 250 μg/용량, 월요일-목요일 x2, IP

[0060] 4: 화합물 C (PD-1), 250 μg/용량, 월요일-목요일 x2, IP

[0061] 5: 화합물 A, 8 mg/kg, 월요일-수요일-금요일 x2, PO/화합물 B (PD-L1), 250 μg/용량, 월요일-목요일 x2, IP

[0062] 6: 화합물 A, 8 mg/kg, 월요일-수요일-금요일 x2, PO/화합물 C (PD-1), 250 μg/용량, 월요일-목요일 x2, IP.

[0063] 시간 경과에 따라 종양 성장 및 체중을 모니터링하여 효능 및 독성 징후를 평가한다. 주 2회에 걸쳐 종양을 2차원적으로 측정하고, 종양 부피는 하기 공식: (종양 부피) = [(L) x (W2) x (Π/6)] (여기서, L은 중간축 길이이고, W는 중간축 너비이다)에 기초하여 계산한다. 종양 부피 데이터를 로그 스케일로 변환시켜 시간 및 처리군 간의 분산을 균등하게 한다. SAS™ 소프트웨어 (버전 8.2)에서 MIXED™ 방법을 사용하여 시간 및 처리에 의한 2원 반복 측정 분산 분석으로 로그 부피 데이터를 분석한다. 반복 측정에 대한 상관성 모델은 공간 검정이다. 각 시점에서 처리군을 대조군과 비교한다. 각 시점에서 조정된 평균 및 표준 오차를 계산하기 위하여 각 처리군에 대하여 별개로 MIXED™ 방법을 사용한다. 두 분석 모두 각 동물, 및 큰 종양을 가지는 동물이 연구 초기에 제거되었을 때 발생한 데이터 손실 범위 내에서 자기상관을 설명한다. 시간 대비 각 처리군에 대해 조정된 평균 및 표준 오차를 플롯팅한다. 항종양 활성은 대조군 대비 처리군에 대한 종양 부피 백분율(%) (% T/C)로 표시되어 있고, 이는 처리군에서의 종양 부피를 비히클 처리군과 비교함으로써 계산된다. 처리군에 대한 % T/C 및 통계적 유의수준 값 (p 값)은 본질적으로 상기 기술된 바와 같이 측정되고, 하기 표 2에 요약되어 있다.

[0064] <표 1>

[0065] 종양 부피 (㎣): 기하 평균

	연구일				
군	8	10	14	17	20
1 비히클	52.92	99.25	486.99	1045.42	1643.20
2 화합물 A	47.96	88.80	376.50	751.13	1227.40
3 화합물 B	49.82	96.48	378.49	790.67	1313.36
4 화합물 C	45.30	87.73	241.50	491.72	622.56
5 화합물 A+B	42.79	88.58	221.73	321.19	472.83
6 화합물 A+C	47.88	102.62	245.30	501.45	569.20

[0066]

[0067] <표 2>

[0068] 종양 부피 모든 쌍들의 비교 p 값

군	2 화합물 A	3 화합물 B	4 화합물 C	5 화합물 A+B	6 화합물 A+C
1 비히클	0.26	0.362	<0.001	<0.001	<0.001
2 화합물 A		0.828	0.009	<0.001	0.001
3 화합물 B			0.005	<0.001	<0.001
4 화합물 C				0.036	0.455
5 화합물 A+B					0.17

[0069]

[0070] 표 2는 본 시험에서 화합물 A 및 PD-L1의 조합 (5군)이 각각 화합물 A 단독 (2군) 및 PD-L1 단독 (3군)인 것에

비하여 통계적으로 유의적인 종양 성장 억제 결과를 입증하였다는 것을 보여준다. 화합물 A 및 PD-1의 조합 (6군)은 화합물 A 단독 (2군)인 것에 비하여 통계적으로 유의적인 성장 억제 결과를 입증하였지만, PD-1 단독 (4군)인 것에 비하여는 그러하지 않았다.

[0071] ***조합 분석***

[0072] 앞서 기술된 반복 측정 분석을 사용함으로써, 대조 진술을 사용하여 조합된 2개의 특정 처리 (화합물 A 및 PD-L1)를 이용하였을 때의 연구 20일째의 상호작용 효과에 대하여 검정한다. 이 검정은 p = 0.008로 통계적으로 유의적이고, 이는, 조합 군에서의 평균 종양 부피의 추정치 (298 ㎣)가 블리스 독립 방법에 따른 상가적 종양 부피 예측치 (1134 x 1069/1448 = 837 ㎣)보다 더 작기 때문에, 상가적인 것보다 우수하거나, 또는 상승작용 활성이 있다는 것을 입증한다.

[0073] 앞서 기술된 반복 측정 분석을 사용함으로써, 대조 진술을 사용하여 조합된 2개의 특정 처리 (화합물 A 및 PD-1)를 이용하였을 때의 연구 20일째의 상호작용 효과에 대하여 검정한다. 이 검정은 p = 0.769로 통계적으로 유의적이지 않고, 이는, 조합 군에서의 평균 종양 부피의 추정치 (431 ㎣)가 블리스 독립 방법에 따른 상가적 종양 부피 예측치 (526 x 1069/1448 = 389 ㎣)에 가깝기 때문에, 상가 효과라는 것을 입증한다.

[0074] ***기전 분석***

[0075] 기전 분석을 위해, 20일째에 화합물 A의 최종 투약 후 1 h 경과시, CT-26 종양을 절제한다. 대략 30 mg의 작은 조각을 절단하고, 유전자 발현 분석을 위해 RNA레이터(RNALater)에 보관한다. 종양의 남은 부분을 유세포 분석법 분석을 위해 프로세싱한다.

[0076] ***유세포 분석법***

[0077] 종양 중량을 측정한 후, 100 ㎛ 스트레이너를 통해 5 ml 4℃ 완전 배지 (CM; RPMI-1640/10% 우태아 혈청 (FBS)) 중에서 균질화시켜 단일 세포 현탁액을 제조한다. 세포를 4℃에서 466 x g로 5분 동안 원심분리하고; 펠릿을 신선한 CM (펠릿 부피에 의존하여 0.5 - 3 ml) 중에 재현탁시키고, 세포를 비-셀 XR(Vi-Cell XR) (벡크만 쿨터(Beckman Coulter))을 사용하여 계수한다. 종양당 동일한 총 개수 (10 x 10^6)의 세포를 96-웰 V-바닥 마이크로플레이트 (피셔 사이언티픽(Fisher Scientific))로 옮겨 놓는다. 세포를 원심분리하고 (700 x g, 3 min., 4℃), 얼음 상에서 30분 동안 CM (항-CD16/32 (클론 2.4G2); 톤보 바이오사이언시스(Tonbo Biosciences)) 중 100 ㎕ 1 ㎍/ml Fc 블록 중에 재현탁시킨다. 세포를 원심분리하고 (700 x g, 3분, 4℃), 고정이 가능한 생존능 염료 (e바이오사이언스(eBioscience))를 함유하는 수개의 플루오크롬 접합 표면 마커 항체 칵테일 [항-CD3 (클론 145-2C11), 항-Ly-6G (클론 1A8), 항-CD11c (클론 HL3), 항-CD45 (클론 30-F11) (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences)), 항-CD8 (클론 53-6.7) (바이오레전드(Biolegend)), 항-CD11b (클론 M1/70), 항-CD3 (클론 145-2C11), 항-F4/80 (클론 BM8), 항-CD4 (클론 RM4-5), (e바이오사이언스)] 중 하나 100 ㎕ 중에 재현탁시키고, 차광하에 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션시킨다. 세포를 200 ㎕ CM으로 2회에 걸쳐 세척하고, 원심분리한다 (700 x g, 3 min., 4℃). 2차 세척 후, 세포를 고정시키고, 투과시키고, 명시된 바와 같이 변형된 제조사의 설명서에 따라 Foxp3/트랜스크립션 팩터 스테이닝 버퍼 세트(Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set) (e바이오사이언스)를 사용하여 Ki67 (클론 SolA15) (e바이오사이언스)에 대하여 세포내 염색을 수행한다. 간략하면, 세포를 30 min. 동안 100 ㎕/웰로 고정시킨 후, 30 min. 동안 (사용되는 염색 패널에 의존하여) 세포내 염색과 함께, 또는 그의 부재하에 100 ㎕/웰 투과화 완충제 중에서 고정시킨다. 세포를 200 ㎕ 1X 투과화 완충제로 2회에 걸쳐 세척하고, 원심분리한 후 (700 x g, 3 min., 4℃), 2% FBS를 포함하는 PBS 중에 재현탁시킨다. 10-채널 LSR II 세포 계수기 (BD 바이오사이언시스)를 사용하여 각 샘플에 대해 부스러기를 제외한, 1 x 10^6개의 이벤트를 포착하고, 플로우조(FlowJo) V.10.0.8 소프트웨어를 사용하여 분석한다. 데이터는 종양 세포 비율(%)로서 제시되어 있고, 여기서, 모체 집단의 비율(%)로서 제시된 경우는 제외된다는 점에 주의한다. 비히클과 처리군 사이의 통계적 분석을 위해 ANOVA 후 사후 t 검정을 사용한다. 결과는 하기 표 3에 요약되어 있다.

[0078] <표 3>

절단	비히클		화합물 A		화합물 B PD-L1 (10F.9G2)		화합물 C PD-1 (RMP1-14)		화합물 A + PD-L1 (10F.9G2)		화합물 A+ PD-1 (RMP1-14)	
	평균(%) ± SEM	p 값	평균(%) ± SEM	p 값	평균(%)± SEM	p 값	평균(%) ± SEM	p 값	평균(%) ± SEM	p 값	평균(%) ± SEM	p 값
CD4+/Ki67+ (CD4+의 비율(%))	5.7 ± 0.9	n.s.	7.6 ± 0.5	n.s.	8.8 ± 1.2	0.022	13.7 ± 2.0	<0.001	14.1 ± 1.2	<0.001	16.3 ± 1.4	<0.001
CD8+/Ki67+ (CD8+의 비율(%))	21.8 ± 3.6	n.s.	23.1 ± 2.0	n.s.	24.1 ± 1.9	n.s.	32.1 ± 4.0	0.017	31.5 ± 1.2	0.005	34.4 ± 2.5	0.002
CD11b+ (중앙의 비율(%))	1.8 ± 0.2	n.s.	2.9 ± 0.2	0.002	2.1 ± 0.2	n.s.	3.9 ± 0.3	<0.001	4.4 ± 0.5	<0.001	4.2 ± 0.6	<0.001
CD11b+F4/80+ (중앙의 비율(%))	0.62 ± 0.11	n.s.	0.89 ± 0.15	-	0.67 ± 0.07	n.s.	1.87 ± 0.18	<0.001	1.75 ± 0.28	<0.001	1.77 ± 0.33	<0.001
CD11c+ (중앙의 비율(%))	0.24 ± 0.04	n.s.	0.42 ± 0.06	0.0035	0.27 ± 0.03	n.s.	0.31 ± 0.05	n.s.	0.46 ± 0.08	0.039	0.32 ± 0.07	n.s.

[0079]

CD11b+Ly-6G+F4/80- (종양의 비율(%))										
0.61 ± 0.08		1.12 ± 0.08	<0.001	0.76 ± 0.07		0.99 ± 0.10	0.003	1.29 ± 0.16	<0.001	1.29 ± 0.19	<0.001
	n.s.				n.s.						

[0080]

[0081] 표 3에 제시된 데이터는 종양내 CD4+Ki67+ (활성화된 CD4+ T 세포), CD8+Ki67+ (활성화된 CD8+ T 세포), CD11b+ (골수성 세포), CD11b+F4/80+ (대식세포), CD11c+ (수지상 세포), 및 CD11b+Ly-6G+F4/80- (호중구)에 의해 입증되는 바와 같이, 염증 반응이 상승되었다는 것을 보여준다.

[0082] **유전자 발현 분석**

[0083] 종양으로부터의 RNA 단리를 위해, 대략 30 mg의 조직을 절단한다. 15 psi 진공에서 퀴아백(QiaVac) 96 진공 매니폴드 및 RN이지 96-웰 칼럼 플레이츠(RNeasy 96-well Column Plates) (퀴아젠(Qiagen: 미국 캘리포니아주 발렌시아); 카탈로그 번호 74182)를 사용하여 RN이지 프로토콜(RNeasy Protocol) (2002년 1월 버전)에 의해 RNA를 추출한다. 간략하면, 매회 30초 동안 2회에 걸쳐 혼합하는 동안 6.0 속도로 조직을 FP120 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific: 미국 매사추세츠주 월섬); 카탈로그 번호 6001-120) 또는 패스트프렙-24(FastPrep-24) (MP 바이오메디컬즈(MP Biomedicals); 카탈로그 번호 116003500) 중의 2 mL 라이싱 매트릭스-D(Lysing Matrix-D)® 튜브 (MP 바이오메디컬즈: 미국 오하이오주 솔론; 카탈로그 번호 6913-500, 로트 번호 6913-500-120156) 중에서 1% β-메트캅토에탄올을 함유하는 800 ㎕ 버퍼-RLT(Buffer-RLT) 중에서 균질화시킨다. 튜브를 30분 동안 분당 14,000회 회전하는 분당 회전수 (RPM)로 원심분리한다. 400-600 ㎕의 상청액을 제거하고, 동등 부피의 70% 에탄올 (데콘 랩스(Decon Labs: 미국 펜실베이니아주 킹 오브 프러시아); 카탈로그 번호 2401)과 혼합하고, 96-웰 RN이지 플레이트 상으로 옮겨 놓는다. 공급업체의 프로토콜에 따라 칼럼 상에서 추가의 DNase-I 분해 (퀴아젠, 카탈로그 번호 79254)에 의해 임의의 잠재적 오염 DNA를 제거한다. 2개의 40 ㎕ 분취량의 DNase/RNase-무함유 물 중에서 전체 RNA를 추출한다. 260 nM에서의 흡광도에 의해 나노드

롭(Nanodrop) ND-1000 분광광도계를 사용하여 전체 RNA 농도를 추정한다. cDNA 합성을 위해 필요할 때까지 전체 RNA를 -80℃에서 보관한다.

[0084] 하이 캐퍼시티 cDNA 리버스 트랩스크립션 키트(High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit) (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems: 미국 매사추세츠주 프레이밍햄); 카탈로그 번호 4368813)를 사용하여 96-웰 PCR 플레이츠(96-Well PCR Plates) (몰레큘러 바이오프로덕츠(Molecular Bioproducts: 미국 캘리포니아주 샌디에고); 카탈로그 번호 3419) 중의 최종 부피 100 ㎕의 3 ㎍의 전체 RNA를 진Amp PCR 시스템 9700(GeneAmp PCR System 9700) (어플라이드 바이오시스템즈)을 이용하여 25℃에서 10분 동안, 37℃에서 2시간 동안, 및 4℃에서 무기한인 파라미터를 이용함으로써 역전사시킨다. 장기간 보관을 위해, cDNA를 -30℃에서 보관하고, 전체 RNA는 -80℃에서 보관한다.

[0085] 택맨(Taqman) 방법을 위해, 100 ㎕의 cDNA를 96-웰 클리어 옵티컬 리액션 플레이트(96-Well Clear Optical Reaction Plate) (어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4306737) 중에서 200 ㎕ RNase/DNase-무함유 물로 희석시키고, 2 mL RNase/DNase-무함유 튜브 (앰비온(Ambion), 카탈로그 번호 AM12475)로 옮겨 놓는다. 384-웰 클리어 옵티컬 리액션 플레이트 (어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4309849) 중 최종 부피 20 ㎕로 2x 유니버셜 버퍼 (어플라이드 바이오시스템즈, 카탈로그 번호 4318157)를 사용하여 택맨 반응을 수행한다. 테칸 오토메이티드 피펫팅 워크스테이션(Tecan Automated Pipetting Workstation) (테칸 US 인크.(Tecan US Inc.: 미국 노스캐롤라이나주 더럼); 모델: 프리덤 에보-100(Freedom Evo-100) 또는 에보-150)을 이용하여 샘플을 분배하고, 플레이트를 50℃에서 2분 동안, 95℃에서 10분 동안, 및 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분으로 진행되는 40 사이클인 프로토콜 설정 환경을 이용하여 ABI 프리즘 9700HT SDS(ABI Prism 9700HT SDS) 플레이트 판독기에서 판독한다. 표준 곡선 기반 방법에 기초하여 절대 C_T 값을 정규화한다. 모든 계산은 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel) 스프레드시트 템플릿에서 수행되고, 억제율(%)은 대조군 값으로부터 계산된다. 통계적 유의수준은 버전 11 JMP 소프트웨어 (SAS: 미국 노스캐롤라이나주 캐리) 상에서 분석한다. 결과는 하기 표 4에 비히클 대조군 대비 변화 배수로서 기술되어 있다. ≥ 1.5배 (1.5X)인 통계적으로 유의적인 값이 제시되어 있다. 화합물 A 및 PD-L1 단독 처리군에서는 유전자 발현에 있어 어떤 유의적인 변화도 없는 것으로 검토되었다. 화합물 A가 PD-L1 또는 PD1 항체와 함께 조합될 때, 종양내 염증 및 T 세포 활성화와 연관된 유전자 발현이 증가된다는 것이 데이터를 통해 입증된다. 하기 열거되는 모든 택맨 프라이머 및 프로브는 어플라이드 바이오시스템즈 인크.(Applied Biosystems Inc.: ABI)로부터 구입하였고, 그의 카탈로그 번호가 결과 요약과 함께 ABI#으로서 표에 열거되어 있다.

[0086] <표 4>

유전자	PD-L1+화합물 A	PD1	PD1+ 화합물 A	ABI #
Ccl2		1.5x		Mm00441242_m1
Ccl3		2.4x		Mm00441259_g1
Ccl4		2.4x		Mm00443111_m1
Ccl5	6.5x	4.1x	4.6x	Mm01302427_m1
Infγ	4.6x	4.8x	4.4x	Mm01168134_m1
Il2	6.6x	3.5x	4.1x	Mm00434256_m1
Il4	5.9x	2.6x	4.1x	Mm00445259_m1
Il5	2.4x			Mm00439646_m1
Il10		2.0x		Mm01288386_m1
Il12b	2.9x	2.1x		Mm01288989_m1
Il13	11.2x	5.0x	8.0x	Mm00434204_m1
Tnfα	2.6x	2.2x		Mm00443260_g1
Gzmb	2.0x	2.3x	2.3x	Mm00442834_m1
Tgfbr1			1.2x	Mm00436964_m1
Tgfbr2	2.4x			Mm03024091_m1
Pd-l1	3.2x	2.7x	3.2x	Mm00452054_m1
Pd-l2	11.0x	7.1x	6.8x	Mm00451734_m1
Pd-1	2.9x	3.5x		Mm01285676_m1
Arg	2.1x			Mm00477592_m1
iNos	5.8x	4.7x	5.9x	Mm00440502_m1
Ido	4.6x	3.5x	4.9x	Mm00492590_m1
Icam	2.5x	2.0x	1.9x	Mm00516023_m1
Cd3e		3.2x		Mm01179194_m1
Cd4	3.1x	2.6x		Mm00442754_m1
Cd8b1	3.2x	3.3x		Mm00438116_m1
Cd20	8.9x			Mm00545909_m1
Cd45		1.7x		Mm01293577_m1
Cd68	1.6x		1.6x	Mm03047343_m1
Cd69	1.8x	1.7x		Mm01183378_m1
Cd86	2.0x	1.6x		Mm00444543_m1
Foxp3	2.8x	2.1x	2.4x	Mm00475162_m1
Icos	4.0x	2.7x	2.8x	Mm00497600_m1
Lag3	2.9x	2.7x		Mm00493071_m1
Tim3	2.3x	2.2x	2.1x	Mm00454540_m1
Tim4		2.8x	2.3x	Mm00724709_m1
Cd40l	4.3x	2.7x	2.8x	Mm00441911_m1
Cd200r1	2.1x	1.8x	1.7x	Mm00491164_m1
Tnfsf4(Ox40l)	1.8x		2.0x	Mm00437214_m1
Tnfsf18(Gitrl)	2.2x		1.9x	Mm00839222_m1
Tnfrsf4(Ox40)	2.2x	1.7x	1.6x	Mm00442039_m1
Tnfrsf18(Gitr)	2.5x	2.2x	2.0x	Mm00437136_m1

[0087]