



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월23일

(11) 등록번호 10-2446655

(24) 등록일자 2022년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/56 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A61K 31/56 (2013.01)  
A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0049214

(22) 출원일자 2020년04월23일

심사청구일자 2020년04월23일

(65) 공개번호 10-2020-0126334

(43) 공개일자 2020년11월06일

(30) 우선권주장  
1020190049990 2019년04월29일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌  
Oncotarget, 2014, Vol.5, No.9, pp.2761-2777.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

주식회사 큐라클  
서울특별시 서초구 효령로 23-1(방배동)

(72) 발명자  
권영근  
서울특별시 용산구 대사관로11길 11, 402호

장해영  
경기도 성남시 수정구 창업로 54, 608, 609, 610, 611호 (시흥동, 엘에이치관교 제2테크노밸리 기업성장센터)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 10 항

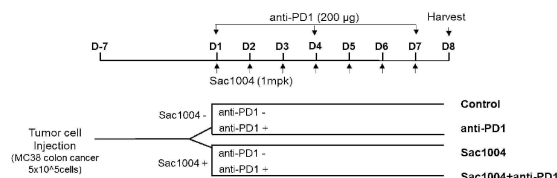
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 면역항암 보조제

## (57) 요약

본 발명은 면역항암 보조제에 관한 것으로, 상기 보조제는 면역항암제와 병용투여함으로써, 생체 내 부작용을 유발하지 않으면서도 면역 인자의 기능을 활성화시킴으로써 면역항암제의 항암효과를 증진시키는 효과를 나타내어, 면역항암 보조제로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

**A61K 45/06** (2013.01)

**A61P 35/00** (2018.01)

**A61K 2300/00** (2013.01)

(72) 발명자

**박송이**

서울특별시 중랑구 봉우재로32길 73 한신월드타운  
1동 402호

**노민영**

서울특별시 도봉구 마들로 646, 104동 703호

**김여명**

경기도 성남시 수정구 창업로 54, 608, 609, 610,  
611호 (시흥동, 엘에이치판교 제2테크노밸리 기업  
성장센터)

**김명화**

경기도 성남시 수정구 창업로 54, 608, 609, 610,  
611호 (시흥동, 엘에이치판교 제2테크노밸리 기업  
성장센터)

**안구현**

경기도 성남시 수정구 창업로 54, 608, 609, 610,  
611호 (시흥동, 엘에이치판교 제2테크노밸리 기업  
성장센터)

**표정인**

경기도 성남시 수정구 창업로 54, 608, 609, 610,  
611호 (시흥동, 엘에이치판교 제2테크노밸리 기업  
성장센터)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110038
과제번호	2019R1A2C3007142
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형2)중견연구
연구과제명	혈관 패터닝과 변이 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

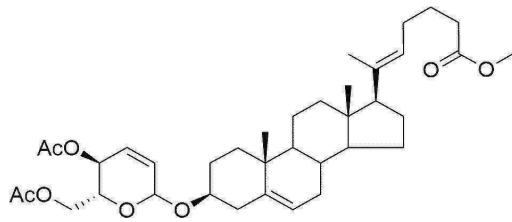
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 anti-PD1 면역항암제에 대한 면역항암 보조제:

[화학식 2]



#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제1항에 있어서,

상기 면역항암 보조제는 anti-PD1 면역항암제의 효능을 증진시키는 것을 특징으로 하는 면역항암 보조제.

#### 청구항 11

제1항에 있어서,

상기 면역항암 보조제는 면역 증강 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 면역항암 보조제.

#### 청구항 12

제1항에 있어서,

상기 면역항암 보조제는 anti-PD1 면역항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있는 것을 특징으로 하는 면역항암 보조제.

#### 청구항 13

제1항에 있어서,

상기 면역항암 보조제는 도움 T세포(helper T세포), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell), 자연살생세포(NK cell) 및 사이토카인(cytokine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 면역 인자들을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 면역항암 보조제.

#### 청구항 14

제1항에 있어서,

상기 면역항암 보조제는 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팡대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성종피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 율름스암, 유방암, 삼중음성유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신용모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시 육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 암을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 면역항암 보조제.

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

anti-PD1 면역항암제; 및

제1항의 면역항암 보조제를 포함하는 항암용 병용제제.

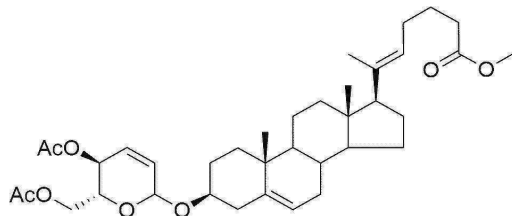
#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 항암용 병용제제는 면역항암용 병용제제인 것인, 항암용 병용제제.

## 청구항 18

하기 화학식 2로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 anti-PD1 면역항암제 효능 증진용 약학적 조성물:

[화학식 2]



## 청구항 19

제16항에 있어서,

상기 항암용 병용제제는 면역 증강 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 항암용 병용제제.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 면역항암 보조제에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 암은 신체 전체로 퍼질 가능성이 있는 비정상의 국소적인 세포 성장을 특징으로 하는 질환이다. 암은 폐암, 방광암, 전립선암, 췌장암, 자궁경부암, 뇌암, 위암, 결장직장암 및 흑색종을 포함한 다수의 암의 유형이 있다. 과거 종양 암을 치료하는 가장 흔한 수단 (종양학)은 수술, 방사선 치료 또는 화학요법 약물의 사용이었다. 그러나, 최근에 암 면역요법이 종양학의 치료법으로서 많은 가능성을 제시하는 것으로 입증되었다.

[0004] 암 면역요법은 종양이 직접 절제되거나 치료되는 기존의 일반적인 치료 방법과는 아주 대조적으로 암 치료에 면역계가 사용되는 종양학의 한 분야이다. 이 치료 개념은 이들 세포의 면역 기능을 저해하도록 작용하는 T 세포의 표면에 있는 많은 단백질의 동정에 기초한다.

[0005] 종양면역에 있어 가장 근본적인 문제는 면역체계가 어떻게 이들 항원을 인식하고 제거할 수 있도록 활성화 시키는가이다. 이런 측면에서, 종양세포들이 특정 사이토카인을 분비하도록 유전공학적인 조작을 가하는 새로운 방식은 종양면역에 신기원을 이룩하였다.

[0006] 이러한 면역치료법에 근거한 유전적으로 변형된 종양백신의 이론적인 배경은 숙주가 외부인자로 종양을 인식할 수 있는 항원을 보유하고 있다는 점이다. 인체의 T 및 B 림프구들은 발생과정을 거쳐 거의 무한대의 항원차이를 구별할 수 있는 능력을 항원 수용체(antigen receptor)의 형태로 갖추었지만, 실질적으로 종양면역의 성공을 위해서는 다음의 두 가지 기준에 부합해야 한다. 첫째로 종양 세포들이 정상세포에서는 발현하지 않는 신규 항원 (펩타이드)을 발현해야 하며, 둘째로 면역 세포들이 이들 항원을 인식하고 적절하게 활성화가 되어야 한다.

[0007] 종래의 사이토카인 유전자를 도입한 종양세포를 이용한 면역치료법은 백서를 이용한 동물실험에서 그 효과를 발휘하였다. 현재, 전 세계적으로 특정 사이토카인 유전자를 도입한 종양 세포를 백서에 투입할 경우 이들 백서에 서 신규 종양의 퇴치와 종양면역이 획득될 수 있다는 연구들이 진행되고 있다.

[0008] 세계적으로, 천만 명 이상의 사람이 매년 암으로 진단되며, 이 숫자는 2020년까지는 매년 1500만의 새로운 증례로 증가할 것이다. 암은 매년 600만 명의 사망을 야기하거나, 세계적으로 사망의 12%를 야기한다. 암을 치료할 수 있는 방법에 대한 필요성은 여전히 남아 있다. 이들 방법은 인간 및 다른 포유동물에서 암의 예방 또는 치료

에 유용한 약학적 조성물에 대한 근거를 제공할 수 있다.

[0009] 특히, 암 치료용 병용투여는 다중 수단을 통해 질환을 공격한다는 이점이 인지됨에 따라 점점 더 일반화되어 가고 있다. 병용투여는, 항암제에 대하여 저항성이 나타난 경우에도 유용할 뿐만 아니라 효능이 나타나는 경우에도 항암제의 효능을 증진시켜 투여하는 항암제의 양을 감소시킬 수 있는 장점이 있다. 이를 통하여 항암제의 신체의 각 장기에 미치는 독성 및 부작용은 최소화하면서 항암 효능은 증대시키는 것이 가능하다. 비록 다수의 효과적인 병용 요법 치료법이 지난 수십 년간에 걸쳐 확인되기는 하였지만; 계속해서 매년 암 사망수는 높다는 것에 비추어 볼 때, 항암 치료법에서 사용하기 위한 효과적인 치료법을 확인하는 것이 계속적으로 요구되고 있다.

[0011] 특허문헌 1에서는 p53 활성화제 및 c-Met 억제제를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료를 위한 병용투여용 약학 조성물에 대하여 개시한 바 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2014-0097607

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2011-0047170

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 일 목적은 면역항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 면역항암제; 및 상기 면역항암 보조제를 포함하는 면역항암용 병용제제를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 면역항암제 효능 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

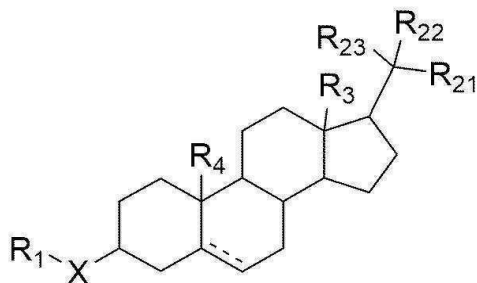
[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 증강용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0023] 본 발명의 일 측면은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역항암 보조제를 제공한다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] (상기 화학식 1에서,

[0027] X는 산소 또는 황이고;

[0028] 는 단일결합 또는 이중결합을 나타내고;

[0030] R1은 수소, 할로, C1-30 알킬, C3-10 사이클로알킬, C2-30 알케닐, C3-10 사이클로알케닐, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C2-15 헤테로사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C3-15 헤테로사

이클로알킬알킬, C<sub>2-30</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-30</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-20</sub> 알코올, C<sub>1-20</sub> 알케놀, C<sub>2-30</sub> 아실, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-10</sub> 아민, C<sub>2-15</sub> 에스테르, 설페이트, 카르복실기, C<sub>3-20</sub> 카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>4-20</sub> 알케닐카르복시알케닐, C<sub>6-30</sub> 아릴, C<sub>6-30</sub> 아랄킬, C<sub>6-30</sub> 알카릴, 헤테로원자로서 질소를 포함하는 C<sub>3-30</sub> 헤테로아릴 또는 C<sub>6-30</sub> 아릴카르보닐이고;

[0032] R<sub>21</sub>은 C<sub>2-30</sub> 알킬, C<sub>3-10</sub> 사이클로알킬, C<sub>2-30</sub> 알케닐, C<sub>3-10</sub> 사이클로알케닐, C<sub>2-30</sub> 카르복시알킬, C<sub>2-30</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-30</sub> 카르복시알케닐, C<sub>3-30</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-30</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-30</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-30</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>4-30</sub> 알케닐카르복시알케닐, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>2-10</sub> 헤테로 사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알킬알킬, C<sub>2-30</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-30</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-20</sub> 알코올, C<sub>1-20</sub> 알케놀, C<sub>2-30</sub> 아실, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-10</sub> 아민 또는 C<sub>2-15</sub> 에스테르이고;

[0034] R<sub>22</sub>는 수소, 히드록시, 할로 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이고;

[0035] R<sub>23</sub>은 수소, 히드록시 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이고;

[0036] R<sub>21</sub>은 R<sub>22</sub> 및 R<sub>23</sub>과 함께 결합하는 탄소에 대하여 이중결합을 형성할 수 있고;

[0037] R<sub>23</sub>은 R<sub>21</sub> 및 R<sub>22</sub>과 함께 결합하는 탄소에 대하여 이중결합을 형성할 수 있고;

[0038] R<sub>21</sub> 또는 R<sub>23</sub>이 상기 탄소에 이중결합을 형성하는 경우 R<sub>22</sub>는 원자를 포함하지 않고; 및

[0039] R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 서로 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이다).

[0041] 본 발명의 다른 일 측면은 면역항암제; 및

[0042] 상기 면역항암 보조제를 포함하는 면역항암용 병용제제를 제공한다.

[0044] 본 발명의 다른 일 측면은 상기 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역항암제 효능 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0046] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0048] 본 발명에 따른 면역항암 보조제는 면역항암제와 병용투여함으로써, 생체 내 부작용을 유발하지 않으면서도 면역 인자의 기능을 활성화시킴으로써 면역항암제의 항암효과를 증진시키는 효과를 나타내어, 면역항암 보조제로 유용하게 사용할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0050] 도 1a는 실험 동물 모델의 준비 및 희생까지의 절차를 나타낸 개략도이다.

도 1b는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양크기 변화를 나타낸 그래프이다.

도 1c는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 함에 따른 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 2a는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 후에, 종양 및 비장을 적출하기 전의 마우스 사진이다.

도 2b는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스에서 적출한 비장의 사진이다.

도 2c는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 후, 마우스에서 적출한 종양의 사진이다.

도 2d는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 몸무게 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2e는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양무게를 나타낸 그래프이다.

- 도 2f는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 비장무게 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 3a-3c는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양에 대해 FACS 분석을 한 결과이다.
- 도 3d는 CD45.2<sup>+</sup> 마커를 통해 각 약물투여군에서 면역 인자들의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 3e는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 3f는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 3g는 각 약물투여군에서 자연살생세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 3h는 각 약물투여군에서 조절T세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 4a는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포의 증식능력을 전체%로 나타낸 그래프이다.
- 도 4b는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포의 증식능력을 전체%로 나타낸 그래프이다.
- 도 4c는 각 약물투여군에서 자연살생세포의 증식능력을 전체%로 나타낸 그래프이다.
- 도 4d는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포의 증식능력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 나타낸 그래프이다.
- 도 4e는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포의 증식능력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 나타낸 그래프이다.
- 도 4f는 각 약물투여군에서 자연살생세포의 증식능력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 나타낸 그래프이다.
- 도 5a는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포 내 CD107a의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 5b는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포 내 CD107a의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 6a는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포 내 TNF  $\alpha$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 6b는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포 내 TNF  $\alpha$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 7a는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포 내 IFN  $\gamma$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 7b는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포 내 IFN  $\gamma$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 8a-8b는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양에 대해 FACS 분석을 한 결과이다.
- 도 8c는 각 약물투여군에서 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포의 CD107a 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 8d는 각 약물투여군에서 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포의 TNF  $\alpha$  수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 8e는 각 약물투여군에서 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포의 IFN  $\gamma$  수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 8f는 각 약물투여군에서 비장 내 CD8<sup>+</sup>T세포의 CD107a 수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 8g는 각 약물투여군에서 비장 내 CD8<sup>+</sup>T세포의 TNF  $\alpha$  수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 8h는 각 약물투여군에서 비장 내 CD8<sup>+</sup>T세포의 IFN  $\gamma$  수준을 나타낸 그래프이다.
- 도 9a는 각 약물투여군에서 종양 내 접착 결합의 발현 수준을 나타낸 형광발광 사진이다.
- 도 9b는 각 약물투여군에서 종양 내 접착 결합의 발현 수준을 수치화하여 형광발광 밀도로 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 각 약물투여군에서 PDL1 및 CD3의 발현 수준을 나타낸 형광발광 사진이다.
- 도 11a는 각 약물투여군에서 전염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인들의 발현에 대해 RT-PCR을 수행한 사진이다.



도 11b는 각 약물투여군에서 CXCL9, iNOS 및 Gapdh의 발현에 대해 RT-PCR을 수행한 사진이다.

도 11c는 각 군별로 RT-PCR을 통해 mRNA 발현 수준을 그래프로 나타낸 사진이다.

도 12a는 CD4/8+T, NK 제거, MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여에 따른 절차를 나타낸 개략도이다.

도 12b는 MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8+T, NK 제거에 따른 결과를 유세포 분석을 통해 확인하였고, 면역세포의 제거가 원활히 진행되었음을 확인한 도이다.

도 12c는 MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8+T, NK 제거에 따른 마우스의 생존율을 나타낸 것으로, CD8+ T 세포를 제거한 실험군 마우스의 경우 가장 생존율이 낮은 것을 확인한 도이다.

도 12d는 상기 도 12c와 동일한 과정을 나타낸 것으로, MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8+T 제거에 따른 종양의 성장율을 시간에 따라 나타낸 것으로, CD8+ T 세포를 제거한 실험군 마우스의 경우 종양 성장율이 가장 큰 것을 확인한 도이다.

도 12e는 MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8+T, NK 제거에 따른 종양의 크기를 각 실험군마다 비교한 것으로, CD8+ T 세포를 제거한 실험군 마우스의 경우 종양 크기가 가장 큰 것을 확인한 도이다.

도 13a는 MC38 대장암 세포주 주입 및 장기간 약물투여의 절차를 나타낸 개략도이다.

도 13b는 MC38 대장암 세포주 주입 및 장기간 약물투여에 따른 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 13c는 MC38 대장암 세포주 주입 및 장기간 약물투여에 따른 마우스의 종양 크기를 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

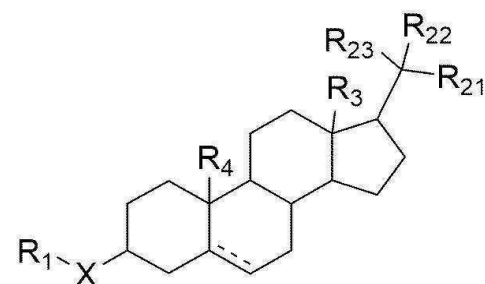
이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

한편, 본 발명의 실시 형태는 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.

본 발명의 일 측면은, 면역항암 보조제를 제공한다.

구체적으로, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역항암 보조제를 제공한다.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

X는 산소 또는 황이고;

$\text{---}$ 는 단일결합 또는 이중결합을 나타내고;

R<sub>1</sub>은 수소, 할로, C<sub>1-30</sub> 알킬, C<sub>3-10</sub> 사이클로알킬, C<sub>2-30</sub> 알케닐, C<sub>3-10</sub> 사이클로알케닐, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>2-15</sub> 헤테로사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-15</sub> 헤테로사이클로알킬알킬, C<sub>2-30</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-30</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub>

헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-20</sub> 알코올, C<sub>1-20</sub> 알케놀, C<sub>2-30</sub> 아실, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-10</sub> 아민, C<sub>2-15</sub> 에스테르, 설페이트, 카르복실기, C<sub>3-20</sub> 카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>4-20</sub> 알케닐카르복시알케닐, C<sub>6-30</sub> 아릴, C<sub>6-30</sub> 아랄킬, C<sub>6-30</sub> 알카릴, 헤테로원자로서 질소를 포함하는 C<sub>3-30</sub> 헤테로아릴 또는 C<sub>6-30</sub> 아릴카르보닐이고;

[0065] R<sub>21</sub>은 C<sub>2-30</sub> 알킬, C<sub>3-10</sub> 사이클로알킬, C<sub>2-30</sub> 알케닐, C<sub>3-10</sub> 사이클로알케닐, C<sub>2-30</sub> 카르복시알킬, C<sub>2-30</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-30</sub> 카르복시알케닐, C<sub>3-30</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-30</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-30</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-30</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>4-30</sub> 알케닐카르복시알케닐, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>2-10</sub> 헤테로 사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알킬알킬, C<sub>2-30</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-30</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-20</sub> 알코올, C<sub>1-20</sub> 알케놀, C<sub>2-30</sub> 아실, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-10</sub> 아민 또는 C<sub>2-15</sub> 에스테르이고;

[0067] R<sub>22</sub>는 수소, 히드록시, 할로 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이고;

[0068] R<sub>23</sub>은 수소, 히드록시 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이고;

[0069] R<sub>21</sub>은 R<sub>22</sub> 및 R<sub>23</sub>과 함께 결합하는 탄소에 대하여 이중결합을 형성할 수 있고;

[0070] R<sub>23</sub>은 R<sub>21</sub> 및 R<sub>22</sub>과 함께 결합하는 탄소에 대하여 이중결합을 형성할 수 있고;

[0071] R<sub>21</sub> 또는 R<sub>23</sub>이 상기 탄소에 이중결합을 형성하는 경우 R<sub>22</sub>는 원자를 포함하지 않고; 및

[0072] R<sub>3</sub> 및 R<sub>4</sub>는 서로 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-10</sub> 알킬이다).

[0074] 상기 화학식 1의 X는 산소일 수 있다.

[0076] 상기 화학식 1의 R<sub>1</sub>은 수소, 할로, C<sub>1-10</sub> 알킬, C<sub>3-8</sub> 사이클로알킬, C<sub>2-10</sub> 알케닐, C<sub>3-8</sub> 사이클로알케닐, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>2-8</sub> 헤테로사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알킬알킬, C<sub>2-20</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-20</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-8</sub> 헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-10</sub> 알코올, C<sub>1-10</sub> 알케놀, C<sub>2-20</sub> 아실, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-5</sub> 아민, C<sub>2-15</sub> 에스테르, 설페이트, 카르복실기, C<sub>3-20</sub> 카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>4-20</sub> 알케닐카르복시알케닐, C<sub>6-20</sub> 아릴, C<sub>6-20</sub> 아랄킬, C<sub>6-20</sub> 알카릴, 헤테로원자로서 질소를 포함하는 C<sub>3-20</sub> 헤테로아릴 또는 C<sub>6-20</sub> 아릴카르보닐일 수 있다.


[0078] 상기 화학식 1의 R<sub>1</sub>은 수소, C<sub>1-10</sub> 알킬, C<sub>3-8</sub> 사이클로알킬, C<sub>2-10</sub> 알케닐, C<sub>3-8</sub> 사이클로알케닐, 헤테로원자로서 산소를 포함하는 C<sub>2-8</sub> 헤테로사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알킬알킬, C<sub>2-20</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-10</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소를 포함하는 C<sub>3-8</sub> 헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-10</sub> 알코올, C<sub>1-10</sub> 알케놀, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-5</sub> 아민, C<sub>2-15</sub> 에스테르, 설페이트, 카르복실기, C<sub>3-20</sub> 카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-20</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-20</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>4-20</sub> 알케닐카르복시알케닐, C<sub>6-20</sub> 아릴, C<sub>6-20</sub> 아랄킬, C<sub>6-20</sub> 알카릴, 헤테로원자로서 질소를 포함하는 C<sub>3-20</sub> 헤테로아릴 또는 C<sub>6-20</sub> 아릴카르보닐일 수 있다.

[0080] 상기 화학식 1의 R<sub>1</sub>에서 상기 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, C<sub>6-20</sub> 아릴, C<sub>7-20</sub> 아릴카르복실 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있고; 상기 C<sub>3-10</sub> 사이클로알케닐 또는 헤테로사이클로알케닐은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>2-8</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-8</sub> 알킬카르복실알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, C<sub>6-20</sub> 아릴, C<sub>7-20</sub> 아릴카르복실 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있으며; 상기 아릴은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, 니트로, C<sub>2-8</sub>

알킬카르복실아미노 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있고; 상기 아랄킬은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, 니트로, C<sub>2-8</sub> 알킬카르복실아미노 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있고; 상기 알카릴은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, 니트로, C<sub>2-8</sub> 알킬카르복실아미노 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있으며; 상기 아릴카르보닐은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, 니트로, 또는 C<sub>2-8</sub> 알킬카르복실아미노 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있으며; 상기 헤테로아릴은 히드록시, 할로, C<sub>1-5</sub> 알킬, C<sub>1-5</sub> 알코올, C<sub>1-5</sub> 알콕시, C<sub>2-8</sub> 알콕시알킬, 니트로, C<sub>2-8</sub> 알킬카르복실아미노 또는 이들의 조합에 의해 치환될 수 있다.

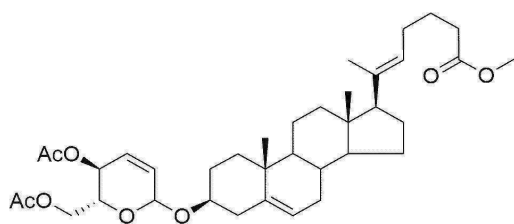
[0082] 상기 화학식 1의 R<sub>21</sub>은 직쇄 또는 분쇄의 C<sub>2-15</sub> 알킬, C<sub>3-10</sub> 사이클로알킬, C<sub>2-15</sub> 알케닐, C<sub>3-10</sub> 사이클로알케닐, C<sub>2-15</sub> 카르복시알킬, C<sub>2-15</sub> 알킬카르복실, C<sub>3-15</sub> 카르복시알케닐, C<sub>2-15</sub> 알케닐카르복실, C<sub>3-15</sub> 알킬카르복시알킬, C<sub>3-15</sub> 알킬카르복시알케닐, C<sub>3-15</sub> 알케닐카르복시알킬, C<sub>2-30</sub> 알케닐카르복시알케닐, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>2-10</sub> 헤테로사이클로알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알킬알킬, C<sub>2-20</sub> 알콕시알킬, C<sub>3-30</sub> 알콕시알콕시알킬, 헤테로원자로서 산소, 황 또는 질소를 포함하는 C<sub>3-10</sub> 헤테로사이클로알케닐, C<sub>1-20</sub> 알코올, C<sub>1-20</sub> 알케놀, C<sub>2-30</sub> 아실, C<sub>1-10</sub> 아미드, C<sub>1-10</sub> 아민 또는 C<sub>2-15</sub> 에스테르일 수 있다.

[0084] 상기 화학식 1의 R<sub>23</sub>은 C<sub>1-5</sub> 알킬이거나 또는 R<sub>21</sub> 및 R<sub>22</sub>과 함께 결합하는 탄소에 대하여 이중결합을 형성할 수 있다.

[0086] 상기 화학식 1의 는 이중결합일 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 예로는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 들 수 있다:

[0089] [화학식 2]



[0090]

[0092] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산, 아인산 등과 같은 무기산류, 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류 등과 같은 무독성 유기산, 트리플루오로아세트산, 아세테이트, 안식향산, 구연산, 젖산, 말레인산, 글루콘산, 메탄설포산, 4-톨루엔설포산, 주석산, 푸마르산 등과 같은 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염의 종류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 만델레이트 등을 포함한다.

[0093] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 유도체를 메탄올, 에탄올, 아세톤, 메틸렌클로라이드, 아세토니트릴 등과 같은 유기용매에 녹이고 유기산 또는 무기산을 가하여 생성된 침전물을 여과, 건조시켜 제조하거나, 용매와 과량의 산을 감압 증류한 후 건조시켜 유기용매 하에서 결정화

시켜서 제조할 수 있다.

- [0094] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0095] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 이의 약학적으로 허용가능한 염뿐만 아니라, 이로부터 제조될 수 있는 용매화물, 광학 이성질체, 수화물 등을 모두 포함한다.
- [0097] 용어 "수화물(hydrate)"은 비공유적 분자간력(non-covalent intermolecular force)에 의해 결합된 화학양론적(stoichiometric) 또는 비화학양론적(non-stoichiometric) 양의 물을 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 수화물은 비공유적 분자간 힘으로 결합되는 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 물을 포함할 수 있다. 상기 수화물은 1당량 이상, 바람직하게는, 1 당량 내지 5당량의 물을 함유할 수 있다. 이러한 수화물은 물 또는 물을 함유하는 용매로부터 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체 또는 이들의 약제학적으로 허용 가능한 염을 결정화시켜 제조될 수 있다.
- [0099] 용어 "용매화물(solvate)"은 비공유적 분자간력에 의해 결합된 화학양론적 또는 비화학양론적 양의 용매를 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 그에 관한 바람직한 용매들로는 휘발성, 비독성, 및/또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들이 있다.
- [0101] 용어 "이성질체(isomer)"는 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 구조적 또는 입체적으로 다른 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미한다. 이러한 이성질체에는 호변이성질체(tautomer) 등의 구조 이성질체와, 비대칭 탄소 중심을 가지는 R 또는 S 이성체, 기하이성질체(트랜스, 시스) 등의 입체 이성질체, 광학 이성질체(enantiomer)가 모두 포함된다. 이들 모든 이성체 및 그것의 혼합물들 역시 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0103] 본 발명에 따른 상기 면역항암 보조제에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 보다 바람직하게는 비경구 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0105] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0107] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 하는 면역항암 보조제는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의한다.
- [0108] 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용

가능한 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0110] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제, 트로키제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염 등과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0112] 상기 면역항암 보조제는 면역항암제의 효능을 증진시킬 수 있으며, 보다 구체적으로, 면역인자를 활성화 시켜 면역항암제의 항암 작용을 보조함으로써 면역항암제의 효능을 증진시킬 수 있다. 상기 면역인자는 도움 T세포(helper T세포), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell), 자연살생세포(NK cell) 및 사이토카인(cytokine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0114] 상기 면역항암 보조제는 면역항암제와 동시적 또는 순차적으로 투여할 수 있고, 순차적으로 투여할 시에는 면역항암 보조제 투입 후 면역항암제를 투입할 수 있고, 면역항암제 투입 후 면역항암 보조제를 투입할 수도 있다. 다만 상기 투여방법은 일례일 뿐, 면역항암효과를 증진시킬 수 있도록 투여방식은 변경될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 매일 정맥주사로 면역항암 보조제를 투여하고, 1주에 3회 복강 내 정맥주사로 면역항암제를 투여하였으나, 이 또한 일례일 뿐, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0116] 상기 면역항암 보조제는 도움 T세포(helper T세포), 세포독성 T세포(cytotoxic T cell), 자연살생세포(NK cell) 및 사이토카인(cytokine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 면역 인자들을 활성화시킬 수 있다. 상기 면역인자를 활성화시킴으로써, 면역항암제의 항암효과를 향상시키는 효과를 나타낸다

[0118] 이때, 상기 면역항암 보조제는 면역항암제와 병용투여되어 암을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0120] 상기 암은 가성점액종, 간내 담도암, 간모세포종, 간암, 갑상선암, 결장암, 고환암, 골수이형성증후군, 교모세포종, 구강암, 구순암, 균상식육종, 급성골수성백혈병, 급성림프구성백혈병, 기저세포암, 난소상피암, 난소생식세포암, 남성유방암, 뇌암, 뇌하수체선종, 다발성골수종, 담낭암, 담도암, 대장암, 만성골수성백혈병, 만성림프구성백혈병, 망막모세포종, 맥락막흑색종, 바터팡대부암, 방광암, 복막암, 부갑상선암, 부신암, 비부비동암, 비소세포폐암, 설암, 성상세포종, 소세포폐암, 소아뇌암, 소아림프종, 소아백혈병, 소장암, 수막종, 식도암, 신경교종, 신우암, 신장암, 심장암, 십이지장암, 악성 연부조직 암, 악성골암, 악성림프종, 악성중피종, 악성흑색종, 안암, 외음부암, 요관암, 요도암, 원발부위불명암, 위림프종, 위암, 위유암종, 위장관간질암, 윌름스암, 유방암, 삼중음성유방암, 육종, 음경암, 인두암, 임신용모질환, 자궁경부암, 자궁내막암, 자궁육종, 전립선암, 전이성 골암, 전이성뇌암, 종격동암, 직장암, 직장유암종, 질암, 척수암, 청신경초종, 췌장암, 침샘암, 카포시육종, 파제트병, 편도암, 편평상피세포암, 폐선암, 폐암, 폐편평상피세포암, 피부암, 항문암, 횡문근육종, 후두암, 흉막암, 혈액암 및 흉선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0122] 상기 면역항암 보조제는 통상적으로 알려지고, 당업자에게 널리 알려진 면역항암제라면 한정되지 않고 함께 병용투여될 수 있으며, 일례로는, anti-PD1, anti-PDL1, anti-CTLA4, anti-LAG3, anti-VISTA, anti-BTLA, anti-TIM3, anti-HVEM, anti-CD27, anti-CD137, anti-OX40, anti-CD28, anti-PDL2, anti-GITR, anti-ICOS, anti-SIRP α, anti-ILT2, anti-ILT3, anti-ILT4, anti-ILT5, anti-EGFR, anti-CD19 및 anti-TIGIT로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 면역항암제와 병용투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0124] 본 발명의 다른 측면은, 면역항암용 병용제제를 제공한다.

[0125] 구체적으로, 면역항암제 및 상기 면역항암 보조제를 포함하는 면역항암용 병용제제를 제공한다.

[0127] 상기 면역항암제, 면역항암 보조제 및 병용에 대한 구체적인 설명은 상기 면역항암 보조제의 구체적인 설명과 동일하다.

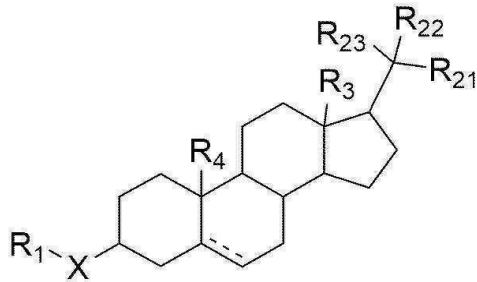
[0129] 본 발명의 다른 측면은, 면역항암제 효능 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0130] 구체적으로, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적



으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역항암제 효능 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0131] [화학식 1]



[0132]

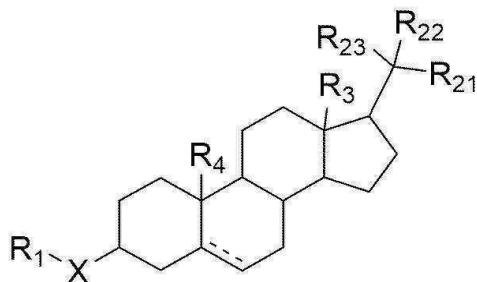
[0133] 상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub> 및 X에 대한 정의는 상기의 면역항암 보조제에서의 화학식 1에 대한 구체적인 설명과 동일하다.

[0135] 아울러, 상기 면역항암제 효능 증진용 약학적 조성물의 구체적인 설명은 상기 면역항암 보조제의 구체적인 설명과 동일하다.

[0137] 본 발명의 다른 측면은, 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0138] 구체적으로, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 이성질체, 이의 용매화물, 이의 수화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0139] [화학식 1]



[0140]

[0141] 상기 화학식 1에서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub> 및 X에 대한 정의는 상기의 면역항암 보조제에서의 화학식 1에 대한 구체적인 설명과 동일하다.

[0143] 아울러, 상기 면역 증강용 약학적 조성물의 구체적인 설명은 상기 면역항암 보조제의 구체적인 설명과 동일하다.

[0145] 본 발명의 다른 측면은, 면역항암 보조제 및 면역항암제를 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0146] 상기 면역항암 보조제 또는 면역항암제는 병용 투여 또는 이시 투여 모두 가능하다.

[0147] 본 발명의 다른 측면은, 암의 예방 또는 치료에 있어서의, 면역항암 보조제 및 면역항암제의 용도를 제공한다.

[0149] 본 발명의 다른 측면은, 면역항암 보조제 및 면역항암제를 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료를 위한 병용요법을 제공한다.

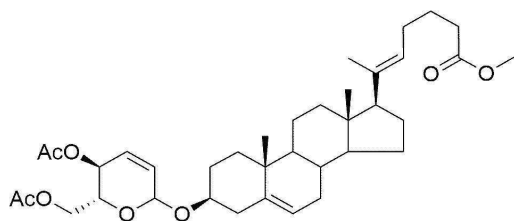
[0151] 본 발명의 다른 측면은, 면역항암 보조제 및 면역항암제를 유효성분으로 함유하는 항암치료용 키트를 제공한다.

[0153] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다.

[0154] 단, 후술하는 실시예 및 실험예는 본 발명을 일 측면에서 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

[0156] <실시예 1> 면역항암 보조제의 준비(SAC-1004)

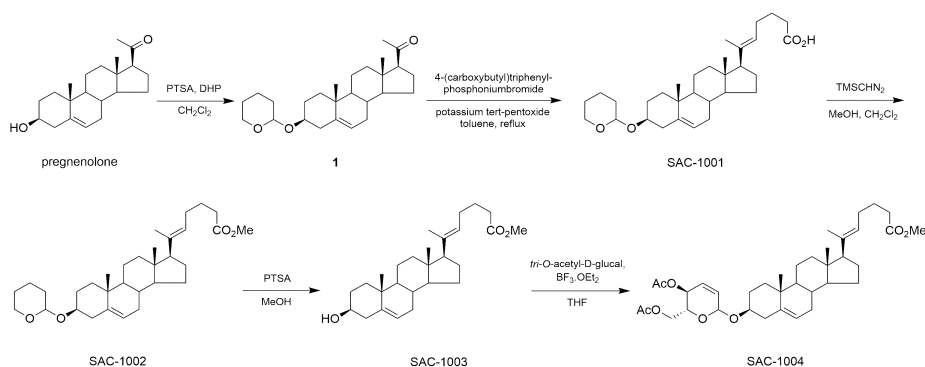
[0157] [화학식 2]



[0158]

[0159] 상기 화학식 2로 표시되는 본 발명의 면역항암제와의 병용 투여용 약학적 조성물인 SAC-1004 화합물을 대한민국 공개특허 10-2011-0047170에 근거하여, 하기 반응식 1에 따라 제조하였다.

[0161] [반응식 1]



[0162]

[0163] SAC-1003 13.4 mg을 테트라히드로퓨란 1 mL에 녹인 뒤, 아르곤 기류 하에서 트리-O-아세틸-D-글루칼(Aldrich) 26 mg과 보론티리플로리드·디에틸에테레이트(Aldrich) 0.012 mL을 가하고, 0℃에서 10시간 교반하였다. 상기 반응액을 실온으로 온도를 올려준 뒤, 디에틸에테르 5 mL을 첨가하여 희석하고, 탄산수소나트륨 수용액으로 세척한 뒤, 황산나트륨으로 건조 및 여과하였다. 여액을 감압 농축한 후, 잔사를 에틸아세테이트/헥산(1:10)의 혼합용출액으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 목적화합물 SAC-1004(11mg, 56%)을 얻었다: <sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.89-5.80 (m, 2H), 5.37-5.27 (m, 2H), 5.17-5.14 (m, 2H), 4.23-4.16 (m, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.56 (m, 1H), 2.38-2.28 (m, 4H), 2.17-0.53 (m, 37H).

[0166] <실험방법>

[0167] 1. 실험 동물 모델의 준비

[0168] C57BL/6 7주령 수컷 마우스에 MC-38 대장암세포 5x10<sup>5</sup>(cells)를 피하에 주입하였다. 상기 대장암세포를 주입한 지 7일이 경과한 후에 피하 MC-38 종양의 평균 종양 용적이 약 40 mm<sup>3</sup>로 되었다. 상기과 같은 마우스 종양 투여 방식은 하기의 4개의 군에 대해 모두 동일하게 적용되며, 이후 vehicle을 투여한 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독 투여군 및 anti-PD1 단독 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다.

[0169] 도 1a는 실험 동물 모델의 준비 및 희생까지의 절차를 나타낸 개략도이다.

[0171] 구체적인 투여방식은 매일 정맥주사로 혈관 누수 억제제인 SAC-1004를 DMSO in PBS에 녹여서 마우스마당 체중 1kg당 1mg을 투여하고, 1주에 3회 복강주사로 면역 관문 억제제인 anti-PD1를 rat igG2a 200 ng과 함께 마우스당 200 ng씩 투여하였다. 상기과 같은 방법으로 각 군에 따라 SAC-1004와 anti-PD1을 7일간 투여하고, 8일째 되는 날에 종양 및 비장을 적출하였다.

[0173] 2. RNA 분리, cDNA 합성 및 PCR 분석

[0174] 적출한 종양조직에 트리졸 시약을 이용하여 전체 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA는 나노-드롭(ND-1000, Thermo scientific)을 이용해 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 구한 후, RNA 2 μg를 포함하고 전체 부피가 20 μl가 되게 하여 cDNA를 합성하였다.

[0176] 3. 마우스 종양 유세포 분석 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

- [0177] 종양조직에서 콜라겐분해효소를 사용하여 세포를 분리한 후, 세포에 배지를 첨가하여 원심분리하고 침전된 세포를 모아 카운팅한다. 살아있는 세포를 37℃에서 약 30분간 염색하였다. 살아있는 세포만 염색이 되며 PBS로 3회 반복해서 세척한다. 라이브/데드 염색을 통하여 보정을 진행한다. 또한, 칸토를 사용하여 FACS를 진행하였다. 이를 통하여 T세포의 활성비율을 비교할 수 있다.
- [0178] T세포는 적응면역반응에 관여되며 도움 T세포(helper T cell)인 CD4<sup>+</sup>T세포와 세포독성 T세포(cytotoxic T cell)인 CD8<sup>+</sup>T세포로 나눌 수 있고, CD4<sup>+</sup>T세포에서 유래되지만 세포독성 T세포를 억제하는 조절 T세포(Treg cell, regulatory T cell)로 나누어진다. 또한 선천면역반응에 관여되는 세포독성적인 특성을 가진 자연살생세포(NK cell, natural killer cell)이 있어, 각 군별로 상기 세포들의 수준을 측정하였다.
- [0179] 마커(marker)로는 도움 T세포인 CD4<sup>+</sup>T 세포를 측정하기 위해 CD4 항체가 사용되었고, 세포독성 T세포인 CD8<sup>+</sup>T 세포를 측정하기 위해 CD8 항체가 사용되었다. 또한 조절 T세포를 측정하기 위해 CD25 항체 및 Foxp<sup>3</sup> 항체가 사용되었고, 자연살생세포를 측정하기 위해 NK1.1 항체가 사용되었다.
- [0181] **4. IHC 염색**
- [0182] 종양조직을 바로 꺼낸 뒤 4% PFA에서 O/N 인큐베이션(4℃ 보관)하고 15 % 내지 30 % 수크로스에서 순차적으로 종양조직을 담그어 가라앉힌 다음, 드라이아이스에서 OCT 샘플링을 진행하였다. 섹션 20μm로 진행한 후 각각의 1차 항체, 2차 항체를 사용하여 염색을 진행하였다.
- [0184] **5. T세포의 기능 분석**
- [0185] T세포의 기능은 크게 두 가지로 측정되는데, 한 가지 방식은 사이토카인 생산능력 분석으로 T세포에서 전염증성 사이토카인에 해당되는 IFN $\gamma$ 나 TNF $\alpha$  등의 분비를 측정하는 것이고, 다른 방식은 세포독성을 측정하는 방법으로 종양세포를 직접 라이제이션(ligation)하여 종양세포 내에 퍼포린(perforin)이나 그랜자임B(GranzymeB) 등을 넣어서 사멸시키는 것들이 있다.
- [0187] **<실험예 1> MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여에 따른 마우스의 종양크기 변화 분석**
- [0188] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 종양크기 변화를 분석하였다.
- [0189] 도 1b는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양크기 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0190] 도 2a는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 후에, 종양 및 비장을 적출하기 전의 마우스 사진이다.
- [0191] 도 2c는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 후, 마우스에서 적출한 종양의 사진이다.
- [0192] 구체적으로, 대조군에 비해 anti-PD1 단독투여군 및 SAC-1004 단독투여군에서 종양의 크기가 감소하였고, 상기 단독투여군들에 비해 SAC-1004 및 anti-PD1을 병용투여한 그룹에서 종양의 크기가 감소하였다. 이는 양방향 ANOVA를 사용하여 통계적 수치로 입증되었다.
- [0193] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 암의 예방 또는 치료효과가 현저하게 상승하는 것을 입증한다.
- [0195] **<실험예 2> MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여에 따른 마우스의 생존율 분석**
- [0196] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 생존율을 분석하였다.
- [0197] 도 1c는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 함에 따른 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이다.
- [0198] 구체적으로, 대조군 및 SAC-1004 단독투여군에 비해 anti-PD1 단독투여군에서의 약물투여에 따른 마우스의 생존율이 더 높았고, anti-PD1 단독투여군에 비해서 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군의 상기 생존율이 높았다. 이는 양방향 ANOVA를 사용하여 통계적 수치로 입증되었다.
- [0199] 상기 결과는, 상기 실험예 1의 종양크기 변화 분석 결과와 같이, SAC-1004 및 면역항암제를 단독투여할 때보다 병용투여할 때에 암의 예방 또는 치료효과가 현저하게 상승함을 입증한다.
- [0201] **<실험예 3> MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 몸무게 변화 분석**



- [0202] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 한 마우스의 몸무게 변화를 분석하였다.
- [0203] 도 2d는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 몸무게 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0204] 구체적으로, 모든 군에서 비슷한 몸무게가 측정되었으므로, 약물을 장기간 투여해도 마우스에서 이상이 나타나지 않는다.
- [0205] 상기 결과는, 본 발명에 따른 병용 투여용 약학적 조성물은 단독 또는 병용투여하여도 생체 내에서 부작용을 유발하지 않고, 안전성이 확보된 물질임을 입증한다.
- [0207] <실험예 4> MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 비장크기 및 무게비교
- [0208] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 한 마우스의 비장 크기를 분석하였다.
- [0209] 도 2b는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스에서 적출한 비장의 사진이다.
- [0210] 도 2f는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 비장무게 변화를 나타낸 그래프이다.
- [0211] 구체적으로, 대조군에 비해 SAC-1004 단독투여군의 비장무게가 높고, SAC-1004 단독투여군보다 anti-PD1 단독투여군의 비장무게가 높으며, anti-PD1 단독투여군보다 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군의 비장무게가 더 높다. 그런데, 이는 편도 ANOVA를 사용하였을 때, 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0212] 상기 결과는, 본 발명에 따른 병용투여용 약학적 조성물은 단독 또는 병용투여하여도 생체 내에서 부작용을 유발하지 않고, 안전성이 확보된 물질임을 입증한다.
- [0214] <실험예 5> MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양무게 비교
- [0215] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 한 마우스의 종양무게를 분석하였다.
- [0216] 도 2e는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양무게를 나타낸 그래프이다.
- [0218] 구체적으로, 대조군에 비해 anti-PD1 단독투여군의 종양무게가 낮았고, anti-PD1 단독투여군보다 SAC-1004 단독투여군의 종양무게가 더 낮았으며, SAC-1004 단독투여군보다 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군의 종양무게가 더 낮았다. 이는 편도 ANOVA를 사용하여 통계적 수치로도 입증하였다.
- [0219] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 암의 예방 또는 치료효과가 현저하게 상승하는 것을 입증한다.
- [0221] <실험예 6> 마우스의 종양에 대한 FACS 분석
- [0222] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 한 마우스의 종양에 대해, 각 약물투여군에서 T세포의 활성비율을 비교하기 위한 FACS(Fluorescence activated cell sorting) 분석을 하였다.
- [0223] 도움 T세포인 CD4<sup>+</sup>T세포를 측정하기 위해 CD4 항체가 사용되었고, 세포독성 T세포인 CD8<sup>+</sup>T세포를 측정하기 위해 CD8 항체가 사용되었다. 또한 조절T세포를 측정하기 위해 CD25 항체와 Foxp<sup>3</sup> 항체가 사용되었고, 자연살생세포를 측정하기 위해 NK1.1 항체가 사용되었다.
- [0224] 도 3a-3c는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양에 대해 FACS 분석을 한 결과이다.
- [0225] 도 3d는 CD45.2<sup>+</sup> 마커를 통해 각 약물투여군에서 면역 인자들의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0226] 도 3e는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0227] 도 3f는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0228] 도 3g는 각 약물투여군에서 자연살생세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0229] 도 3h는 각 약물투여군에서 조절T세포의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0230] 구체적으로, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 도움 T세포뿐만 아니라 세포독성 T세포의 수준이 상당히 높

았고, 자연살생세포의 수준도 높았으며, 세포독성 T세포를 억제하는 조절 T세포의 수준은 감소되었다. 이는 편도 ANOVA를 통해 통계적 수치로 입증되었다.

[0231] 따라서, SAC-1004 및 면역항암제를 단독투여할 때보다 병용투여할 때 T세포들을 활성화시키는 효과가 더 크다.

[0232] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 면역 관련 인자인 T세포를 활성화시키는 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역 인자를 활성화 시킴으로써, 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0234] <실험예 7> 마우스의 종양 내 면역인자들의 증식능력 분석

[0235] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양 내 면역인자들의 증식능력을 분석하였는데, 증식능력을 측정하기 위해 증식마커인 Ki67를 사용하였다.

[0236] 도 4a는 각 약물투여군에서  $CD4^{+}$  T세포의 증식능력을 전체%로 나타낸 그래프이다.

[0237] 도 4b는 각 약물투여군에서  $CD8^{+}$  T세포의 증식능력을 전체%로 나타낸 그래프이다.

[0238] 도 4c는 각 약물투여군에서 자연살생세포의 증식능력을 전체%로 나타낸 그래프이다.

[0239] 도 4d는 각 약물투여군에서  $CD4^{+}$  T세포의 증식능력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 나타낸 그래프이다.

[0240] 도 4e는 각 약물투여군에서  $CD8^{+}$  T세포의 증식능력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 나타낸 그래프이다.

[0241] 도 4f는 각 약물투여군에서 자연살생세포의 증식능력을 MFI(mean fluorescence intensity)로 나타낸 그래프이다.

[0242] 구체적으로, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 도움 T세포, 세포독성 T세포, 자연살생세포의 증식능력이 다른 군들에 비해 높았다.

[0243] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 면역 관련 인자의 증식능력을 향상시키는 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역 인자를 활성화시킴으로써, 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

[0245] <실험예 8> 마우스의 종양 내 T세포의 세포독성 분석

[0246] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양 내 T세포의 세포독성을 분석하였다.

[0247] 세포독성을 측정하기 위해 자연살생세포의 탈과립과  $CD8^{+}$  T세포의 활성화에 관여하는 CD107a를 마커로 사용하였고, T세포를 활성화시키기 위해 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리하였다. 펩티드를 처리한 군은 종양에서 발현하는 펩티드를 생체 외 상태에서 넣어준 것이고, PMA/아이오노마이신을 처리한 군은 T세포 칼슘 신호를 자극시켜 모든 T세포를 활성화시키는 것이라 차이가 있다.

[0248] 도 5a는 각 약물투여군에서  $CD4^{+}$  T세포 내 CD107a의 수준을 나타낸 그래프이다.

[0249] 도 5b는 각 약물투여군에서  $CD8^{+}$  T세포 내 CD107a의 수준을 나타낸 그래프이다.

[0250] 구체적으로, 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리하지 않은 군은 T세포 내 CD107a의 수준이 적었고, 펩티드보다 PMA/아이오노마이신을 처리한 군이 T세포 내 CD107a의 수준이 높았다. 특히 PMA/아이오노마이신을 처리한 경우, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서  $CD8^{+}$  T세포 내 CD107a의 수준이 높았다.

[0251] 상기 결과는, 상대적으로  $CD8^{+}$  T세포에서 활성화가 증가하였지만 모든 그룹에서 유의하지는 않았으며, SAC-1004 및 면역항암제를 단독투여할 때보다 병용투여할 때 T세포를 활성화시켜 암세포를 사멸시키는 세포독성 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역항암제와 병용투여함으로써, 항암효과를 증대시키는 역할을 수행함을 알 수 있다.

- [0253] <실험예 9> 마우스의 종양 내 T세포의 사이토카인 생성능력 분석
- [0254] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양 내 T세포의 사이토카인 생성능력을 분석하였다.
- [0256] (9-1)
- [0257] 사이토카인 생성능력을 측정하기 위해 전염증성 사이토카인의 정도를 비교할 수 있고, 전염증성 사이토카인 마커인 TNF  $\alpha$ 를 이용할 수 있다. 상기 실험예 8과 같이, T세포를 활성화시키기 위해 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리한 후 TNF  $\alpha$ 의 수준을 측정하였다.
- [0258] 도 6a는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포 내 TNF  $\alpha$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0259] 도 6b는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포 내 TNF  $\alpha$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0260] 구체적으로, 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리하지 않은 경우 각 약물투여군에서 TNF  $\alpha$ 의 수준 차이가 적었으나, 펩티드를 처리한 경우 및 PMA/아이오노마이신을 처리한 경우는 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 TNF  $\alpha$ 의 수준이 상당히 증가했다.
- [0261] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 면역 관련 인자인 T세포를 활성화시키는 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역 인자를 활성화 시킴으로써, 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0263] (9-2)
- [0264] IFN  $\gamma$ 도 또한, 전염증성 사이토카인 마커이다. 마찬가지로 T세포를 활성화시키기 위해 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리한 후 IFN  $\gamma$ 의 수준을 측정하였다.
- [0265] 도 7a는 각 약물투여군에서 CD4<sup>+</sup>T세포 내 IFN  $\gamma$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0266] 도 7b는 각 약물투여군에서 CD8<sup>+</sup>T세포 내 IFN  $\gamma$ 의 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0267] 구체적으로, CD8<sup>+</sup>T세포에서 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리하지 않은 경우는 각 약물투여군에서 IFN  $\gamma$ 의 수준 차이가 적었으나, 펩티드를 처리한 경우 및 PMA/아이오노마이신을 처리한 경우는 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 IFN  $\gamma$ 의 수준이 상당히 증가했다.
- [0268] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 면역 관련 인자인 T세포를 활성화시키는 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역 인자를 활성화시킴으로써, 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0270] <실험예 10> 마우스의 비장 내 T세포의 사이토카인 생성능력 분석
- [0271] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 비장 내 T세포의 기능을 비교하기 위해 CD107a, TNF  $\alpha$  및 IFN  $\gamma$  마커를 사용하여 FACS 분석, 세포독성 분석, 사이토카인 생성능력 분석을 수행하였다. 또한, 상기 실험예 8 및 실험예 9와 같이 T세포를 활성화시키기 위해 펩티드 및 PMA/아이오노마이신을 처리하였다.
- [0272] 도 8a-8b는 MC38 대장암세포주 주입 및 약물투여를 한 마우스의 종양에 대해 FACS 분석을 한 결과이다.
- [0273] 도 8c는 각 약물투여군에서 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포의 CD107a 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0274] 도 8d는 각 약물투여군에서 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포의 TNF  $\alpha$  수준을 나타낸 그래프이다.
- [0275] 도 8e는 각 약물투여군에서 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포의 IFN  $\gamma$  수준을 나타낸 그래프이다.
- [0276] 도 8f는 각 약물투여군에서 비장 내 CD8<sup>+</sup>T세포의 CD107a 수준을 나타낸 그래프이다.
- [0277] 도 8g는 각 약물투여군에서 비장 내 CD8<sup>+</sup>T세포의 TNF  $\alpha$  수준을 나타낸 그래프이다.

- [0278] 도 8h는 각 약물투여군에서 비장 내 CD8<sup>+</sup>T세포의 IFN  $\gamma$  수준을 나타낸 그래프이다.
- [0279] 구체적으로, 비장 내 CD4<sup>+</sup>T세포와 CD8<sup>+</sup>T세포에서 PMA/아이오노마이신을 처리하여 T세포를 활성화시킨 경우에 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 CD107a, TNF  $\alpha$  및 IFN  $\gamma$ 의 수준이 증가되었다.
- [0280] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 암세포를 사멸시키는 세포독성 효과가 우수함을 나타내고, 면역 관련 인자인 T세포를 활성화시키는 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역 인자를 활성화시킴으로써, 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0282] **<실험예 11> 마우스의 종양 내 접착 결합의 발현 분석**
- [0283] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 7일간 SAC-1004를 매일 투여한 후에 anti-PD1을 1주간 3회 투여함으로써 14일간 약물투여한 것을 제외하고는 상기 실험 동물 모델에서 상술한 바와 같이 처리한 후, 마우스의 종양 내 접착 결합의 발현을 분석하였다.
- [0284] 도 9a는 각 약물투여군에서 종양 내 접착 결합의 발현 수준을 나타낸 형광발광 사진이다.
- [0285] 도 9b는 각 약물투여군에서 종양 내 접착 결합의 발현 수준을 형광발광 밀도로 나타낸 그래프이다.
- [0286] 구체적으로, 도 9a는 IHC염색 실험을 진행한 것으로서, DAPI(다피)는 핵을 염색하기 위해 사용되었고, CD31은 혈관을 염색하기 위해 사용되었으며, 접착 단백질인 VE-카드헤린(VE-cadherin)은 부착연접(adherent junction)을 보기 위해 사용되었다. 이 때, VE-카드헤린이 잘 발현되면 약물전달이 잘 되어 항암효과가 증가된다는 것이고, 또한 내피세포 사이가 접합이 잘 되어 혈관이 안정화되고 T세포가 종양으로 잘 침투하는 것이다.
- [0287] 도 9a 및 도 9b에 나타난 바와 같이, 대조군과 anti-PD1 단독투여군보다 SAC-1004 단독투여군에서 종양 내 VE-카드헤린의 비율이 증가했고, SAC-1004 단독투여군보다 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 종양 내 VE-카드헤린이 잘 발현되었다.
- [0288] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때 면역항암제 전달이 잘 되고, T세포가 종양으로 잘 침투하여, 항암 효과가 증가되는 것임을 나타내고, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0290] **<실험예 12> 마우스의 종양 내 PDL1의 발현 분석**
- [0291] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양 내 PDL1(programmed death-ligand 1)의 발현을 분석하였다. PDL1은 종양에서 발현되는 리간드이고, CD3는 T세포 마커로 사용된다.
- [0292] 도 10은 각 약물투여군에서 PDL1 및 CD3의 발현 수준을 나타낸 형광발광 사진이다.
- [0293] 구체적으로, 도 10은 IHC염색 실험을 진행한 것으로서, PDL1이 증가한 것은 anti-PD1이 잘 전달되어 면역활성화가 일어났다는 것을 의미하는데, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군이 anti-PD1 단독투여군보다 PDL1 및 CD3의 발현 수준이 높다.
- [0294] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때 면역항암제 전달이 잘 되고, 면역활성화가 잘 일어나서, 항암 효과가 증가되는 것임을 나타내고, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0296] **<실험예 13> 마우스의 종양 내 사이토카인 발현수준 분석**
- [0297] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 상술한대로 7일간 약물투여를 함에 따른 마우스의 종양 내 사이토카인의 발현정도를 분석하였다. 사이토카인 마커로 전염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인을 사용하였고 RT-PCR을 수행하였다.
- [0298] 도 11a는 각 약물투여군에서 전염증성 사이토카인과 항염증성 사이토카인들의 발현에 대해 RT-PCR을 수행한 사진이다.

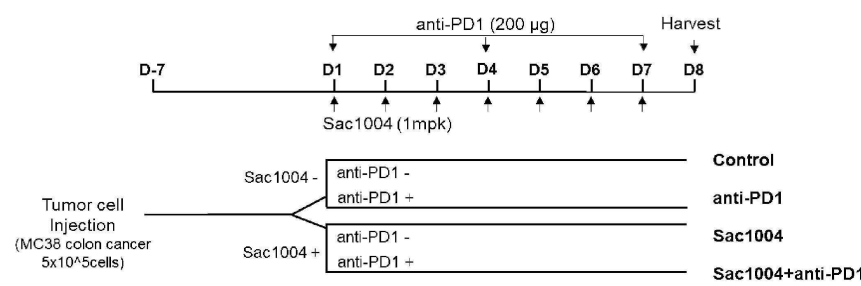
- [0299] 도 11b는 각 약물투여군에서 CXCL9, iNOS 및 Gapdh의 발현에 대해 RT-PCR을 수행한 사진이다.
- [0300] 도 11c는 각 군별로 RT-PCR을 통해 mRNA 발현 수준을 그래프로 나타낸 사진이다.
- [0301] 구체적으로, 전염증성 사이토카인 중 Ifny가 anti-PD1을 투여한 군에서 증가하였고, anti-PD1을 투여한 군보다 SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군에서 더 증가한다.
- [0302] 상기 결과는, SAC-1004 및 면역항암제를 각각 단독으로 투여할 때보다 병용투여할 때에 면역 관련 인자인 T세포를 활성화시키는 효과가 우수함을 나타내며, 이로부터, 본 발명의 병용투여용 약학적 조성물은 면역 인자를 활성화 시킴으로써, 면역항암제의 항암 효과를 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.
- [0304] **<실험예 14> MC38 대장암 세포주가 자라는 시기와 약물을 주입하는 시기에 CD4/8<sup>+</sup>T, NK 세포 제거 후 약물투여에 따른 마우스의 생존율 분석**
- [0305] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 상기 실험 동물 모델에서 CD4/8<sup>+</sup>T, NK 제거(depletion)를 진행한 후 상술한대로 7일간 약물투여를 하여 유세포 분석(flow cytometry)을 통해 마우스의 생존율을 분석하였다.
- [0306] 도 12a는 CD4/8<sup>+</sup>T, NK 제거, MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여에 따른 절차를 나타낸 개략도이다.
- [0307] 도 12b는 MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8<sup>+</sup>T, NK 제거에 따른 결과를 유세포 분석을 통해 확인하였고, 면역세포의 제거가 원활히 진행되었음을 확인한 도이다.
- [0308] 도 12c는 MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8<sup>+</sup>T, NK 제거에 따른 마우스의 생존율을 나타낸 것으로, CD8<sup>+</sup> T 세포를 제거한 실험군 마우스의 경우 가장 생존율이 낮은 것을 확인한 도이다.
- [0309] 도 12d는 상기 도 12c와 동일한 과정을 나타낸 것으로, MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8<sup>+</sup>T 제거에 따른 종양의 성장율을 시간에 따라 나타낸 것으로, CD8<sup>+</sup> T 세포를 제거한 실험군 마우스의 경우 종양 성장율이 가장 큰 것을 확인한 도이다.
- [0310] 도 12e는 MC38 대장암 세포주 주입 및 약물투여 후 CD4/8<sup>+</sup>T, NK 제거에 따른 종양의 크기를 각 실험군마다 비교한 것으로, CD8<sup>+</sup> T 세포를 제거한 실험군 마우스의 경우 종양 크기가 가장 큰 것을 확인한 도이다.
- [0311] 상기 결과를 통해 CD8<sup>+</sup> T 세포를 제거한 경우 가장 큰 종양 성장율을 보여주었고, 그 다음으로 NK 세포와 CD4<sup>+</sup> T 세포를 제거한 실험군이 큰 종양 성장율을 보여주었다. 이는 SAC-1004와 anti-PD1의 병합투여가 CD8<sup>+</sup> T 세포에 의존적으로 유도되는 과정임을 제시한다.
- [0313] **<실험예 15> 장기간 약물 투여에 따른 결과 분석**
- [0314] 대조군, SAC-1004 및 anti-PD1 병용투여군, SAC-1004 단독투여군 및 anti-PD1 단독 투여군으로 이루어진 총 4개의 군에, 장기간 약물을 주입하여 생존율을 분석하였다.
- [0315] 도 13a는 MC38 대장암 세포주 주입 및 장기간 약물투여의 절차를 나타낸 개략도이다.
- [0316] 도 13b는 MC38 대장암 세포주 주입 및 장기간 약물투여에 따른 마우스의 생존율을 나타낸 그래프이다.
- [0317] 도 13c는 MC38 대장암 세포주 주입 및 장기간 약물투여에 따른 마우스의 종양 크기를 나타낸 그래프이다.
- [0318] 장기간 약물을 처리하여도 동일한 결과를 지속적으로 보여줌에 따라 위 실험 과정에 신뢰도를 증가시켰고, 오랜 약물투여임에도 불구하고 약물 독성이 없음을 증명하였다.
- [0320] **<제제예 1> 산제의 제조**
- [0321] 화학식 1로 표시되는 화합물 2g
- [0322] 유당 1g
- [0323] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0325] **<제제예 2> 정제의 제조**



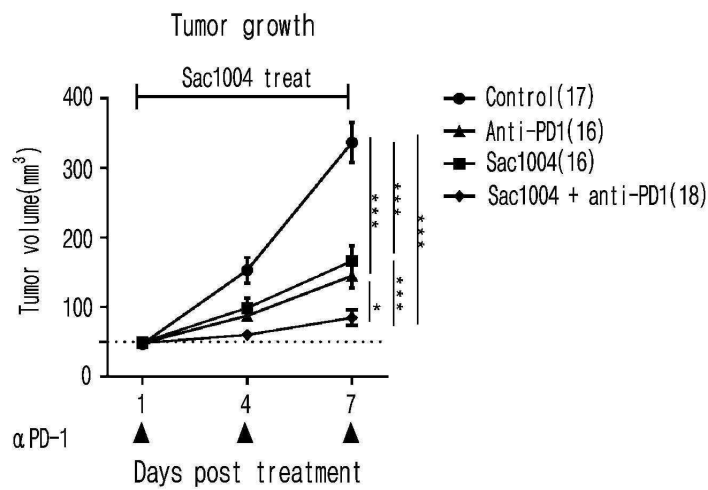
[0326]	화학식 1로 표시되는 화합물	100 mg
[0327]	옥수수전분	100 mg
[0328]	유당	100 mg
[0329]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0330]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.	
[0332]	<b>&lt;제제예 3&gt; 캡슐제의 제조</b>	
[0333]	화학식 1로 표시되는 화합물	100 mg
[0334]	옥수수전분	100 mg
[0335]	유당	100 mg
[0336]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0337]	상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.	
[0339]	<b>&lt;제제예 4&gt; 주사제의 제조</b>	
[0340]	화학식 1로 표시되는 화합물	100 mg
[0341]	만니톨	180 mg
[0342]	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	26 mg
[0343]	증류수	2974 mg
[0344]	통상적인 주사제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 주사제를 제조하였다.	
[0346]	<b>&lt;제제예 5&gt; 연고제의 제조</b>	
[0347]	화학식 1로 표시되는 화합물	5 g
[0348]	세틸팔미테이트	20 g
[0349]	세탄올	40 g
[0350]	스테아릴알콜	40 g
[0351]	미리스타이소프로필	80 g
[0352]	폴리솔베이트	60 g
[0353]	파라옥시안식향산 프로필	1 g
[0354]	파라옥시안식향산 메틸	1 g
[0355]	인산 및 정제수	적량
[0356]	통상적인 연고제의 제조방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 함유시켜 연고제를 제조하였다.	

도면

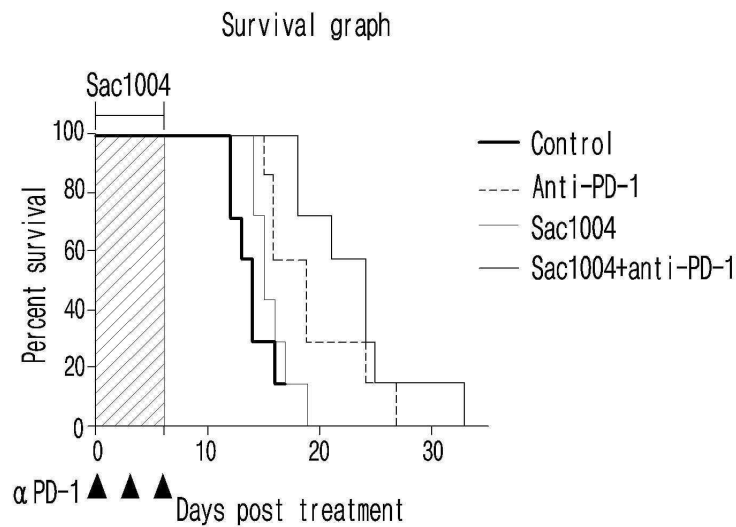
도면1a



도면1b



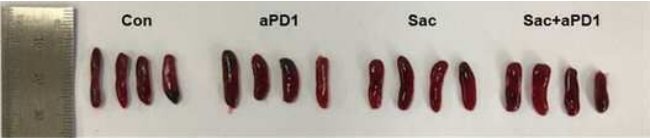
도면1c



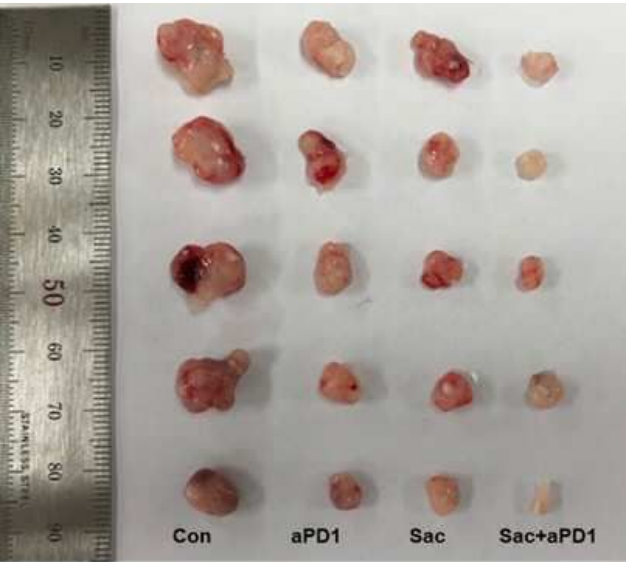
도면2a



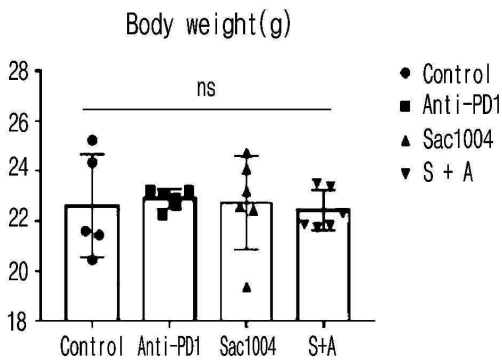
도면2b



도면2c

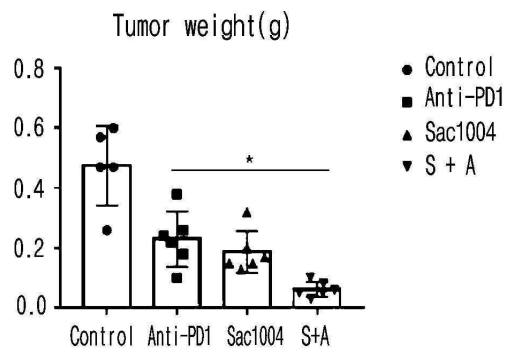


도면2d

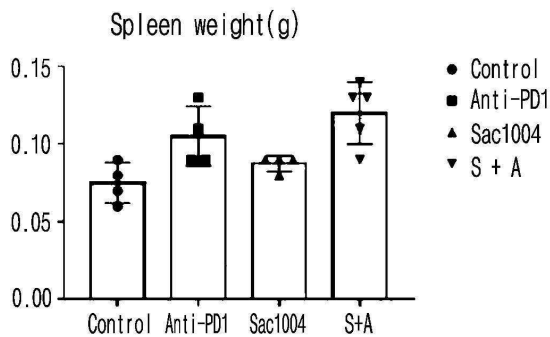




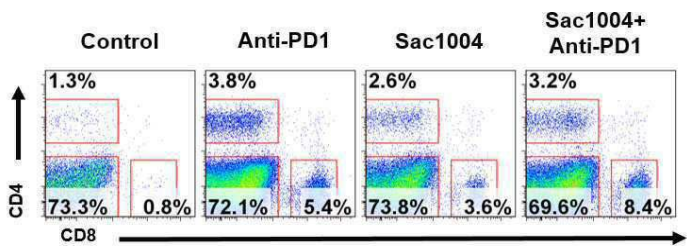
도면2e



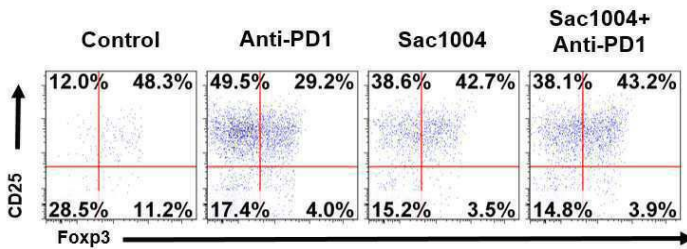
도면2f



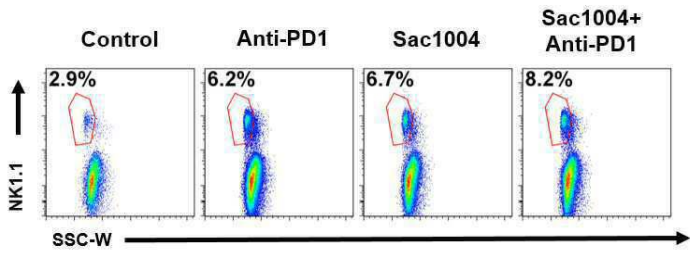
도면3a



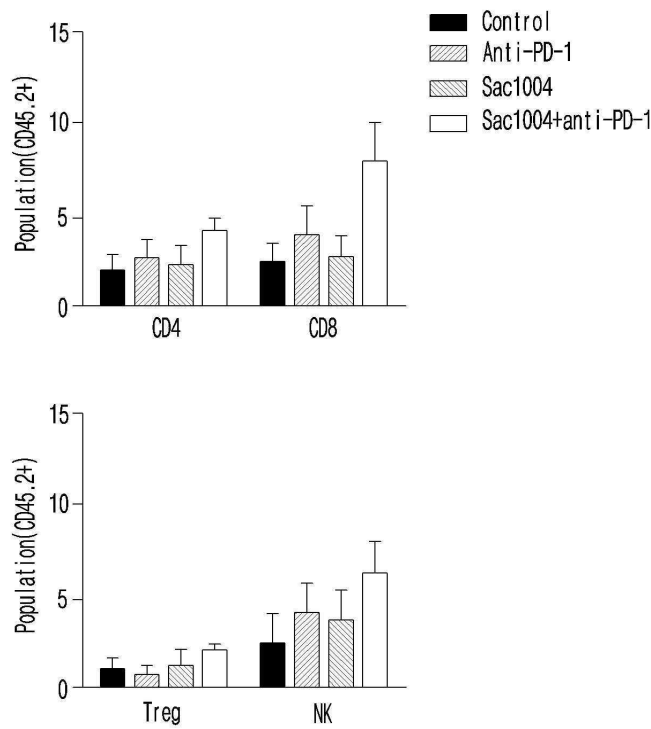
도면3b



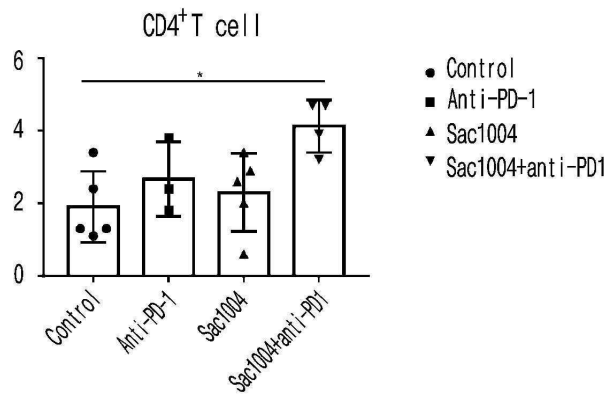
도면3c



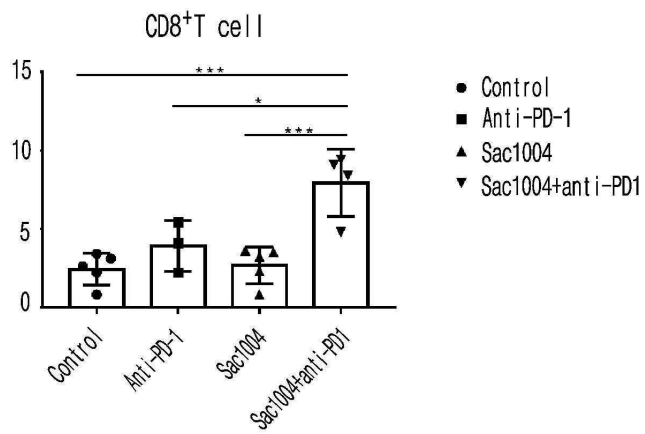
도면3d



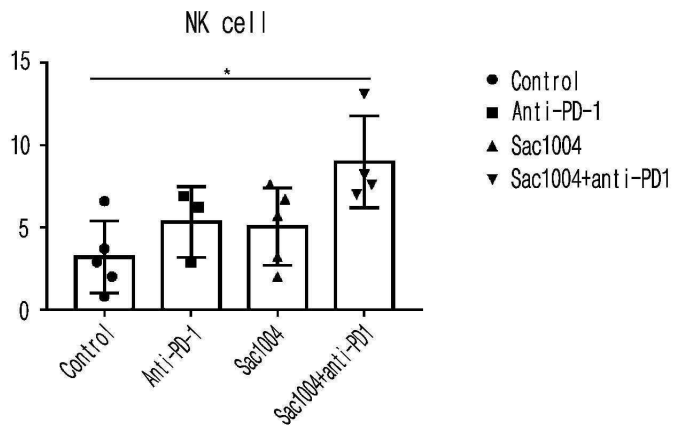
도면3e



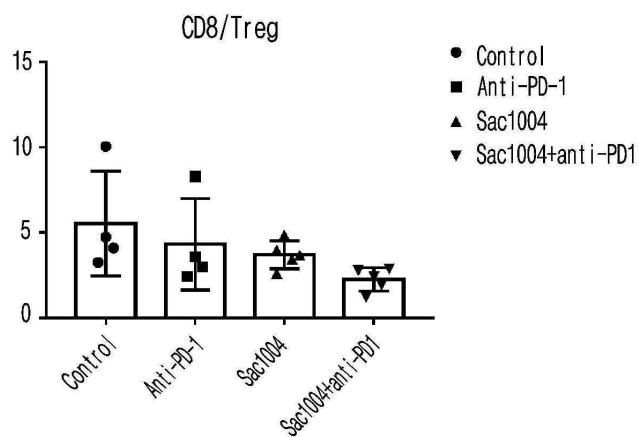
도면3f



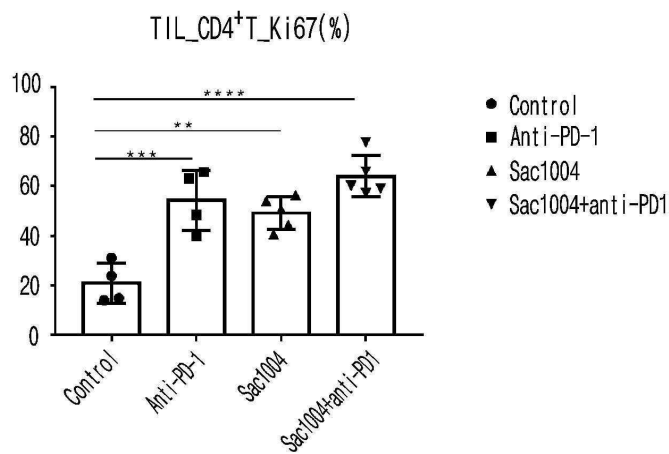
도면3g



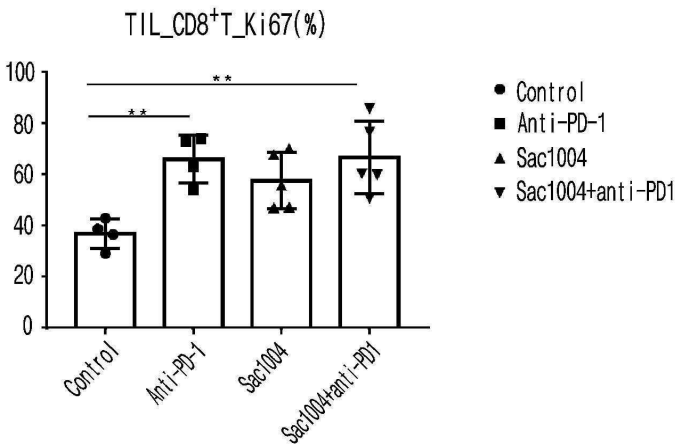
도면3h



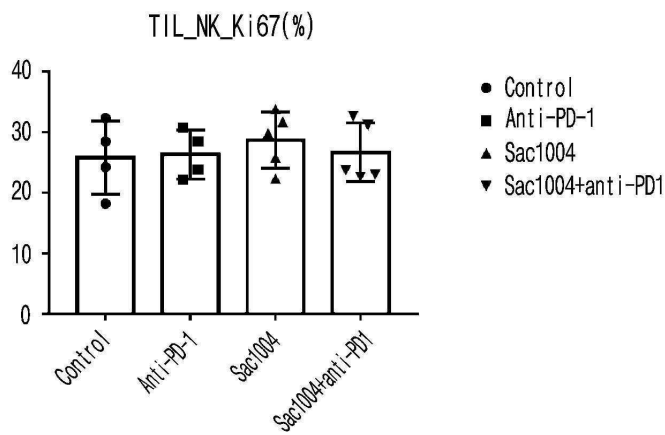
도면4a



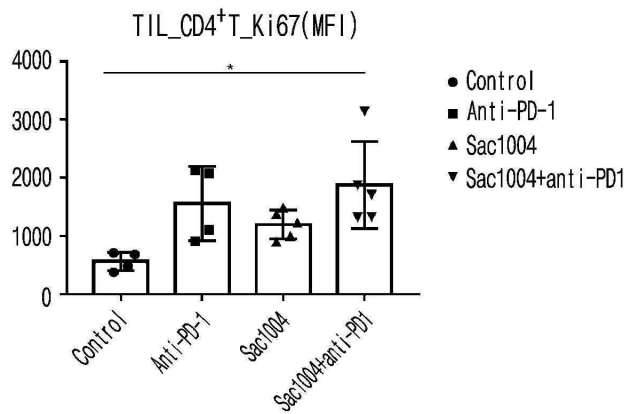
도면4b



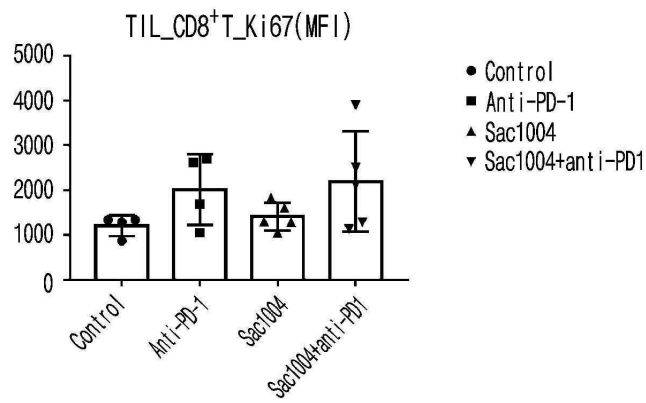
도면4c



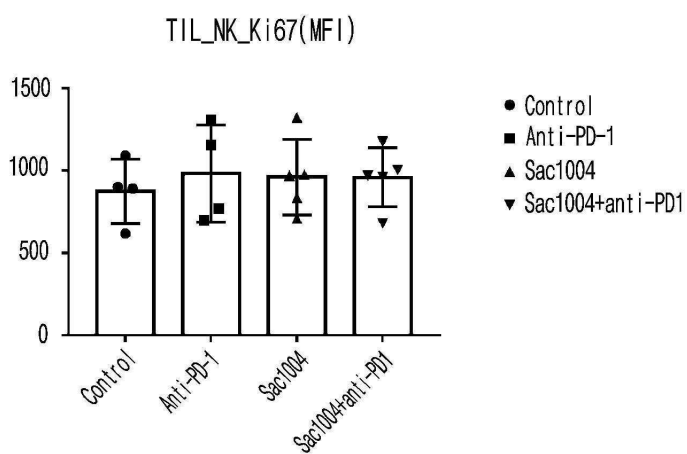
도면4d



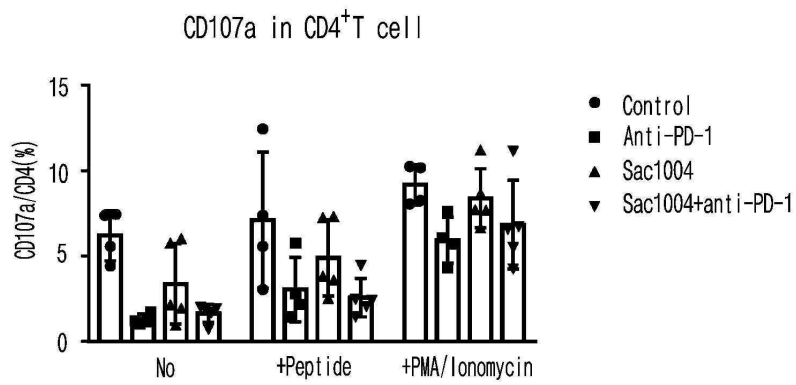
도면4e



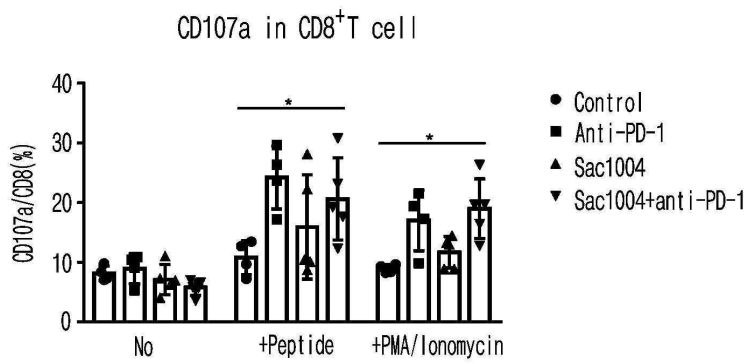
도면4f



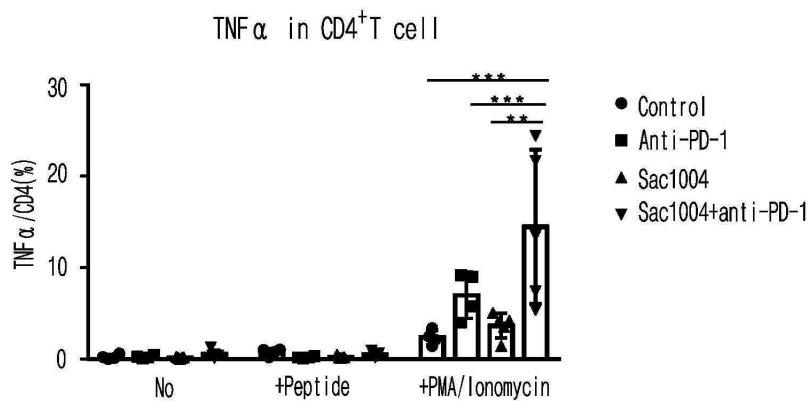
도면5a



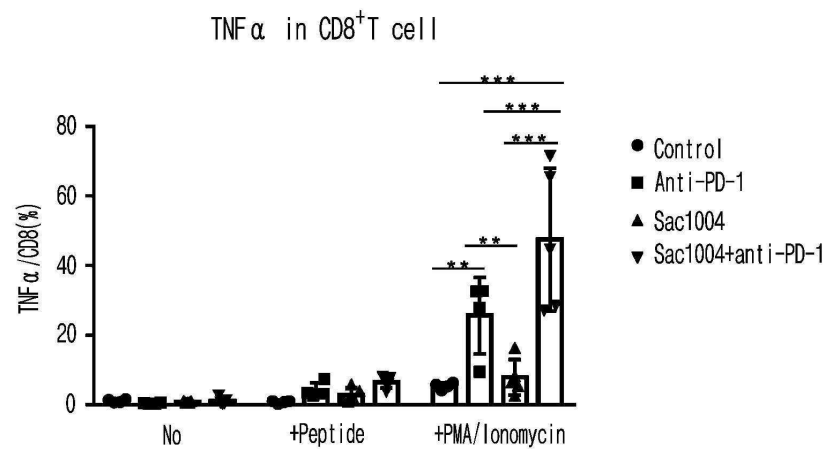
도면5b



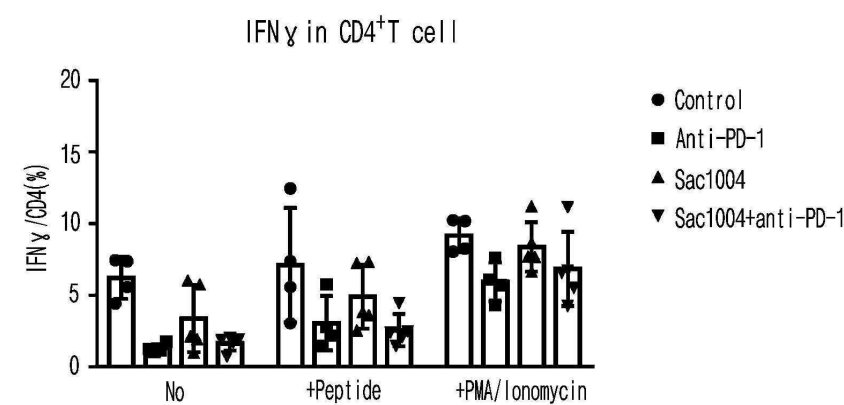
도면6a



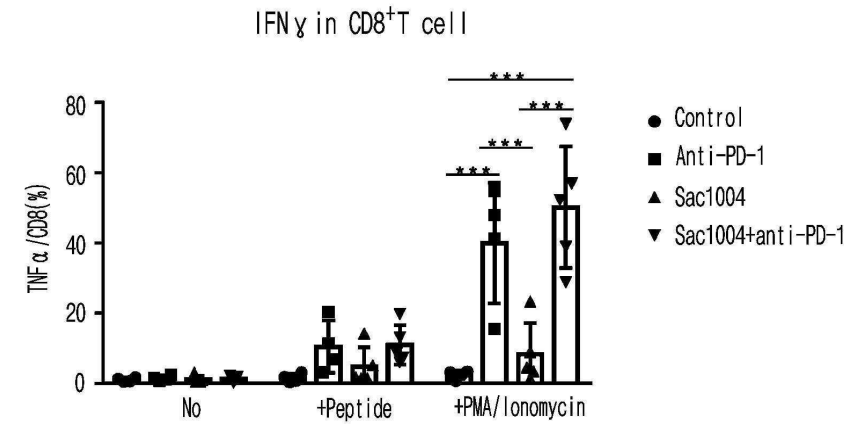
도면6b



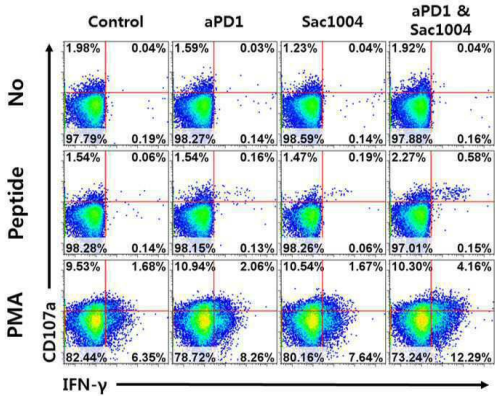
도면7a



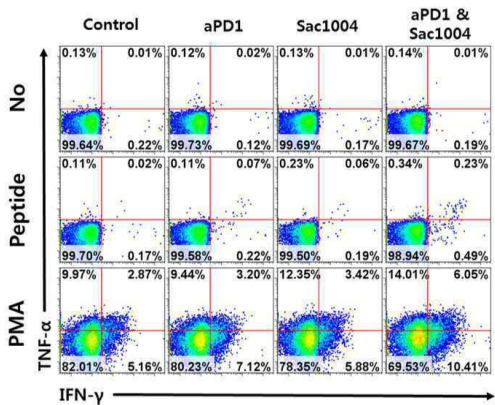
도면7b



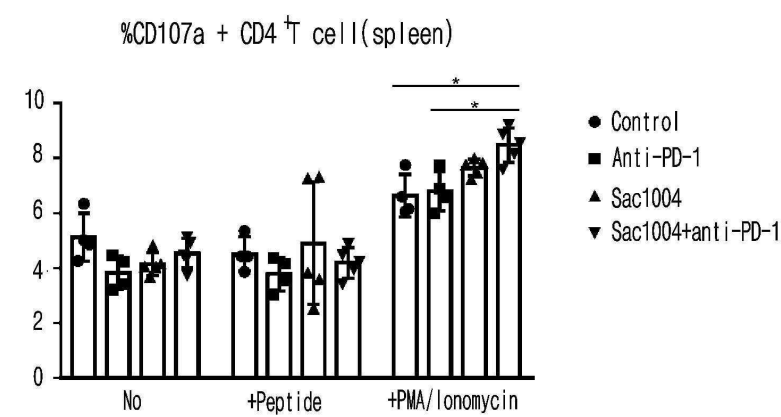
도면8a



도면8b

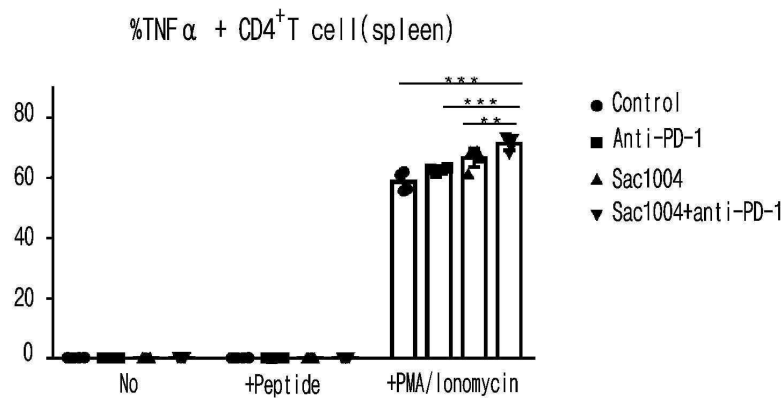


도면8c

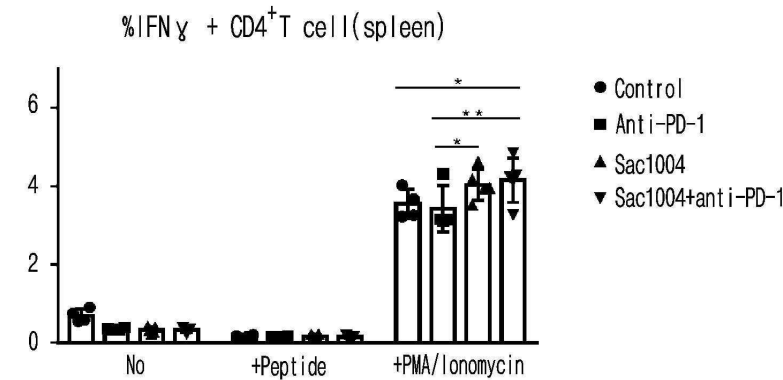




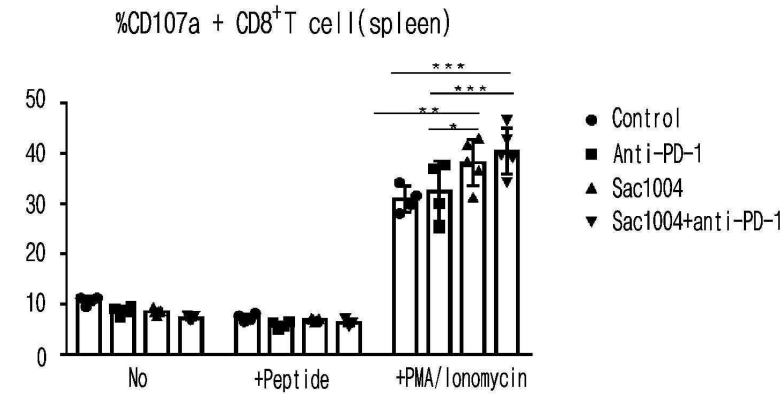
도면8d



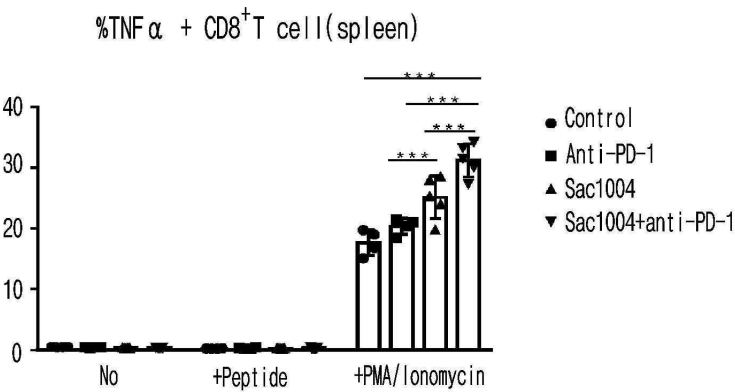
도면8e



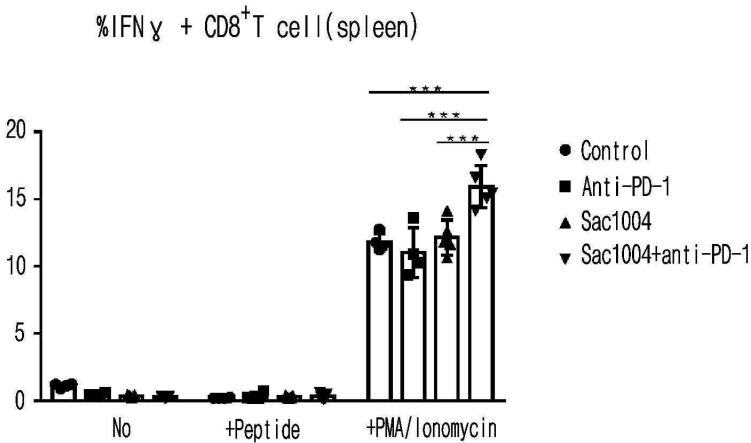
도면8f



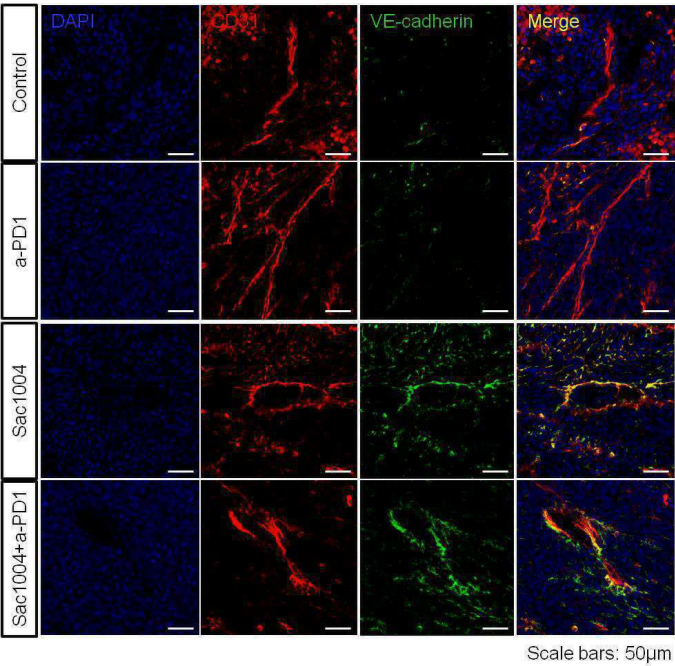
도면8g



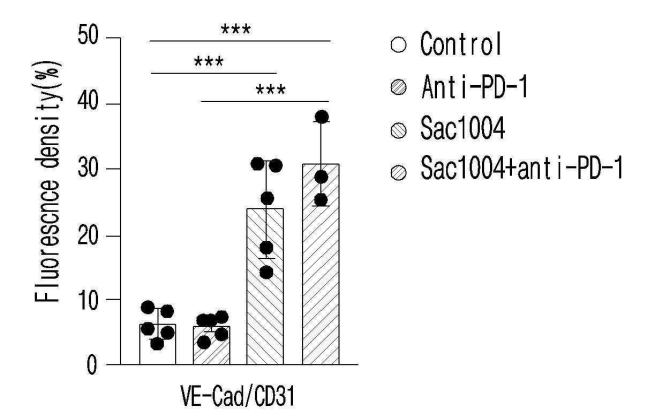
도면8h



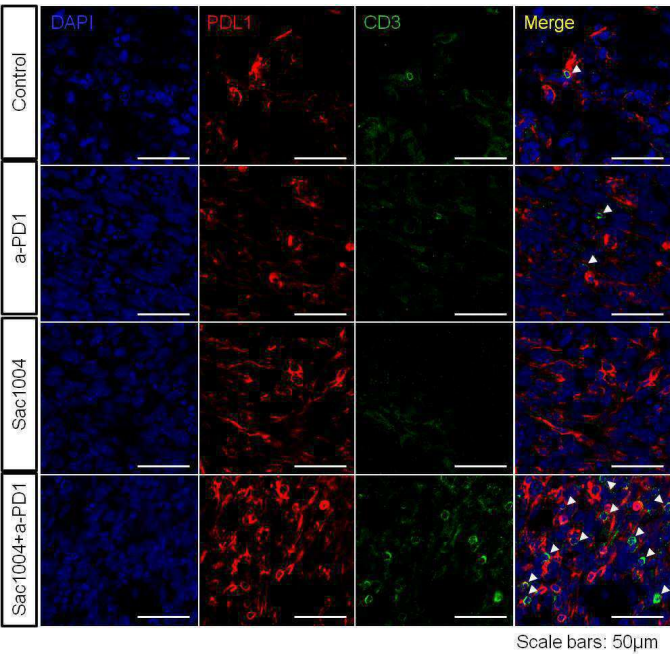
도면9a



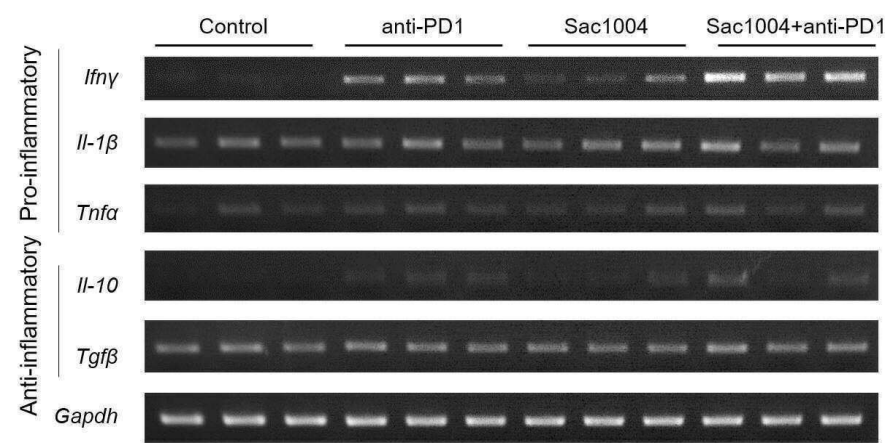
도면9b



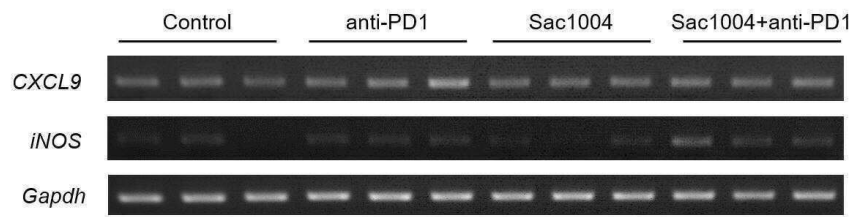
도면10



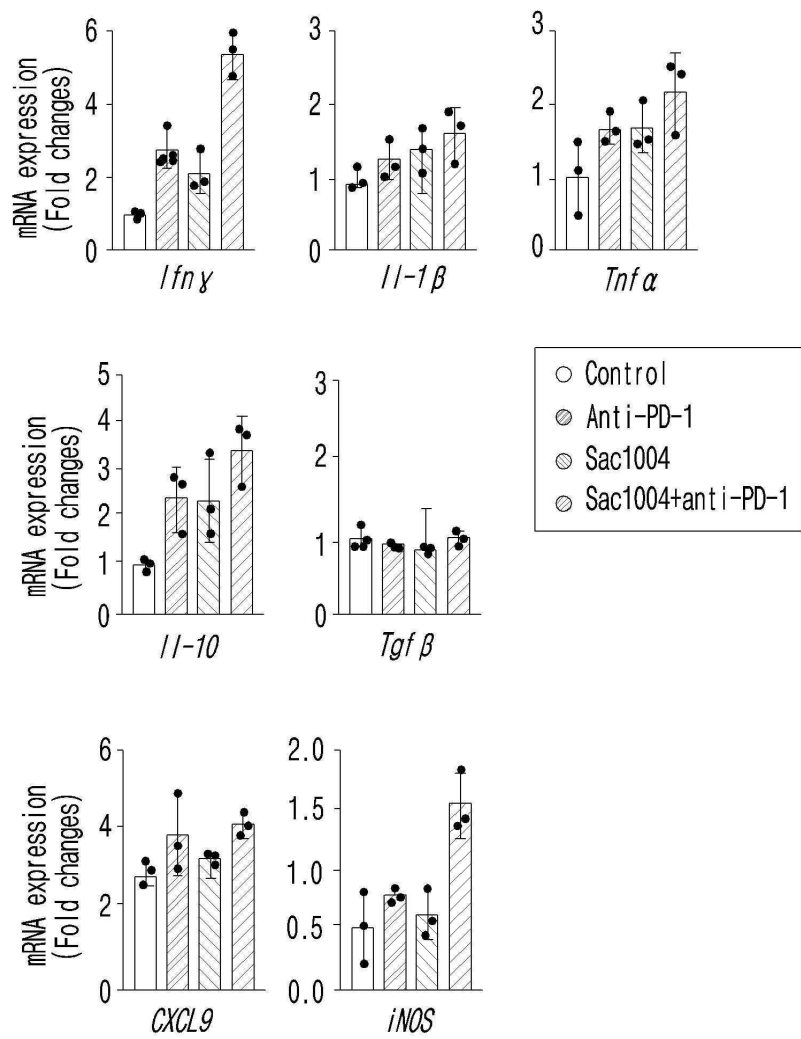
도면11a



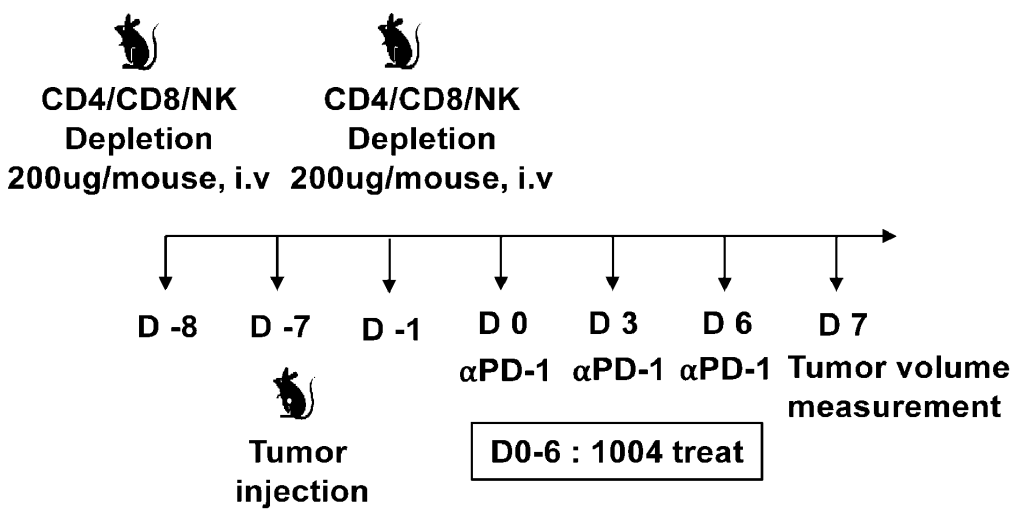
도면11b



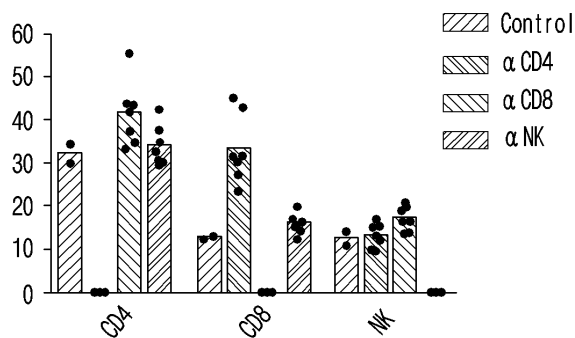
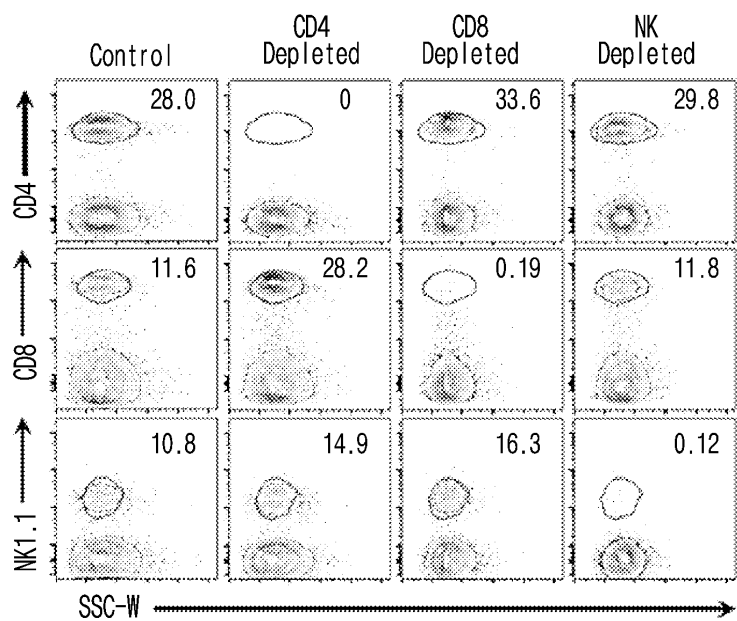
도면11c



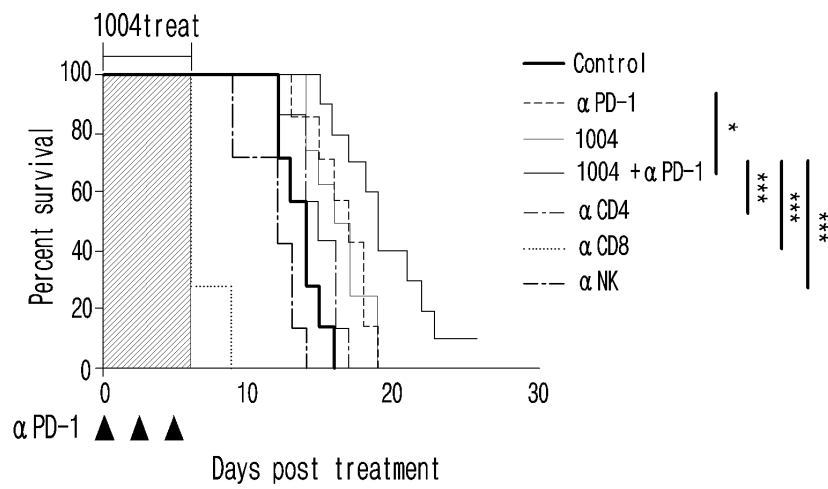
도면12a



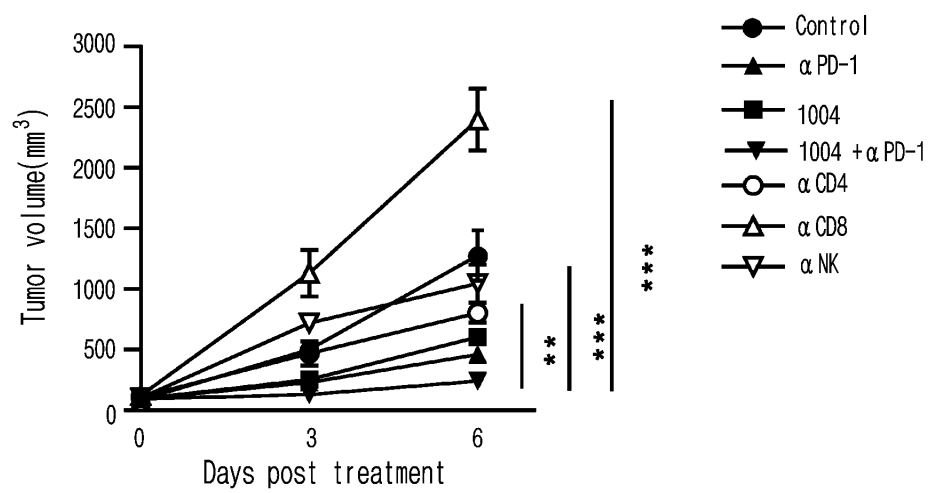
도면12b



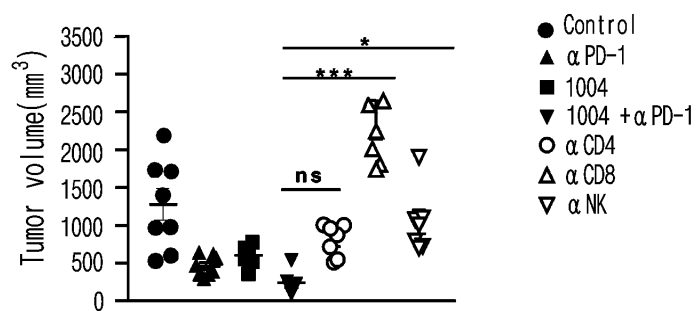
도면12c



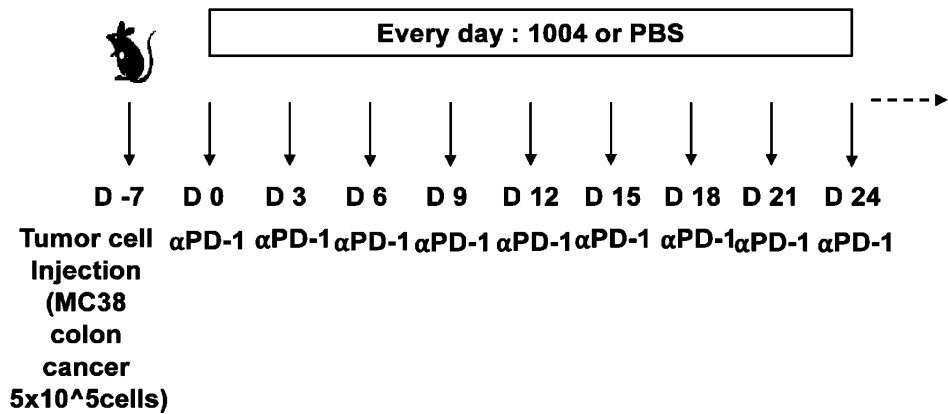
도면12d



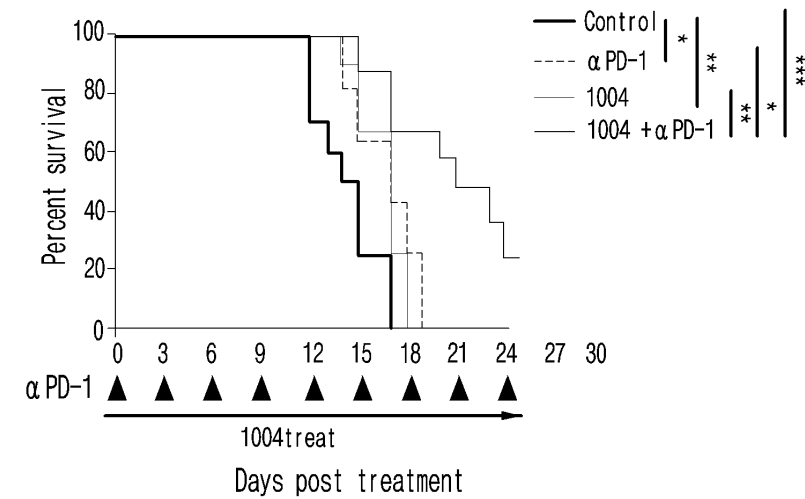
도면12e



도면13a



도면13b



도면13c

