(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0172001
(43) 공개일자 2023년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/41 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/41 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7039421
(22) 출원일자(국제) 2022년04월19일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/060287
(87) 국제공개번호 WO 2022/223543
국제공개일자 2022년10월27일
(30) 우선권주장
102021000009926 2021년04월20일 이탈리아(IT)

(71) 출원인
이탈파마코 에스.피.에이.
이탈리아 밀라노 20126 비알레 풀비오 테스티 330
(72) 발명자
포사티 지안루카
이탈리아 아이-20146 밀라노 (엠아이) 비아 코스탄자 22
레오니 플라비오
이탈리아 아이-20153 밀라노 (엠아이) 40 비아 마르크스
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김태헌

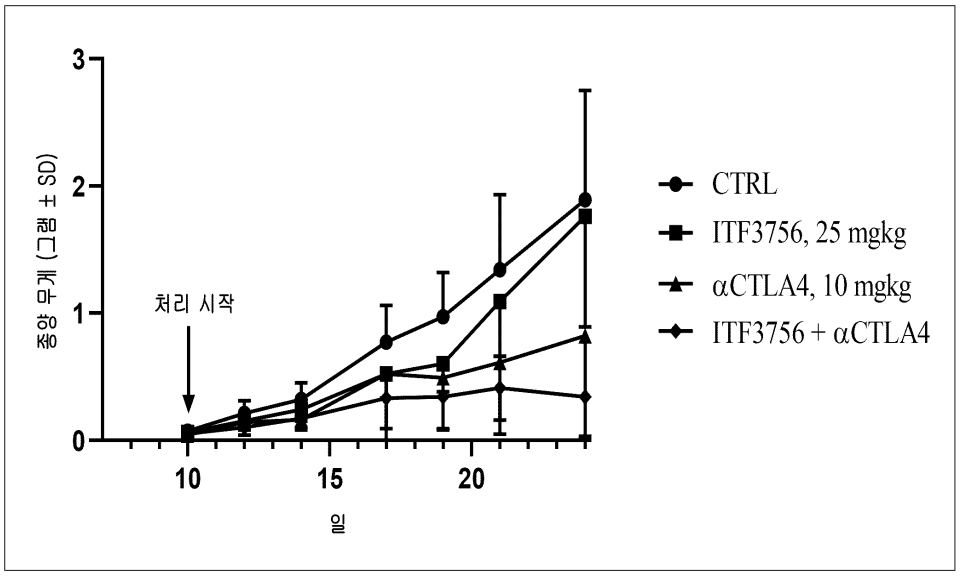
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **특이적 HDAC6 억제제와 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제를 포함하는 조합물**

(57) 요 약

본 발명은 종양의 면역요법 및 하나 이상의 HDAC6-매개 질환 치료에 유용한, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제를 포함하는 조합물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
(72) 발명자
포치 피에트로 사무엘
이탈리아 아이-20025 레냐노 (엠아이) 6 비아 나자리오 사우로
갈비아티 엘리자베타
이탈리아 아이-20900 몬자 (엠비) 21 비아 구에랏찌
스텐퀼러 크리스티앙
이탈리아 아이-00128 로마 (알엠) 11 비아 에르네스토 바슬

명 세 서

청구범위

청구항 1

N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 및 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제를 포함하는, 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제는 이필리무맙 또는 트레멜리무맙인 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 약제로 사용하기 위한, 조합물.

청구항 4

제3항에 있어서, 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PD-L1 항체를 사용한 치료에 의해 개선되거나 예방되기 쉬운 임의의 질환 또는 병태의 치료에 사용하기 위한, 조합물.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PDL1 항체로 치료를 중단한 환자의 치료에 사용하기 위한, 조합물.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 종양의 면역요법 또는 하나 이상의 HDAC6-매개 질환의 치료에 사용하기 위한, 조합물.

청구항 7

제6항에 있어서, 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PDL1 항체로 치료하지 않은 환자의 치료에 사용하기 위한, 조합물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 흑색종, 유방암, 신세포 암종, 비소세포 폐암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환의 치료에 사용하기 위한, 조합물.

청구항 9

제3항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제는 동시, 개별 또는 순차적 투여를 위한 것임을 특징으로 하는. 조합물.

청구항 10

제9항에 있어서, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드는 환자에게 매일, 바람직하게는 1일 2 내지 3회, 보다 바람직하게는 경구 투여로 투여되고, 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제는 환자에게 2 내지 4주마다, 바람직하게는 정맥내 주입에 의해 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드는 환자에게 200 mg 내지 1000 mg BID 또는 100 mg 내지 1000 mg TID 범위의 양으로 투여되고, 상기 적어도 하나의 CTLA4

체크포인트 억제제는 환자에게 2 내지 4주마다 0.5 내지 10 mg/kg, 바람직하게는 2 내지 4주마다 1 내지 3 mg/kg 범위의 양으로 투여되는 것을 특징으로 하는, 조합물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종양의 면역요법 및 하나 이상의 HDAC6-매개 질환 치료에 유용한, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제를 포함하는 조합물(combination)에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드(본원에서 ITF3756으로도 표시됨)는 WO2018/189340에 개시된 화합물 8이며, 상기 특허에는 이의 합성 방법과 HDAC6 억제제로서 그리고 이식 거부, GVHD, 근염, 비정상적인 림프구 기능과 관련된 질환, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종, 말초 신경병증, 자가면역 질환, 염증성 질환, 암 및 신경퇴행성 병리의 치료에서의 이의 활성도 개시되어 있다.

[0003] 인간 HDAC 부류는 18개의 효소로 이루어지며 아연 의존성 HDAC와 시르투인(부류 III)으로도 알려진 NAD 의존성 HDAC의 두 그룹으로 나뉜다. 아연 의존성 HDAC는 4개의 부류로 다시 분류된다: 1) 주로 핵에 위치하는 유비퀴터스 동종효소인, HDAC1, 2, 3 및 8을 포함한 부류 I; 2) 핵과 세포질 둘 모두에 위치한 동종효소인 HDAC4, 5, 7 및 9를 포함한 부류 IIa; 3) 주로 세포질에 위치한 HDAC6 및 HDAC10을 포함한 부류 IIb 및 4) HDAC11만을 포함한 부류 IV. 부류 I HDAC와 달리, 부류 IIa 및 IIb는 조직-특이적 발현을 갖는다.

[0004] HDAC 패밀리 또는 특이적 이소형, 특히 HDAC6에 대한 선택적 억제제는 증식성 장애 및 단백질 축적, 면역계 장애 및 신경 및 신경퇴행성 질환, 예컨대 뇌졸중, 헌팅턴병, ALS 및 알츠하이머병과 관련된 병리를 치료하는데 특히 유용할 수 있다.

[0005] 특히 HDAC6 이소형의 경우 α-튜불린, Hsp90(열충격 단백질 90), 코르탁틴 β-카테닌과 같은 다양한 기질이 확인되었다. HDAC6에 의한 이들 단백질 아세틸화의 조절은 면역 반응(J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651; Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078), 세포 이동 및 세포-세포 상호작용을 포함하는 미세소관 역학의 조절(Aldana-Masangkay et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 2011, 875824) 및 퇴행성 단백질의 분해와 같은 몇 가지 중요한 과정과 상관관계가 있었다.

[0006] 또한, HDAC6은 응집체로 알려진 복합체를 통해 분해된 단백질의 이화작용 과정에 관여한다: HDAC6은 폴리유비퀴틴화된 단백질 및 디네인에 결합할 수 있고, 따라서 미세소관을 따라 일종의 변성 단백질이 응집체로 전달되는 것을 활성화한다(Kawaguchi et al., Cell (2003) 115(6), 727-738).

[0007] 이러한 HDAC6 세포보호 활성의 변화는 다양한 신경퇴행성 병리, 예컨대 파킨슨병(Outerio et al., Science (2007), 317 (5837), 516-519) 및 헌팅턴병 (Dompierre et al., J. Neurosci. (2007), 27(13), 3571-3583)과 관련이 있으며, 여기서 분해된 단백질의 축적은 일반적인 병리학적 특징이다.

[0008] 또한, HDAC6은 많은 종양학적 단백질, 특히 다양한 유형의 백혈병(Fiskus et al., Blood (2008), 112(7), 2896-2905) 및 다발성 골수종(Hideshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572)과 같은 혈액 종양에서 조절하는 데 관여한다. HDAC6에 의한 α-튜불린 아세틸화의 조절은 전이 개시와 관련될 수 있으며, 여기서 세포 운동성은 중요한 역할을 한다(Sakamoto et al., J. Biomed. 생명 공학. (2011), 2011, 875824). 최근에, HDAC6은 이 효소가 면역 체크포인트 단백질인 PD-L1의 발현의 절대 조절자인 것으로 나타났기 때문에 새로운 면역 종양학 표적으로서 관심을 끌었다(Lienlaf et al. Mol Oncol 2016 May;10(5):735-750). HDAC6 억제제는 전임상 면역종양학 모델에서 효과적이며 항 PD-1 항체의 활성을 향상시키는 것으로 나타났다(Ray et al., Leukemia 2018 Mar;32(3):843-846. Keremu et al Cancer Chemother Pharmacol. 2019 Feb;83(2):255-264. Knox et al. Sci Rep. 2019 Apr 16;9(1):6136).

[0009] CTLA4 또는 CTLA-4(세포독성 T-림프구 관련 단백질 4)는 면역 체크포인트 역할을 하고 면역 반응을 하향 조절하는 단백질 수용체이다. CTLA4는 조절 T 세포에서 구성적으로 발현되지만 활성화 후 기존 T 세포에서만 상향 조절되며 - 이는 암에서 특히 두드러지는 현상이다. 항원 제시 세포 표면의 CD80 또는 CD86에 결합할 때 "오프" 스위치 역할을 한다.

[0010] CTLA4 차단(CTLA4에 대한 길항 항체 사용)의 가능한 치료 이점에 대한 관심이 증가하고 있다. 이필리무맙은 2011년 3월 미국 식품의약국(FDA)에서 흑색종 치료용으로 승인한 최초의 항-CTLA4 항체였다. FDA는 또한 진행성 흑색종 환자를 위해 항-CTLA4 요법 이필리무맙 3 mg/kg과 항-PD-1 요법 니볼루맙 1 mg/kg을 승인했다. 이러한 용법은 이필리무맙 단독에 비해 생존율을 높이고 진행을 지연시키고 객관적인 반응을 달성하는 환자의 비율을 증가시키는 것으로 나타났다(Larkin J et al. n engl j med 381;16 2019). 그러나, 이러한 이점은 3/4등급 치료 관련 부작용의 높은 비율을 포함하여 독성이 증가했다. 예를 들어, 니볼루맙 치료는 하기 부작용과 관련이 있다: 신장염, 간염, 췌장염 및 폐렴(Kang JH et al. Trends in Immunology 42, 293, 2021).

[0011] 체크포인트 억제제를 다른 제제와 조합하는 것에 대해서 많은 관심을 보여 왔다. 물론 적절한 다른 제제를 찾는 것이 목표이다. 폐암과 현재 유방암 및 화학 요법이 효과적인 다른 질환의 세계에서, 연구자들은 화학요법과 면역 체크포인트 억제제 요법의 조합을 검토하고 있으며 어느 정도 성공을 거두었다.

[0012] 그러나, 흑색종을 가진 대상체에서 펨브롤리주맙(항 PD-1) 및 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1) 억제제 에파카도스타트의 3상 시험은 펨브롤리주맙 단독에 비해 조합 요법이 무진행 생존을 개선하는 첫 번째 1차 평가변수(primary endpoint)를 달성하지 못해 2018년 4월에 중단되는 등 일부 실패가 발생했다.

[0013] 기계론적 관점에서 볼 때, 이러한 조합이 우수한 결과를 낳는다는 것은 이치에 맞았지만, 이러한 조합의 놀라운 실패는 연구자들이 개발 과정에서 앞으로 나아가는 조합을 더 잘 조사할 필요가 있다는 탁월한 교훈을 제공한다.

발명의 내용

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 공지되고 승인된 조합물 및/또는 개별적으로 투여되는 약물의 치료 효능을 유지하거나 개선하지만 동시에 더 나은 독성학적 프로파일을 갖는 새로운 조합물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명자들은 놀랍게도 ITF3756 및 항-CTLA4 항체를 포함하는 조합물이 단일 약물의 투여보다 우수한 항종양 효과를 나타내고 상기 조합물이 상승적 치료 효과를 나타낸다는 것을 발견하였다. 특히, 가장 강력한 항종양 효과는 항-CTLA4 10 mg/kg과 병용하여 ITF3756 50 mg/Kg을 1일 3회 투여하면 얻어졌으며, 이는 또한 2차 종양의 발병을 예방할 수 있다.

[0016] 본 발명자들은 또한 놀랍게도 본 발명에 따른 조합 치료가 종양 성장 억제에 대해 동일한 효능을 유지하면서 항-CTLA4 및 항-PD1 조합 또는 항-CTLA4 및 항-PD-L1 조합보다 더 우수한 안전성 프로파일을 가질 수 있다는 것을 발견하였다.

[0017] 따라서, 본 발명의 제1 목적은 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 및 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제를 포함하는 조합물이다.

[0018] 본 발명의 두 번째 목적은 약제로서 사용하기 위한 상기 조합물이다.

도면의 간단한 설명

[0019] - **도 1**은 마우스에서 CT26 종양 성장에 대한 ITF3756 처리의 효과를 나타낸 다.

- **도 2**는 마우스에서 CT26 종양 성장에 대한 항-CTLA4 Mab의 효과를 나타낸다.

- **도 3**은 항-CTLA4 Mab와 조합된 25 mg/Kg 용량으로 마우스에서 CT26 종양 성장에 대한 ITF3756의 효과를 나타낸다.

- **도 4**는 항-CTLA4 Mab와 조합된 50 mg/Kg 용량으로 마우스에서 CT26 종양 성장에 대한 ITF3756의 효과를 나타낸다.

- **도 5**는 항-CTLA4 Mab와 조합된 50 mg/Kg x3 용량으로 마우스에서 CT26 종양 성장에 대한 ITF3756의 효과를 나타낸다.

- **도 6**은 항-CTLA4 Mab와 조합된 ITF3756을 50 mg/Kg의 용량으로 1일 3회 및 1일 1회 장기간 투여했을 때 마우스에서 CT26 종양 성장에 대한 효과를 나타낸다.

- **도 7**은 CT26 뮤린 모델에서 2차 종양의 성장(종양 챌린지)에 대한 항-CTLA4와 조합된 ITF3756의 이전 투여의 효과를 나타낸다.

- **도 8a-8b**는 CT26 뮤린 모델에서 2차 종양의 성장(종양 챌린지)에 대한 항-CTLA4(10 mg/kg, 1일 1회)와 조합된 ITF3756(50 mg/Kg)의 이전 투여의 효과를 나타낸다.

- **도 9a-9b**는 CT26 뮤린 모델에서 2차 종양의 성장에 대한 항-CTLA4(10 mg/kg, 1일 3회)와 조합된 ITF3756(50 mg/Kg)의 이전 투여의 효과를 나타낸다.

- **도 10**은 종양 성장을 예방하기 위해 항-CTLA4와 조합된 ITF3756 대 항-PD-1 + 항-CTLA4 조합의 효과를 나타낸다.

- **도 11**은 암컷 NOD 마우스에서 당뇨병에 대한 ITF3756 단독 또는 항-CTLA4와 조합의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] **정의**

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 기타 과학 용어는 본원 개시내용이 속하는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖도록 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어들은 명확성 및/또는 즉시 참조를 위해 본원에 정의되며; 따라서, 본원에 그러한 정의를 포함하는 것이 당해 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0022] 본원에서 용어 "**생리학적으로 허용되는 부형제**"는 그 자체로는 어떠한 약리학적 효과도 결여되어 있고 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때 유해 반응을 일으키지 않는 물질을 지칭한다. 생리학적으로 허용되는 부형제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 문헌(*Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition 2009*, herein incorporated by reference)에 개시되어 있다.

[0023] 본원에서 용어 "**약제학적으로 허용되는 염**"은 염화된 화합물의 생물학적 효능 및 특성을 지니고 포유동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때 유해 반응을 일으키지 않는 염을 지칭한다. 약제학적으로 허용되는 염은 무기 또는 유기 염일 수 있고; 약제학적으로 허용되는 염의 예는 탄산염, 염산염, 브롬화수소산염, 황산염, 황산수소, 시트르산염, 말레산염, 푸마르산염, 트리플루오로아세테이트, 2-나프탈렌설포네이트, 및 파라톨루엔설포네이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염에 대한 추가의 정보는 본원에 참고로 포함된 문헌(*Handbook of pharmaceutical salts*, P. Stahl, C. Wermuth, WILEY-VCH, 127-133, 2008)에서 찾을 수 있다.

[0024] 본원에서 용어 "**동시, 개별 또는 순차적 투여**"는 제1 및 제2 화합물을 동시에 투여하거나 두 화합물이 동시에 환자의 신체에서 작용하는 방식으로 또는 치료 효과를 제공하는 방식으로 다른 화합물 이후에 하나의 화합물을 투여하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 화합물은 식사와 함께 복용한다. 다른 실시양태에서, 화합물은 식사 후, 예컨대 식사 후 30분 또는 60분에 복용한다. 일부 실시양태에서, 한 화합물은 일정 기간 동안 환자에게 투여된 후 다른 화합물이 투여된다.

[0025] 본 출원에 따른 용어 "**CTLA4 체크포인트 억제제**" 또는 "**항-CTLA4**" 또는 "**항-CTLA4 항체**"는 CTLA4(세포독성 T-림프구 관련 단백질 4) 면역 체크포인트의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 억제할 수 있는 모든 화합물을 지칭한다.

[0026] 본원에서 용어 "대략" 및 "약"은 측정에서 발생할 수 있는 실험적 오차의 범위를 지칭한다.

[0027] 용어 "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)" 및 "함유하는(containing)"은 개방형 용어(즉, "포함하지만 이에 제한되지 않음"을 의미)로 해석되어야 하며, "본질적으로 이루어진다", "본질적으로 이루어지는", "이루어진다" 또는 "이루어지는"과 같은 용어에 대해서도 지지를 제공하는 것으로 간주되어야 한다.

[0028] 용어 "본질적으로 이루어진다", "본질적으로 이루어지는"은 반폐쇄형 용어로 해석되어야 하며, 이는 본 발명의 기본적이고 새로운 특성에 실질적으로 영향을 미치는 다른 성분이 포함되지 않음을 의미한다(따라서 선택적인 부형제가 포함될 수 있음).

[0029] 용어 "이루어진다", "이루어지는"은 폐쇄형 용어로 해석되어야 한다.

[0030] **발명의 상세한 설명**

[0031] 실험 섹션에서 상세히 개시될 바와 같이, 본 발명자들은 ITF3756(25 mg/Kg 및 50 mg/Kg) + 항-CTLA(10 mg/Kg)

의 치료 조합이 단일 약물의 투여보다 더 활성을 초래할 것임을 발견하였다.

[0032] 특히, 얻어진 데이터는 ITF3756 및 항-CTLA4 단독 투여에 비해 조합된 ITF3756 및 항-CTLA4의 상승 효과를 입증한다.

[0033] 또한, 본 발명자들은 항-CTLA4(10 mg/kg)와 조합하여 ITF3756(50 mg/Kg, 1일 3회) 투여할 때 가장 강력한 항종양 효과가 얻어졌다는 것을 발견하였다.

[0034] 얻어진 결과는 치료 조합에 의해 유도된 면역계의 활성화를 시사한다. 실제로, 본 발명의 조합은 2차 종양의 발병을 예방할 것이다.

[0035] 본 발명자들은 또한 ITF3756이 시험관 내에서 자극된 인간 단핵구에서 PD-L1의 사이토카인 유발 발현을 감소시키고 ITF3756(50 mg/Kg, 1일 3회)의 투여가 생체 내 마우스 면역 세포에서 PD-L1 발현을 감소시킨다는 것을 발견하였다. 항 PD-1, 항 PD-L1 항체 또는 항 PD-1 또는 항 PD-L1 항체와 항 CTLA4 항체의 조합으로 NOD 마우스를 처리하면 임상 관련 부작용으로 알려진 자가면역 당뇨병의 유도를 잠재적으로 가속화한다. 놀랍게도, 본 발명자들은 NOD 마우스를 ITF3756(50 mg/Kg, 1일 3회)으로 단독으로 또는 항 CTLA4 항체와 조합하여 처리하면 자가면역 당뇨병의 유도를 가속화하지 않는다는 것을 발견하였으며, 이는 이러한 조합 치료가 항 PD(L)1 항체와 항 CTLA4 항체의 조합에 비해 내약성이 훨씬 우수하고 자가면역 부작용이 덜 발생할 것임을 시사한다.

[0036] 따라서, 본 발명의 제1 목적은 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 및 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제를 포함하는 조합물이다.

[0037] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제는 이필리무맙 또는 트레멜리무맙으로부터 선택된다.

[0038] 본 발명의 두 번째 목적은 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 조합물이다.

[0039] 바람직하게는, 조합물은 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PD-L1 항체를 사용한 치료에 의해 개선되거나 예방되기 쉬운 임의의 질환 또는 병태의 치료에 유용하다.

[0040] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 조합물은 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PDL1 항체로 치료를 중단한 환자의 치료에 유용하다. 특히, 환자는 독성 때문에 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PDL1 항체로 치료를 중단하였다.

[0041] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 조합물은 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PDL1 항체로 치료를 중단한 환자의 치료에 유용하다. 특히, 환자는 예상되는 독성 때문에 항 CTLA4, 항 PD1 및/또는 항 PDL1 항체로 치료하지 않는다.

[0042] 본 발명의 조합물은 바람직하게는 종양의 면역요법 및 HDAC6 매개 질환의 치료에 유용하다.

[0043] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 조합은 다음 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환의 치료에 유용하다: 부신피질암종, 항문암, 성상세포종, 피부의 기저세포암종, 방광암, 뇌종양, 유방암, 원인불명의 원발성 암종, 심장 종양, 자궁경부암, 담관암종, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 안내 흑색종, 나팔관암, 담낭암, 위암, 위장관 카르시노이드 종양, 위장관 기질종양(GIST: Gastrointestinal Stromal Tumor), 생식세포종양, 고환암, 두경부암, 간세포암종, 섬세포종양(Islet Cell Tumor), 췌장 신경내분비 종양, 랑게르한스 세포 조직구증가증, 백혈병, 폐암(비소세포, 소세포, 흉막폐 모세포종 및 기관지종양), 흑색종, 메르켈 세포암종, 중피종, NUT 유전자 변화를 동반한 정중선 암종, 다발성 내분비선 종양 증후군, 다발성 골수종/형질세포 신생물, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 신경모세포종, 난소암, 췌장암, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 갈색세포종, 뇌하수체 종양, 원발성 복막암, 전립선암, 신장세포암, 망막모세포종, 육종, 피부의 편평세포암종, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신장 골반 및 요관의 이행세포암, 자궁암, 질암, 혈관종양, 외음부암, 윌름스 종양(Wilms Tumor). 바람직하게는, 조합물은 흑색종, 유방암, 신세포 암종, 비소세포 폐암 및 결장직장암의 치료에 유용하다.

[0044] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명에 따른 사용을 위한 조합물은 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제가 동시, 개별 또는 순차적 투여를 위한 것을 특징으로 한다.

[0045] 바람직하게는, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 환자에게 매일, 바람직하게는 1일 2 내지 3회 투여하고, 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트

억제제는 환자에게 2 내지 4주마다, 바람직하게는 최대 4회 용량으로 투여된다.

[0046] 바람직하게는, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 환자에게 경구 투여로 투여된다.

[0047] 바람직하게는, CTLA4 체크포인트 억제제는 정맥내 주입으로 투여된다.

[0048] 보다 바람직하게는, N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 환자에게 200 mg 내지 1000 mg BID 또는 100 mg 내지 1000 mg TID 범위의 양으로 투여되고, 상기 적어도 하나의 CTLA4 체크포인트 억제제는 환자에게 2 내지 4주마다 0.5 내지 10 mg/kg, 바람직하게는 2 내지 4주마다 1 내지 3 mg/kg 범위의 양으로 투여된다.

[0049] ITF3756에 대한 인간 용량은 소프트웨어 GastroPlus™(Simulation Plus, Lancaster, CA)를 사용하여 생리학적 기반 약동학(PBPK: physiologically based pharmacokinetic) 모델을 사용하여 예측되었다. 예상 용량에 대한 목표 $C_{평균}$은 200 ng/mL로, 이는 마우스에서 효능을 보인 투여 일정 후 24시간 동안 발견된 평균 수준이다.

[0050] 모델링 전략은 실험적인 생체내 약동학 데이터가 있는 동물 종(마우스, 래트, 개 및 시노몰거스 원숭이)에 대한 모델을 먼저 확립하고 평가하고 그 후 인간 약동학의 예측을 위한 일관된 시험관내 대 생체내 스케일링 접근법을 사용하여 종별 입력 및 생리학적 데이터를 활용하는 것이었다. ITF3756과 제거 메커니즘이 유사한, 기존 임상 데이터가 있는 화합물인 ITF2357(givinostat)에 대해서도 동일한 작업을 수행하여 ITF3756 제거에 대한 가정을 뒷받침하였다.

[0051] 모델은 LogD, pkA, 물 및 생체 관련 유체에 대한 용해도, 투과성 및 단백질 결합 및 각 종에 대해 생성된 단백질 결합 및 혈액 대 혈장 분할과 같은 ITF3756의 물리화학적 특성 및 시험관내 데이터를 사용하여 구축되었다.

[0052] ITF3756을 종 특이적 냉동 보존된 간세포와 함께 인큐베이션한 후 시험관내에서 생성된 데이터로부터 시작하여 간 대사를 연구하였다. 신장 및 장 대사는 NADPH 및 UDPGA를 보조 인자로 포함하는 종 특이적 신장 및 장 마이크로솜과 함께 시험 항목의 인큐베이션 후 수집된 시험관내 데이터로부터 추론되었다. 이어서, 적절한 스케일링 인자를 사용하여 시험관내에서 생체내 외삽을 수행하였다. 전혈 제거율은 간외 대사를 위한 대용물로서 사용되었다.

[0053] 모든 조직이 관류 속도 제한 분포를 갖는 잘 교반된 구획으로 거동하고, 약물 및 조직 특이적 조직이 혈장 분배 계수 Kp로 거동한다고 가정하여 조직 농도를 예측하였다. Kp 값은 일반적으로 약물 물리화학적 특성 및 조직 조성으로부터 예측하였다.

[0054] 소화관 벽을 통한 흡수 및 통과는 전신 PBPK 모델에 통합된 ACAT 모델(Advanced Compartmental Absorption and Transit)을 사용하여 예측하였다.

[0055] 제1 단계에서, 정맥 투여 후의 약동학적 파라미터를 각 동물 종에서 예측하였다. 경험적 스케일링 인자는 간외 대사에 사용되어 신체 제거율을 포착하고 LogD에서는 분포 부피를 포착하였다. 경험적 스케일링 인자를 기반으로 낮은 제거율 시나리오와 높은 제거율 시나리오가 발견되었다.

[0056] 이어서, 경구 투여 후 약동학을 모델링하여 종간 변동성으로 인한 투과성, 용해도 및 용해의 불확실성을 발견하였다. 이어서, 8가지 시나리오가 설명되었으며 그 중 최악의 구강 흡수 시나리오와 최상의 구강 흡수 시나리오를 찾을 수 있었다.

[0057] 이어서, 생체 이용률의 최상의 경우와 최악의 경우 높고 낮은 제거율, 높고 낮은 분포 부피의 조합으로부터 유도된 8가지 시나리오를 사용하여 인간 약동학의 예측이 이루어졌다. 시뮬레이션된 시나리오 중 어느 것이 인간 약동학을 가장 잘 포착하는지에 따라, 목표 노출에 도달할 것으로 예측되는 투여 요법은 상기 언급된 바와 같이 200 mg 내지 1000 mg BID 또는 100 mg 내지 1000 mg TID의 범위이다.

[0058] 본 발명은 다음의 실험 섹션에서 더욱 상세히 설명될 것이다.

[0059] 실험 섹션

[0060] **실시예 1**

[0061] *CT26 뮤린 모델에서 항-CTLA4 항체와 조합하여 투여된 ITF3756의 항종양 효과*

[0062] 항-CTLA4 항체와 조합하여 투여된 ITF3756의 항종양 효능은 마우스 결장암종 세포주 CT26의 사용을 기반으로 한

뮤린 모델을 사용하여 결정하였다. 이 모델에서, CT26 세포를 동계(syngeneic) 마우스에 피하 이식하고, 효능은 종양 결절의 부피에 기반하여 종양 성장 억제로서 결정한다.

[0063] **재료 및 방법**

[0064] *ITF3756(N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드)*

[0065] ITF3756은 Italfarmaco SpA의 의약 화학부에서 합성하였다. ITF3756, 배치 5를 분말로서 DMSO에 가용화시키고 -20℃에서 보관하였다. 각 투여 일에, 용액을 H_2O/PEG 400 1:1로 희석하여 2.5 및 5.0 mg/mL의 DMSO 0.5% 중 H_2O/PEG 400 1:1의 최종 용액을 얻었다.

[0066] 용액은 마우스용 위관영양 바늘을 사용하여 200 μL(최종 용량 25 및 50 mg/Kg)의 부피로 경구 투여하였다.

[0067] ITF3756 투여는 종양 결절이 만져질 수 있을 때(세포 접종 후 약 10일차) 시작되었다. ITF3756은 표 1에 보고된 바와 같이 1일 1회 또는 1일 3회 경구(os) 투여하였다.

[0068] *항-CTLA4 항체*

[0069] 시리아 햄스터 IgG Mab 항-마우스 CTLA4는 BioXell(cat. BE0131, 클론 9H10)에서 구입하여 PBS로 1, 0.3 및 0.1 mg/mL 최종 농도로 희석하고 +4℃에서 보관하였다. 각 마우스를 200 μL의 각 용액(최종 용량 10.0, 3.0 및 1.0 mg/Kg)으로 처리하였다.

[0070] 항-CTLA4 Mab 투여는 종양 결절이 만져질 수 있을 때(세포 접종으로부터 약 10일차) 시작되었다. 항-CTLA4는 표 1에 보고된 바와 같이 총 4회 치료 동안 격일로 1일 1회 복강내(ip) 투여한 후 7일 동안 휴약(wash-out)을 실시하였다. 이 치료 주기는 연구가 끝날 때까지 계속되었다.

[0071] *생체내 연구*

[0072] 암컷 6주령 BALB/c 마우스를 Charles River Italia에서 구입하여 12시간의 명암 주기 하에서 음식과 물을 자유롭게 공급하여 유지하였다.

[0073] 순응 5일 후, 마우스에 종양 세포 주사를 실시하였다.

[0074] CT26(뮤린 BALB/c 결장암종, CT26. WT ATCC CRL-2638) 세포를 RPMI 1640 세포 배양 배지 + 10% 태아 송아지 혈청(FCS: fetal calf serum)에서 성장시켰다.

[0075] 지수기(exponential phase) 동안 트립신을 사용하여 세포를 분리하고, FCS가 없는 배양 배지로 세척하고 5 × 10^6개 세포/mL 최종 농도로 현탁시켰다. 세포(1×10^6개 세포/마우스)를 마우스의 오른쪽 옆구리의 서혜부 영역에 200 μL의 부피로 s.c. 주사하였다.

[0076] 동물의 적어도 80%에서 종양 결절이 만져졌을 때, 마우스를 다음 실험 그룹으로 무작위화하고 약물 투여를 시작했다.

[0077] [표 1] 실험 그룹 및 치료 일정.

그룹 번호 (동물/군)	실험 그룹	처리 일정
1 (n=6)	**대조군**, 비히클*	**경구,** 1 일 1 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
2 (n=3)	**대조군**, 비히클*	**경구,** 1 일 3 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
3 (n=3)	**대조군**, 미처리	-
4 (n=6)	**ITF3756**, 25 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회.
5 (n=6)	**ITF3756**, 50 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회.
6 (n=6)	**ITF3756**, 50 mg/Kg	**경구,** 1 일 3 회.
7 (n=6)	**항-CTLA4**, 1 mg/Kg	**ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
8 (n=6)	**항-CTLA4**, 3 mg/Kg	**ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
9 (n=6)	**항-CTLA4**, 10 mg/Kg	**ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
10 (n=6)	**ITF3756**, 25 mg/Kg + **항-CTLA4**, 1 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
11 (n=6)	**ITF3756**, 25 mg/Kg + **항-CTLA4**, 3 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
12 (n=6)	**ITF3756**, 25 mg/Kg + **항-CTLA4**, 10 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
13 (n=6)	**ITF3756**, 50 mg/Kg + **항-CTLA4**, 1 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
14 (n=6)	**ITF3756**, 50 mg/Kg + **항-CTLA4**, 3 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회.

[0078]

		ip, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
15 (n=6)	**ITF3756**, 50 mg/Kg + **항-CTLA4**, 10 mg/Kg	**경구,** 1 일 1 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약
16 (n=6)	**ITF3756**, 50 mg/Kg + **항-CTLA4**, 10 mg/Kg	**경구,** 1 일 3 회. **ip**, 격일로 총 4 회 투여, 이후 7 일의 휴약

[0079]

[0080] **대조군 동물은 ITF3756 비히클(H_2O/PEG 400 1:1+DMSO 0.5%)로 경구 치료하고 항 CTLA4 비히클(PBS)로 복강내 치료하였다.*

[0081] 체중은 약물 투여 첫날부터 시작하여 격일로 측정하였다.

[0082] 피하 종양 결절의 부피는 하기 식에 따라 격일로 결정하였다(Papagiannoros A. et al. *in vivo* 20:129-136, 2006):

[0083] 부피 (mm^3) = (D x d^2)/2

[0084] 상기 식에서, D = 결절의 주요 직경이고, d = 결절의 작은 직경이다.

[0085] 종양 결절의 무게는 1.05 g/mL의 종양 밀도를 고려하여 종양 부피에 의해 결정하였다(Jensen M.M. et al. *BMC Medical Imaging* 8(16), 2008).

[0086] 종양 무게가 체중의 10%와 같거나 종양 결절에 궤양이 생겼을 때 동물을 안락사시켰다(인도적 종점).

[0087] 약물 효과의 통계적 분석은 GraphPad Prism 8 소프트웨어를 사용하여 Dunnett의 다중 비교 테스트와 함께 이원 분산분석(2-way ANOVA)에 의해 수행되었다.

[0088] **결과**

[0089] CT26 종양의 성장에 대한 ITF3756의 효과는 **도 1**에 요약되어 있다.

[0090] 25 mg/Kg(1일 1회)의 용량은 전체 실험 기간 동안 종양 성장의 유의미한 억제를 나타내지 않았다. 더 높은 용량(50 mg/Kg, 1일 1회)은 21일차에 종양 성장을 34% 억제(0.88 g 대 1.34 g)하여 유의미한 효과를 발휘했고, 24일차에는 더 이상 검출되지 않았다(9% 억제).

[0091] 반대로, ITF3756 50 mg/Kg으로 1일 3회 투여한 동물은 19일부터 시작하여 24일차까지 종양의 유의미한 감소를 보였으며(30% 억제, 1.32 g 대 1.89 g), 이는 이러한 치료 일정이 1일 1회 투여보다 우수한 약리학적 효과를 발휘했음을 나타낸다.

[0092]

	일별 대조군 대비 통계적 유의성						
그룹	**10**	**12**	**14**	**17**	**19**	**21**	**24**
ITF3756, 25 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
ITF3756, 50 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
ITF3756, 50 mg/Kg x3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**

[0093] n.s. = 유의미하지 않음, * $p < 0.05$, **$p < 0.01$

[0094] 항-CTLA4 항체의 효과는 **도 2**에 요약되어 있다. 항체의 3회 투여 모두 24일차에 최대 종양 억제 효과(66 - 57 %)로 유사한 활성을 나타냈다.

[0095]

	일별 대조군 대비 통계적 유의성						
그룹	**10**	**12**	**14**	**17**	**19**	**21**	**24**
αCTLA4 1 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	***	***
αCTLA4 3 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	**	***
αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

[0096] n.s. = 유의미하지 않음, * p < 0.05, ** p <0.01, *** p < 0.001

[0097] 최고 용량의 항-CTLA4 항체(10 mg/Kg)와 조합하여 25 mg/Kg으로 투여된 ITF3756의 효과는 **도 3**에 보고되어 있다.

	일별 대조군 대비 통계적 유의성						
그룹	**10**	**12**	**14**	**17**	**19**	**21**	**24**
ITF3756 25 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	***
ITF3756 25 mg/Kg + αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***

[0098]

[0099] n.s. = 유의미하지 않음, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

[0100] 본 발명에 따른 ITF3756(25 mg/Kg) + 항-CTLA(10 mg/Kg)의 치료 조합물은 단일 약물의 투여보다 더 활성을 나타냈다. 더욱이, 상기 조합은 상승적인 치료 효과를 나타낸다.

[0101] 실제로, 24일차에, 약물 조합은 종양 성장의 82% 억제(0.34 g 대 1.89 g)를 유도한 반면, ITF3756 및 항-CTLA4 단독은 각각 7%(1.76 대 1.89 g) 및 57% 억제(0.82 대 1.89 g)를 유도하였다.

[0102] 항-CTLA4 항체의 최고 용량(10 mg/Kg)과 조합하여 50 mg/Kg으로 투여된 ITF3756의 효과는 **도 4**에 보고되어 있다.

	일별 대조군 대비 통계적 유의성						
그룹	**10**	**12**	**14**	**17**	**19**	**21**	**24**
ITF3756 50 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***
ITF3756 50 mg/Kg + αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	**	***	***	***

[0103]

[0104] n.s. = 유의미하지 않음, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

[0105] ITF3756(50 mg/Kg) + 항-CTLA(10 mg/Kg)의 치료 조합은 단일 약물 투여보다 더 활성을 나타냈다. 더욱이, 상기

조합은 상승적인 치료 효과를 나타낸다.

[0106] 실제로, 24일차에, 약물 조합은 종양 성장의 83% 억제(0.32 대 1.89 g)를 유도한 반면, ITF3756 및 항-CTLA4 단독은 각각 9%(1.72 대 1.89 g) 및 57%(0.82 대 1.89 g) 억제를 유도하였다.

[0107] 항-CTLA4 항체의 최고 용량(10 mg/Kg)과 조합하여 1일 3회 50 mg/Kg으로 ITF3756 투여한 효과는 **도 5**에 보고되어 있다.

[0108]

	일별 대조군 대비 통계적 유의성						
그룹	**10**	**12**	**14**	**17**	**19**	**21**	**24**
ITF3756 50 mg/Kg x3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	**	**
αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***
ITF3756 50 mg/Kg x3 + αCTLA4 10 mg/Kg	n.s.	n.s.	n.s.	*	***	***	***

[0109] n.s. = 유의미하지 않음, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

[0110] ITF3756(50 mg/Kg ×3) + 항-CTLA(10 mg/Kg)의 치료 조합은 단일 약물 투여보다 더 활성을 나타냈다. 더욱이, 상기 조합은 상승적인 치료 효과를 나타낸다.

[0111] 실제로, 24일차에, 약물 조합은 종양 성장의 89%(0.2 대 1.89 g) 억제를 유도한 반면, ITF3756 및 항-CTLA4 단독은 각각 30%(1.32 대 1.89 g) 및 57%(0.82 대 1.89 g) 억제를 유도하였다. 더욱이, 24일차에 조합 치료의 효능은 항-CTLA4 항체 단독에 의해 발휘된 것보다 유의미하게 더 높았다($p < 0.001$).

[0112] 두 약물 조합(항-CTLA4 + ITF3756 50 mg/Kg, 1일 1회 및 1일 3회)으로 처리한 동물의 종양 성장이 24일차(대조군의 마지막 실험일)에 거의 완전히 사라졌으므로 이 두 그룹에 대한 약물 투여는 42일차까지 연장되었다.

[0113] 얻어진 결과는 **도 6**에 보고되어 있다. 그래프에서 측정 가능한 종양의 평균 부피가 보고되어 있다.

[0114] 본 발명에 따른 두 약물 조합은 35일차까지 중첩 가능하고 강력한 종양 성장의 억제를 유도하였다. 이날부터 ITF 3756을 1일 1회 + 항-CTLA4로 처리한 동물의 종양은 48일차까지 계속 성장한 반면, ITF3756을 1일 3회 + 항-CTLA4로 처리한 동물의 종양은 42일차까지 일정하게 유지된 후 부피가 감소하였다.

[0115] 예기치 않게, 48일차에, ITF3756 1일 1회 + 항-CTLA4로 처리한 그룹의 5마리 마우스 중 2마리 및 ITF3756 1일 3회 + 항 -CTLA4로 처리한 그룹의 4마리 마우스 중 2마리는 종양이 사라졌다.

[0116] 더욱이, 두 약물 조합 그룹(항-CTLA4 + ITF3756 50 mg/Kg 1일 1회 및 1일 3회)의 마우스에 2차 종양 주사(종양 챌린지)를 실시하여 2차 종양의 성장을 모니터링하였다.

[0117] 두 번째 주사(1×10^6개 CT26 세포/마우스 s.c.)는 49일차에 왼쪽 서혜부 영역에 수행되었으며 동물은 73일차까지 미처리된 상태로 유지되었다. 두 번째 주사에 사용된 CT26 세포의 최적 성장에 대한 대조군으로서, 5마리의 나이브 마우스에 같은 날 주사하였다.

[0118] 얻어진 결과는 **도 7**에 보고되어 있다.

[0119] 나이브 동물의 왼쪽 옆구리에 주사된 CT26 세포(대조군)는 예상되는 성장을 보였다.

[0120] **도 8(a-b)**에 보고된 바와 같이, 2차 종양은 ITF3756(50 mg/Kg, 1일 1회) + 항-CTLA4(10 mg/kg)로 처리된 5마리의 마우스 중 3마리(#3, 5 및 6)에서 약간 성장한다(63일차에).

[0121] 이러한 그룹(ITF3756 50 mg/Kg 1일 1회 + 항-CTLA4 10 mg/kg)에서 2차 종양은 48일차에 종양이 있는 동물에서만 발생한 반면 종양이 없는 동물(마우스 #2 및 4)에서는 성장하지 않는다는 점에서 유의해야 한다.

[0122] **도 9(a-b)**에 보고된 바와 같이, 2차 종양은 48일차에 원발성 종양의 존재(마우스 #6에서와 같이) 또는 부재(마우스 #2, 4 및 5에서와 같이)에 관계없이 ITF3756(50 mg/Kg, 1일 3회) + 항-CTLA4(10 mg/kg)로 처리된 마우스 중 어느 것에서도 발생하지 않았다.

[0123] **결론**

[0124] 얻어진 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다:

[0125] 1. 항-CTLA4 항체와 조합하여 25 및 50 mg/Kg을 1일 1회로 투여한 ITF3756은 단일 약물 투여에 비해 우수한 항종양 효과를 나타내며 이러한 치료 효과는 상승 효과가 있다.

[0126] 2 가장 강력한 항종양 효과는 ITF3756(50 mg/Kg, 1일 3회)을 항-CTLA4(10 mg/kg)와 조합하여 투여했을 때 얻어졌다.

[0127] 3. ITF3756 50 mg/Kg을 1일 1회 또는 1일 3회와 항-CTLA4 10 mg/kg의 조합은 종양 성장을 유의미하게 지연시켰으며, 치료 73일 후 5마리 중 2마리와 4마리 중 4마리가 각각 종양이 없었다.

[0128] 4. 2차 종양은 발생하지 않았거나(ITF3756 50 mg/Kg. 1일 3회 + 항-CTLA4 10 mg/kg으로 처리한 그룹에서와 같이), 5마리 마우스 중 3마리에서만 천천히 발생하였다(ITF3756 50 mg/Kg. 1일 1회 + 항-CTLA4 10 mg/kg으로 처리한 그룹에서와 같이). ITF3756 및 항-CTLA4 둘 모두 그들의 항종양 효과를 발휘하기 위해 유능한 면역계를 필요로 하기 때문에, 이러한 결과는 처리된 동물에서 효과적인 항종양 면역 반응이 유도되어 2차 종양의 성장을 예방하는 반응이 나타났다는 것을 나타낸다.

[0129] **실시예 2**

[0130] *종양 성장을 예방하기 위한 항 CTLA4와 조합한 ITF3756 대 항 PD-1 + 항 CTLA4 조합의 효과*

[0131] 6주령의 Balb/c 암컷에게 오른쪽 옆구리에 CT26.WT 종양 세포 주사를 실시하였다. 약 10일 후, 종양이 검출될 때마다 다음 계획에 따라 처리를 시작하였다:

[0132] 1) ITF3756 50 mg/kg을 경구로 1일 3회(Q3 x 5) + αCTLA4 10 mg/kg을 복강내 격일로 4회 투여한 후 6일간 휴약함(본 발명);

[0133] 2) αPD1 3 mg/kg을 복강내 격일로(eod) + αCTLA4 10 mg/kg를 복강내 격일로 4회 투여한 후 6일 동안 휴약함(참조).

[0134] 동물의 적어도 80-85%에서 종양 결절이 검출될 때마다 처리가 시작되고, 대조군 종양 무게가 동물 체중의 10%와 같거나 (인도적 종점) 일부 결절이 궤양화되면 실험이 중단된다. 동물은 일주일에 2회 측정하였고 종양은 일주일에 3회 측정하였다.

[0135] 종양 결절의 측정은 다음 식으로 계산된다: 부피(mm^3) = (D x d^2)/2, 상기 식에서, D = 결절의 주요 직경이고, d = 결절의 작은 직경이다.

[0136] **도 10**에 보고된 결과는 종양 성장 억제에 대한 두 가지 조합 치료 간에 통계적 차이가 없음을 나타낸다.

[0137] 본 발명에 따른 ITF3756 + 항 CTLA4 조합은 참조로서 사용된 승인된 항 PD-1 + 항 CTLA4 조합과 동일한 항종양 활성을 갖는다.

[0138] **실시예 3**

[0139] *암컷 NOD 마우스에서 당뇨병에 대한 ITF3756 단독 또는 항 CTLA4와의 조합의 효과*

[0140] NOD 마우스는 자발적으로 당뇨병이 발생했으며 이는 제1형 진성 당뇨병의 널리 받아들여지는 자발적 모델을 나타낸다(Pearson et al., 2016, Journal of Autoimmunity 66, 76-88).

[0141] PD-1(Programmed Death-1) 경로는 NOD 마우스에서 자가면역 당뇨병을 조절한다. PD-1 또는 PD-L1 차단은 당뇨병 전단계 10주령의 암컷 마우스에서 일주일 이내에 급속히 당뇨병을 촉발시켰다(Ansari et al., 2003, The Journal of experimental medicine 198, 63-69).

[0142] PD-1/PD-L1 축의 차단은 다른 자가면역 모델에서도 해롭다. 예를 들어, PD-$1^{-/-}$ 마우스는 야생형 마우스보다 콜라겐 유발 관절염(CIA)의 발병률이 증가하고 중증도가 더 높은 것으로 나타났다(Raptopoulou et al., 2010. Arthritis & Rheumatism 62, 1870-1880). 대식세포에서 발현된 PD-L1은 CIA로부터 보호하고 콜라겐 유발 관절염 동안 PD-L1을 차단하면 더 심각한 관절염을 초래했다(Wood et al., 2020, The Journal of Immunology 204, 73.12). 다발성 경화증의 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE) 모델에서, PD-1은 결정적인 역할을 하고, PD-1의 결실은 병리과정을 악화시킨다(Zhang and Braun, 2014, International Immunology 26, 407-415).

[0143] HDAC6 억제는 상이한 자극을 받은 다수의 세포 유형에서 PD-L1의 발현을 감소시켜 면역계의 잠재적인 활성화와 함께 PD-1/PD-L1 축에 영향을 미칠 수 있다.

[0144] 그러나, HDAC6 억제는 CIA 및 EAE와 같은 자가면역 병리 모델에서 효과적이다. 또한, 본 발명자들의 도움으로, HDAC6 KO 마우스는 연령 및 성별이 일치하는 HDAC6 야생형 대조군에 비해 더 온화한 EAE를 발달시켰다.

[0145] 종합적으로, 이러한 데이터는 PD-L1 발현을 하향 조절하는 데 있어 HDAC6 억제제의 널리 설명된 역할에도 불구하고 자가면역 반응의 맥락에서 HDAC6 억제가 보호적이라는 것을 나타낸다.

[0146] PD-L1에 대한 HDAC6i의 효과를 고려하여, 본 발명자들은 ITF3756으로 처리된 NOD 마우스가 항 PD-(L)1로 처리된 마우스에서와 같이 당뇨병의 급속한 유도를 가질 수 있는지 또는 대신 당뇨병 유도에 영향을 미치지 않는지를 질문하였다.

[0147] 10-12주령 마우스를 항 CTLA-4로 처리하면 당뇨병 유도에 효과가 없지만, 본 발명자들은 항 PD-(L)1)/항 CTLA-4 공동 치료가 항 PD-(L)1 단독과 필적할만한 효과를 발생시킬 것으로 예측한다.

[0148] 본 발명자들의 가설은 선택적 HDAC6 억제제 ITF3756 단독으로 또는 항 CTLA-4와 조합하여 처리된 NOD 마우스가 당뇨병 경과를 수정하지 않거나 제한된 효과만 유도할 것이라는 것이었다.

[0149] **재료 및 방법**

[0150] ***ITF3756****(N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드)*

[0151] ITF3756은 Italfarmaco SpA의 의약 화학부에서 합성하였다. ITF3756, 배치 9를 분말로서 DMSO에 가용화시키고 -20℃에서 보관하였다.

식별	**ITF3756 lot 9**
제형의 유형	비히클 내 용액
용량 농도	5 mg/ml
제조 지침	적절한 양의 시험 화합물을 칭량하고 DMSO 에서 100 mg/mL 의 용액을 만든다. 이 용액을 H2O/PEG 1:1 로 희석하여 시험 물품의 필요한 투여량(5 mg/ml 용액)에 도달한다. 자기 교반 하에 보관한다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	실온
공급업체 및 제조업체	Italfarmaco SpA
방법 및 경로	금속 위관 영양법과 눈금이 매겨진 플라스틱 주사기를 사용하여 위관 영양법으로 경구.
지속 기간	연속 5 일 x 2 주기 (주기 1: 0-4 일; 주기 2: 6-8,11 일)
빈도	3 x 하루 4 시간 간격
부피	10 mL/kg. 개인별 용량 부피는 투여 당일 기록된 체중을 기준으로 계산하였다.

[0152]

[0153] **항체**

[0154] 항체 치료는 Ansari(Ansari et al., 2003, The Journal of experimental medicine 198, 63-69)에 따랐다.

식별	**항 마우스 PD-1**
로트/배치 번호	735019O1 및 786520N1B
제형의 유형	약제학적 제제
용량 농도 s	500 μg (0 일)/200 μL; 250 μg (2, 4, 6, 8, 11 일)/200 μL
제조 지침	7.7 mg/mL(로트 735019O1) 또는 8.31 mg/mL(로트 786520N1B)의 용액을 사용할 준비가 되었다. 이어서, 목표 농도로 PBS 에 희석하였다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	+ 4°C, 빛으로부터 보호됨
공급업체 및 제조업체	BioXCell

식별	**항 마우스 PD-L1**
로트/배치 번호	720620A2
제형의 유형	약제학적 제제
용량 농도 s	500 μg (0 일)/200 μL; 250 μg (2, 4, 6, 8, 11 일)/200 μL
제조 지침	8.29 mg/mL 의 용액을 사용할 준비가 되었다. 이어서, 목표 농도로 PBS 에 희석하였다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	+ 4°C, 빛으로부터 보호됨
공급업체 및 제조업체	BioXCell

[0155]

식별	**항 마우스 CTLA-4**
로트/배치 번호	755620A2
제형의 유형	약제학적 제제
용량 농도 s	500 μg (0 일)/200 μL; 250 μg (day 2, 4, 6, 8, 11)/200 μL
제조 지침	8.35 mg/mL 의 용액을 사용할 준비가 되었다. 이어서, 목표 농도로 PBS 에 희석하였다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	+ 4°C, 빛으로부터 보호됨
공급업체 및 제조업체	BioXCell

[0156]

식별	**래트 IgG2b 이소형 대조군**
로트/배치 번호	707119D1
제형의 유형	약제학적 제제
용량 농도	500 μg (0 일)/200 μL; 250 μg (day 2, 4, 6, 8, 11)/200 μL
제조 지침	9.16 mg/mL 의 용액을 사용할 준비가 되었다. 이어서, 목표 농도로 PBS 에 희석하였다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	+ 4°C, 빛으로부터 보호됨
공급업체 및 제조업체	BioXCell

[0157]

[0158] **동물**

종/계통 또는 품종	**NOD (비-비만성 당뇨병) 암컷 마우스**
공급업체	Charles River Laboratories, Italia S.p.A. Via Indipendenza 11, Calco (이탈리아)
주령	치료 기간 시작 시 대략 11~12 주(암컷 비-비만 당뇨병 마우스의 당뇨병 전단계)
체중	범위: 0 일차에 19-27 그램
적응	적어도 4 일
선택 기준	동물들은 주령, 체중 및 임상 관찰을 기준으로 무작위화되었음
식별	오른쪽 귀에 번호가 매겨진 금속 태그
연구에 참여한 동물	90 마리 암컷
실험 절차 상태에 대해 나이브함	예
동물의 운명	연구 종료 시 동물을 희생시켰음

[0159]

[0160] NOD 마우스는 하기 계획에 따라 처리하였다:

시험 그룹	시험 항목	항목 용량	경로	부피	빈도	동물 수
1	대조군/나이브	-	-	-	-	10
2	비히클[b] + 이소형 대조군	0 500(d0)+250μg/마우스	OS IP	10 mL/kg 200 μL/마우스	3x/일[a] (0-4,6-8,11 일)[c] 0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
3	ITF3756	50 mg/kg	OS	10 mL/kg	3x/일[a] (0-4,6-8,11 일)[c]	10
4	항-PD-1	500(d0)+250μg/마우스	IP	200 μL/마우스	0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
5	항-PD-L1	500(d0)+250μg/마우스	IP	200 μL/마우스	0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
6	항-CTLA-4	500(d0)+250μg/마우스	IP	200 μL/마우스	0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
7	ITF3756 + 항-CTLA-4	50 mg/kg 500(d0)+250μg/마우스	OS IP	10 mL/kg IP	3x/일[a] (0-4,6-8,11 일)[c] 0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
8	항-PD1 + 항-CTLA-4	500(d0)+250μg/마우스	IP IP	200 μL/마우스 200 μL/마우스	0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
9	항-PD-L1 + 항-CTLA-4	500(d0)+250μg/마우스	IP IP	200 μL/마우스 200 μL/마우스	0, 2, 4, 6, 8, 11 일	10
a= 이전 투여와 약 4 시간 간격을 두고 1 일 2 차 및 3 차 투여 b= DMSO (최대 5%)를 함유하는 PEG 400/H_20 (1:1) c= 주기 1: 0-4 일; 주기 2: 6-8, 11 일						

[0161]

[0162] 글루코스 수준 측정

[0163] 0일(치료 시작)부터 21일(연구 종료)까지 3주 동안 모든 마우스에서 혈당증을 평가하였다. 혈당 수치는 혈당계 OneTouch® Verio로 측정하였다. 혈액 샘플은 바늘로 찔러 꼬리 정맥에서 채취하였다. 한 방울의 혈액을 테스트 스트립에 삽입하고 혈당계가 자동으로 글루코스 수치를 계산하였다. 결과는 기기의 디스플레이에 표시되었다. 기기는 20 - 600 mg/dL을 측정한다. 20 미만 또는 600 mg/dL 초과의 결과는 기기에 의해 "20 미만" 또는 "600 초과"로 시각화한다.

[0164] 당뇨병은 연속 이틀 동안 ≥ 250 mg/dL의 혈당 수치로 정의되었다.

[0165] 마우스를 3주 동안 모니터링하였고; 이 시간 동안 체중을 7회 측정하였다.

[0166] **결과**

[0167] ICI를 사용한 치료에는 임상 실습으로 확인된 자가면역 반응을 일으킬 수 있는 내재적 가능성이 부여된다. 항 CTLA4 및 항 PD-1과 같은 두 ICI의 조합은 효능이 더 좋고 부작용 발생률이 더 높다. 따라서, 종양 면역요법의 목표는 효능을 개선하고 부작용을 관리 가능한 수준으로 줄이는 것이다. 선택적 HDAC6 억제제 ITF3756과 항 CTLA4의 조합은 항 CTLA4 + 항 PD-1에 필적하는 항종양 효능을 가지며 NOD 마우스에 대한 당사의 데이터는 이것이 우수한 안전성 프로파일을 가지고 있음을 보여준다.

[0168] NOD 모델에서 얻어진 결과는 항 PD-L1 및 조합(항 PD-L1 + 항 CTLA-4)으로 처리된 마우스에서 당뇨병의 급격한

유도를 보여준다. 이러한 발견은 각각 문헌 데이터 및 발명자들의 예측과 일치한다(**도 11**).

[0169] 당뇨병 발병률의 증가를 보인 다른 두 그룹은 항 PD-1 및 (항 PD-1 + 항 CTLA-4)였으며 21일차에 당뇨병 발병률이 각각 60% 및 50%였다.

[0170] 현저한 대조로, (ITF3756 + 항 CTLA-4) 그룹에서 단 한 마리의 마우스만이 11일과 14일 사이에 글루코스 수준이 일시적으로 증가하였다. 그러나, 15일 이후의 모든 측정치가 대조군의 평균값보다 높았지만 250 mg/dL 미만이었기 때문에 상기 마우스는 부분적으로 회복되었다.

[0171] 다른 그룹에서는 당뇨병 유발이 검출되지 않았다.

[0172] 항체로 처리된 그룹에서 얻어진 결과는 NOD 마우스에서 PD-1/PD-L1 축의 중요한 역할을 설명한 문헌 데이터와 일치한다.

[0173] 결과는 HDAC6 억제가 당뇨병 발병을 증가시키지 않으며 특히 선택적 HDAC6 억제제 ITF3756과 항 CTLA-4 항체의 조합이 당뇨병 유도에 매우 미미한 영향을 미친다는 것을 분명히 나타낸다.

[0174] 반면에, 항 CTLA-4 항체와 항 PD-1 및 항 PD-L1 항체의 조합은 당뇨병을 강력하게 악화시킨다.

[0175] 이러한 결과는 (항 CTLA-4 + ITF3756) 치료가 항 CTLA-4 + 항 PD-(L)1보다 더 나은 안전성 프로파일을 가질 수 있음을 시사한다.

[0176] **실시예 4**

[0177] *4T1 유방암 모델에서 항-CTLA4 항체와 조합하여 투여된 ITF3756의 항종양 효과*

[0178] 동계 종양 세포주 4T1 삼중 음성 유방암으로 공격받은 C57BL/6 마우스를 사용한다.

[0179] 4T1 종양 모델은 면역원성이 낮은 종양으로 간주된다(Demaria et al., Clin. Cancer Res. 11, 728-734, 2005). 이전 실험에 따르면, 이 종양의 항 CTLA-4 치료는 일반적인 효능을 나타내지만 처리된 동물 간에 가변성을 나타내므로 4T1은 면역요법 기반 조합 요법을 테스트하기에 좋은 모델을 구성한다.

[0180] ITF3756은 CT26 결장암 치료에 사용되는 것과 동일한 용량, 즉 단일 제제로 50 mg/kg(mpk) TID로 항 CTLA-4 항체와 조합하여 사용한다. 후자는 격일로 일주일에 3회 3 mpk로 투여된다. 이전 실험에서, 본 발명자들은 두 약물 모두에 대해 대략 40%의 종양 성장의 필적할만한 평균 감소를 관찰하였다. 항 CTLA-4는 3 mpk 및 10 mpk에서 필적할만한 종양 감소를 보인 반면, 1 mpk에서의 활성은 미미했다.

[0181] 종양 성장을 세포주의 피하 주사 후에 유도하고, 마우스는 주사 후 적어도 3주 동안 모니터링한다.

[0182] **실시예 5**

[0183] *B16F10 흑색종 모델에서 항-CTLA4 항체와 조합하여 투여된 ITF3756의 항종양 효과*

[0184] 동계 종양 세포주 B16F10 흑색종으로 공격받은 C57BL/6 마우스를 사용한다.

[0185] B16F10 흑색종 모델은 또한 면역원성이 낮은 종양으로 간주되며(Reilley et al., J. Immunother. Cancer 7, 323, 2019) 따라서 면역요법 기반 조합을 테스트하기 위한 또 다른 좋은 모델을 나타낸다.

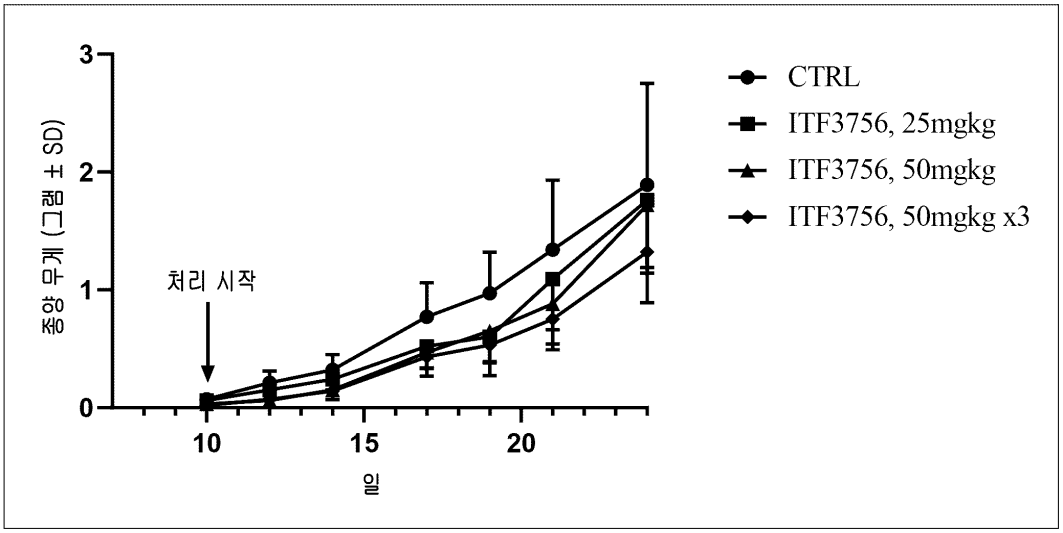
[0186] ITF3756은 CT26 결장암 치료에 사용되는 것과 동일한 용량, 즉 단일 제제로 50 mg/kg(mpk) TID로 항 CTLA-4 항체와 조합하여 사용한다.

[0187] 이 모델에서 항 CTLA-4 항체의 투여량과 관련하여, 본 발명자들은 ITF3756과 조합될 수 있는 최적의 투여량을 확인하기 위해 예비 실험을 수행하였다. 문헌에 따르면, 항 CTLA-4 항체는 다양한 투여량으로 투여되는데, 종양 세포 주사 후 3일차에 200 ug/마우스, 이어서 6일, 9일, 12일차에 100 ug/마우스의 용량(Reilley et al., 2019; Sharma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 116, 10453-10462, 2019)을 이 실험의 가이드로 사용하였다.

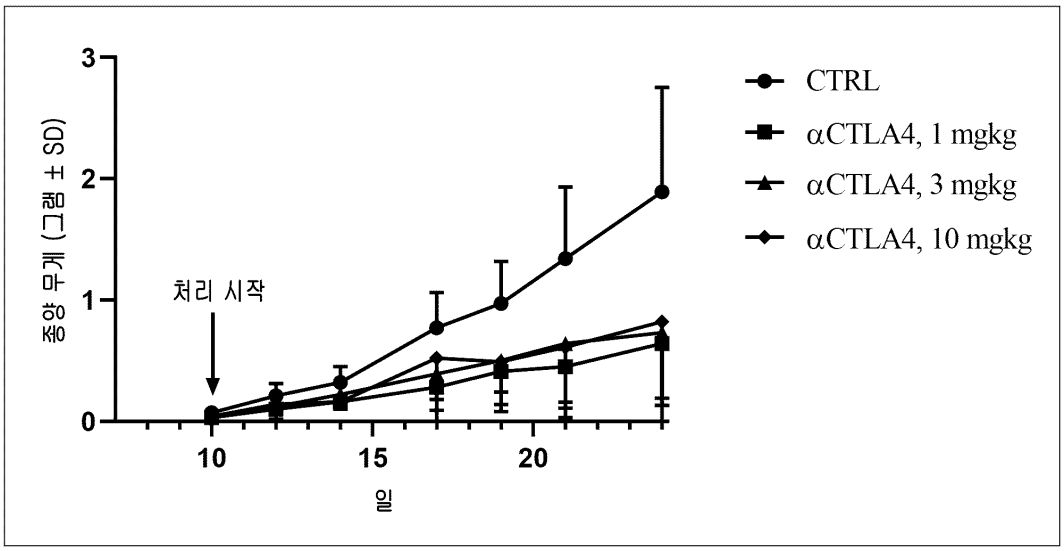
[0188] 세포주의 피하 주사 후에 종양 성장을 유도하고, 마우스는 주사 후 적어도 3주 동안 모니터링한다.

도면

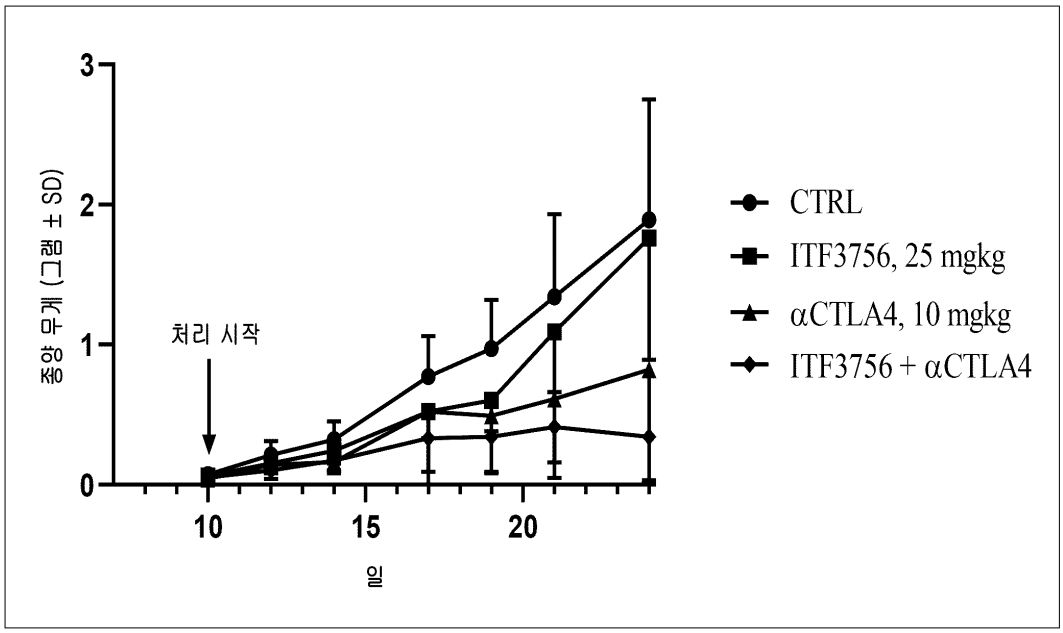
도면1


종양 무게 (그램 ± SD)
3
2
1
0
처리 시작
10
15
20
일
CTRL
ITF3756, 25mgkg
ITF3756, 50mgkg
ITF3756, 50mgkg x3

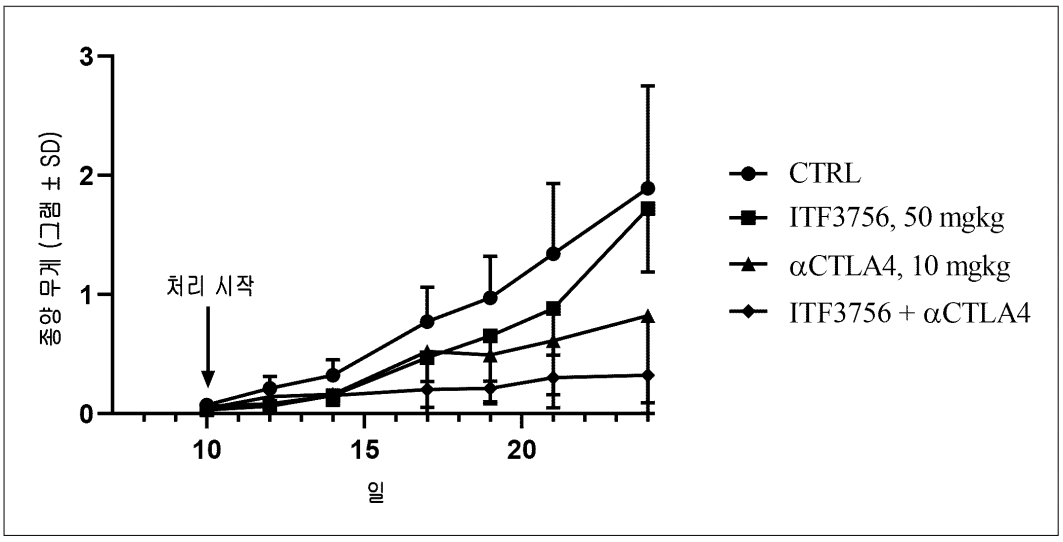
도면2


종양 무게 (그램 ± SD)
3
2
1
0
처리 시작
10
15
20
일
CTRL
αCTLA4, 1 mgkg
αCTLA4, 3 mgkg
αCTLA4, 10 mgkg

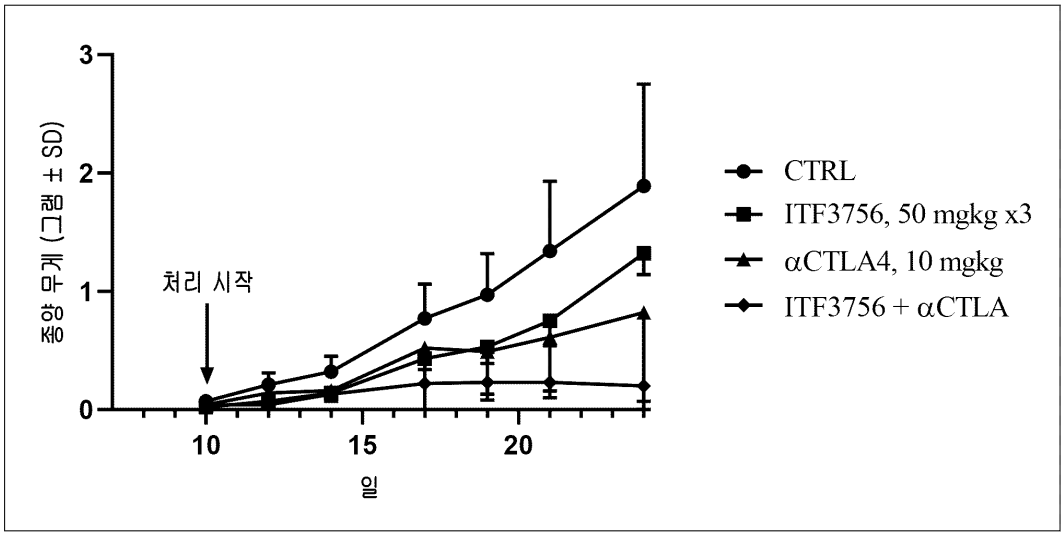
도면3


종양 무게 (그램 ± SD)
3
2
1
0
처리 시작
10
15
20
일
CTRL
ITF3756, 25 mgkg
αCTLA4, 10 mgkg
ITF3756 + αCTLA4

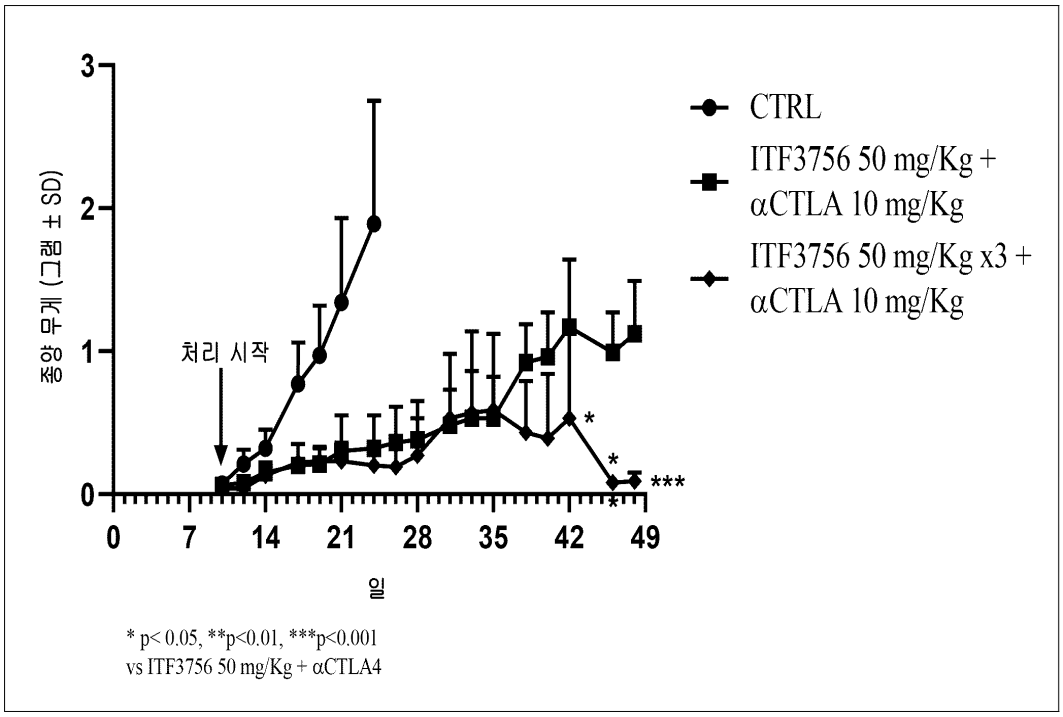
도면4


종양 무게 (그램 ± SD)
3
2
1
0
처리 시작
10
15
20
일
CTRL
ITF3756, 50 mgkg
αCTLA4, 10 mgkg
ITF3756 + αCTLA4

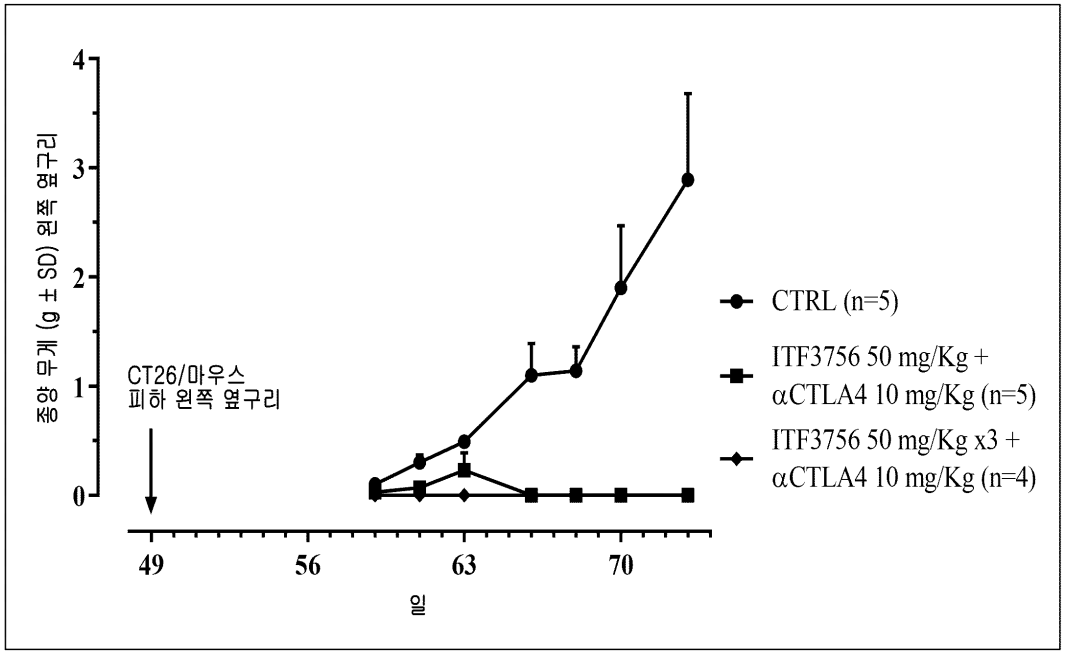
도면5


종양 무게 (그램 ± SD)
3
2
1
0
처리 시작
10
15
20
일
CTRL
ITF3756, 50 mgkg x3
αCTLA4, 10 mgkg
ITF3756 + αCTLA

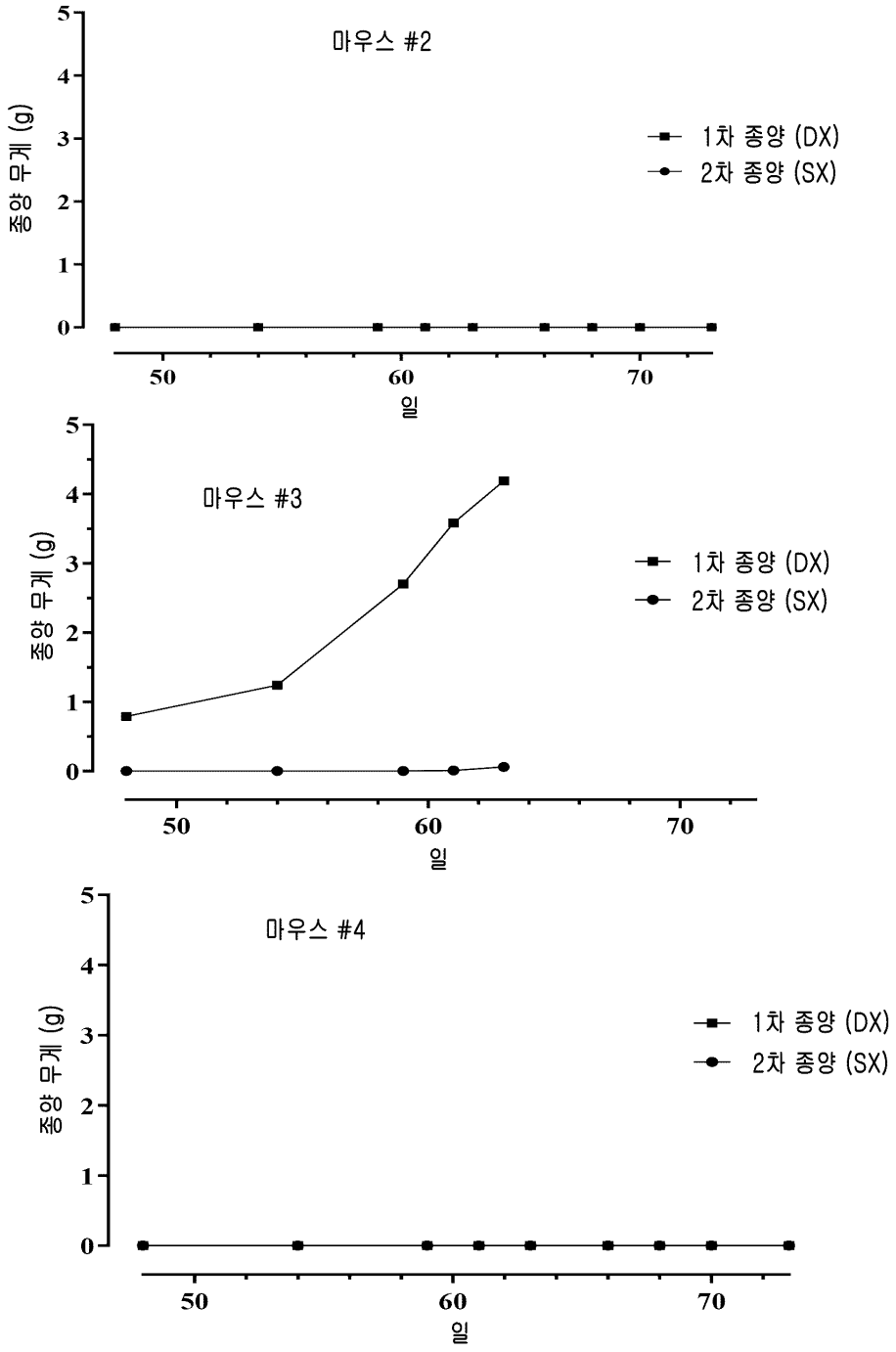
도면6


종양 무게 (그램 ± SD)
3
2
1
0
처리 시작
0
7
14
21
28
35
42
49
일
*
*
*
***
CTRL
ITF3756 50 mg/Kg + αCTLA 10 mg/Kg
ITF3756 50 mg/Kg x3 + αCTLA 10 mg/Kg
* p< 0.05, **p<0.01, ***p<0.001
vs ITF3756 50 mg/Kg + αCTLA4

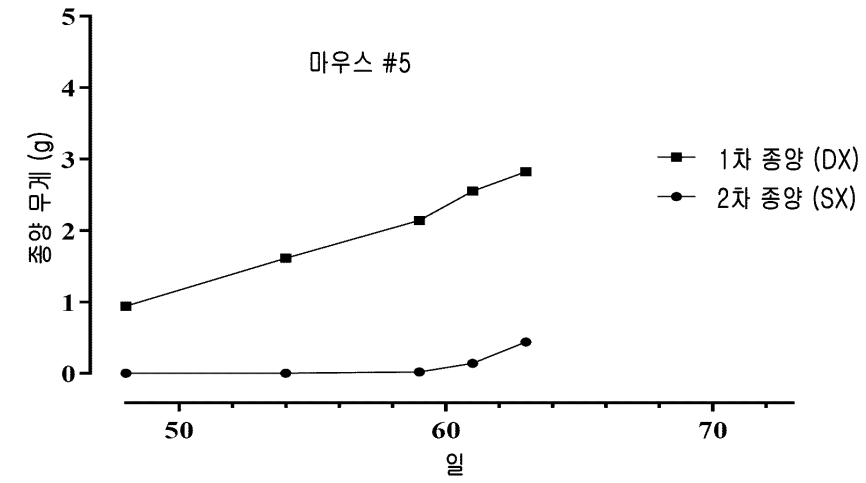
도면7

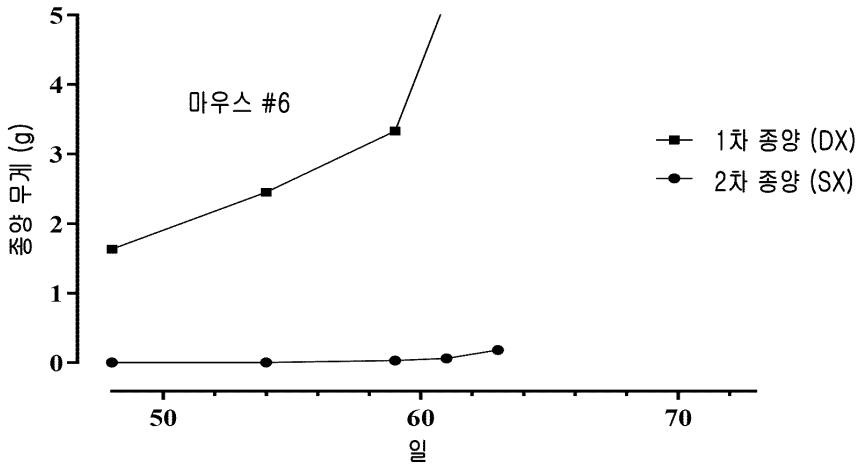

종양 무게 (g ± SD) 왼쪽 옆구리
4
3
2
1
0
CT26/마우스
피하 왼쪽 옆구리
49
56
63
70
일
CTRL (n=5)
ITF3756 50 mg/Kg +
αCTLA4 10 mg/Kg (n=5)
ITF3756 50 mg/Kg x3 +
αCTLA4 10 mg/Kg (n=4)

도면8a

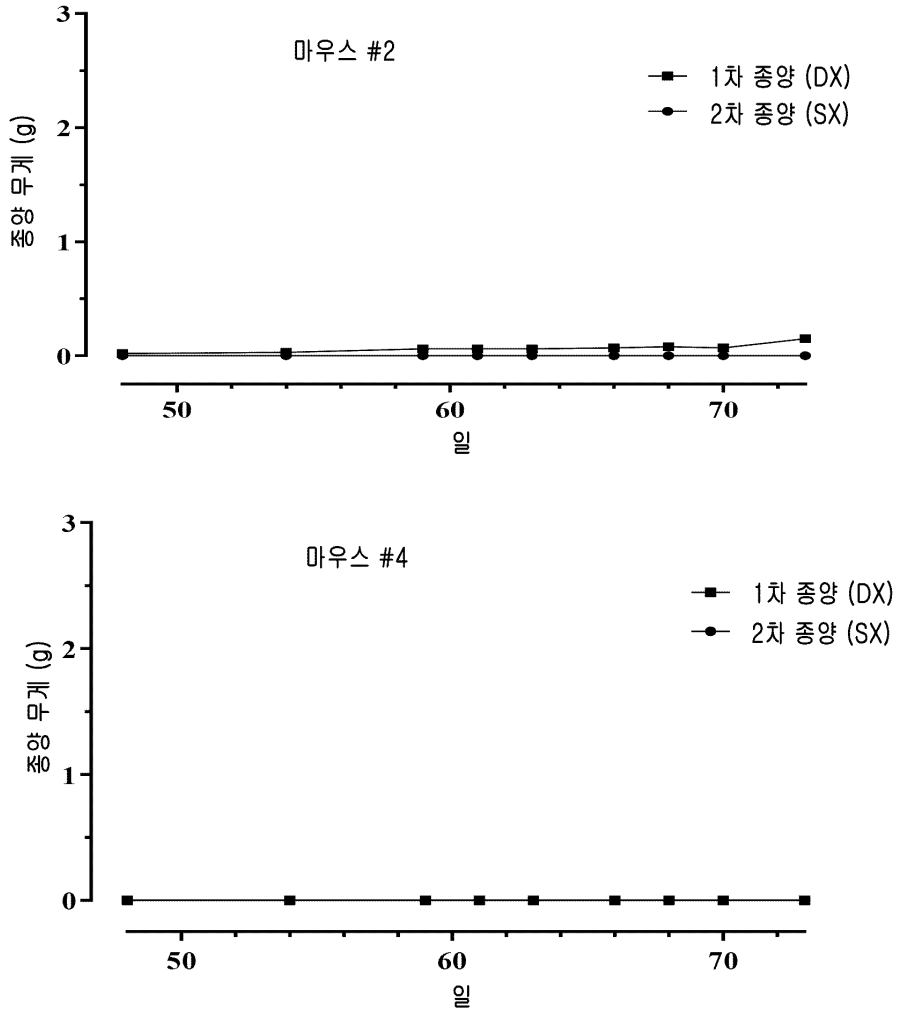

마우스 #2
종양 무게 (g)
0
1
2
3
4
5
50
60
70
일
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)
마우스 #3
종양 무게 (g)
0
1
2
3
4
5
50
60
70
일
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)
마우스 #4
종양 무게 (g)
0
1
2
3
4
5
50
60
70
일
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)

도면8b

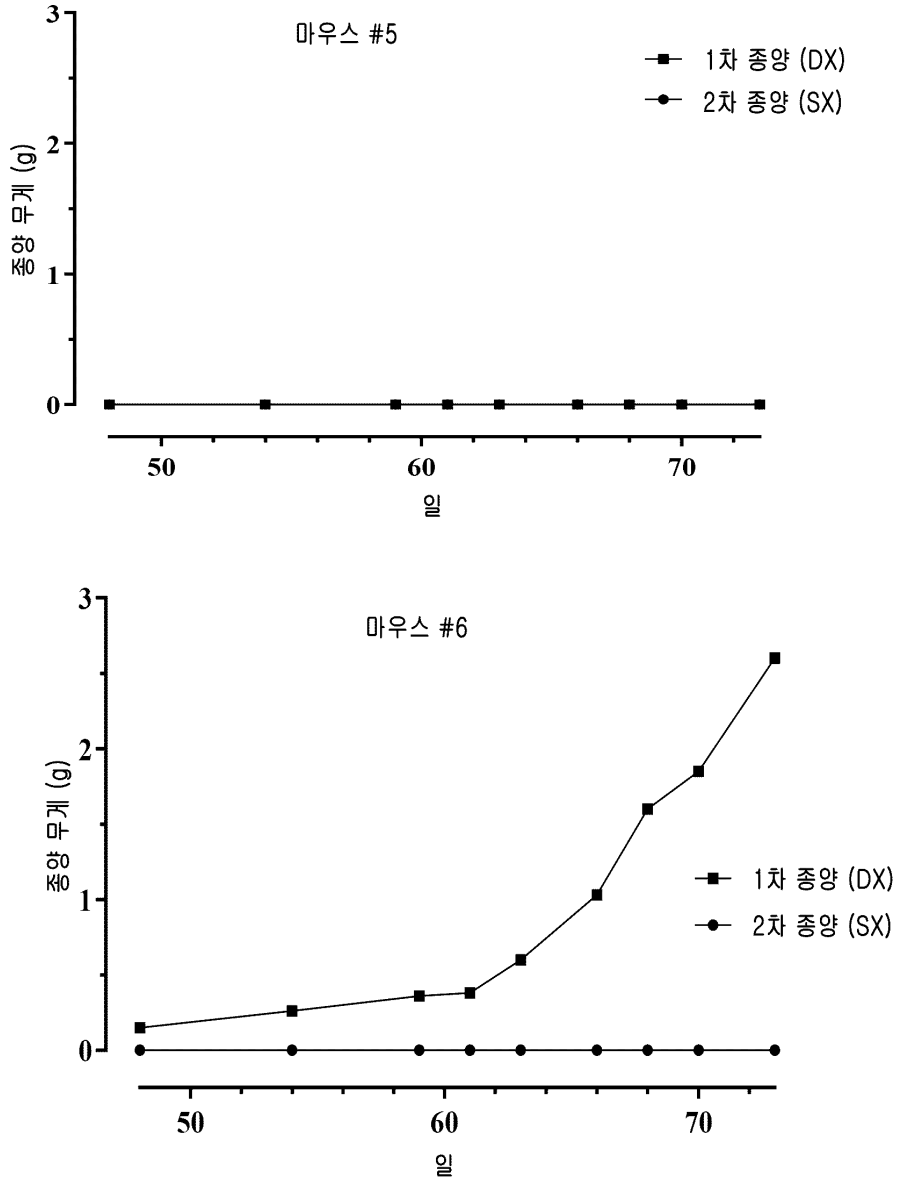

마우스 #5
종양 무게 (g)
0
1
2
3
4
5
50
60
70
일
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)


마우스 #6
종양 무게 (g)
0
1
2
3
4
5
50
60
70
일
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)

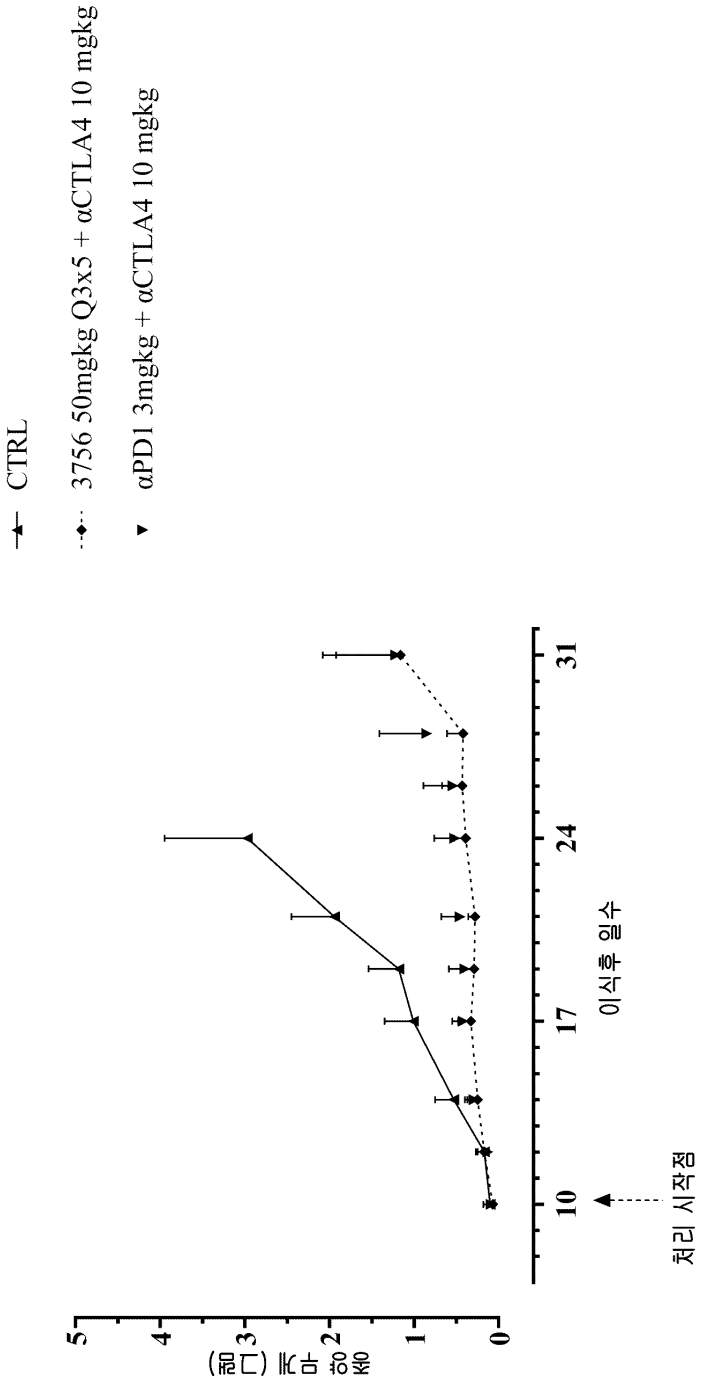
도면9a


마우스 #2
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)
종양 무게 (g)
0
1
2
3
50
60
70
일
마우스 #4
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)
종양 무게 (g)
0
1
2
3
50
60
70
일

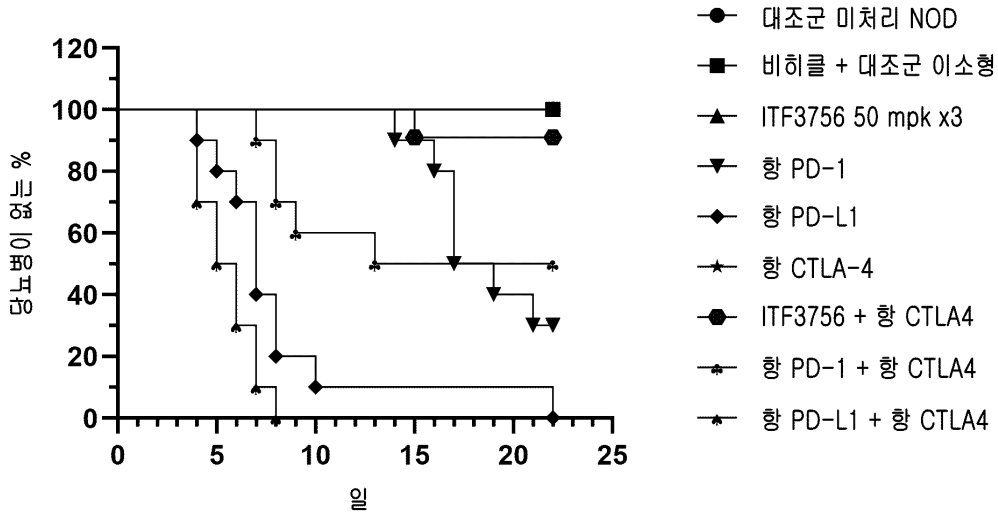
도면9b


마우스 #5
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)
종양 무게 (g)
0
1
2
3
50
60
70
일
마우스 #6
1차 종양 (DX)
2차 종양 (SX)
종양 무게 (g)
0
1
2
3
50
60
70
일

도면10


CTRL
3756 50mgkg Q3x5 + αCTLA4 10 mgkg
αPD1 3mgkg + αCTLA4 10 mgkg
종양 부피 (㎤)
0
1
2
3
4
5
10
17
24
31
이식후 일수
처리 시작점

도면11


120
100
80
60
40
20
0
당뇨병이 없는 %
0
5
10
15
20
25
일
대조군 미처리 NOD
비히클 + 대조군 이소형
ITF3756 50 mpk x3
항 PD-1
항 PD-L1
항 CTLA-4
ITF3756 + 항 CTLA4
항 PD-1 + 항 CTLA4
항 PD-L1 + 항 CTLA4