



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0048881
(43) 공개일자 2014년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7032528
(22) 출원일자(국제) 2012년05월09일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년12월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/037056
(87) 국제공개번호 WO 2012/154809
국제공개일자 2012년11월15일
(30) 우선권주장
61/483,821 2011년05월09일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 버지니아 페이턴트 파운데이션
미합중국 버지니아주 22902 샬로트스빌 스위트
300 웨스트 메인 스트리트 250
(72) 발명자
산턴 리차드 제이.
미국 22945 버지니아주 아이비 터너 마운틴 로드
1187
아이야르 세라 이.
미국 33647 플로리다주 탬파 헌터스 키 씨클 8664
(74) 대리인
유미특허법인

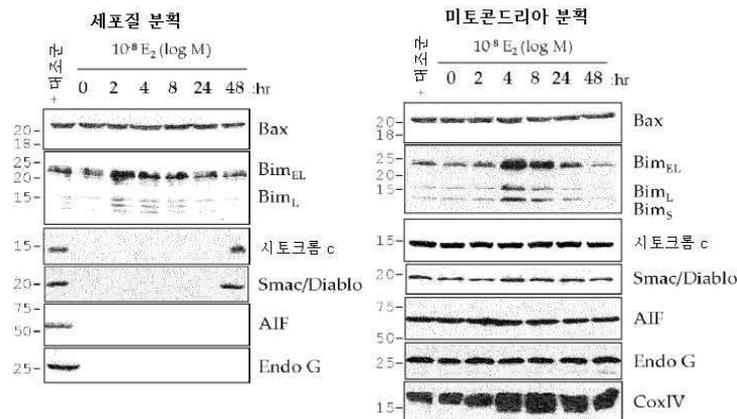
전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료 조성물 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 암, 특히 유방암 치료에 유용한 조합 치료제를 제공한다. 본 발명은, 다양한 구현예들에서, 암 환자에게, 단일클론 항체 모이어티와 그것에 연결된 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 포함하는 면역접합체를 유효량으로 암 환자에게 투여하는 단계; 및 제2 세포자살 유발성 약물을 유효량으로 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법을 제공한다. 면역접합체의 단일클론 항체 모이어티는 호르몬 내성 유방암 세포의 수용체, 예를 들어 HER2를 타겟팅하는 것으로 작용할 수 있다. 상승 작용은, 공통 분자 기전 ("수직 조절") 또는 다른 분자 기전 ("수평 조절")에 의해 작용하는 2가지 세포자살 유발성 약물을 호르몬 내성 유방암 등의 유방암을 앓고 있는 환자에게 투여하였을 때, 나타날 수 있다.

대표도 - 도1d



특허청구의 범위

청구항 1

암 치료 방법으로서,

단일클론 항체 모이어티와 상기 단일클론 항체 모이어티에 연결된 제1 세포자살 유발성 약물(pro-apoptotic drug) 모이어티를 포함하는 면역접합체(immunoconjugate)를 유효량으로 암 환자에게 투여하는 단계; 및

제2 세포자살 유발성 약물을 유효량으로 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티가 상기 단일클론 항체 모이어티에 공유 결합된 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 암이 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유방암이 아로마타제 내성 유방암 (aromatase-resistant breast cancer)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 유방암이 타목시펜 내성 유방암 (tamoxifen-resistant breast cancer)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 유방암이 ER+ 호르몬 불응성 유방암 (ER+ hormone refractory breast cancer)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 유방암이 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 유방암이 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 단일클론 항체 모이어티가 HER2에 결합하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 단일클론 항체 모이어티가 트라스투주맙 (trastuzumab)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티가 미소관 탈중합제(microtubule depolymerization agent)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티가 메이탄시노이드(maytansinoid) 또는 아우리스타틴(auristatin)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 단일클론 항체 모이어티가 HER2에 결합하는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 면역접합체가 T-DM1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 상기 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티에 의해 발휘되는 세포독성의 분자 기전과는 다른 분자 기전을 통해 세포독성을 발휘하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 면역접합체와 제2 세포자살 유발성 약물의 투여가 상승 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 외인성 경로 (extrinsic pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 약물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 Fas 경로를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 c-FLIP 경로를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 CMH, E2 또는 δ -토코트리에놀인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 내인성 경로 (intrinsic pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 약물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 카스파제-비의존형 경로 (caspase-independent pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 카스파제-의존형 경로 (caspase-dependent pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 E2, FTS, δ -토코트리에놀, 살리노마이신 또는 커큐민인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제1항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 항암제가 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀, 살리노마이신 또는 커큐민인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제13항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 외인성 경로를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 면역접합체와 상기 제2 세포자살 유발성 약물의 투여가 상승 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 CMH, E2 또는 δ -토코트리에놀인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 면역접합체가 T-DM1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제13항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 내인성 경로를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 면역접합체와 상기 제2 세포자살 유발성 약물의 투여가 상승 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 약물이 FTS인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 면역접합체가 T-DM1인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제1항에 있어서,

환자에게, 유효량의 T-DM1, 및 유효량의, FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀, 커큐민 또는 이들의 조합을 투여하는 단계를 포함하는,

아로마타제 내성 유방암, 타목시펜 내성 유방암 또는 ER+ 호르몬 불응성 유방암의 치료용으로 이용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한항에 있어서, 상기 방법이 보조 요법 (adjuvant therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한항에 있어서, 상기 방법이 1차 치료법 (first-line therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제1항 내지 제34항 중 어느 한항에 있어서, 상기 방법이 2차 치료법 (second-line therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제1항 내지 제34항 중 어느 한항에 있어서, 상기 면역접합체와 상기 제2 세포자살 유발성 약물이, 조합 제형 (combined formulation)으로서 또는 서로 교대로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제34항 중 어느 한항에 있어서,

상기 환자에게, 선택적으로, 상기 제1 세포자살 유발성 항암 약물 모이어티의 분자 기전 및 상기 제2 세포자살 유발성 항암 약물의 분자 기전과 상이한 분자 기전을 통해 효과가 발휘되는, 부가적인 항암제를 투여하는 단계;

상기 환자에게, X선, 감마선, 방사선훈중 방출 또는 원자 수준 미만 입자 (subatomic particle)를 포함하는 이온화 방사선을 투여하는 단계;

또는 이들 단계들의 조합을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

(a) 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티에 연결된 단일클론 항체 모이어티를 포함하는 면역접합체, 및

(b) 제2 세포자살 유발성 약물

을 포함하는 치료 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 공유 결합된 면역접합체가 T-DM1인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 42

제40항에 있어서, 상기 제2 세포자살 유발성 항암 약물이 FTS, CMH, E2, TMS, δ-토코트리에놀 또는 커큐민인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] **연방 지원의 연구 또는 개발에 관한 언급**

[0002] 본 발명은 미국 국방부에서 제공하는 정부 지원 GG11284 하에 이루어졌다. 정부가 본 발명에 대해 일부 권리를 가진다.

[0003] **관련 출원에 대한 교차-참조**

[0004] 이 출원은 2011년 5월 9일자 미국 출원번호 61/483,821에 대해 우선권을 주장하며, 그 문헌의 내용이 원용에 의해 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0005] 2011년 유럽 연합에서 예측한 유방암 사망률은 사망 75,688건이다 [1]. 미국의 2010년 유방암 사망 건수는 39,840건으로 예측되었다 [2]. 유방암의 약 70%는, 에스트로겐 수용체(ER)가 종양 증식의 주요 촉매자이고, 그에 따라 1차 치료는 에스트로겐 생산을 차단하는 타목시펜 또는 아로마타제 저해제를 사용하여 ER 신호전달을 저해하는 것이다 [3]. 그러나, 생물학적인 리프로그래밍 (reprogramming)을 통한 암 세포의 에스트로겐 민감성 증가로 인해 발생하는 것으로 보이는, 이들 저해제의 효능에 대한 초기 (새로운) 또는 후속적인 (후천적인) 암 세포 내성이, 수많은 환자들에게 에스트로겐 강하제의 치료학적 이점을 제한할 수 있다.

[0006] 에스트로겐 수용체 (ER) 양성 유방암을 앓고 있는 여성의 2/3는 난소 제거, 타목시펜 또는 아로마타제 (에스트로겐 합성) 저해제 투여, 및 GnRH 슈퍼-작용제 유사체로 지칭되는 화합물의 사용에 의해 달성될 수 있는, 호르몬 요법에 반응을 나타낸다. 그러나, 임상적인 관찰을 통해, 유방암 세포가 에스트라디올에 대해 증가된 민감성을 발현함으로써 에스테라디올 수준이 낮은 환경에 적응할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 특히, 에스트라디올은 급성 에스트라디올 고갈이 발생되기 전에는 종양 증식을 자극하기 위해서는 200 pg/ml이 필요하지만, 이후 12-18개월의 적응 기간을 거친 후에는 10-15 pg/ml의 수준으로도 종양 증식을 유발하는데 충분하다. 이러한 호르

몬-내성 유방암은 다시 계속되는 아로마타제 요법에 불응성으로 되어, 이들 호르몬-내성 세포를 함유한 암은 통제 불능상태가 될 수 있다.

[0007] 유방암 세포의 배양을 통해 그 증식을 조사한 바에 따르면, 야생형 MCF-7 세포를 에스트로겐 비함유 배지에서 장기간 배양하였을 때, 세포는 초기에는 증식을 멈춘 상태로 있다가 몇개월 후 세포가 적응하여 에스트라디올로 최대 자극받은 야생형 MCF-7 세포처럼 빠르게 증식하는 것으로 확인되었다. 이러한 적응된 배양 세포는, 유방암이 아로마타제 저해제에 대한 반응성을 상실하게되는 원인이 되기에, "호르몬-내성" 또는 "호르몬-불응성" 세포의 모델이 되는 LTED (장기 에스트로겐 고갈) 세포로 지칭되며, 호르몬 적응과 관련된 프로세스를 연구하는데 활용되고 있다. 환자에서 이러한 세포에 돌연변이가 발생한다면, 이는 환자의 생존 가능성에 상당히 부정적으로 작용하게 된다.

[0008] 호르몬 요법을 수행한 후에는 에스트로겐 수용체인 HER2의 상향 조절이 관찰된다. 트라스투주맙-메이탄시노이드 접합체 (trastuzumab-maytansinoid conjugate)인 T-DM1은, HER2-특이적인 인간화된 항체인 트라스투주맙이 메이탄신 유사체인 미소관 저해제 DM1과 공유 결합된 항체-약물 접합체이다. 이 접합체는 HER2-양성 유방암 세포를 표적화하는 것으로 입증된 바 있다. 예를 들어, Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blattler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH, Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate, *Cancer Res* 2008;68:9280-90; Junttila TT, Li G, Parsons K, Phillips GL, Sliwkowski MX. trastuzumab-DM1 (T-DM1) retains all the mechanisms of action of trastuzumab and efficiently inhibits growth of lapatinib insensitive breast cancer, *Breast Cancer Res Treat* (2010) 128(2):347-56; 및 Liu C and Chari R, The development of antibody delivery systems to target cancer with highly potent maytansinoids, *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1997) 6(2):169-172를 참조한다.

[0009] 내성을 치료하고 보다 장기간의 관해를 달성하기 위한 새로운 치료 전략들이 시급히 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) 1. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E: Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010, 60: 277-300.
- (비특허문헌 0002) 2. Malvezzi M, Arfe A, Bertuccio P, Levi F, La VC, Negri E: European cancer mortality predictions for the year 2011. *Ann Oncol* 2011.
- (비특허문헌 0003) 3. Musgrove EA, Sutherland RL: Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Cancer* 2009, 9: 631-643.
- (비특허문헌 0004) 4. Kim S, Ko H, Park JE, Jung S, Lee SK, Chun YJ (2002) Design, synthesis, and discovery of novel trans-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P450 1B1 inhibitors. *J Med Chem* 45:160-164
- (비특허문헌 0005) 5. Fan P, Yue W, Wang JP, Aiyar S, Li Y, Kim TH, Santen RJ (2009) Mechanisms of resistance to structurally diverse antiestrogens differ under premenopausal and postmenopausal conditions: evidence from in vitro breast cancer cell models. *Endocrinology* 150:2036-2045
- (비특허문헌 0006) 6. Jeng MH, Shupnik MA, Bender TP, Westin EH, Bandyopadhyay D, Kumar R, Masamura S, Santen RJ (1998) Estrogen receptor expression and function in long-term estrogen-deprived human breast cancer cells. *Endocrinology* 139:4164-4174
- (비특허문헌 0007) 7. Chen S, Masri S, Hong Y, Wang X, Phung S, Yuan YC, Wu X (2007) New experimental models for aromatase inhibitor resistance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 106:8-15
- (비특허문헌 0008) 8. Chou TC (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681
- (비특허문헌 0009) 9. Chou TC (2008) Preclinical versus clinical drug combination studies. *Leuk*

Lymphoma 49:2059-2080

- (비특허문헌 0010) 10. Chang TT, Chou TC (2000) Rational approach to the clinical protocol design for drug combinations: a review. *Acta Paediatr Taiwan* 41:294-302
- (비특허문헌 0011) 11. Blum R, Jacob-Hirsch J, Rechavi G, Kloog Y (2006) Suppression of survivin expression in glioblastoma cells by the Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid promotes caspase-dependent apoptosis. *Mol Cancer Ther* 5:2337-2347
- (비특허문헌 0012) 12. Charette N, De SC, Lannoy V, Horsmans Y, Leclercq I, Starkel P (2010) Salirasib inhibits the growth of hepatocarcinoma cell line in vitro and tumor growth in vivo through ras and mTOR inhibition. *Mol Cancer* 9:256
- (비특허문헌 0013) 13. Santen RJ, Lynch AR, Neal LR, McPherson RA, Yue W (2006) Farnesylthiosalicylic acid: inhibition of proliferation and enhancement of apoptosis of hormone-dependent breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 17:33-40
- (비특허문헌 0014) 14. Bijangi-Vishehsaraei K, Saadatzadeh MR, Huang S, Murphy MP, Safa AR (2010) 4-(4-Chloro-2-methylphenoxy)-N-hydroxybutanamide (CMH) targets mRNA of the c-FLIP variants and induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 342:133-142
- (비특허문헌 0015) 15. Wood TE, Dalili S, Simpson CD, Sukhai MA, Hurren R, Anyiwe K, Mao X, Suarez SF, Gronda M, Eberhard Y, MacLean N, Ketela T, Reed JC, Moffat J, Minden MD, Batey RA, Schimmer AD (2010) Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther* 9:246-256
- (비특허문헌 0016) 16. Aiyar SE, Park H, Aldo PB, Mor G, Gildea JJ, Miller AL, Thompson EB, Castle JD, Kim S, Santen RJ (2010) TMS, a chemically modified herbal derivative of resveratrol, induces cell death by targeting Bax. *Breast Cancer Res Treat* 124:265-277
- (비특허문헌 0017) 17. Park H, Aiyar SE, Fan P, Wang J, Yue W, Okouneva T, Cox C, Jordan MA, Demers L, Cho H, Kim S, Song RX, Santen RJ (2007) Effects of tetramethoxystilbene on hormone-resistant breast cancer cells: biological and biochemical mechanisms of action. *Cancer Res* 67:5717-5726
- (비특허문헌 0018) 18. Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, Jordan VC (2005) Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst* 97:1746-1759
- (비특허문헌 0019) 19. Song RX, Mor G, Naftolin F, McPherson RA, Song J, Zhang Z, Yue W, Wang J, Santen RJ (2001) Effect of long-term estrogen deprivation on apoptotic responses of breast cancer cells to 17beta-estradiol. *J Natl Cancer Inst* 93:1714-1723
- (비특허문헌 0020) 20. Jordan VC, Lewis-Wambi JS, Patel RR, Kim H, Ariazi EA (2009) New hypotheses and opportunities in endocrine therapy: amplification of oestrogen-induced apoptosis. *Breast* 18 Suppl 3:S10-S17
- (비특허문헌 0021) 21. Santen RJ, Allred DC (2007) The estrogen paradox. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3:496-497
- (비특허문헌 0022) 22. Song RX, Santen RJ (2003) Apoptotic action of estrogen. *Apoptosis* 8:55-60
- (비특허문헌 0023) 23. Lewis JS, Meeke K, Osipo C, Ross EA, Kidawi N, Li T, Bell E, Chandel NS, Jordan VC (2007) Intrinsic mechanism of estradiol-induced apoptosis in breast cancer cells resistant to estrogen deprivation. *J Natl Cancer Inst* 97:1746-1759
- (비특허문헌 0024) 24. Shim WS, Conaway M, Masamura S, Yue W, Wang JP, Kmar R, Santen RJ (2000) Estradiol hypersensitivity and mitogen-activated protein kinase expression in long-term estrogen deprived human breast cancer cells in vivo. *Endocrinology* 141:396-405
- (비특허문헌 0025) 25. Ingle JN, Ahmann DL, Green SJ, Edmonson JH, Bisel HF, Kvols LK, Nichols WC,

Creagan ET, Hahn RG, Rubin J, Frytak S (1981) Randomized clinical trial of diethylstilbestrol versus tamoxifen in postmenopausal women with advanced breast cancer. N Engl J Med 304:16-21

(비특허문헌 0026) 26. Oroudjev E, Lopus M, Wilson L, Audette C, Provenzano C, Erickson H, Kovtun Y, Chari R, Jordan MA (2010) Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule dynamic instability. Mol Cancer Ther 9:2700-2713

(비특허문헌 0027) 27. Esteve MA, Carre M, Braguer D (2007) Microtubules in apoptosis induction: are they necessary? Curr Cancer Drug Targets 7:713-729

(비특허문헌 0028) 28. Jordan MA, Wilson L (2004) Microtubules as a target for anticancer drugs. Nat Rev Cancer 4:253-265

(비특허문헌 0029) 29. Jumbe NL, Xin Y, Leipold DD, Crocker L, Dugger D, Mai E, Sliwkowski MX, Fielder PJ, Tibbitts J (2010) Modeling the efficacy of trastuzumab-DM1, an antibody drug conjugate, in mice. J Pharmacokinet Pharmacodyn 37:221-242

(비특허문헌 0030) 30. Burris HA, III, Rugo HS, Vukelja SJ, Vogel CL, Borson RA, Limentani S, Tan-Chiu E, Krop IE, Michaelson RA, Girish S, Amler L, Zheng M, Chu YW, Klencke B, O'Shaughnessy JA (2011) Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy. J Clin Oncol 29:398-405

(비특허문헌 0031) 31. Sabnis G, Brodie A (2010) Understanding resistance to endocrine agents: molecular mechanisms and potential for intervention. Clin Breast Cancer 10:E6-E15

(비특허문헌 0032) 32. Sabnis G, Brodie A (2010) Adaptive changes results in activation of alternate signaling pathways and resistance to aromatase inhibitor resistance. Mol Cell Endocrinol

(비특허문헌 0033) 33. Flageng MH, Moi LL, Dixon JM, Geisler J, Lien EA, Miller WR, Lonning PE, Mellgren G (2009) Nuclear receptor co-activators and HER2/neu are upregulated in breast cancer patients during neo-adjuvant treatment with aromatase inhibitors. Br J Cancer 101:1253-1260

(비특허문헌 0034) 34. Chou TC, Talalay P (1984) Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 22:27-55

발명의 내용

[0011] 본 발명은, 다양한 구현예로, 암을 치료하기 위한 조합 치료제 (combination therapy)에 관한 것으로, 상기 암은, 비제한적인 예로, 환자에게 아나스트로졸(anastrozole)과 같은 아로마타제 저해제, 타목시펜과 같은 에스트로겐 수용체 조절제 등을 투여하는 등의 1차 치료에 더 이상 반응하지 않는 암 등의, 호르몬-내성 (호르몬-불응성) 유방암을 포함한다. 본 발명은, 다양한 구현예로, 단일클론 항체 모이어티와 그것에 연결된 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 포함하는 면역접합체를 유효량으로 암 환자에게 투여하는 단계; 환자에게 제2 세포자살 유발성 약물을 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 암은 유방암, 예컨대 아로마타제-내성 유방암, 타목시펜-내성 유방암, ER+ 호르몬 불응성 유방암 또는 HER2 발현이 상향 조절된 암 세포를 함유한 유방암, 또는 이들의 임의 조합일 수 있다.

[0012] 특정 구현예에서, 면역접합체는 링커를 통해 서로 연결된 단일클론 항체 모이어티와 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 포함한다. 다양한 구현예들에서, 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티는 메이탄시노이드 또는 아우리스타틴 등의 미소관 탈중합제(microtubule depolymerization agent)이다. 예를 들면, 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티는 링커 모이어티를 통해 단일클론 항체 모이어티에 연결된 메이탄신 유사체 (메이탄시노이드)일 수 있다. 보다 구체적으로, 면역접합체는 비-환원성 링커 모이어티를 통해 메이탄시노이드 세포자살 유발성 약물 모이어티와 트라스투주맵(Herceptin[®])이 커플링된 트라스투주맵-메이탄시노이드 접합체 (예, T-DM1)일 수 있다. 본 발명자들은, 본원에서, 세포의 증식을 단순 저해하기 보다는 내성 세포를 제거함으로써 적응을 위한 리프로그래밍화 과정을 중단시키기 위해, 증식 저해 전략으로서 보다 바람직한 것으로서, 세포자살 유발 전략을

선택하였다.

- [0013] 다양한 구현예들에서, 제2 세포자살 유발성 약물은 제1 세포자살 유발성 약물에 의해 발휘되는 세포독성 분자 기전이 아닌 다른 분자 기전을 통해 세포독성을 발휘한다.
- [0014] 이를, 본원에서는, 하나의 세포자살 유발 경로에서 2 단계 이상을 타겟팅하는 "수직 조절 (vertical modulation)"에 대하여, 독립적인 2개의 세포자살 경로를 치료 용법에 의해 활성화시키거나 유도하는 "수평 조절 (horizontal modulation)"이라 한다. 본 발명자들은, 본원을 통해, 예를 들어 T-DM1과 제2 세포자살 유발성 약물의 조합을 사용하는 수평 조절이 호르몬 불응성 유방암 세포에 세포자살을 유도하는데 상승적인 작용을 발휘한다는 것을 밝히는 바이다.
- [0015] 일부 구현예들에서, 제2 세포자살 유발성 약물은 외인성 경로 (extrinsic pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 약물이다. 다른 구현예로, 제2 세포자살 유발성 약물은 내인성 경로 (intrinsic pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 약물이다. 예컨대, 제2 세포자살 유발성 항암제는 파르네실-티오살리실산 (FTS), 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-하이드록시부탄아미드 (CMH), 에스트라디올 (E2), 테트라메톡시스틸벤 (TMS), δ -토카트리에놀, 살리노마이신 또는 커큐민일 수 있다.
- [0016] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 유방암과 같은 암을 치료하기 위한, 특히, 전술한 호르몬-내성 유방암을 치료하기 위한, 제1 세포자살 유발성 약물과 제2 세포자살 유발성 약물의 조합의 의학적 용도를 제공한다. 예를 들어, 제1 세포자살 유발성 약물은 T-DM1 등의 면역접합체일 수 있으며, 제2 세포자살 유발성 약물은, 제1 세포자살 유발성 약물이 항암 효과를 발휘할 수 있는 분자 기전과는 다른 분자 기전으로, 암 세포에 세포자살을 유도하는 약물일 수 있다.
- [0017] 다양한 구현예들에서, 본 발명은 유방암과 같은 암을 치료하기 위한, 특히, 전술한 호르몬-내성 유방암을 치료하기 위한, 단일클론 항체 모이어티와 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 포함하는 면역접합체, 및 제2 세포자살 유발성 약물을 포함하는 치료 조성물을 제공한다.
- [0018] 면역접합체의 단일클론 항체 모이어티는 호르몬 내성 유방암 세포에서 상향 조절되는 HER2 수용체를 타겟으로 하는 등의, 제1 세포자살 유발성 약물에게 타겟팅 기전을 제공할 수 있다. 항암제의 타겟팅 요소는 접합체, 예를 들어, 하나가 타겟팅 기전을 제공하고, 다른 쪽이 세포독성 또는 세포자살 기전을 제공하는, 공유 결합된 모이어티들을 이용함으로써 달성될 수 있다. 이러한 제제의 일종인 T-DM1은 단일클론 항체 트라스투주맵 (Herceptin®)이 메이탄시노이드 마크로사이클릭 세포자살 유발성 세포독성제와 공유 결합된 접합체이다. T-DM1은 세포자살 유발성 미소관 저해제인 DM1에 공유 결합된 HER2-특이적인 인간화된 항체 트라스투주맵을 타겟팅 모이어티로서 포함한다. 예로, Oroudjev E, Lopus M, Wilson L, Audette C, Provenzano C, Erickson H, Kovtun Y, Chari R, Jordan MA (2010) *Mol Cancer Ther* 9:2700-2713, Maytansinoid-antibody conjugates induce mitotic arrest by suppressing microtubule polymerization를 참조한다. 본원에서, 본 발명자들은, T-DM1이, 파르네실-티오살리실산 (FTS, Salirasib, 내인성 미토콘드리아 사멸 경로를 타겟팅하는 Ras 저해제, 케스파제 의존형), 에스트라디올 (E2, 내인성 미토콘드리아 사멸 경로, 카스파제 의존형), 테트라메톡시스틸벤 (TMS, 미토콘드리아 사멸 경로, 카스파제 비의존형), 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-하이드록시부탄아미드 (CMH, 외인성 세포자살 경로), δ -토코트리에놀, 살리노마이신, 커큐민 또는 이들의 임의 조합을 비롯한, 다른 세포자살 유발성 항암제와 조합하여, 호르몬 내성 (MCF-7; T47D) 및 호르몬 불응성 (LTED; TamR) 유방암 세포가 시험관내에서 사멸되도록, 무독성의 세포자살 촉발에 상승적으로 작용할 수 있다는 것을, 놀랍게도 확인하게 되었다. 본원에 개시되고 청구된 치료제에 대한 평가에 사용된 상기한 세포주들은 암 환자를 대상으로 치료제의 생체내 사용시 성공 가능성을 예측할 수 있는 우수한 예측인자일 수 있다는 것은, 당해 기술 분야에 널리 공지되어 있다.
- [0019] 다양한 구현예들에서, 본 발명자들은, 본원에서, 특정 세포자살 유발제들의 조합이 호르몬 내성 (호르몬 불응성) 유방암 세포에 세포자살, 세포 사멸을 유발하는데 상승적으로 작용할 수 있다는 가설을 검증하기 위해 수행한 실험들의 결과를 개시한다. 예를 들어, 본 발명은 타겟팅 단일클론 항체와 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 포함하는 면역접합체를 유효량으로 암 환자에게 투여하는 단계; 환자에게 제2 세포자살 유발성 약물을 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법을 제공한다. "상승"이란, 치료 효과가 각 약물을 단독 투여한 경우에 달성되는 각각의 치료 효과를 합한 것 보다 더 높다는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1A - 1F는 전기영동 겔 자동방사선사진 (1A, 1B, 1D, 1E)과, LTED 세포에 FTS를 처리하였을 때 지정된 세포

자살 유발 단백질의 수준에 대해 수득한 결과와 더불어 세포질 분획과 미토콘드리아 분획내 이들 단백질의 수준 변화를 평가한 결과를 요약 개시한 막대 그래프 (1C, 1F)이다.

도 2A-B는 야생형 MCF-7 세포에 대한 FTS + 커큐민 조합물의 효과 (도 2A)와 MCF-7 세포 생존성에 대한 FTS 단독 또는 커큐민과의 조합물의 효과 (도 2B)를 나타낸, 시간 경과 막대 그래프 (2A) 및 세포 생존성-농도 그래프 (2B)이다.

도 3A-B는 MCF-7 세포에 대한 살리노마이신의 효과를 나타낸 시간 경과 막대 그래프 (3A) 및 세포 생존성-농도 그래프 (3B)이다.

도 4는 비-적응 세포: 지정된 조합으로 5일간 처리한, MCF-7 세포 (a-c; 상단 그래프) 및 T47D (d-f; 하단 그래프)의 농도 효과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 지정된 조합으로 5일간 처리한 적응 세포주 LTED D29의 농도 효과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 표시된 바와 같이 처리한 비-적응된 MCF-7 세포 (a-c; 상단 그래프) 및 T47D (d-f; 하단 그래프)의 조합 인덱스 (combination index)를 나타낸 그래프이다. 세로 좌표 - 조합 인덱스 (CI); 가로 좌표 - 분율 효과 (Fractional Effect)

도 7A, B는 표시된 바와 같이 처리한 적응 세포주 LTED D29 (a-i) 및 TamR 세포 (j-s)의 조합 인덱스를 나타낸 그래프이다.

도 8은 지정된 조합을 처리한 비-적응 세포 MCF-7 세포 (a-c; 상위 그래프 3개) 및 T47D 세포 (d-f; 하단 그래프 3개)에 대한 약효등효도(Isobologram) 분석 결과를 예시한 그래프이다. 세로 좌표 - 농도 A; 가로 좌표 - 농도 B.

도 9는 표시된 바와 같이 처리한 적응 세포주, LTED D29 세포 (a-i)에 대한 약효등효도 분석 결과를 예시한 그래프이다. 세로 좌표 - 농도 A; 가로 좌표 - 농도 B.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명을 기술하고, 권리를 청구함에 있어, 아래 용어들은 하기에 기술된 정의로 사용될 것이다. 달리 언급되지 않은 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어와 과학 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본원에 기술된 바와 유사하거나 등가인 모든 방법들과 물질들이 본 발명의 실행 또는 시험시 사용될 수 있지만, 바람직한 방법들과 물질들은 본원에 기술된다. 본원에서, 아래 각각의 용어들은 그 섹션에서 그것과 연관된 의미를 가진다. 라디컬, 치환기 및 범위에 대해 아래 열거된 구체적이고 바람직한 값들은 단순히 예시하기 위한 것일 뿐, 라디컬과 치환기에 대해 지정된 범위내에 속하는 다른 값이나 다른 정의된 값을 배제하는 것은 아니다.
- [0022] 본원에서, 관사 "하나(a)" 및 "하나(an)"은 하나 또는 하나 보다 많은 것을 지칭하며, 즉, 관사의 문법적인 대상이 1개 이상임을 지칭한다. 예를 들어, "하나의 요소"는 요소 하나 또는 하나 보다 많은 요소를 의미한다.
- [0023] 용어 "약"은, 본원에서, 대략, 근처, 거의 또는 썸을 의미한다. 용어 "약"이 수적 범위와 같이 사용되는 경우, 상한에서 하한에 이르는 수치 값들의 범위를 나타내는 것으로 변형된다. 일반적으로, 용어 "약"은 본원에서 기재된 값에서 상하 편차 20%인 값을 의미한다.
- [0024] 본원에서, 용어 "병에 걸린 세포"는 질병 또는 장애를 받고 있는 개체의 세포를 지칭하며, 병에 걸린 세포는 질병, 병태 또는 장애에 걸리지 않은 개체와 비교하여 변형된 표현형을 가진다.
- [0025] 세포 또는 조직이 질병, 병태 또는 장애에 걸리지 않은 개체의 동일 세포 또는 조직에 비해 변형된 표현형을 가진다면, 세포 또는 조직은 "병에 걸린" 것이다.
- [0026] 본원에서, "작용제"는 인간 등의 포유류에게 투여되었을 때, 생물학적인 대상 활성을 강화하거나 연장하는 물질 조성이다. 이러한 효과는 직접적이거나 간접적일 수 있다.
- [0027] "길항제"는 인간 등의 포유류에게 투여되었을 때, 포유류에서의 내인성 화합물의 존재나 수준에 기인한 생물학적 활성을 저해 또는 방해하는 물질 조성이다. 이러한 효과는 직접적이거나 간접적일 수 있다.
- [0028] 본원에서, 용어 "아로마타제 저해제"는 안드로스텐다이온 (androstenedione)에서 에스트론으로 및/또는 테스토스테론에서 에스트라디올로의 변환을 차단하는 조성을 지칭한다. 아로마타제 저해제는 예를 들어 엑세메스탄

(exemestane), 아나스트로졸 (anastrozole) 및 레트로졸 (letrozole) 등의 스테로이드계 및 비-스테로이드계 클래스 둘다를 포함한다.

[0029] 본원에서, 화합물의 "유사체"는, 예를 들어, 반드시 이성질체인 것은 아니지만 구조상 서로 비슷한 화합물이다 (예. 5-플루오로우라실은 티민의 유사체임).

[0030] 용어 "세포자살"은 다양한 방식으로 유도될 수 있는 생화학적 경로에 의해 매개되는 프로그램화된 세포 사멸을 지칭한다. "세포자살 유발성" 물질 또는 약물은 프로그램화된 세포 사멸을 야기하는 생화학적 효과를 나타내는 생활성 물 또는 약물이다. 본원에 기술된 바와 같이, 세포자살은 아래에서 상세히 기술된 바와 같이, 내인성 또는 외인성 경로나 기전에 의해 유발되거나 초래될 수 있다. "외인성" 세포자살 경로는 사멸 수용체가 관여하는데, 이 경로는 사멸 수용체에 리간드가 결합함으로써 활성화된다. "내인성" 세포자살 경로는 세포자살을 개시하는 미토콘드리아 경로가 참여한다. 수평 조절에서와 같이 "수평"은 한가지 이상의 특정 경로에 작용하는 자극을 지칭하는 반면, 수직 조절에서와 같이 "수직"은 동일한 경로에서 여러가지 단계들에 관여하는 것을 의미한다.

[0031] 본원에서, 용어 "유방암"은 유방 또는 유선 조직의 다양한 타입 및 아형의 임의 암종을 지칭한다.

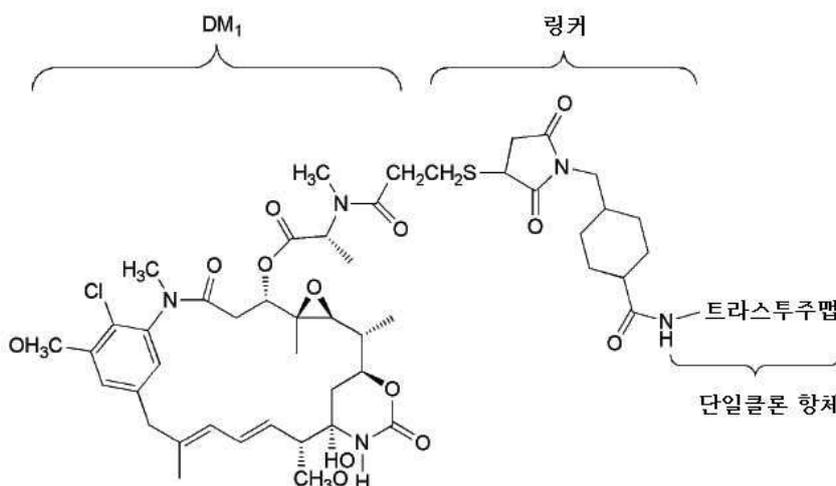
[0032] 용어 "암"은 본원에서 독특한 형질을 가지며 - 정상적인 통제 상실 - 통제되지 않는 증식, 분화 결여, 국소 조직 침범 및 전이를 나타내는, 세포 증식으로서 정의된다. 이러한 예로는, 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암 및 폐암이 있으나, 이들로 한정되지 않는다.

[0033] "화합물"은 본원에서 통상적으로 약물, 또는 약물로 사용하기 위한 후보 물질 뿐만 아니라 이들의 조합 및 혼합물인, 임의 타입의 물질 또는 체제를 지칭한다.

[0034] "접합체"는 2 이상의 "모이어티" 또는 도메인이 서로 조합된 분자 집합체 (molecular entity)이다. "공유" 접합체는 모이어티들이 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 바와 같은 공유적인 화학 결합에 의해 조합된 접합체이다. 예를 들어, 단일클론 항체와 같은 단백질은 공유 결합 등을 통해 약물 등의 유기 화합물과 접합체를 형성할 수 있다. 단백질이 항체, 예를 들어, 단일클론 항체인 경우, 제조되는 접합체는 본원에서 "면역접합체"로 지칭된다. 단백질 (예, 단일클론 항체)과 유기 화합물 (예, 약물) 간의 공유 결합 형성은 상기 유기 화합물과 단백질 둘다와 공유적으로 결합된 "링커"나 "링커 모이어티"를 통해 이루어질 수 있다. 그 예들은 아래에 기술한다.

[0035] 본원에서, 용어 "링커" 또는 "링커 모이어티"는 공유적으로 또는 비공유적으로, 예를 들어 이온 결합, 수소 결합 또는 반 데르 발스 상호작용을 통해 2개의 다른 분자 모이어티들을 연결하는 분자 모이어티를 지칭한다. 구체적인 예는 아래에 제공된다. "연결(Linkage)" 또는 "링커"는 2가지 그룹 간의 연결을 지칭한다.

[0036] "모이어티"는 본원에서 큰 분자의 도메인을 지칭하며, 예를 들어 접합체 T-DM1의 경우, 최종 산물에서 메이탄시노이드 약물 모이어티가 링커 모이어티를 통해 단일클론 항체 모이어티에 결합되도록, 메이탄시노이드 약물이 링커를 통해 단일클론 항체와 커플링된다. 이러한 모이어티들을 포함하는 접합체의 예는, 하기 식으로 표시되는 구조로서, 단일클론 항체인 트라스투주맵 (Herceptin[®])과 메이탄시노이드 마크로사이클릭 세포독성 화합물의 공유 접합체, T-DM1 분자 집합체이다:



[0037]

- [0038] 트라투주맵에 링커를 커플링하는 것은 라이신 잔기 등의 트라투주맵 단백질의 측쇄 아미노산 잔기의 질소에 링커 모이어티를 결합시킴으로써 이루어지는 것으로 생각된다. 트라투주맵의 분자 구조는 당해 분야에 널리 공지되어 있으며, 상세히 기술하진 않는다. 항체와 메이탄시노이드와 같은 세포자살 유발성 약물 등의 면역접합체를 제조하여, 본원 또는 본원에 원용에 의해 포함된 문헌에 기술된 방법으로 평가할 수 있다.
- [0039] 면역접합체는 하나 이상의 생활성 분자에 항체가 접합된 것을 포함한다. 전술한 바와 같이 면역접합체 T-DM1은 메이탄시노이드 모이어티가 단일클론 항체 모이어티에 커플링된 것이다. 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 저해하거나 미소관 탈중합을 유도함으로써 작용하는 유사분열 저해제이다. 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 튜블린 중합과 탈중합은 유사분열, 세포 분열에 수반되는 필수 반응이다. 세포 분열의 장기간 억제는 유사분열이 억제된 세포에서 세포자살을 유도할 수 있는 상태인 것으로 보인다.
- [0040] 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)에서 처음 분리되었다 (미국 특허 3,896,111). 이후에, 일부 미생물들이 메이탄시놀과 C-3 메이탄시놀 에스테르 등의 메이탄시노이드를 생산한다는 것이 발견되었다 (미국 특허 4,151,042). 합성 메이탄시놀과 이의 유도체 및 유사체들은 예컨대 미국 특허 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 기술되어 있다.
- [0041] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, (i) 발효 또는 발효 산물의 화학적 변형 또는 유도체화에 의한 제조가 상대적으로 용이하고, (ii) 비-이황화 (비-환원성) 링커를 통해 항체에 접합시키기 적합한 관능기를 가진 유도체화가 용이하며, (iii) 혈장내에서 안정적이며, (iv) 다양한 종양 세포주들에 효과적이기 때문에, 항체-약물 접합체의 매력적인 약물 모이어티이다.
- [0042] 메이탄시노이드 약물 모이어티로서 사용하기에 적합한 메이탄신 화합물들은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 유전자 조작 기법을 이용하여 제조하거나 또는 공지 방법에 따라 천연 자원으로부터 분리할 수 있다 (Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973). 메이탄시놀과 메이탄시놀 유사체들 역시 공지 방법에 따라 합성 제조할 수 있다.
- [0043] 메이탄시노이드 약물 모이어티는, 방향족 고리, 예컨대: C-19-테클로로 (미국 특허 4,256,746) (안사미톡신 P2의 리튬 알루미늄 하이드라이드 환원에 의해 제조됨); C-20-하이드록시 (또는 C-20-데메틸) +/-C-19-테클로로 (미국 특허 4,361,650 및 4,307,016) (스트렙토마이세스 또는 액티노마이세스를 이용한 탈메틸화에 의해, 또는 LAH를 이용한 탈염소화에 의해 제조됨); 및 C-20-데메톡시, C-20-아실옥시 (-OCOR), +/-테클로로 (미국 특허 4,294,757) (아실 클로라이드를 이용한 아실화에 의해 제조됨), 및 다른 위치에서 변형된 화합물 등의, 변형된 방향족 고리를 가진 것을 포함한다.
- [0044] 메이탄시노이드 약물 모이어티의 예로는, 또한, C-9-SH (미국 특허 4424219) (메이탄시놀을 H₂S 또는 P₂S₅와 반응시켜 제조됨); C-14-알콕시메틸 (데메톡시/CH₂ OR) (US 4,331,598); C-14-하이드록시메틸 또는 아실옥시메틸 (CH₂OH 또는 CH₂OAc) (미국 특허 4,450,254) (노카르디아로부터 제조됨); C-15-하이드록시/아실옥시 (US 4,364,866) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 변환을 통해 제조됨); C-15-메톡시 (미국 특허 4,313,946 및 4,315,929) (트레위아 누들플로라 (*Trewia nudiflora*)에서 분리됨); C-18-N-데메틸 (미국 특허 4,362,663 및 4,322,348) (스트렙토마이세스에 의한 메이탄시놀의 탈메틸화를 통해 제조됨); 및 4,5-데옥시 (US 4,371,533) (메이탄시놀의 티타늄 트리클로라이드/LAH 환원에 의해 제조됨) 등의 변형을 가진 것을 포함한다.
- [0045] "아우리스타틴 (auristatin)"은, 본원에서, 미소관 다이내믹스, GTP 가수분해 및 핵과 세포 분열을 방해하며 (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother* 45(12):3580-3584), 항암 활성 (미국 특허 5,663,149)과 항진균 활성 (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother* 42:2961-2965)을 가지는 것으로 입증된, 돌라스타틴과 아우리스타틴 등의 펩타이드 항암제를 지칭한다. 예를 들어, 미국 특허 5,635,483과 5,780,588을 참조한다.
- [0046] "대조군" 개체는 유사한 타입의 상관성 등의 테스트 개체와 동일한 특징을 가진 개체이다. 대조군 개체는, 예를 들어, 테스트 개체에 처리 또는 검사시 거의 또는 완전히 동시에 검사할 수 있다. 대조군 개체는 또한 예를 들어 테스트 개체를 검사하는 시기와 다른 시기에 검사할 수도 있으며, 대조군 개체의 검사 결과를 기록하여, 기록 결과를 테스트 개체의 검사를 통해 수득한 결과와 비교할 수 있다.
- [0047] "테스트" 개체는 치료 중인 개체이다.

- [0048] 본원에서, 화합물의 "유도체"는, H를 알킬, 아실 또는 아미노기로 치환하는 것과 같이, 한 단계 이상으로 유사한 구조를 가진 다른 화합물로부터 제조할 수 있는 화학적 화합물을 지칭한다.
- [0049] "질환"은, 개체가 항상성을 유지할 수 없으며, 질환이 완료되지 않을 경우 개체의 건강이 계속 악화되는, 개체의 건강 상태이다. 이와는 대조적으로, 개체의 "장애"는, 개체가 항상성을 유지할 수 있지만, 개체의 건강 상태가 장애가 없을 경우에 비해서는 좋지 않은, 건강 상태이다.
- [0050] 질환, 병태 또는 장애는, 질환 또는 장애의 증상 중증도, 이러한 증상이 환자에서 발병하는 빈도, 또는 이 2가지 모두가 감소된다면, "완화된다".
- [0051] 본원에서, "유효량"은 질환 또는 장애의 증상 완화 등의 정해진 효과를 구현하는데 충분한 양을 의미한다. 2 이상의 화합물을 투여하는 경우, 다른 화합물(들)과 조합하여 투여하는 경우 각 화합물의 양은 화합물 단독 투여시와는 다를 수 있다.
- [0052] 본원에서, 용어 "에스트로겐"은, 에스트로겐 반응성 세포에서 세포 증식 유도력 및/또는 새로운 단백질 합성 개시력이 입증된, 천연 및 합성 제조된 화합물을 비롯한, 화합물 유형이다. 천연 에스트로겐으로는 에스트론(E1), 에스트라디올-17β (E2) 및 에스트리올 (E3)이 있으며, 그 중 에스트라디올이 가장 약리학적으로 유효하다.
- [0053] 합성 에스트로겐은, 천연적으로는 만들어지지 않으며, 내인성 에스트로겐의 활성을 어느 정도 복제하거나 모방하는, 화합물이다. 이들 화합물로는 다양한 스테로이드계 및 비-스테로이드계 화합물이 있으며, 그 예로는 다이엔에스트롤(dienestrol), 벤즈에스트롤(benzestrol), 헥스에스트롤(hexestrol), 메트에스트롤(methestrol), 다이에틸 스틸베스트롤 (DES: diethyl stilbestrol) 퀴네스트롤 (quiestrol) (Estrovis), 클로로트리아니센(chlorotrianisene) (Tace), 및 메탈렌에스트릴(methallenestril) (Vallestril)를 포함한다.
- [0054] 본원에서, 용어 "에스트로겐 길항제"는 에스트로겐과 동시에 투여하였을 때 에스트로겐의 활성을 중화 또는 저해하는 효과를 가진 화합물이다. 에스트로겐 저해제의 예로는 타목시펜(tamoxifen)과 토레미펜(toremifene)을 포함한다.
- [0055] 본원에서, "기능성" 분자는 특징적인 특성이나 활성을 나타내는 형태의 분자이다. 기능성 효소는 예를 들어 효소를 특정화하는 특징적인 촉매 활성을 나타내는 효소이다.
- [0056] 본원에서, 용어 "호르몬 고갈 요법"은 환자로부터 호르몬 작용을 차단하거나 또는 (호르몬의 합성을 방지하거나 호르몬의 파괴를 강화함으로써) 호르몬의 존재를 제거하는, 모든 환자 치료법이다. 특수 유방암 사례에서는, 호르몬 결핍 요법은 에스트로겐의 생합성을 차단하거나 또는 HER2 등의 에스트로겐 수용체에 대한 에스트로겐의 작용을 차단함으로써, 에스트로겐을 고갈시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0057] 본원에서, 용어 "호르몬 반응성 세포/조직"은, 호르몬의 존재 하에 새로운 단백질의 합성을 개시하거나 및/또는 증식하는, 예를 들어, 에스트로겐 또는 안드로겐에 본래대로 반응하는 비-암성 세포 또는 조직이다. 호르몬 반응성 조직으로는 유방, 고환, 전립선, 자궁 및 자궁 경부를 포함한다. 본래 에스트로겐이나 안드로겐에 반응하는 조직은 그 호르몬에 대한 반응성을 상실할 수도 있다. 즉, "호르몬 반응성 조직"은 본원에서 광의의 용어이며, 본래 호르몬에 반응하는 호르몬-민감성 및 호르몬-둔감성 조직 둘다를 포괄한다. "에스트로겐 반응성 세포/조직"은 에스트로겐에 반응하는 세포/조직이다.
- [0058] 본원에서, 용어 "호르몬 반응성 암"은 호르몬 반응성 세포/조직으로부터 유래된 세포 또는 조직이며, "적응형 호르몬 반응성 암 세포"는 대응되는 호르몬 반응성 세포에서는 반응하지 않는 호르몬 수준에서 반응하여 증식하는 호르몬 반응성 암 세포이다.
- [0059] 전술한 바와 같이, 에스트로겐 생산을 차단하는 아로마타제 저해제 또는 타목시펜 등의 에스트로겐 길항제와 같은 물질이나, 또는 유사한 에스트로겐-차단 효과를 가진 기타 물질에 노출되면, 에스트로겐 반응성 암 세포는, 유방암에서 나타나는 바와 같이, 조직내 에스트로겐 수준 감소에 대해 내성을 발현할 수 있다. 이런 경우, 아로마타제 저해제를 사용하는 것은 더 이상 유방암을 통제하는데 유효하지 않다. 이러한 암에 연루된 세포는, 본원에서, "장기간 에스트로겐 고갈된", "호르몬 내성" 또는 "호르몬 불응성" 세포라고 지칭되며, 거시적인 질환은 상호 호환적으로 "호르몬 내성" 또는 "호르몬 불응성" 유방암으로 지칭된다. 그러나, "호르몬 내성" 또는 "호르몬 불응성" 세포와 암은 물론 다른 기전을 통해 생길 수 있다.
- [0060] 본원에서, 용어 "적응형 호르몬 반응" 또는 "적응 반응"은, 호르몬 반응성 조직으로부터 유래된 세포 또는 조직이, 이전에는 이들 세포에서 반응을 형성시키지 못하는 호르몬 수준에 반응 (즉, 증식하거나 및/또는 새로운 단

백질 합성을 개시) 할 수 있게 되는 프로세스이다.

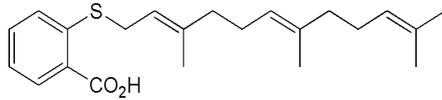
- [0061] 용어 "저해한다"는, 본원에서, 용어 "저해한다"가 사용되는 문맥에 언급된 기능, 수준, 활성, 합성, 방출, 결합 등을 감소시키거나 또는 방해하는 화합물 또는 임의 제제의 능력을 의미한다. 바람직하게는, 저해는, 적어도 10%이며, 더 바람직하게는, 적어도 25%, 보다 더 바람직하게는, 적어도 50%이며, 가장 바람직하게는, 기능은 적어도 75%까지 저해된다. 용어 "저해한다"는 "감소시킨다" 및 "차단한다"와 상호 호환적으로 사용된다.
- [0062] 용어 "단백질을 저해한다"는, 본원에서, 단백질 합성, 수준, 활성 또는 기능을 저해하며, 뿐만 아니라 대상 단백질의 합성, 수준, 활성 또는 기능의 유도 또는 자극을 저해하는, 모든 방법 또는 기법을 지칭한다. 또한, 이 용어는 대상 단백질의 합성, 수준, 활성 또는 기능을 조절할 수 있는, 모든 대사 또는 조절 경로를 지칭한다. 이 용어는 다른 분자와의 결합과 복합체 형성을 포함한다. 따라서, 용어 "단백질을 저해한다"는, 적용시 단백질 기능 또는 단백질 경로 기능을 저해하는 임의의 물질 또는 화합물을 나타낸다. 그러나, 이 용어는 이들 기능들 각각 그리고 모두가 동시에 저해되어야 한다는 것을 암시하는 것은 아니다. "저해제"는 이들 기능들 중 임의의 기능을 수행할 수 있으며, 예를 들어, 아로마타제 저해제는 아로마타제 효소 (단백질)가 전구체를 에스트로겐으로 변환시키는 생합성 촉매 활성을 차단한다.
- [0063] 본원에서, 용어 "mTOR 활성의 저해"는, 예를 들어 p70 S6K 및 PHAS-I 등의, 임의의 기질 하나 이상을 인산화하는 mTOR 능력을 검출가능한 수준으로 감소하는 것을 나타낸다. mTOR 저해제는 mTOR 활성에 대해 직접적인 저해 효과를 나타내는 (즉, mTOR 활성의 저해는 상류 경로 효소에 대한 저해 효과를 통해 매개되지 않는) 화합물이다.
- [0064] 본원에서, "교시 자료"는, 본원에 인용된 다양한 질환 또는 장애를 완화시키기 위한 키트에서, 본 발명의 화합물의 유용성을 전달하기 위해 사용할 수 있는, 간행물, 기록, 도표 또는 기타 모든 표시 매체를 포함한다. 선택적으로, 또는 다른 예로, 상기 교시 자료는 개체에서 질환 또는 장애를 완화하는 한가지 이상의 방법을 설명할 수 있다. 본 발명에 따른 키트의 교시 자료는, 예를 들어, 본 발명의 동정된 화합물을 포함하는 용기에 부착되거나 또는 동정된 화합물이 포함된 용기와 함께 수송될 수 있다. 다른 예로, 교시 자료는, 수용자에게 교시 자료와 화합물이 함께 사용되도록 하는 의도로 용기와는 별도로 수송될 수 있다.
- [0065] 본원에서, "리간드"는 타겟 화합물 분자에 특이적으로 결합하는 화합물이다. 리간드가 이중 화합물들로 구성된 샘플에서 화합물의 존재를 측정할 수 있는 결합 반응에서 기능하는 경우, 리간드는 화합물에 "특이적으로 결합"하거나 또는 화합물과 "특이적으로 반응"하는 것이다.
- [0066] "수용체"는 리간드에 특이적으로 결합하는 화합물 또는 분자이다.
- [0067] 본원에서, 용어 "핵산"은 RNA 뿐만 아니라 단일 가닥 및 이중 가닥의 DNA 및 cDNA를 포괄한다. 아울러, 용어 "핵산", "DNA", "RNA" 및 유사 용어는 또한 핵산 유사체, 즉, 포스포다이에스테르 백본 이외의 것을 가진 유사체를 포함한다.
- [0068] 용어 "펩타이드"는 전형적으로 짧은 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0069] "폴리펩타이드"는 아미노산 잔기로 구성된 폴리머, 관련된 천연 구조 변이체 및 펩타이드 결합을 통해 연결된 임의의 합성 비-천연 유사체, 관련 천연 구조 변이체 및 임의의 합성 비-천연 유사체를 지칭한다. 합성 폴리펩타이드는, 예를 들어, 자동 폴리펩타이드 합성기를 이용하여 합성할 수 있다.
- [0070] 용어 "단백질"은 전형적으로 큰 폴리펩타이드를 지칭한다.
- [0071] "재조합 폴리펩타이드"는 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현시 제조되는 것이다.
- [0072] 용어 "적용 당(per application)"는 본원에서 개체에게 약물 또는 화합물의 투여를 지칭한다.
- [0073] 본원에서, 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 포스페이트 완충화된 염수액, 물, 오일/물 또는 물/오일 에멀전 등의 에멀전, 및 다양한 타입의 습윤제와 같은, 임의의 표준적인 약제학적 담체를 포함한다. 또한, 이 용어는 미국 연방 정부의 규제 기관으로부터 승인받거나 또는 인간을 비롯한 동물에 대한 용도로 미국 약전에 열거된 임의의 제제를 포괄한다. "약제학적으로 허용가능한 염"은, 규제 기관으로부터 승인받거나 또는 미국 약전에 열거된 측면에서 약제학적으로 허용가능한, 반대 이온과의 염 형태인, 산성 또는 염기성 분자 집합체를 지칭한다.
- [0074] 본원에서, 용어 "생리학적으로 허용가능한" 에스테르 또는 염은, 약학 조성물의 다른 임의의 성분과 혼용가능하며, 조성물을 투여하는 개체에 유해하지 않은, 활성 성분의 에스테르 또는 염 형태를 지칭한다.

- [0075] 용어 "예방한다"는, 본원에서, 어떤 사건의 발생을 정지시키거나, 가능하거나 또는 발생 가능성이 있는 어떤 일들에 대한 선행 조치를 취하는 것을 의미한다. 의학적인 측면에서, "예방"은 일반적으로 질환 또는 병태를 앓을 가능성을 줄이기 위해 취해지는 행위를 지칭한다.
- [0076] 본원에서, 말단 아미노기와 관련된 "보호기"는, 말단 아미노기가 펩타이드 합성에 전통적으로 채택되는 다양한 아미노-말단 보호기들 중 임의의 것과 커플링된, 펩타이드의 말단 아미노기를 지칭한다. 이러한 보호기로는, 예를 들어, 포르밀, 아세틸, 벤조일, 트리플루오로아세틸, 숙시닐 및 메톡시숙시닐 등의 아실 보호기; 벤질 옥시카르보닐 등의 방향족 우레탄 보호기; 및 tert-부톡시카르보닐 또는 아다만틸옥시카르보닐 등의 지방족 우레탄 보호기를 포함한다. 적합한 보호기로는 Gross and Mienhofer, eds., *The Peptides*, vol. 3, pp. 3-88 (Academic Press, New York, 1981)을 참조한다.
- [0077] 본원에서, 말단 카르복시기와 관련하여 "보호기"는, 말단 카르복시기가 다양한 카르복시-말단 보호기 중 임의의 것과 커플링된, 펩타이드의 말단 카르복시기를 지칭한다. 이러한 보호기로는 예컨대, tert-부틸, 벤질, 또는 에스테르 또는 에테르 결합을 통해 말단 카르복시기에 연결된 다른 허용가능한 기들을 포함한다.
- [0078] 본원에서, 용어 "정제된" 및 유사 용어는 본래의 환경에서 분자 또는 화합물과 정상적으로 조합된 다른 성분들에 비해 분자나 화합물이 상대적으로 농화된 것을 지칭한다. 용어 "정제된"은 반드시 특정 분자의 전체 순도가 프로세스 중에 달성됨을 나타내는 것은 아니다. "고도로 정제된" 화합물은, 본원에서, 순도가 90% 보다 높은 화합물을 지칭한다.
- [0079] 용어 "조절한다"는 대상 기능이나 활성을 자극 또는 저해하는 것을 지칭한다.
- [0080] "샘플"은 본원에서 비제한적인 예로, 정상 조직 샘플, 질병에 걸린 조직 샘플, 생검, 혈액, 체액, 변, 정액, 눈물 및 뇨 등의 대상으로부터 유래된 생물 샘플을 지칭한다. 또한, 샘플은 대상 세포, 조직 또는 체액을 함유한 개체로부터 획득된 임의의 다른 물질 소스일 수도 있다.
- [0081] 용어 "특이적으로 결합한다"는, 본원에서, 분자가 샘플에서 특정 분자는 인지하여 결합하지만, 샘플내 다른 분자는 실질적으로 인지 또는 결합하지 않거나, 또는 세포 조절 프로세스의 일부분으로서 샘플내 다른 분자를 실질적으로 인지하거나 결합하지 않는 2 이상의 분자들 간의 결합을 지칭한다.
- [0082] 용어 "표준"은, 본원에서, 비교용으로 사용되는 것을 지칭한다. 예를 들어, 테스트 화합물을 사용하는 경우 결과를 비교하기 위해 투여 또는 첨가 및 사용되는 기지의 표준 물질 또는 화합물일 수 있거나, 또는 물질 또는 화합물이 파라미터 또는 기능에 미치는 효과를 측정하는 경우에 대조 값을 획득하기 위해 측정되는 표준 파라미터 또는 기능일 수 있다. 또한, 표준은, 샘플에 기지량으로 첨가되며, 대상 마커를 측정하기 전에 샘플을 정제 또는 추출 공정으로 가공 또는 수행하는 경우에 그러한 것들의 정제 또는 회수 비율을 결정하는데 유용한, 물질 또는 화합물 등의 "내부 표준 물질"을 지칭할 수도 있다. 내부 표준 물질은 종종 방사성 동위원소와 같은 것으로 표지된 정제된 대상 마커이며, 따라서 내인성 마커와 구분할 수 있다.
- [0083] 진단 또는 치료의 "대상"은 인간을 비롯한 포유류이다.
- [0084] 용어 "증상"은, 본원에서, 환자가 경험하게 되며 질병을 표시하는 모든 병적 현상 또는 구조, 기능 또는 감정 측면에서 정상적인 상태로부터의 이탈을 지칭한다. 반면에, 신호는 질병의 객관적인 증거이다. 예를 들어, 코피는 신호이다. 이는 환자, 의사, 간호사 및 그의 목격자에게 명확한 것이다.
- [0085] 본원에서, 용어 "치료하는"은, 특정 질환, 장애 또는 병태의 예방, 또는 특정 질환, 장애 또는 병태와 관련된 증상의 완화, 및/또는 상기 증상의 예방 또는 완치를 포함할 수 있다. "예방" 치료는 질병의 신호를 발현하지 않거나 질병과 관련된 병리학적 이상이 발생된 위험성을 낮추기 위한 목적으로 질병의 초기 신호만을 나타내는 개체에게 투여되는 치료이다. "치료하는"은 본원에서 "치료와" 상호 호환적으로 사용된다. 예를 들어, 암 치료는 암 세포의 증식 및/또는 분열 방지 또는 서행 뿐만 아니라, 암 세포의 사멸 또는 종양의 크기 축소를 포함한다. 성공적인 암 치료에 대한 부가적인 신호는 백혈구 세포수, 적혈구 세포수, 혈소판 수, 적혈구 침강 속도 및 트랜스아미나제 및 히드로게나제 등의 다양한 효소 수준과 같은 검사의 정상화를 포함한다. 아울러, 임상 의는 전립선 특이 항원 (PSA)와 같은 검출가능한 종양 마커의 감소를 관찰할 수도 있다.
- [0086] "치료학적" 치료는 병리학적 이상의 신호를 낮추거나 없애기 위한 목적으로 병리학적 이상의 신호를 나타내는 개체에게 투여되는 치료이다.
- [0087] 화합물의 "치료학적 유효량"은 화합물이 투여되는 개체에게 유의한 효과를 제공하기에 충분한 화합물의 양이다.

[0088] 본 발명의 방법에 대한 다양한 구현예들에서, 면역접합체는 전술한 면역접합체들 중 임의의 것일 수 있다. T-DM1의 구조는 상기에 제시되어 있다.

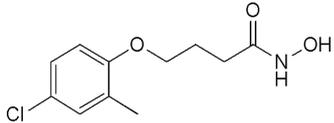
[0089] 본원에 언급된 세포자살 유발성 약물은 하기 화합물을 포함한다:

[0090] FTS (살리라십(Salirasib)[®])



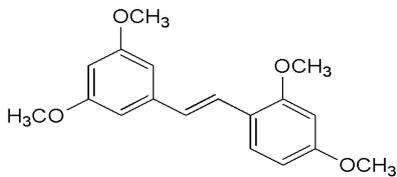
[0091]

[0092] CMH (드록시노스타트(droxinostat))



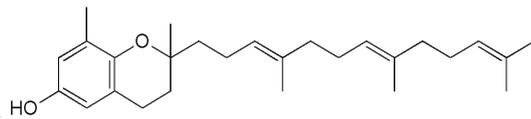
[0093]

[0094] TMS (2',3,4',5-테트라메톡시스틸벤)



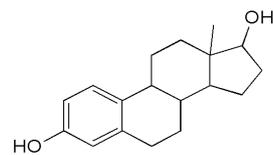
[0095]

[0096] δ-토코트리엔올



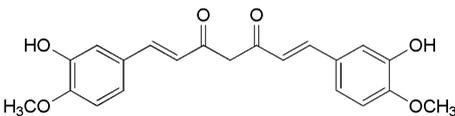
[0097]

[0098] 에스트라디올 (E2)



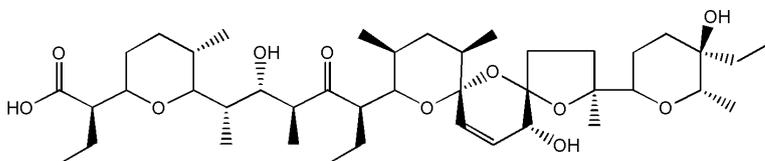
[0099]

[0100] 커큐민



[0101]

[0102] 살리노마이신



[0103]

[0104] 구현예들

[0105] 본 발명은, 다양한 구현예들에서, 본원에 기술되고 청구된 바와 같이, 세포 사멸 (세포자살)을 유도하는 물질들의 상가적인 또는 상승적인 조합을 이용함으로써, 암 세포의 내성 발생이 발생되거나 또는 발생 가능성이 높은

질병 상태에 적합한 항암 치료제를 개발하는 것에 관한 것이다. 이러한 방법을 이용함으로써, 암 세포에서의 약물 내성 발생을 단일 항암제를 이용하는 경우의 내성 발생 비율 보다 낮출 수 있거나, 또는 이미 치료제에 대해 적응 돌연변이가 발생한 암 세포에서 내성을 극복할 수 있다. 다양한 구현예들에서, 본 발명의 방법은, 아나스트라졸 등의 아로마타제 저해제를 이용하거나, 또는 타목시펜 등의 에스트로겐 수용체 조절제나 길항제를 사용하는 등의, 1차 치료제에 암이 더 이상 반응하지 않는 경우, 호르몬 내성 유방암을 치료하는데 유효할 수 있다.

[0106] 예를 들어, 치료제 내성 암은 유방암, 예컨대, 아로마타제-내성 유방암, 타목시펜-내성 유방암, ER+ 호르몬 불응성 유방암 또는 HER2 발현이 상향 조절된 암 세포를 함유한 유방암 (HER2 양성 유방암), 또는 이들의 임의 조합일 수 있다.

[0107] 진술한 바와 같이, 아로마타제 저해제 또는 에스트로겐 길항제로 치료를 받아 온 환자에서, 장기간 에스트로겐 고갈된 세포, 예컨대, 에스트로겐 반응성 유방암 세포는, 유방 조직에서 정상적으로 확인되는 수준 보다 훨씬 낮은 수준의 에스트로겐에 대해 증가된 수준의 반응성을 나타낼 수 있다. 이러한 현상은, HER2를 코딩하는 유전자 등의 HER 수용체를 코딩하는 유전자의 상향 조절 및 과다 발현으로 인해 발생할 수 있다. 아로마타제 저해제 또는 에스트로겐 길항제 등의 1차 치료제로 치료받은 유방암 환자의 경우, 이러한 세포는 정상적인 에스트로겐 수준의 부재 하에 증식할 수 있어, 이들 1차 치료제에 대해 내성이 발현된 유방암 세포가 생겨나게 되며, 즉, 호르몬 내성 또는 호르몬 불응성 유방암 세포가 된다. 이러한 질병 상태에서는, 2차 치료제의 사용이 환자 생존에 있어 중요해진다. 다양한 구현예들에서, 본 발명은, 이러한 기전에 대해 내성이 발현된 암 등의, 호르몬 내성 유방암을 치료하기 위한 2차 치료제를 제공한다.

[0108] 본 발명자들은, 타겟 세포의 증식만을 저해하기 보다는, 내성 암 세포를 소멸시킴으로써, 타겟 세포에서의 적응 돌연변이의 발생 빈도를 낮추기 위해, 증식 저해 전략으로서 보다 바람직한 것으로서, 세포자살 유발 전략을 채택하였다. 또한, 본 발명자들은, 각각이 세포자살 및 세포 사멸을 유도하는 결과를 초래할 수 있는, 수평적으로, 즉, 2가지의 다른 경로들로 작용하는 ("수평 조절"), 2 종 이상의 세포자살 유발 물질의 사용이, 내성 발현 빈도가 감소되는 세포자살 유도에 있어 상가적이거나 상승적인 효과를 제공함을 발견하여, 이를 기술한다. 호르몬 내성 유방암 세포의 치료에 수반되는 2차 치료에서는, 세포자살 유발 전략으로 세포사멸을 유도함으로써 추가적인 적응 돌연변이 발생 가능성을 낮출 수 있다. 추가적인 수평 조절의 적용은, 적응 돌연변이 유발에 의해 세포가 세포자살을 회피할 가능성을, 단일 세포자살 유도 기전이 발생시킬 수 있는 것 보다 훨씬 높은 수준으로 추가로 낮출 수 있는데, 사멸되기 전에 단일 세포에서 2가지 내성 기전이 발생할 가능성은 한가지 내성 기전이 발생할 가능성 보다 낮다.

[0109] 세포자살은 사멸 수용체 경로 (외인성 경로) 또는 미토콘드리아 매개 경로 (내인성 경로)를 통해 이루어질 수 있다. 본원에서, 본 발명자들은, 잘 확립된 세포주, 예를 들어, 호르몬 불응성 유방암 모델로서, 타목시펜 내성 (TamR) 및 장기간 에스트로겐 고갈된 (LTED) 세포주, 그리고 비교를 위한 야생형 MCF-7 및 T47D 세포주에서, 호르몬-적응된 암 세포를 사멸시키는데 유효한 개별 분자 기전들을 통해 세포자살을 야기하도록 작용하는 한쌍의 세포자살 유도 물질들 등의, 세포자살 유발성 항암제들의 상가적이고 상승적인 조합들을 예상치 못하게도 발견하게 되었다. 상승적인 작용은, 2가지 세포자살 유발성 항암제가 다른 기전으로 세포자살을 유도하는 경우에 달성될 가능성이 가장 높을 것으로 생각된다.

[0110] 다양한 구현예들에서, 본 발명의 치료 방법은 암 치료, 특히 유방암에 대해 상승적인 치료학적 효과를 제공한다. 본 발명은, 특정 약물들의 조합이 유방암 세포 치료시 상승적인 작용을 제공한다는 놀라운 사실을 개시한다. 일 구현예에서, FTS와 CMH를 이용한 조합 치료가 상승적인 작용을 제공하는 것으로 확인된다. 일 구현예에서, TMS와 CMH를 이용한 조합 치료가 상승적인 작용을 제공한다. 이에, 본 발명은, FTS, TMS 및 CMH 뿐만 아니라 비슷한 활성을 가진 약물을 이용한 조합 치료제를 추가로 포괄하며, 이들 2종 이상의 약물을 함께 투여하면 유방암, 예컨대 호르몬 불응성 유방암 및 호르몬 내성 유방암의 치료 등에 있어 상승적인 치료학적 효과를 제공할 수 있다. 예를 들어, FTS와 ES를 이용한 조합이 높은 상승 작용을 놀랍게도 제공한다.

[0111] 일부 구현예들에서, T-DM1과, E2, FTS 및 CMH 중 어느 것과의 조합이 상승적인 작용을 제공해주며, T-DM1과 FTS 또는 CMH와의 조합이 가장 강력한 상승 작용을 제공해준다. 아래 표 1을 참조한다.

[0112] 본원에서, 본 발명자들은, 유방암 등의 암을 앓고 있는 환자에게, 수평 조절을 통해 세포에 작용하는 2 이상의 세포자살 유발성 항암제를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법을 개시하며, 여기서, 상기 항암제 2종은, 한가지 세포자살 경로의 순차적인 단계들 (수직 조절)이기 보다는 별개의 세포자살 경로들에 작용한다. 외인성 경로에는 사멸 수용체가 관여하며, 이 경로는 사멸 수용체에 결합하는 리간드에 의해 달성된다. 내인성 경로는

세포자살을 개시하는 미토콘드리아 경로가 관여한다. 수평은 2가지 이상의 특정 경로에 작용하는 자극을 지칭하는데 반해, 수직은 동일 경로의 여러 단계가 관여하는 것을 의미한다. 다양한 구현예들에서, 적어도 2종의 약물이 수평 조절을 달성한다. 다른 구현예들에서, 수평 조절은 2 이상의 약물들의 상승적인 작용을 제공한다. 다양한 구현예들에서, 2 이상의 약물을 이용하는 본 발명의 조합 치료법은 비-적응형 유방암 세포에 대해 상승적인 작용을 발휘한다.

[0113] 본 발명의 방법은, 다양한 구현예들에서, 단일클론 항체 모이어티와, 그것에 링커 모이어티를 통해 연결된 제1 세포자살 약물 모이어티를 포함하는 면역접합체를 유효량으로 암 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 단계; 및 제2 세포자살 유발성 약물을 유효량으로 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 면역접합체는 아래에서 보다 상세하게 기술된 바와 같이, 그것에 공유적으로 결합된 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 포함할 수 있다.

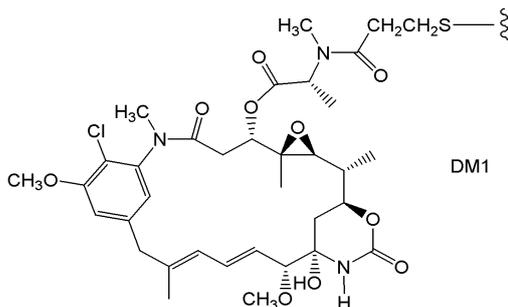
[0114] 예를 들어, 치료할 암은 유방암일 수 있다. 보다 구체적으로, 유방암은 적응 돌연변이를 겪은 장기간 에스트로겐 고갈된 세포의 증식으로 인해 생기는 등의, 호르몬 내성 (호르몬 불응성) 유방암일 수 있다. 호르몬 내성을 부여하는 일부 적응 돌연변이에 있어, 유방암은 HER2 내성 유방암으로 지칭된다. HER2 내성 유방암은, 물질과 이과 HER2 수용체와의 상호작용을 타겟팅하는 1차 치료제에 대해 내성을 제공하는 적응 돌연변이를 겪은, 유방암을 의미한다. 호르몬 내성을 부여하는 일부 적응 돌연변이에 있어, 유방암은 아로마타제 내성 유방암으로 지칭된다. 아로마타제 내성 유방암은 리아로마타제 치료에 내성이 된 유방암을 의미한다. 전술한 바와 같이, 아로마타제는 에스트로겐 생합성의 주요 단계에 참여하는 효소이다.

[0115] 다양한 구현예들에서, 면역접합체의 타겟팅 모이어티는 HER2 수용체에 결합한다. 아로마타제 또는 에스트로겐 길항제 요법에 대해 내성화된 암 세포의 경우, HER2 수용체의 과다 발현이 원인일 수 있다. 과다 발현이 발생되면, 이 수용체는 내성 암 세포에서 세포 당 선택적으로 훨씬 더 풍부해지게 되며, HER2 특이적인 단일클론 항체 타겟팅 모이어티가 존재하는 경우, 항체-약물 접합체가 세포 당 더 많은 분자에 결합할 수 있게 된다. 종양 세포 상에 위치한 면역접합체로 인해, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티는 높은 국소 농축이 달성될 수 있다. Liu C and Chari R, The development of antibody delivery systems to target cancer with highly potent maytansinoids, *Exp. Opin. Invest. Drugs* (1997) 6(2):169-172를 참조한다.

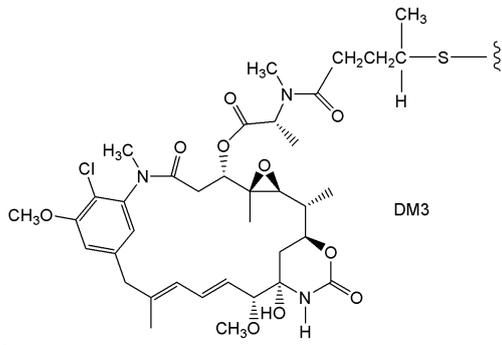
[0116] 이에, 다양한 구현예들에서, 본 발명의 방법은, 유방암인 암의 치료에 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 유방암은 아로마타제 내성 유방암일 수 있거나; 또는 유방암은 ER+ 호르몬 불응성 유방암 세포일 수 있거나; 또는 유방암은 HER2 양성 유방암일 수 있거나; 또는 유방암은 JER2 발현이 상향 조절된 암 세포를 포함한다. 다양한 구현예들에서, 전술한 면역접합체는 호르몬 내성 유방암 세포 등의 유방암 세포에서 발현되는 HER2 수용체에 결합한다. 예를 들어, 면역접합체의 단일클론 항체는 HER2 수용체에 특이적인 것으로 공지된 트라스투주맙일 수 있다.

[0117] 다양한 구현예들에서, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티는 미소관 탈중합제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 아우리스타틴일 수 있다. 예를 들어, 공유 접합체는 링커를 통해 메이탄시노이드 세포자살 유발성 항암제 모이어티와 공유적으로 결합된 트라스투주맙으로 필수적으로 구성될 수 있다.

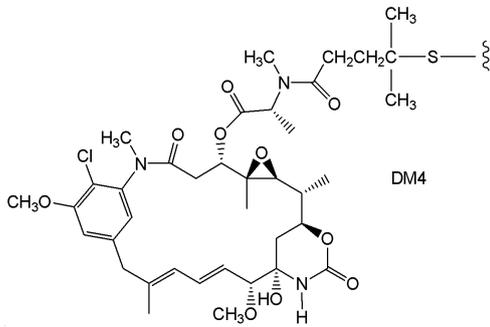
[0118] 단일클론 항체 타겟팅 모이어티와 접합될 수 있는 메이탄시노이드 약물 모이어티에 대한 예시적인 예로는, 하기 구조의 DM1; DM3; 및 DM4를 포함한다:



[0119]



[0120]



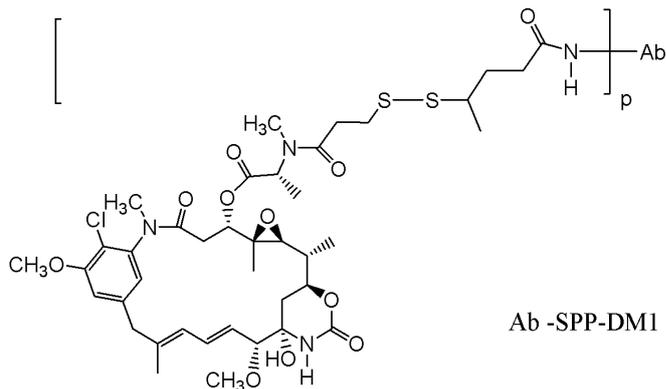
[0121]

[0122]

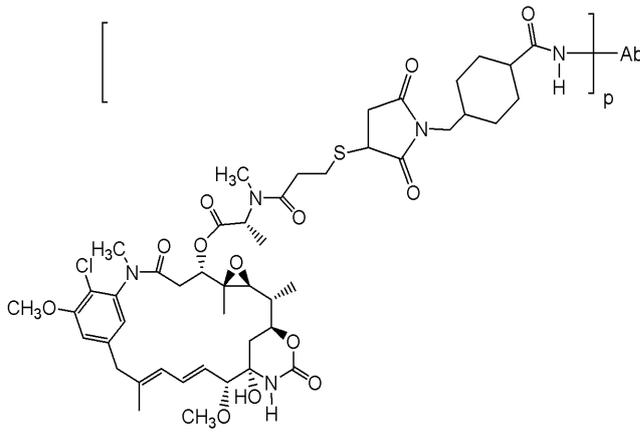
상기 식들에서, 물결 선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 약물의 황 원자가 공유 결합된 것을 나타낸다. DM1에 SMCC에 의해 연결된 HERCEPTIN[®](trastuzumab)은 보고되어 있다 (WO2005/037992; US 2005/0276812 A1).

[0123]

다양한 구현예들에서, 공유 면역접합체는 T-DM1 (구조는 위에 기재됨)이며, 즉, 상기 나타낸 바와 같이 DM1이 트라스투주맵에 공유적으로 커플링다. 다른 구현예들에서, 공유 면역접합체는, 트라스투주맵에 커플링된 DM3 또는 DM4 등의 다른 메이탄시노이드일 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시예에 사용되는 메이탄시노이드 항체-약물 접합체는 아래 구조를 가질 수 있으며 약칭될 수 있다 (Ab는 항체이고, p는 1 내지 약 8임):



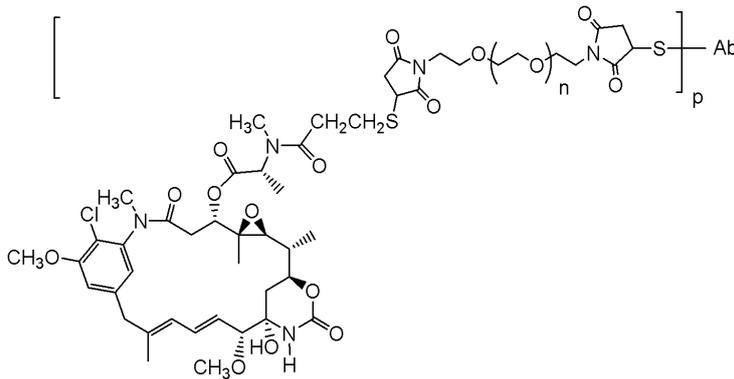
[0124]



Ab-SMCC-DM1

[0125]

[0126] DM1이 BMPEO 링커를 통해 항체의 티올기에 연결된 항체-약물 접합체의 예는 하기 구조를 가지며, 하기로 약칭된다:



[0127]

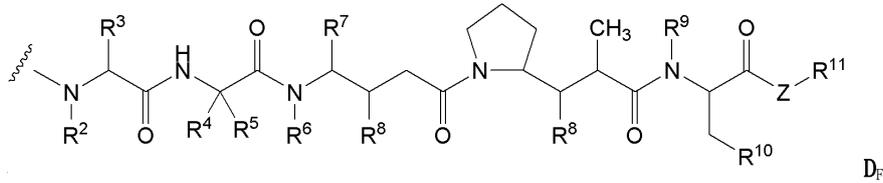
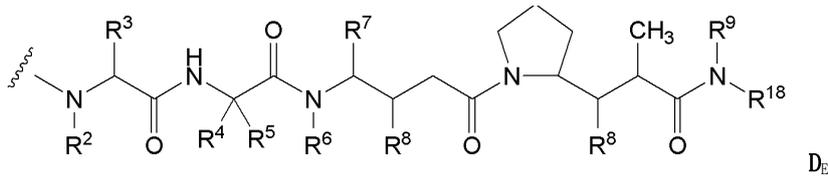
[0128] 상기 식에서, Ab는 항체이고, n은 0, 1 또는 2이고; p는 1, 2, 3 또는 4이다.

[0129] 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체, 이의 제조 방법, 및 이의 치료학적 용도는, 예를 들어, 미국 특허 5,208,020, 5,416,064, US 2005/0276812 A1과, 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 기술되어 있으며, 이들 문헌의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 명확하게 포함된다. Liu et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)에서는, 인간 결장직장 암에 대한 단일클론 항체 C242에 결합된 DM1으로 지정된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체를 개시하였다. 이 접합체는 배양한 대장암 세포에 대해 높은 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었으며, 생체내 종양 증식 분석에서도 항종양 활성이 확인되었다. Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992)에서는, 인간 대장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤라닝 항체 A7 또는 HER2/neu 온코진에 결합하는 다른 뮤라인 단일클론 항체 TA.1에, 이화화 링커를 통해 메이탄시노이드가 결합된 면역접합체를 개시하였다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포 당 HER2 표면 항원을 3×10^5 으로 발현하는 인간 유방암 세포주인 SK-BR-3에서 시험관내 실험 평가하였다. 이 약물 접합체는 메이탄시노이드 비함유 약물과 비슷한 수준의 세포독성을 나타내었으며, 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 높임으로써 증가시킬 수 있었다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타내었다.

[0130] 항체-메이탄시노이드 접합체는, 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성은 유의하게 감소시키지 않으면서, 메이탄시노이드 분자에 항체를 화학적으로 연결함으로써 제조된다. 예로, 미국 특허 5,208,020 (문헌의 내용은 원용에 의해 본 명세서에 명백하게 포함됨)을 참조한다. 항체 분자 당 평균 3-4개의 메이탄시노이드 분자가 결합된 것이, 항체의 기능 또는 용해성에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 타겟 세포의 세포독성을 강화하는데 있어 효과가 입증되었지만, 독소/항체 한 분자도 네이키드 항체를 사용하는 것에 비해서는 세포독성을 강화할 것으로 예상된다. 메이탄시노이드는 당해 기술 분야에서 널리 알려져 있으며, 천연 자원으로부터 분리하거나 또는 기정 기법으로 합성할 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는, 예를 들어, 미국 특허 5,208,020과 앞에서 언급한 기외 특허문헌 및 비특허 문헌들에 기술되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 또는 메이탄시놀 분자의 방향족 고리나 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르

화합물이다.

- [0131] 예를 들어, 미국 특허 5208020 또는 유럽 특허 0 425 235 B1; Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992); 및 US 2005/016993 A1에 개시된 것과 같이, 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하기 위한 연결 기들은 당해 기술 분야에서 다수개가 알려져 있으며, 상기 문헌들은 원용에 의해 본 명세서에 명확하게 포함된다. 링커 요소로 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 US 2005/0276812 A1, "항체-약물 접합체 및 제조방법"에 기술된 바와 같이 제조할 수 있다. 링커는, 상기 언급한 특허들에 개시된 바와 같이, 이황화 기, 티오에테르 기, 산 분해성 기(acid labile group), 광 분해성 기(photolabile group), 펩티다제 분해성 기 또는 에스테라제 분해성 기를 포함한다. 추가적인 링커들은 본원에 기술 및 예시된다.
- [0132] 다양한 구현예들에서, 공유 접합체는, 체내 도입 후, 효소 작용, 산 가수분해, 염기 가수분해 등에 의해서와 같이 연결이 절단되어, 2개의 개별 화합물이 형성되도록 선정된 링커 모이어티를 포함한다. 다른 구현예들에서, 링커 모이어티는, 세포자살 유발성 항암제 모이어티가 트라스투주맵과 같은 단일클론 항체 등의 타겟팅 모이어티와 여전히 연결된 상태로 세포독성 효과를 발휘할 수 있는, 생물학적 조건에서의 안정성으로 선택된다.
- [0133] 당해 기술 분야에서의 기존의 구조-활성 상관성 (SAR) 실험 데이터들, 화합물의 효능과 선택성이 여전히 높게 유지시키도록 가닥 (tether)에 부착시키기 위해 사용할 화합물과 분자 상의 최적의 위치 또는 위치들을 정하는 데 지침으로써 사용할 수 있다. 가닥 또는 링커 모이어티는 생활성 분자들을 함께 연결함에 있어 유용성이 입증된 것들 중에서 선택된다. 본원에서는 여러가지 조합들을 함께 부착하여, 이형 2가 (heterobivalent)의 치료학적 물질을 형성할 수 있는 화합물의 예들을 개시한다.
- [0134] 항체와 메이탄시노이드의 접합체는, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 2관능성 유도체 (예, 디메틸 아디피메이트 HCl), 활성 에스테르 (예, 다이숙신이미딜 서베레이트), 알데하이드 (예, 글루타르알데하이드), 비스-아지도 화합물 (예, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-다이아조늄 유도체 (예, 비스-(p-다이아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예, 톨루엔 2,6-다이이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물 (예, 1,5-다이플루오로-2,4-다이니트로벤젠) 등의, 다양한 2관능성 단백질 커플링제를 이용하여 제조될 수 있다. 특정 구현예에서, 커플링제는 이황화 연결을 제공하기 위한 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜다이티오)프로피오네이트 (SPDP) (Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) 또는 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)이다.
- [0135] 링커는 링커의 타입에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자와 결합될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기법을 이용하여 하이드록시 기와 반응함으로써 형성될 수 있다. 이 반응은 하이드록시기를 가진 C-3 위치에서, 하이드록시메틸로 변형된 C-14 위치에서, 하이드록시기로 변형된 C-15 위치에서, 그리고 하이드록시기를 가진 C-20 위치에서 발생할 수 있다. 일 구현예에서, 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C- 위치에서 형성된다.
- [0136] 면역접합체는, 본 발명의 치료 및 이용 방법에 대한 다양한 구현예들에서 사용될 수 있는 바와 같이, 전술한 메이탄시노이드 등의 미소관 탈중합체와 접합된 타겟팅 단일클론 항체를 포함하거나, 또는, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티로서 돌라스타틴 또는 돌라스타틴 펩타이드 유사체 또는 유도체, 예컨대 아우리스타틴을 포함할 수 있다 (미국 특허 5635483; 5780588). 돌라스타틴 및 아우리스타틴은 미소관 다이내믹스, GTP 가수분해 및 핵과 세포 분열을 방해하며 (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother* 45(12):3580-3584), 항암 활성 (미국 특허 5,663,149)과 항진균 활성 (Pettit et al (1998) *Antimicrob. Agents Chemother* 42:2961-2965)을 가지는 것으로 입증된 바 있다. 돌라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩타이드 약물 모이어티의 N(아미노) 말단 또는 C(카르복시) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).
- [0137] 아우리스타틴에 대한 예시적인 구현예는, Senter et al, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004에 개시된, N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 D_E 및 D_F이며, 상기 문헌의 내용은 그 전체가 원용에 의해 본 명세서에 포함된다. 하기에 그 예들을 나타낸다.
- [0138] 아우리스타틴과 유사한 세포자살 유발성 항암제 모이어티는 아래 식 D_E 및 D_F로부터 선택될 수 있다:



[0139]

[0140]

[0141] 상기 식에서, D_E 및 D_F 의 물결 선은 항체 또는 항체-링커 성분에 대한 공유 부착 부위를 나타내며, 각 위치에서 독립적으로:

[0142] R^2 는 H 및 C_1-C_8 알킬 중에서 선택되고;

[0143] R^3 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬- $(C_3-C_8$ 카르보사이클), C_3-C_8 헤테로 사이클 및 C_1-C_8 알킬- $(C_3-C_8$ 헤테로사이클) 중에서 선택되고;

[0144] R^4 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬- $(C_3-C_8$ 카르보사이클), C_3-C_8 헤테로 사이클 및 C_1-C_8 알킬- $(C_3-C_8$ 헤테로사이클) 중에서 선택되고;

[0145] R^5 는 H 및 메틸 중에서 선택되거나;

[0146] 또는 R^4 및 R^5 는 함께 연결되어 카르보사이클릭 고리를 형성하며 식 $-(CR^aR^b)_n-$ 를 가지되, 여기서 R^a 및 R^b 는 독립적으로 H, C_1-C_8 알킬 및 C_3-C_8 카르보사이클 중에서 선택되고, n은 2, 3, 4, 5 및 6 중에서 선택되고;

[0147] R^6 는 H 및 C_1-C_8 알킬 중에서 선택되고;

[0148] R^7 는 H, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클, 아릴, C_1-C_8 알킬-아릴, C_1-C_8 알킬- $(C_3-C_8$ 카르보사이클), C_3-C_8 헤테로 사이클 및 C_1-C_8 알킬- $(C_3-C_8$ 헤테로사이클) 중에서 선택되고;

[0149] 각각의 R^8 은 독립적으로 H, OH, C_1-C_8 알킬, C_3-C_8 카르보사이클 및 $O-(C_1-C_8$ 알킬) 중에서 선택되고;

[0150] R^9 는 H 및 C_1-C_8 알킬 중에서 선택되고;

[0151] R^{10} 은 아릴 또는 C_3-C_8 헤테로사이클 중에서 선택되고;

[0152] Z는 O, S, NH 또는 NR^{12} 이며, 여기서 R^{12} 은 C_1-C_8 알킬이고;

[0153] R^{11} 은 H, C_1-C_{20} 알킬, 아릴, C_3-C_8 헤테로사이클, $-(R^{13}O)_m-R^{14}$, 또는 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ 중에서 선택되고;

[0154] m은 1-1000의 정수이고;

[0155] R^{13} 은 C_2-C_8 알킬이고;

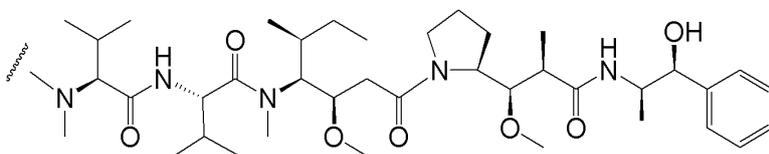
[0156] R^{14} 은 H 또는 C_1-C_8 알킬이고;

[0157] 각각의 경우의 R^{15} 은 독립적으로 H, COOH, $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_n-SO_3H$, 또는 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_8$ 알킬이고;

- [0158] 각각의 경우의 R¹⁶은 독립적으로 H, C₁-C₈ 알킬, 또는 -(CH₂)_n-COOH이고;
- [0159] R¹⁸은 -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-아릴, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈ 헤테로사이클), 및 -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈ 카르보사이클) 중에서 선택되고; 및
- [0160] n은 0 내지 6의 정수이다.
- [0161] 일 구현예에서, R³, R⁴ 및 R⁷은 독립적으로 이소프로필 또는 sec-부틸이고, R⁵는 -H 또는 메틸이다. 예시적인 구현예에서, R³ 및 R⁴는 각각 이소프로필이고, R⁵는 -H이고, R⁷은 sec-부틸이다.
- [0162] 또 다른 구현예에서, R² 및 R⁶는 각각 메틸이고, R⁹은 -H이다.
- [0163] 또 다른 구현예에서, 각각의 경우의 R⁸은 -OCH₃이다.
- [0164] 예시적인 구현예에서, R³ 및 R⁴는 각각 이소프로필이고, R² 및 R⁶는 각각 메틸이고, R⁵는 -H이고, R⁷은 sec-부틸이고, 각각의 경우의 R⁸은 -OCH₃이고, R⁹은 -H이다.
- [0165] 일 구현예에서, Z는 -O- 또는 -NH-이다.
- [0166] 일 구현예에서, R¹⁰은 아릴이다.
- [0167] 예시적인 구현예에서, R¹⁰은 -페닐이다.
- [0168] 예시적인 구현예에서, Z는 -O-이고, R¹¹은 -H, 메틸 또는 t-부틸이다.
- [0169] 일 구현예에서, Z는 -NH이고, R¹¹은 -CH(R¹⁵)₂이되, 여기서 R¹⁵은 -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂이고, R¹⁶은 -C₁-C₈ 알킬 또는 -(CH₂)_n-COOH이다.

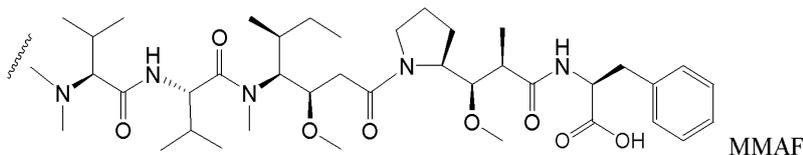
[0170] 다른 구현예에서, Z가 -NH이면, R¹¹은 -CH(R¹⁵)₂이며, 여기서 R¹⁵은 -(CH₂)_n-SO₃H이다.

[0171] 식 D_E의 아우리스타틴에 대한 예시적인 구현예는 MMAE이며, 여기서 물결 선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다:



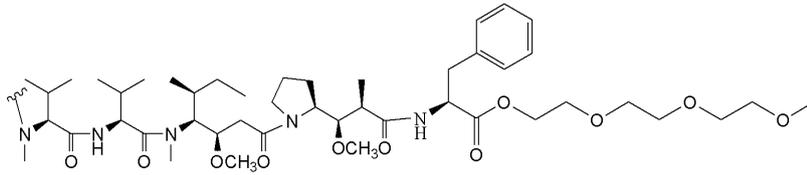
MMAE

- [0172]
- [0173] 식 D_F의 아우리스타틴에 대한 예시적인 구현예는 MMAF이며, 여기서 물결 선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다 (US 2005/0238649 및 Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124):

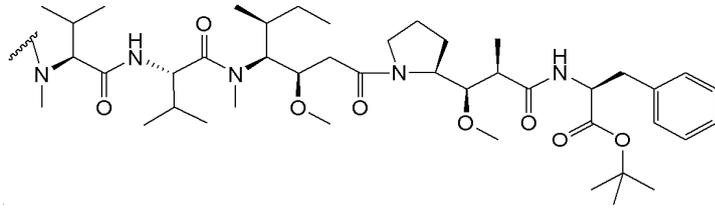


MMAF

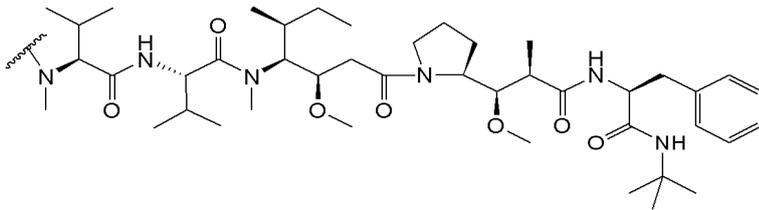
- [0174]
- [0175] 그외 약물 모이어티로는 아래 MMAF 유도체들을 포함하며, 여기서 물결 선은 항체-약물 접합체의 링커 (L)에 대한 공유 결합을 나타낸다:



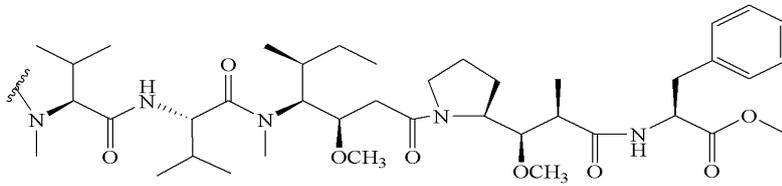
[0176]



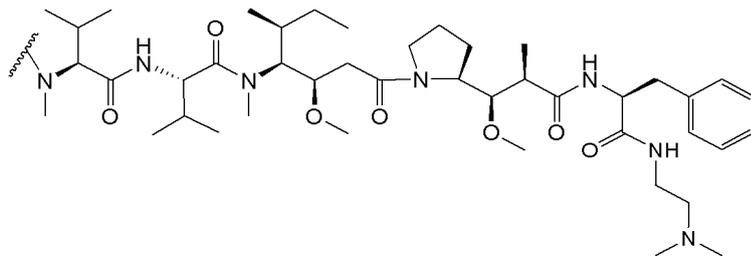
[0177]



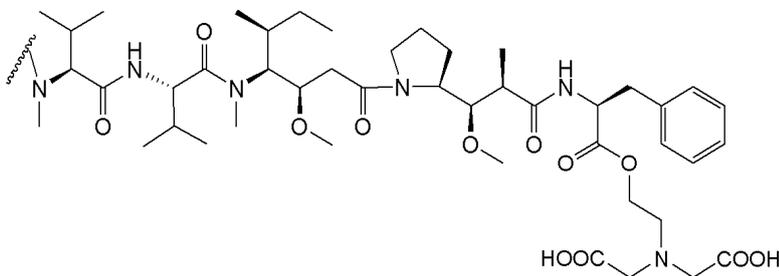
[0178]



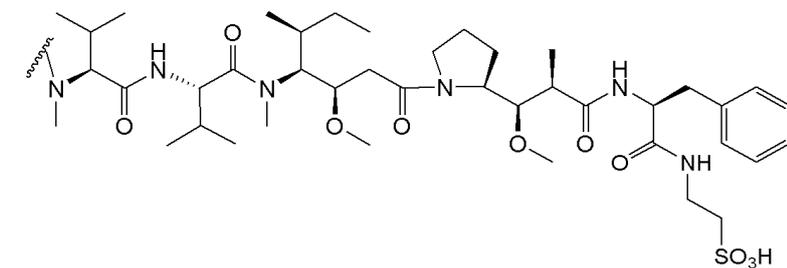
[0179]



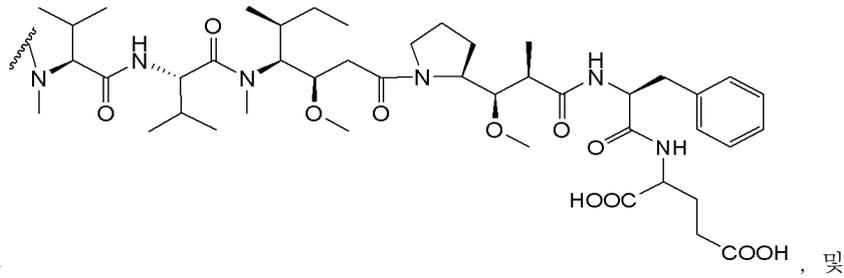
[0180]



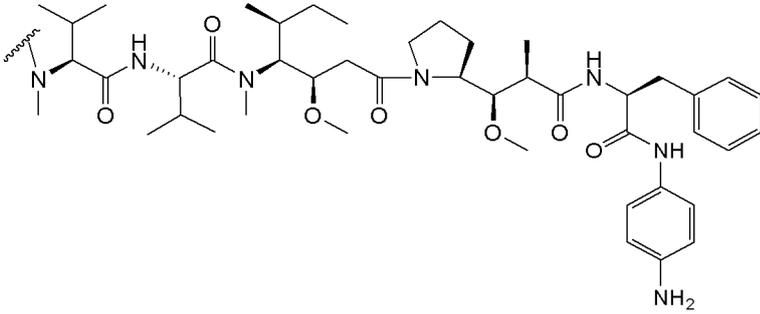
[0181]



[0182]



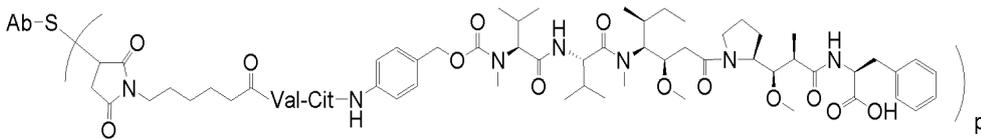
[0183]



[0184]

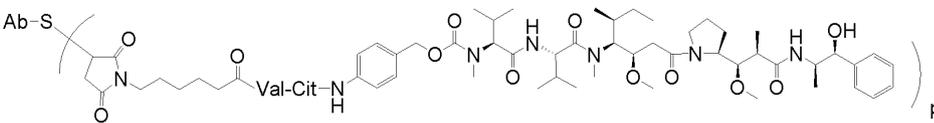
[0185] 일 측면에서, 비제한적인 예로 트리에틸렌 글리콜 에스테르 (TEG) 등의, 전술한 친수성기는, R¹¹에서 약물 모이어티에 부착될 수 있다. 어떠한 특정 이론으로 결부되지 않으나, 친수성기는 약물 모이어티의 내재화 (internalization) 및 비-응집화(non-agglomeration)에 일조한다.

[0186] 아우리스타틴/돌라스타틴 또는 이의 유도체를 포함하는 식 I의 ADC에 대한 예시적인 구현에는 US 2005-0238649 A1 및 Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124에 기술되어 있으며, 이들 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 명백하게 포함된다. MMAE 또는 MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 식 I의 ADC에 대한 예시적인 구현예들은 아래 구조와 약어를 가진다 ("Ab"는 항체, 예컨대 트라스투주맙이고; p는 1 내지 약 8이고, "Val-Cit"는 발린-시트룰린 다이펩타이드이고; "S"는 황 원자이다):



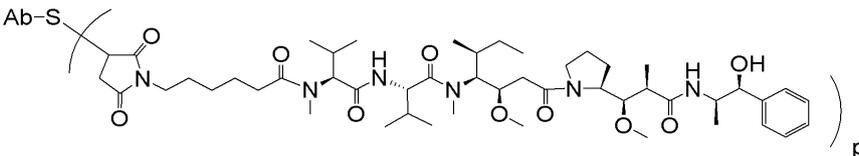
[0187]

[0188] Ab-MC-vc-PAB-MMAF



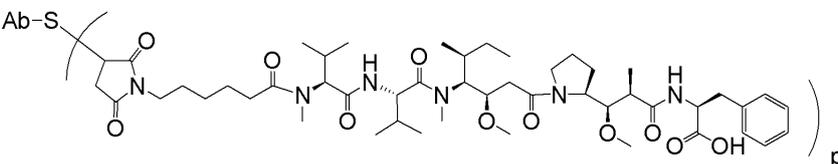
[0189]

[0190] Ab-MC-vc-PAB-MMAE



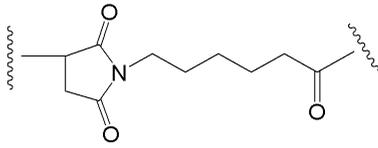
[0191]

[0192] Ab-MC-MMAE



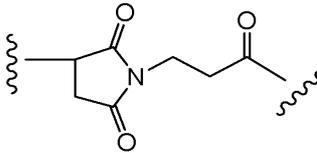
[0193]

- [0194] Ab-MC-MMAF
- [0195] MMAF 및 다양한 링커 성분을 포함하는 식 I의 ADC에 대한 예시적인 구현예들은, 추가적으로 Ab-MC-PAB-MMAF 및 Ab-PAB-MMAF를 포함한다. 흥미롭게도, 단백질 분해를 통해 절단되지 않는 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체는, 단백질 분해를 통해 절단가능한 링커에 의해 항체에 부착된 MMAF를 포함하는 면역접합체와 상응하는 활성을 가진 것으로 확인된 바 있다. Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124를 참조한다. 이러한 경우, 약물 방출은 세포에서의 항체 분해를 통해 구현되는 것으로 생각된다.
- [0196] 전형적으로, 펩타이드계 약물 모이어티는 2 이상의 아미노산 및/또는 펩타이드 단편들 간의 펩타이드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. 이러한 펩타이드 결합은, 예를 들어, 펩타이드 화학 분야에 잘 공지된 역상 합성 방법에 따라 제조될 수 있다 (E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press). 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티들은 US 2005-0238649 A1; 미국 특허 5,635,483; 미국 특허 5,780,588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863; 및 Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0197] 특히, 식 D_F의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예컨대 MMAF 및 이들의 유도체는, US 2005-0238649 A1 및 Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124에 기술된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 식 D_E의 아우리스타틴/돌라스타틴 약물 모이어티, 예컨대, MMAE 및 이의 유도체는, Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784에 기술된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 약물-링커 모이어티들 MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, 및 MC-vc-PAB-MMAE는 Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784, 및 특허 출원 공개 번호 US 2005/0238649 A1에 기술된 바와 같이, 보편적인 방법으로 적절하게 합성한 다음, 대상 항체에 접합시킬 수 있다.
- [0198] 과학 문헌에 보고된 링커의 예로는, 메틸렌 (CH₂)_n 링커 (Hussey et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125:3692-3693; Tamiz et al., *J. Med. Chem.*, 2001, 44:1615-1622), 나트렉시아민을 다른 오피오이드계 화합물에 연결하는데 사용되는 올리고 에틸렌옥시(-CH₂CH₂O-)_n 단위, 오피오이드 길항제와 작용제를 함께 연결하는데 사용되는 식 -NH-(COCH₂NH)_nCOCH₂CH₂CO--(NHCH₂CO)_nNH--의 글리신 올리고머 ((a) Portoghese et al., *Life Sci.*, 1982, 31:1283-1286. (b) Portoghese et al., *J. Med. Chem.*, 1986, 29:1855-1861), 오피오이드 펩타이드들을 연결하는데 사용되는 친수성 다이아민 (Stepinski et al., *Internat. J. of Peptide & Protein Res.*, 1991, 38:588-92), 견고한 2중 가닥의 DNA 스페이서(spacer) (Paar et al., *J. Immunol.*, 2002, 169:856-864), 및 생분해성 링커 폴리(L-락트산) (Klok et al., *Macromolecules*, 2002, 35:746-759)을 포함한다. 가닥을 화합물에 부착함으로써, 유익한 결합 배향(favorable binding orientation)이 이루어진 화합물을 만들 수 있다. 링커 자체는 생분해성이거나 아닐 수 있다. 링커는 프로드럭의 형태를 취할 수 있으며, 연결된 약물의 최상의 방출 카이네틱스를 위해 조율가능하다. 링커는 전장 전체가 구조적으로 유연할 수 있으며, 또는 가닥의 세그먼트가 구조적으로 제한정되게 설계될 수 있다 (Portoghese et al., *J. Med. Chem.*, 1986, 29:1650-1653).
- [0199] 링커의 예
- [0200] 링커는 하나 이상의 링커 요소를 포함할 수 있다. 링커 요소의 예로는, 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit" 또는 "vc"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질 옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC"), 및 N-숙신이미딜 (4-요오도-아세틸) 아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 다양한 링커 요소들은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 일부는 아래에 기술된다.
- [0201] 링커는 "절단가능한 링커"일 수 있어, 세포내 약물의 방출을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 산 분해성 링커 (예, 하이드라존), 단백질효소-민감성 (예, 펩티드제-민감성) 링커, 광 분해성 링커, 다이메틸 링커 또는 이황화-함유 링커 (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); 미국 특허 5,208,020)가 사용될 수 있다.
- [0202] 일부 구현예들에서, 링커 요소는 항체를 다른 링커 요소나 약물 모이어티와 연결하는 "신장 유닛(stretcher unit)"을 포함할 수 있다. 신장 유닛의 예는 아래에 나타낸다 (물결 선은 항체에 대한 공유 결합 부위를 표시함):



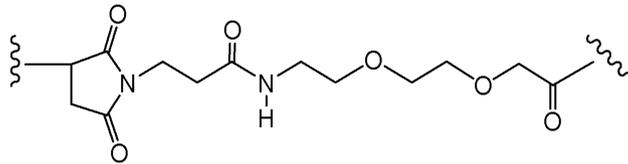
MC

[0203]



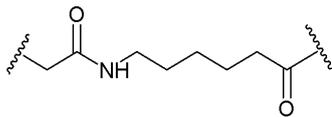
MP

[0204]



MPEG

[0205]



[0206]

[0207]

일부 구현예들에서, 링커는 아미노산 유닛을 포함할 수 있다. 이러한 구현예에서, 아미노산 유닛은 단백질효소에 의한 링커의 절단을 가능하게 하므로, 세포내 단백질 효소, 예컨대 라이소좀 효소에 노출되었을 때 면역접합체로부터 약물이 해리되게 촉진한다. 예로, Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784를 참조한다. 아미노산 유닛의 예로는, 다이펩타이드, 트리펩타이드, 테트라펩타이드 및 펜타펩타이드가 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 다이펩타이드의 예로는, 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe); 페닐알라닌-라이신 (fk 또는 phe-lys); 또는 N-메틸-발린-시트룰린 (Me-val-cit)을 포함한다. 트리펩타이드의 예로는, 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit)과 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 유닛은 천연적인 아미노산 잔기 뿐만 아니라 소수 아미노산과 비천연 아미노산 유사체, 예를 들어 시트룰린을 포함할 수 있다. 아미노산 유닛은 특정 효소, 예를 들어, 종양-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소적 절단을 위한 선택성으로 설계 및 최적화될 수 있다.

[0208]

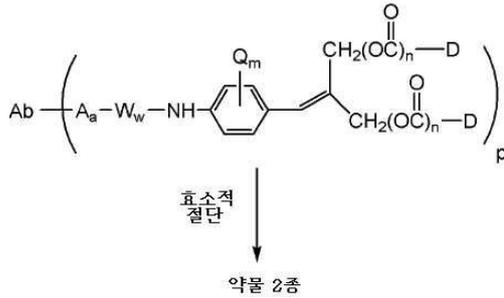
일부 구현예들에서, 링커 요소는 항체를 약물 모이어티에 직접 또는 신장 유닛 및/또는 아미노산 유닛을 이용함으로써 연결시키는 "스페이서"를 포함할 수도 있다. 스페이스 유닛은 "자가-제거성(self-immolative)" 또는 또는 "비-자가 제거성"일 수 있다. "비-자가 제거성" 스페이스 유닛은 ADC의 효소적 (예, 단백질 분해에 의한) 절단 시, 스페이스 유닛의 일부 또는 전체가 약물 모이어티에 결합된 채 잔류하는 것이다. 비-자가 제거성 스페이스 유닛으로는, 글리신 스페이스 유닛과 글리신-글리신 스페이스 유닛이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 또한, 서열 특이적인 효소적 절단을 허용하는 펩타이드 스페이스들의 다른 조합들도 고려된다. 예를 들어, 글리신-글리신 스페이스 유닛을 포함하는 ADC를 종양 세포 관련 프로테아제로 효소적으로 절단하게 되면, ADC의 나머지 부분으로부터 글리신-글리신-약물 모이어티가 방출될 것이다. 이러한 구현예에서, 글리신-글리신-약물 모이어티는, 그후 종양 세포 내에서 별도의 가수분해 단계를 거쳐, 약물 모이어티로부터 글리신-글리신 스페이스 유닛이 절단된다.

[0209]

"자가 제거성" 스페이스 유닛은 별개의 가수분해 단계 없이도 약물 모이어티로부터 방출이 가능하다. 일부 구현예에서, 링커의 스페이스 유닛은 p-아미노벤질 유닛을 포함한다. 이러한 구현예에서, p-아미노벤질 알코올은 아마이드 결합을 통해 아미노산 유닛에 부착되며, 카바메이트, 메틸카바메이트 또는 카보네이트가 벤질 알코올과 세포독성 물질 간에 형성된다. 예로, Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103을 참조한다. 일 구현예에서, 스페이스 유닛은 p-아미노벤질옥시카르보닐 (PAB)이다. 특정 구현예에서, p-아미노벤질 유닛의 페닐렌 부분은 Q_m으로 치환되며, 이때 Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고, m은 0-4의 정수이다. 자가-제거성 스페이스 유닛의 예로는, 비제한적으로, p-아미노벤질 알코올과 전기적으로 유사한 방향족 화합물 (예, US 2005/0256030 A1), 예를 들어 2-아미노이미다졸-5-메탄올 유도체 (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) 및 오르토- 또는 파라-아미노벤질아세탈을 포함한다.

치환된 및 비치환된 4-아미노부티르산 아미드 (Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223); 적절하게 치환된 바이사이클로[2.2.1] 및 바이사이클로[2.2.2] 고리 시스템 (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); 및 2-아미노페닐프로피온산 아미드 (Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867)와 같이, 아미드 결합의 가수분해시 고리화되는 스페이스가 사용될 수 있다. 글리신의 α-위치에서 치환된 아민-함유 약물의 제거 (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447)는 ADC에서 사용가능한 자가-제거성 스페이스의 예이다.

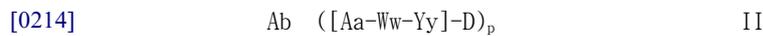
[0210] 일 구현예에서, 스페이스 유닛은 아래 도시된 바와 같이 분지형 비스(하이드록시메틸)스티렌 (BHMS) 유닛이며, 이것은 다중 약물을 통합 및 방출시키는데 사용될 수 있다.



[0211]

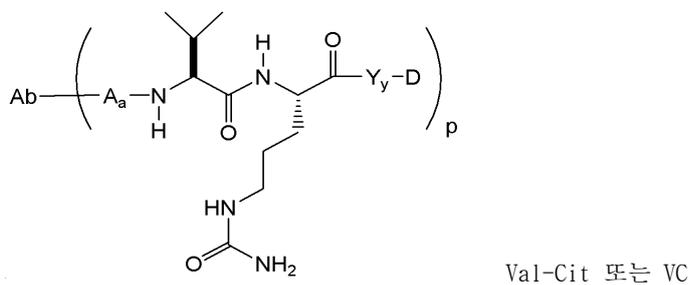
[0212] 상기 식에서, Q는 -C₁-C₈ 알킬, -O-(C₁-C₈ 알킬), -할로젠, -니트로 또는 -시아노이고; m은 0-4의 정수이고; n은 0 또는 1이고; p는 1 내지 약 20이다.

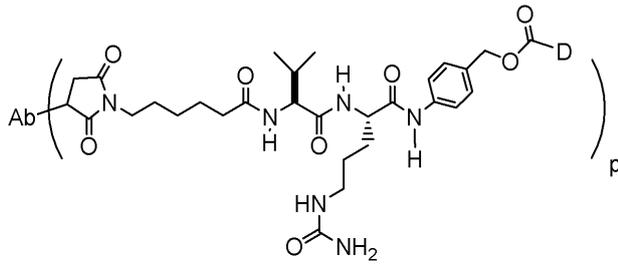
[0213] 링커는 상기 링커 요소들 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 링커는 아래 식 II의 ADC에서 괄호 안에 표시된다



[0215] 식에서, A는 신장 유닛이고, a는 0-1의 정수이고, W는 아미노산 유닛이고, w는 0-12의 정수이고, Y는 스페이스 유닛이고, y는 0, 1, 또는 2이고, Ab, D 및 p는 식 I에서 정의된 바와 같이 정의된다. 이러한 링커에 대한 예시적인 구현예들은 US 2005-0238649 A1에 기술되어 있으며, 이 문헌은 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0216] 예시적인 링커 요소들과 이들의 조합은 식 II의 ADC를 들어 아래에 나타낸다:





MC-val-cit-PAB

[0219]

[0220]

신장 유닛, 스페이서 유닛 및 아미노산 유닛을 비롯한 링커 요소들은, US 2005-0238649 A1에 기술된 바와 같이, 당해 기술 분양 공지된 방법으로 합성할 수 있다.

[0221]

본 발명의 치료 방법은, 다양한 구현예들에서, 전술한 바와 같이, 수평 조절을 제공하는 치료학적 방법으로서, 제2 세포자살 유발성 약물은 세포독성을 나타내며, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티에 의해 발휘되는 세포독성과는 다른 분자 기준에 의해 세포자살을 유도한다. 수평 조절은, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티와 제2 세포자살 유발성 항암제가 각각의 별도로 세포자살을 유도할 수 있는 상이한 생화학적 캐스케이드나 프로세스로 작동할 때, 달성된다. 예를 들어, 아래 표 2에 나타낸 바와 같이, 당해 기술 분야에 잘 알려진 바와 같이, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티, 예컨대 메이탄시노이드 또는 아우리스타틴은 미소관 탈중합 등의 내인성 세포자살 기전을 통해 작동할 수 있으며, 제2 세포자살 유발성 항암제는 Fas 경로 또는 c-FLIP 경로 등의 외인성 경로를 통해 세포자살을 유도하는 약물일 수 있다. 다른 예로, 만일 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티가 외인성 경로를 통해 효능을 나타낸다면, 제2 세포자살 유발성 항암제는 카스파제-독립적인 경로 등의 내인성 경로 또는 카스파제-의존적인 경로를 통해 세포자살을 유도하는 약물일 수 있다.

[0222]

이에, 다양한 구현예에서, 제2 세포자살 유발성 약물은 외인성 경로를 통해 세포자살을 유도하는 약물이며; 예를 들어, 제2 세포자살 유발성 약물은 FAS 경로를 통해 세포자살을 유도하거나, 또는 제2 세포자살 유발성 약물은 c-FLIP 경로를 통해 세포자살을 유도한다. 보다 구체적으로, 제2 세포자살 유발성 약물은 CMH, E2, 또는 δ -토코트리엔놀일 수 있다.

[0223]

다른 구현예들에서, 제2 세포자살 유발성 약물은 내인성 경로를 통해 세포자살을 유도하는 약물이며; 예컨대, 제2 세포자살 유발성 약물은 카스파제-독립적인 경로를 통해 세포자살을 유도할 수 있거나, 또는 다른 예로, 제2 세포자살 유발성 약물은 카스파제-의존적인 경로를 통해 세포자살을 유도할 수 있다. 보다 구체적으로, 제2 세포자살 유발성 약물은 E2, FTS, δ -토코트리엔놀, 살리노마이신 또는 커큐민일 수 있다.

[0224]

따라서, 다양한 구현예들에서, 제2 세포자살 유발성 항암제는 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리엔놀, 살리노마이신, 또는 커큐민이다. 다양한 구현예들에서, 면역접합체는 T-DM1이고, 제2 세포자살 유발성 약물은 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리엔놀, 또는 커큐민이다. 면역접합체가 T-DM1인 경우, 제2 세포자살 유발성 약물은 E2, FTS, δ -토코트리엔놀, 또는 TMS일 수 있거나; 또는, 보다 구체적으로, 면역접합체가 T-DM1이고 제2 세포자살 유발성 약물은 FTS이다.

[0225]

본 발명은 면역접합체와 제2 세포자살 유발성 약물의 투여가 상승적인 작용을 나타낼 수 있는 방법을 제공한다. 일부 구현예들에서, 상승은 수평 조절을 이용함으로써 달성된다.

[0226]

그러나, 2종의 세포자살 유발성 항암제가 수직 조절로 작용하더라도, 상승적인 또는 상가적인 작용이 달성될 수 있다. 아울러, 수평 조절을 달성하기 위해, 2종의 항암제들이 둘다 경로내 동일한 프로세스에 작동하지 않으며 약물 내성을 제공하기 위한 적응 돌연변이화에 내성을 부여하기 위해서 2가지의 동시적인 돌연변이화가 여전히 요구되는 한, 2종의 항암제는 둘다 외인성 경로 또는 내인성 경로를 통해 작동하는 것도 여전히 가능할 수 있다.

[0227]

다양한 구현예들에서, 본 발명은, 암 환자에게, 타겟팅 단일클론 항체 트라스투주맵 (Herceptin[®])이 링커 모이어티를 통해 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티인 메이탄시노이드 마크롤라이드에 결합된 전술한 공유 접합체의 일례로서, 트라스투주맵-DM1 (T-DM1)을 투여하는 단계를 포함한다. 이 접합체, T-DM1은, 제2 세포자살 유발성 항암제로서 파르네실-티오살리실레이트 FTS를 이용하는 조합 치료 용법으로 제공하는 것으로, 본원에서, 본 발명자에 의해 개시되며, 놀랍게도 높은 상승 작용을 제공하는 것으로 확인되었다. 또 다른 측면에서, E2와 T-DM1의 조합 요법이 놀랍게도 높은 상승 작용을 제공한다. 또 다른 측면에서, CMH와 T-DM1의 조합 요법이 놀랍게도 높은 상승 작용을 제공한다.

[0228] 상기 T-DM1에 대한 예에서, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티, 메이탄신의 근접 유사체(close analog)는 링커 모이어티를 통해 트라스투주맵 (Herceptin)에 커플링된다. 링커는 이황화 결합에 참여하지 않으므로, 본원의 의미에 따르면 비-환원성 링커로 간주되며, 즉, 쉽게 환원가능한 이황화 결합이 존재하지 않는다. 이에, 다양한 구현예들에서, 본 발명은, 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티와 비-환원성 링커를 통해 공유적으로 커플링된 단일클론 항체 모이어티로 필수적으로 구성된, 공유 접합체를 제공하며, 여기서 비-환원성은 이황화 결합 또는 생물학적인 조건에서 환원이 틀림없이 발생할 것으로 보이는 다른 기가 없다는 것을 의미한다.

[0229] 아래 표 1에서, 상가적인 작용 및 상승 작용을 나타내는 다양한 조합들의 결과를 나타낸다.

표 1

세포주	세포자살 물질	비율	투약 효과 파라미터			조합 인덱스 값				상호작용
			Dm	m	r	ED50	ED75	ED 90	ED95	
MCF-7	TMS + FTS	TMS:FTS (1µM:1µM)	4.806	1.74598 ± 0.07883	0.9939	0.988	0.939	0.898	0.865	상가
	TMS + CMH	TMS:CMH (1µM:10µM)	5.839	1.17019 ± 0.07844	0.9933	0.321	0.343	0.368	0.386	상승
	FTS + CMH	FTS:CMH (1µM:1µM)	17.402	1.39405 ± 0.10368	0.9891	0.351	0.399	0.454	0.495	상승
T47D	TMS + FTS	TMS:FTS (1µM:1µM)	16.046	1.552969 ± 0.13846	0.9888	2.408	1.839	1.443	1.246	길항
	TMS + CMH	TMS:CMH (1µM:10µM)	4.885	1.02624 ± 0.15858	0.9769	0.242	0.328	0.452	0.566	상승
	FTS + CMH	FTS:CMH (1µM:1µM)	16.447	1.3291 ± 0.11190	0.9895	0.730	0.658	0.602	0.571	약한 상승
LTED	TMS+FTS	TMS:FTS (1µM:1µM)	5.891	0.76939 ± 0.01125	0.9995	0.911	0.889	0.869	0.858	약한 상승
	TMS+CMH	TMS:CMH (1µM:10µM)	0.088	0.55289 ± 0.04221	0.9942	0.391	0.223	0.177	0.206	상승
	TMS+E2	TMS:E2 (1µM:10µM)	1.025	.74308 ± 0.0681	0.9836	0.322	0.566	1.009	1.498	상가
	TMS+T-DM1	TMS:T-DM1 (1µM:1ng)	7.337	0.134089 ± 0.16995	0.9843	1.034	1.024	1.015	1.010	상가
	FTS+CMH	FTS:CMH (1µM:1µM)	20.964	1.20938 ± 0.10418	0.9855	0.811	0.763	0.719	0.692	약한 상승
	FTS+E2	FTS:E2 (10µM:1µM)	14.082	0.78722 ± 0.12684	0.9408	0.784	0.609	0.491	0.429	상승
	FTS+T-DM1	FTS:T-DM1 (1µM: 10 ng)	63.540	1.01308 ± 0.05397	0.9944	0.400	0.266	0.178	0.135	강한 상승
	E2+CMH	E2:CMH (1µM:10µM)	21.759	1.27183 ± 0.05093	0.9976	1.002	0.753	0.684	0.663	상가
	E2+T-DM1	E2:T-DM1 (1µM:10 ng)	1.349	0.64658 ± 0.00913	0.9996	0.421	0.329	0.299	0.295	상승
CMH+T-DM1	CMH:T-DM1 (1µM: 10 ng)	33.937	1.22358 ± 0.02137	0.9995	0.144	0.123	0.115	0.113	강한 상승	

[0230]

[0231] 강한 상승은 T-DM1 + FTS와 T-DM1 + CMH에서 관찰된다. 상승 정도를 측정하기 위해 사용된 방법들과 다양한 실험의 결과들은 아래에 기술되며, 도면에 그래프 형태로 도시된다.

[0232] 다른 구현예들에서, 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티는 환원성 링커를 통해 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티와 공유적으로 커플링될 수 있다. "환원성" 연결은 생물학적 조건에서 발생할 가능성이 있는 환원 공정, 즉, 이황화 결합의 환원에 의해 링커가 절단될 가능성이 있을 것으로 여겨지거나 예상되는 것을 의미한다. 이러한 접합체에서, 타겟팅 모이어티, 예를 들어 단일클론 항체는 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티를 원하는 타겟, 예컨대 HER2 또는 호르몬 내성 유방암 사례에서의 관련 수용체로 운반하는 것으로 간주되며, 상기 타겟팅 모이어티로부터 약물이 절단되면, 조직을 통해 보다 쉽게 확산되고, 세포 막을 통과할 수 있는 등으로 약물이 자유롭게 된다.

[0233] 다양한 구현예들에서, 암 치료 방법은, 암이 유방암인 경우에 사용된다. 유방암은 유방 조직에 침범할 수 있는 다양한 암 타입 모두를 의미한다. 다른 구현예들에서, 다른 타입의 암도 유사하게, 즉 암 타입의 특징적인 예피토프, 예컨대 과다발현된 수용체에 특이적인 타겟팅 모이어티를 이용함으로써, 치료할 수 있으며, 이때 선정된 단일클론 항체 또는 다른 타겟팅 모이어티는 제1 세포자살 유발성 약물과 공유적으로 커플링되며, 제조되는 접합체는 제2 세포자살 유발성 약물과 병용하여 투여된다. 이들 구현예들에서도, 수평 조절 방식이 타겟화된 암 세포에 의해 내성 발현 가능성을 낮출 것으로 생각된다.

[0234] 암 세포에서의 세포자살 유발 기전

[0235] 본 발명의 치료학적 방법에 사용될 수 있는 특정 세포자살 유발성 약물들은 아래에서 보다 상세하게 기술한다.

[0236] FTS

[0237] 본 발명자들은, 본원에서, 처음으로, 세포자살 내인성 경로의 주 성분인 MOMP (미토콘드리아 외막 기공) 형성에 영향을 미치는 단백질 클래스를 조사하였다. Bax, Bim 및 Bak 등의 세포자살 유발 구성원들은 미토콘드리아로부터 시토크롬 c의 방출을 촉매하는 반면, Bcl-2 및 Mcl-1과 같은 항-세포자살 구성원은 방출을 방지한다. 세포자살 유발 및 항-세포자살 Bcl-2 단백질 간의 균형이 따라서 세포의 운명에 영향을 미치게 된다. LTED 세포에 75 μ M FTS를 0, 4, 8, 16, 24 및 48시간 처리하여, 세포질 분획(cytosolic fraction)을 조사하였다 (도 1A). 세포자살 신호전달로 Mcl-1이 24시간까지 감소하고, Bim이 증가되었지만, Bcl-2는 변화가 없었다. 포스포 JNK는 48시간 동안 증가하였고, p21은 4시간째부터 시작해 안정적인 감소를 나타내어 48시간째까지 지속되었다 (도 4A). 서비빈(survivin)은 8시간째부터 시작해 16시간째까지 감소되었으며, 24시간 및 48시간째에는 검출불가능한 수준에 도달하였고, XIAP는 변화가 없었다 (도 1A).

[0238] Bax가 FTS-처리한 LTED 세포에서 활성화되는지를 확인하기 위해, Bcl-2를 면역침강시키고, Bim 및 Bax를 탐침하였다 (도 1B). 탐침된 세포 추출물을 구조적으로 변형된 Bax 단백질만 인지하는 항체를 사용하여 탐침하였다. 도 1B에 나타낸 바와 같이, Bax는 FTS-처리 세포에서 구조적인 변화를 겪어, MOMP를 촉진시키게 될 것이다. Bim의 세포자살 유발 효과는, 대부분, Bcl-2의 생존 촉진 기능을 취소시키는, Bcl-2와의 결합을 통해서이다 [16,17]. 도 1B에 나타낸 바와 같이, Bim과 Bcl-2 간의 상호작용이 증가된 반면, Bax와 Bcl-2와의 상호작용은 감소된 것으로 확인되었다. 미토콘드리아 막 기공을 통한 단백질의 유출의 증거로서, 시토크롬 c와 Smac의 세포질내 수준이 24시간째와 48시간째에 증가되었으며, 이때 Mcl-1은 감소되고 Bim은 증가되었다 (도 1A). 다른 주요 세포 사멸 인자인 세포자살 유도 인자 (AIF)가 48시간째에 세포질에서만 확인되었다. MOMP에 대한 이러한 작용을 확인한 후, 세포자살에 관여하는 다른 주요 인자들을 조사하였다.

[0239] FTS는 비-유방 조직들에서 카스파제 활성화를 통해 세포사멸을 유발하는 것으로 보고된 바 있다 [18-20]. FTS가 카스파제의 활성화를 통해 유방암 세포의 사멸을 촉매하는지를 확인하기 위해, LTED 세포에, 비히클, FTS 또는 pan-카스파제 저해제인 z-VAD-fmk를 점진적인 증가시킨 여러가지 농도 하에 FTS를 처리하였다 (도 1C, 상단 패널). 그 결과, z-VAD-fmk가 FTS-유발성 세포자살을 차단하는 것으로 나타났다. 이전의 보고들에서는, 다른 암에서, 카스파제-8의 증가를 증거로 FTS가 사멸 수용체를 통해 세포자살을 유도한다고 제안되었다 [18-20]. 유방암 세포의 경우, 카스파제-8에 실질적인 변화가 없었으므로, 사멸 수용체 경로는 관여하지 않는 것으로 나타났다 (도 1C, 하단 패널). 카스파제-8의 활성화는 증가하는 것으로 보이지만, Z-IETD-FMK에 의해 저해되진 않는다. 야생형 MCF-7 세포에 대한 FTS + 커큐민 조합물의 효과 (도 2A)와; MCF-7 세포 생존성에 대한 FTS 단독 또는 커큐민과의 조합물의 효과 (도 2B)를 나타낸, 시간 경과 막대 그래프 (2A) 및 세포 생존성-농도 그래프 (2B)를 나타낸 도 2를 참조한다.

[0240] 에스트라디올

[0241] LTED 세포에서 에스트라디올 유발성 세포자살에 중요한 세포자살 유발 인자가 어느 것인지를 조사하였다. 세포에 에스트라디올을 0, 2, 4, 8, 24 및 48시간 동안 처리하고, 세포질 분획을 준비하였다. Bim_{EL} 및 Bim_L은 초기 시간대에 증가하였지만 (도 1D, 대조군과 4, 8시간과 비교), Bax는 그렇지 않았다. 미토콘드리아 분획 (도 1D, 우측 패널)에서 Bim 이소형의 증가가 확인되었다. 48시간째까지, 시토크롬 c와 Smac/Diablo이 세포질로 방출되었는데, 이는 에스트라디올 세포자살 컴포넌트가 미토콘드리아 경로를 통해 매개됨을 의미한다. Bim은 에스트라디올 매개 세포자살에 중요한 것으로 보이기에, Bim을 탐침하는 E2의 타이트레이션(titration)을 수행하였으며, 경시적으로 증가되는 것을 확인하였다 (도 1E). 또한, Bim 낮다운도 세포자살을 차단하였다 (도 1F). 세포자살의 상류 조절자들을 조사하였으며, JN의 인산화된 형태가 증가됨을 확인하였다 (도 1E). 세포자살 유발 단백질인 Bok 역시 농도-의존적인 방식으로 증가되었다 (도 1E). 또한, 항-세포자살 인자인 Mcl-1은 에스트로겐 첨가에 따라 감소되었지만, XIAP나 서비빈은 그렇지 않았다.

[0242] 기존에 공개된 데이터들은, 에스트라디올 유발성 세포자살에서의 외인성 사멸 수용체 경로를 간접적으로 암시한다. 이러한 종래 데이터는, 에스트라디올이 FAS가 존재하는 LTED 세포에서 FAS-리간드의 수준을 증가시키고, 세포자살을 자극하는 FAS에 대한 단일클론 항체에 의해 경로가 활성화될 수 있음을 입증하였다. 그래서, FAS/FAS-리간드의 참여에 대한 직접적인 증거는, Fas-리간드에 대한 siRNA가 에스트라디올 유발성 세포자살을 일부 중단시킨다는 사실에 의해 제공된다 (도 1F). 즉, 에스트라디올은 외인성 및 내인성 경로 활성화 둘다에 의해 세포자살을 개시한다.

[0243] 과거 결과와 현재의 결과, 그리고 문헌 리뷰를 토대로, 미토콘드리아 매개 세포자살에 대한 각 물질의 작용, 및

외인성 사멸 수용체 매개 세포자살 경로의 작용을 아래 표 2에 요약 개시한다.

[0244] 살리노마이신

[0245] 살리노마이신은 세포질 막과 미토콘드리아 막을 비롯한 여러가지 생물 막에서, 엄격한 염기성 이온에 대한 선택성과 포타슘에 대한 강력한 선호성을 가진 이온포어로서 작용하여, 미토콘드리아와 세포의 포타슘 유입을 촉매하며, 미토콘드리아의 산화적 인산화를 저해한다. 현행 연구를 통해, 살리노마이신이 여러가지 기원의 인감 암 세포에서 세포자살을 유도하며 세포자살 내성을 해결하는 것으로 밝혀졌다. 먼저, 살리노마이신은 Gupta 등이 사용한 농도 보다 낮은 농도에서 급성 T 세포 백혈병 환자로부터 분리한 CD4+ T-세포 백혈병 세포에서 상당한 세포자살을 유도하는 것으로 입증되었다. http://www.scitopics.com/New_mission_for_salinomycin_in_cancer.html을 참조한다. 살리노마이신은 내인성, 카스파제 비의존적인 경로에 의해 작용하여, 세포자살을 유도하는 것으로 생각된다. 살리노마이신은, 세포 주기 정지를 수반하지 않으며 종양 억제자 단백질 p53, 카스파제 활성화, CD95/DC95 리간드 시스템 및 26S 프로테아좀과 독립적인, 암 세포에서, 개별적이고 비관습적인 세포자살 경로를 활성화한다. 이런 점이, 살리노마이신이 인간 암 세포에서의 약물의 다중 기전들과 세포자살 내성을 극복할 수 있는 이유일 수 있다. 많은 암 세포들이 p53 감소와, Bcl-2, P-당단백질 또는 단백질 분해 활성이 보강된 26S 프로테아좀의 과다 발현에 의해 매개되는, 복수의 기전들을 자기고 있거나 습득한다. 그러나, 살리노마이신은, 이러한 약물의 기전들과 세포자살 내성을 극복할 수 있는 것으로 보인다. MCF-7 세포에 대한 살리노마이신의 효과를 나타낸 시간 경과 막대 그래프 (3A) 및 세포 생존성-농도 그래프 (3B)를 도시한 도 3을 참조한다.

[0246] 표 2: 선정된 세포자살 유발성 약물의 작용의 분자 기전

표 2

[0247]

세포자살 물질	내인성 사멸 경로	외인성 사멸 경로
CMH/드록시노스타트	X	0 c-FLIP 차단
E2	0 카스파제-의존형	0 Fas 경로
FTS (살리라십)	0 카스파제-의존형	X
T-DM1	0 카스파제-의존형	X
δ -토코트리에놀	0 카스파제-의존형 카스파제-비의존형	0 Fas 경로
TMS	0 카스파제-비의존형	X

[0248] 다양한 구현예들에서, 본 발명은, 제2 세포자살 유발성 항암제가 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀, 커큐민 또는 살리노마이신인, 전술한 치료 방법을 제공한다. 이들 화합물의 구조들, 상기 기술된 선정 이유는 아래에 제시된다. 살리노마이신 및 커큐민 등의, 이러한 약물들 중 일부는 줄기 세포에 작용할 수 있는 것으로 생각된다.

[0249] 커큐민

[0250] 커큐민은 향신료 강황 (*Curcuma longa* Linn)으로부터 유래된 활성 성분으로서, 강력한 항산화제이자 항-염증제이다. 최근에는 별개의 화학예방(chemopreventive) 활성이 있는 것으로 입증되었다. 그러나, 커큐민의 이러한 항암 특성의 근원이 되는 분자 기전은, 암 세포에서의 세포자살 유도가 가능성 있는 설명일 수도 있다는 추정은 있지만, 아직 규명되지 않았다. 현행 연구에서, 커큐민이 종양 세포에서 세포자살 유도를 통해 예리히 복수 암 종 (EAC) 세포 수를 감소시킨다는 것이, 핵 DNA와 올리고뉴클레오타이드 분절화에 대한 세포 주기 상 분포의 유세포 분석을 통한 증거로서, 확인되었다. EAC 세포의 세포자살을 유도하는 분자 신호에 대한 추가적인 연구를 통해, 커큐민이 프로토-온코단백질 Bax의 상향 조절, 미토콘드리아로부터 시토크롬 c 방출 및 카스파제-3의 활성화를 통해 종양 세포의 사멸을 야기한다는 것을 관찰하였다. Bcl-2의 상태는 EAC에서 변화없이 유지되는데, 이는, 커큐민이 Bcl-2 체크포인트를 우회하여 세포자살에 대한 이의 예방 효과를 무효화함을 암시한다. 이에, 커큐민

이 내인성의 카스파제-의존성 경로를 통해 세포자살을 유도할 수 있는 것으로 간주된다.

- [0251] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11676493>을 참조한다.
- [0252] 조합 파트너들의 선정 이유
- [0253] 수평 조절이 본 발명의 조합 치료 방법으로 달성될 수 있도록, 다양한 형태의 세포 사멸을 일으키는 물질들을 선정하였다. FTS (살리라십)는 미토콘드리아 세포 사멸 경로를 통해 암 세포에서 카스파제-의존성 사멸을 불러 일으킨다 [11,12]. FTS는 MCF-7 세포와 종양 이식편에서 세포자살을 촉매한다 [13]. CMH는 세포성 FLICE (FADD-유사 IL-1 β -변화 효소)-저해성 단백질 (c-FLIP)의 소형 분자 저해제로서, CMH는 c-FLIP를 저해함으로써 카스파제-8과 -10을 활성화할 수 있다 [14,15]. CMH의 세포에 사멸 리간드를 감각화하는 기전의 일부는, HDAC3, HDAC6 및 HDAC8을 저해하는 저해력을 통해서이다 [15]. TMS는, 미소관 저해를 경유한 미토콘드리아 사멸 경로를 통해 카스파제-비의존성 사멸을 주로 일으키는 물질이다 [16,17]. TMS는 TamR 내성 유방암 종양 이식편의 증식을 강하하는데 효과적이다 [17]. 에스트라디올은 미토콘드리아 세포 사멸 경로[18,19]와 Fas 사멸 수용체 경로 [19]를 통해 장기간 에스트로겐 고갈된 세포의 세포자살을 유도하는 것으로 확인되었다. 이전 연구에서, 에스트라디올이 시험관내 장기간 에스트로겐 고갈된 세포에서 [18-22], 이종이식 모델에서 [23,24], 그리고 환자에서 [25] 세포자살을 촉매하는 것으로 입증되었다. 메이탄시노이드-항체 접합체는 미소관 탈중합화를 통해 유사분열 전중기/중기로 유방암 세포를 정지시킴으로써 세포 증식을 저해하는 것으로 입증된 바 있다 [26].
- [0254] 세포가 장기간 세포 주기 진행이 정지된 경우, 이러한 현상이 세포자살을 유도할 수 있다 [27,28]. T-DM1, 즉 약물 항체 접합체 트라스투주맵-DM1 (메이탄신 유도체)은, HER2 진행 유방암(advanced breast cancer)을 앓고 있는 환자에서 유효할 [30] 뿐만 아니라 이종이식편에서 발현되는 HER2를 낮추는데 유효 [29]한 것으로 입증되었다. 아로마타제 저해제인 레트로졸을 투여함으로써 이종이식 모델에서 생체내 에스트로겐을 고갈시킨 유방암 세포주들에서는, HER2 신호전달이 상향 조절되었다 [31,32]. 부가적으로, HER2는 아로마타제 저해제로 치료하는 동안 유방암 환자에서 상향 조절되는 것으로 확인되었다 [33]. 즉, 장기간의 에스트로겐 고갈을 겪은 유방암 세포는 HER2를 증가된 수준으로 가지며, 이를 T-DM1에 민감하게 만든다.
- [0255] 상승 작용 분석
- [0256] 조합 요법에서의 상승 작용 분석은 3종의 세포주 MCF-7, T47D 및 LTED에 초점을 맞춰 수행되었다. MCF-7과 T47D 세포주는 비-적응 유방암 모델이다. LTED (장기간 에스트로겐 고갈된) 세포주는 장기간 에스트로겐 고갈 후 엔도크린 내성을 나타낸다. 아래 약물 제제들은 비-적응 세포주에 사용하였다: 파르네실티오살리실산 (FTS, 살리라십), 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-하이드록시부탄아미드 (CMH), 및 2, 4, 3', 5-테트라메톡시스티벤 (TMS). 적응 세포주의 경우, 에스트라디올 (E₂)과 트라스투주맵-DM1 (T-DM1)도 포함시켰다.
- [0257] 종양 증식의 주요 컴포넌트로서 줄기 세포 집단의 출현으로, 커큐민의 효과를 시험관내 시스템에서도 조사하였다. 커큐민은 비-유방암 실험들에서 콜로니 형성과 줄기 세포 구체 형성에 대한 농도 및 시간 의존적인 저해를 유도한다. 이러한 이유로, 장기간 에스트로겐 고갈된 (LTED) 유방암 세포에서 이러한 물질의 효과를 예비 실험하였다. 커큐민의 효과는 농도 반응 방식으로 조사하였다. 이 물질은 세포 수 감소에 매우 유효하였으며, 처음 효과는 250 nM에서 관찰되었다. 이후 실험에서는 125 nM에서 효과를 관찰하였다. 그런 후, 커큐민을 FTS와 조합하여 조사하였다. FTS는 비히클에 25, 50, 75 및 100 μ M로 포함시켰다. FTS 단독의 경우 대조군 대비 14%의 세포 수 감소를 나타내었다. 커큐민 단독 125 nM에서도 비슷한 수준으로 세포 수가 감소되었다. 커큐민의 높은 수준의 효능으로 인해, FTS가 이들 실험에서 상가 작용 또는 상승 작용을 유발하는지는 결정할 수 없었다.
- [0258] 살리노마이신은 줄기 세포를 사멸시키는데 유효한 것으로 입증된 다른 물질이다. 이 물질은 커큐민 보다는 효능이 낮았으며, MCF-7 세포에 대해 2 μ M에서 50%의 저해 효과를 나타내었다. 도 3을 참조한다. 기존에 생체내에서 세포자살을 겪는 것으로 확인된 MCF-7-5C 세포를 대상으로, E₂, T-DM-1 단독 및 이들의 조합 효과를 실험하기 위한 실험을 수행하였다. E₂와 T-DM-1은 둘다 세포자살을 유발하였다. 중간 수준의 농도에서, E₂ + T-DM-1 조합이 각각의 단독에 비해 보다 효과적인 것으로 나타났다.
- [0259] 이들 물질들을 비-적응 세포주 (도 4, 6, 8)와 적응 세포주 (도 5, 7, 9) 둘다에서 조사하였다. 유방암 세포에, 개개 약물을 상향식의 여러가지 농도로 처리한 다음, 이들의 조합도 조사하였다. 사멸된 세포의 수 (영향을 받은 분획, fa)와 약물로부터 영향을 받지 않은 세포의 수 (영향을 받지 않은 분획, fu)를 측정하였다

(도 4). 그런 후, 농도 효과 그래프를, $y = \log(fa/fu)$ vs. $x = \log(D)$ 인, 반수-효과 플롯 (median-effect plot)으로 선형 형태로 변환시켰다 [8,34]. 반수-효과 플롯으로부터, 조합 인덱스 (combination index: CI)를 구할 수 있다. CI 그래프 작성에는 몬테 카를로 옵션(Monte Carlo option)을 사용하여, 평균 및 표준 편차 값 뿐만 아니라 신뢰 구간을 구하였다 (도 6, 7).

[0260] 조합 인덱스가 1이면 (CI =1), 2종의 약물이 상가적인 방식으로 작용한다는 것을 의미한다. 조합 인덱스가 1보다 낮으면 (CI<1), 약물들이 개별의 합 보다 훨씬 효과적이며, 상승적인 작용을 나타낸다는 것을 의미한다. 조합 인덱스가 1보다 높으면 (CI>1), 2종의 약물이 각각의 약물이 제공하는 것 보다 효과가 낮으며, 즉 길항 작용을 한다는 것을 의미한다. 유효 농도 1 (D1)을 x-축에 그리고, 유효 농도 2 (D2)를 y-축에 표시하였다. 유효 농도 (ED)의 플롯팅은 $Fa = 0.5, 0.75, 0.9$ 및 0.95 에서 행할 수 있다. 이로써 약효등효도(Isobologram)가 작성된다. 이러한 2가지 방법, 조합 인덱스 (도 6, 7)와 약효등효도 (도 8, 9)를 사용하여, 여러가지 물질들의 조합을 사용하였을 때 상승 작용이 있는지를 확인하였다. 결과는 상기 표 1에 요약 개시된다.

[0261] 비-적응 세포주 결과

[0262] 비-적응 세포 (도 4, 6, 8)에서 조사하였을 때, TMS + FTS의 조합 인덱스가 MCF-7 세포주에서 상가적이었으며 (도 6a, 도 8a), T47D 세포주에서는 길항적이었다 (도 6d, 도 8d). FTS + CMH 조합은 MCF-7 세포주에 상승 작용을 나타내었지만 (도 6b, 8b), T47D 세포주에서는 상승 작용이 약하였다 (도 6e, 8e). TMS + CMH 조합은 MCF-7 (도 6c, 8c) 및 T47D (도 6f, 8f) 둘다에서 상승 작용을 나타내었다.

[0263] 적응 세포주 결과

[0264] TMS를 이용한 다양한 조합들을 준비하였다. TMS를 CMH와 조합한 경우, LTED 세포주에서 상승 작용이, 타목시펜 내성 세포주에서는 약한 상승 작용이 있었다. TMS를 FTS, E2, 또는 T-DM1 중 어느 하나와 조합한 경우, 조합물들은 LTED 및 TamR 세포주 둘다에 대해 상가적인 특성을 나타내었다 (도 7 a, c-d, j, l-m). FTS + CMH 조합은 LTED와 TamR 세포 둘다에서 약한 상승 작용을 나타내었다 (도 7e, n). 그러나, FTS + T-DM1 조합과, FTS + E2 조합이, 타목시펜 내성 세포주 (도 7o, p)에 비해 LTED 세포에서 보다 강력한 상승 작용을 나타내었다 (도 7f, g). E2 + CMH 조합은 이들 2종의 세포주들에서 상가적이었다 (도 7 e, q). 가장 효능이 우수한 조합은 LTED 세포주의 경우 CMH + T-DM1 조합이었다 (도 7i). 이 조합은 타목시펜 내성 세포주 (도 7s)에서도 약한 상승 작용이 관찰되었다. 이는, 타목시펜 내성 세포가 저 농도 에스트로겐 환경에서 보다 단 기간만 배양되어, HER2의 수준을 낮게 발현하는 것이 원인일 수 있다.

[0265] 아울러, 적응 세포주의 약효등효도 분석 그래프를 예시한 도 9를 참조한다.

[0266] 결과 요약

[0267] 상기 표 1은 결과들을 요약 개시한 것으로, 상승 작용을 나타낸 조합은 강조 표시하였다. 관찰한 최고 상승 작용은 적응 LTED 세포주에 적용된 T-DM1 + CMH 조합에서 나타났다. 이는, 이 조합이 내인성 미토콘드리아 사멸 경로 뿐만 아니라 외인성 사멸 수용체 경로 둘다를 타겟팅하기 때문인 것으로, 즉 수평 조절이 달성되었기 때문인 것으로 보인다. T-DM1은 LTED 세포의 표면에 과다발현된 HER2를 타겟팅할 수 있으며, DM1 물질은 내인성 미토콘드리아 경로를 통한 세포 사멸을 일으킨다. CMH는 c-FLIP를 조절하여, 외인성 사멸 수용체 경로를 활성화시킨다 [14, 15]. T-DM1의 효능과 HER2에 대한 타겟팅 모두 관찰된 상승 작용에 중요할 것으로 보인다. 테스트한, TMS를 이용한 조합들 모두 상가적인 특성을 나타내었다 (도 6-9). FTS 조합들은 비-적응 LTED 세포주에 비해 적응 세포주에서 더 효과가 낮았다 (도 6b, d, e를 도. 7e, f, g와, 도 8b, d, e를 도. 9 e, f, g와 비교).

[0268] 투여 및 조성물

[0269] 본 발명은 조합 약물 요법과 함께 사용할 수 있는 부속 요법들을 추가로 제공한다. 다양한 구현예들에서, 상이한 세포자살 분자 기전들의 유발시키는 조합물 등의, 세포자살 유발성 항암제 조합물들은, X선, 감마선, 방사선 핵종 방출 및 원자 수준 미만 입자(subatomic particle) 노출, 근접 방사선 요법 등의 방사선 요법, 및 자체적으로 세포자살 유발성이거나 세포 증식 저해성 또는 세포 재생산 저해성 제제인 부가적인 항암제의 사용을 비롯하여, 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 다른 치료학적 접근법과 조합하여 사용될 수 있다. 이들 조합물들의 평가 방법 및 결과의 분석 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다.

[0270] 복수의 경로를 타겟팅하기에 유효한 약제들의 조합은 암을 치료하기 위한 약물 요법을 개발하는 새로운 영역을 열어준다. 본원에 개시된 바와 같이, 본 발명의 조합 요법은, 비제한적인 예로서, 세포의 카스파제-의존형 사

멸 유발, 세포성 FLICE 저해, 카스파제 활성화, 카스파제의 간접 활성화 포함, HDAC3, HDAC6 및 HDAC8 저해, 카스파제-비존형 사멸 유도, 미토콘드리아 사멸 및 Fas 사멸 수용체 경로 조절, 및 미소관 구조 파괴를 비롯하여, 상이한/복수의 경로들에 대한 타겟팅을 기반으로 한다.

- [0271] 본 발명은, 다른 구현예들에서, 제1 세포자살 유발성 항암제를 제2 세포자살 유발성 항암제와 "병용하여(in conjunction with)" 투여하는 방법을 제공한다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 서로 병용하여 투여되는 2종 이상의 물질이 동시에 또는 동량으로 반드시 투여되어야 하는 것은 아님을 인지할 것이다. 일 측면에서, 약물 조합 요법의 일부로서 투여되는 화합물은 별도로 투여된다. 다른 측면에서, 제1 화합물은 제2 화합물을 투여하기 전에 투여된다. 또 다른 측면에서, 제1 화합물과 제2 화합물은 거의 동시에 투여된다. 다른 측면에서, 제1 화합물은 제2 화합물을 투여한 다음에 투여된다. 각각의 물질은 여러번, 여러가지 용량으로, 투여 주기(at frequencies of administration)로, 그리고 의학 실무자의 지식과 기술에 기초로 정해질 수 있는 기간 동안 투여될 수 있다.
- [0272] 본 발명은 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다. 약학 조성물은 본 발명의 하나 이상의 화합물과, 생리 활성 유사체, 상동체, 유도체, 변형체, 및 약제학적으로 허용가능한 이의 염, 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 화합물은 약학 조성물로서 투여된다.
- [0273] 투여 경로는 투여되는 화합물의 타입에 따라 달라질 수 있다. 일 측면에서, 화합물은 경구, 국소, 직장, 근육내, 점막내, 코내, 흡입, 눈 및 정맥내 등의 경로로 투여된다.
- [0274] 본 발명은 조절-방출형 제형으로서 본 발명의 화합물의 투여를 추가로 제공한다.
- [0275] 일 구현예에서, 2종 이상의 화합물들의 조합으로 개체를 치료한 결과는 임의의 화합물을 단독으로 이용하는 경우의 효과와 비교해 상가적이다. 일 측면에서, 2종 이상의 화합물을 이용할 때 나타나는 효과는 임의의 화합물 단독을 이용하는 경우에 비해 더 크다.
- [0276] 본 발명의 조성물은 환자에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해 약제학적으로 허용가능한 비히클을 적량으로 포함할 수 있다.
- [0277] 또한, 본 발명의 조성물은 행동 요법(behavioral therapy) 또는 상호작용과 조합하여 개체에게 투여될 수 있다.
- [0278] 다양한 개개 아노머, 부분입체이성질체 및 거울상이성질체 뿐만 아니라 이들의 혼합물들이 본 발명의 범위에 포함된다. 아울러, 본 발명의 화합물은, 또한, 모든 약제학적으로 허용가능한 염, 예를 들어, 알칼린 금속 염, 예컨대 소듐 및 포타슘; 암모늄 염; 모노알킬암모늄 염; 다이알킬암모늄 염; 트리알킬암모늄 염; 테트라알킬암모늄 염; 및 트로메타민 염을 포함한다. 화합물의 수화물 및 기타 용매화물도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0279] 첫 투여량이 효과적이지 않다면, 조합 요법의 1종 이상의 화합물의 투여량을 높일 수 있다. 첫 투여량이 상기 수준 보다 보다 빠르게 체중을 감량시킨다면, 2 이상의 화합물 중 하나 이상의 투여량을 낮출 수 있다.
- [0280] 약제학적으로 허용가능한 염기 부가 염은 무기 및 유기 염기로부터 제조될 수 있다. 무기 염기로부터 유래된 염으로는, 단순 예로서, 소듐, 포타슘, 리튬, 암모늄, 칼슘 및 마그네슘 염을 포함한다. 유기 염기 유래 염으로는, 1차, 2차 및 3차 아민, 예컨대 알킬 아민, 다이알킬 아민, 트리알킬 아민, 치환된 알킬 아민, 다이(치환된 알킬) 아민, 트리(치환된 알킬) 아민, 알케닐 아민, 다이알케닐 아민, 트리알케닐 아민, 치환된 알케닐 아민, 다이(치환된 알케닐) 아민, 트리(치환된 알케닐) 아민, 사이클로알킬 아민, 다이(사이클로알킬) 아민, 트리(사이클로알킬) 아민, 치환된 사이클로알킬 아민, 2번 치환된 사이클로알킬 아민, 3번 치환된 사이클로알킬 아민, 사이클로알케닐 아민, 다이(사이클로알케닐) 아민, 트리(사이클로알케닐) 아민, 치환된 사이클로알케닐 아민, 2번 치환된 사이클로알케닐 아민, 3번 치환된 사이클로알케닐 아민, 아릴 아민, 다이아릴 아민, 트리아릴 아민, 헤테로아릴 아민, 다이헤테로아릴 아민, 트리헤테로아릴 아민, 헤테로사이클릭 아민, 다이헤테로사이클릭 아민, 트리헤테로사이클릭 아민, 혼성 다이- 및 트리-아민 (아민 상의 2 이상 치환기가 상이하며, 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 사이클로알킬, 치환된 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 치환된 사이클로알케닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릭 등으로 이루어진 군으로부터 선택됨)이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 또한, 2 또는 3개의 치환기들이 아미노 질소와 함께 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴기를 형성하는 아민도 포함된다. 적절한 아민의 예로는, 단순 예로서, 이소프로필아민, 트리메틸 아민, 디에틸 아민, 트리(이소-프로필) 아민, 트리(n-프로필) 아민, 에탄올아민, 2-디메틸아미노에탄올, 트로메타민, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라바민, 콜린, 베타인, 에틸렌디아민, 글루코사민, N-알킬글루카민, 테오브로민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, 모르폴린, N-에틸피페리딘 등을 포함한다. 또한, 다른 카르복실산 유도체, 예를 들어, 카르복사미드, 저급 알킬 카르복사미드, 다이알킬 카르복사미드 등을 비롯하여 카르복실산 아미드도 본 발

명의 실시에 유용할 것이다.

- [0281] 약제학적으로 허용가능한 산 부가 염은 무기 및 유기 산들로부터 제조될 수 있다. 무기 산 유래 염으로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 유기 산 유래 염으로는 아세트산, 프로피론산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔-설폰산, 살리실산 등을 포함한다.
- [0282] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 화합물 하나를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 화합물을 2 이상 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 기타 장애를 치료하기 위해 사용가능한 추가적인 약물 또는 화합물도 조성물의 일부일 수 있다. 일 구현예에서, 본 발명의 화합물을 단지 하나만 포함하는 조성물은 본 발명의 다른 화합물 1종 이상을 포함하는 다른 조성물과 동시에 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 여러가지 조성물들은 서로 다른 시기에 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물이 본 발명의 화합물을 한가지만 포함하는 경우, 1종 이상의 추가적인 화합물을 포함하는 추가적인 조성물도 사용되어야 한다.
- [0283] 본 발명을 실시하는데 사용가능한 약학 조성물은, 예를 들어, 1 ng/kg/day - 100 mg/kg/day의 용량을 전달하도록 투여될 수 있다.
- [0284] 본 발명의 방법에서 사용가능한 약학 조성물은, 예를 들어, 경구 고체 제형으로 전신에, 또는 안 제형, 좌제, 에어로졸제, 국소제 또는 그의 유사 제형으로 투여될 수 있다. 적절한 화합물 외에도, 이러한 약학 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체와 약물 투여를 강화하고 촉진시키는 것으로 알려진 다른 성분들을 포함할 수 있다. 나노입자, 리포솜, 재밀봉된 적혈구 (resealed erythrocyte) 및 면역학적 기반의 시스템 등의 다른 가능한 제형들도 사용하여, 본 발명의 방법에 따라 적정 화합물, 또는 그의 유사체, 변형체 또는 유도체를 투여할 수 있다.
- [0285] 본원에 기술된 임의의 방법을 이용하여 동정한 화합물은 본원에 기술된 질환을 치료하기 위해 제형화되어 개체에 투여될 수 있다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 이러한 방법들이 물론 다른 질환, 장애 및 병태들에도 유용할 것임을 알 것이다.
- [0286] "프로드럭"은 생체내에서 모 약물로 변환되는 물질을 지칭한다. 프로드럭은, 어떤 경우에는, 모 약물 보다 투여하기 더 쉬울 수 있기 때문에, 종종 사용가능하다. 이는, 예를 들어, 경구 투여에 의해 생체이용가능할 수 있지만, 모 약물은 그렇지 않을 수 있다. 또한, 프로드럭은 모 약물 보다 약학 조성물에 대해 개선된 용해성을 가질 수 있거나, 또는 개선된 식미를 나타내거나 제형화하기 더 쉬울 수 있다. 프로드럭의 예는, 비제한적으로, 수용성이 유동성에는 좋지 않은 세포 막을 통과하는 전달을 용이하게 하는 에스테르 ("프로드럭")으로서 투여되지만, 수용성이 유리한 세포 내부에 도입되는 활성 물질인 카르복시산으로 대사적으로 가수분해되는, 본 발명의 화합물일 것이다. 프로드럭에 대한 추가적인 예는 펩타이드가 대사되는 활성 모이머티를 제공하는 산성 기에 결합된 짧은 펩타이드(폴리아미노산)일 수 있다.
- [0287] 본 발명은 활성 성분으로서 본원에 기술된 질병의 치료에 유용한 화합물을 포함하는 약학 조성물의 제조 및 용도를 포함한다. 이러한 약학 조성물은, 활성 성분 단독으로만 개체에 투여하기 적합한 형태로 구성될 수 있거나, 또는 약학 조성물은 활성 성분과, 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체, 하나 이상의 부가적인 성분, 또는 이들의 일부 조합을 포함할 수도 있다. 활성 성분은 생리학적으로 허용가능한 에스테르 또는 염의 형태로, 예를 들어 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 생리학적으로 허용가능한 양이온 또는 음이온과 조합하여, 약학 조성물에 존재될 수 있다.
- [0288] 본원에 기술된 약학 조성물의 제형은 임의의 공지된 방법으로 또는 이후 약학 분야에서 개발되는 임의의 방법으로 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 활성 성분을 담체나 또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 조합하는 단계를 포함하며, 이후, 필요하거나 바람직하다면, 산물을 바람직한 단일 투약 유닛 (single-dose unit) 또는 다중 투약 단위 (multi-dose unit)로 만들거나 포장할 수 있다.
- [0289] 본원에 제공된 약학 조성물에 대한 설명은 원칙적으로 인간에게 윤리적으로 투여(ethical administration)하기 적합한 약학 조성물에 관한 것이지만, 당업자라면 이러한 조성물이 모든 종류의 동물에 투여하는 데에도 일반적으로 적합하다는 것을 이해할 것이다. 다양한 동물에게 투여하기 적합한 조성물을 제공하기 위해, 인간에게 투여하기 적합한 약학 조성물을 변형시키는 것은 잘 숙지되어 있으며, 전문적인 동물 약물학자는 주로 통상적인, 가능하다면 실험을 이용하여 이러한 변형을 설계 및 수행할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물이 투여되는 개체는, 인간 및 그의 영장류, 소, 돼지, 말, 양, 고양이 및 개 등의 산업적으로 관련있는 포유류, 닭, 오리, 거위 및 칠면조 등의 산업적으로 관련있는 조류를 비롯한 포유류가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

- [0290] 본 발명의 방법에 포함되는 한가지 투약 유형은 비경구 투여로서, 이의 비제한적인 예로는, 조성물의 주입, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직-침투성 비-외과적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한, 약학 조성물의 투여를 포함한다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복막내, 근육내, 흉골내 주입 및 신장 투석 주입 기법을 고려하지만, 이들로 한정되지 않는다.
- [0291] 본 발명의 방법에 이용가능한 약학 조성물은 경구 직장, 질, 비경구, 국소, 폐, 비강내, 볼, 안, 척수강내 (intrathecal) 또는 그외 투여 경로에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 그의 고려가능한 조성물은, 활성 성분을 포함하고 있는 투사형 나노입자 (projected nanoparticle), 리포솜 조제물, 재밀봉된 적혈구, 및 면역학적 기반의 제형을 포함한다.
- [0292] 본 발명의 약학 조성물은 1회분(single unit dose)으로 또는 복수개의 1회분(plurality of single unit doses)으로서 제조, 포장 또는 벌크(bulk)로 판매할 수 있다. 본원에서, "1회분"은 활성 성분을 미리 결정된 함량으로 포함하는 약학 조성물 각각의 함량이다. 활성 성분의 양은 개체에게 투여하게 될 활성 성분의 투여량과 동일하거나, 또는 투여량의 예컨대 1/2 또는 1/3 등의 투여량의 적정 일부(convenient fraction)이다.
- [0293] 본 발명의 약학 조성물내 활성 성분, 약제학적으로 허용가능한 담체 및 임의의 부가적인 성분의 상대적인 함량은 치료받는 개체의 정제, 체격 및 상태에 따라, 그리고 또한 투여되는 조성물의 경로에 따라 달라질 수 있다. 예컨대, 상기 조성물은 활성 성분을 0.1% 내지 100% (w/w)로 포함할 수 있다.
- [0294] 활성 성분 이외에도, 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 부가적인 약제학적으로 활성인 물질을 더 포함할 수 있다. 특히, 부가적인 물질은 구토억제제 및 스캐빈저, 예컨대 시아나이드 및 시아네이트 스캐빈저를 포함하는 것으로 간주된다.
- [0295] 본 발명의 약학 조성물의 조절 방출형 제형 또는 서방형 제형은 통상적인 기법을 이용하여 제조할 수 있다.
- [0296] 경구 투여에 적합한 본 발명의 약학 조성물의 제형은, 비제한적인 예로, 미리 결정된 함량으로 활성 성분을 각각 포함하는, 정제, 경질 캡슐제, 연질 캡슐제, 카세트(cachet), 트로키제(troche) 또는 로젠제(lozenge) 등의 개별 고형 투약 단위 형태로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 경구 투여에 적합한 다른 제형으로는 분말 제형, 과립 제형, 수성 현탁제, 오일성 현탁제, 수용액, 오일성 용액 또는 에멀전이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0297] 본원에서, "오일성" 액체는 탄소-함유성 액체 분자를 포함하며 물 보다 극성이 낮다.
- [0298] 활성 성분을 포함하는 정제는, 활성 성분을 선택적으로 하나 이상의 부가적인 성분과 함께 압축하거나 성형하여 제조할 수 있다. 압축된 정제는 적정 장치에서, 선택적으로 하나 이상의 결합제, 윤활제, 부형제, 계면활성제 및 분산제과 혼합하여, 활성 성분을 분말 또는 과립 조제물과 같은 자유 유동 형태로 압축시켜 제조할 수 있다. 성형된 정제는 적합한 장치에서, 활성 성분, 약제학적으로 허용가능한 담체 및 혼합물에 수분을 제공하는데 적어도 충분한 액체로 구성된 혼합물을 성형하여, 제조할 수 있다. 정제 제조에 사용되는 약제학적으로 허용가능한 부형제는, 불활성 희석제, 과립화제, 붕괴제, 결합제 및 윤활제가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 분산제로는 감자 전분 및 소듐 스타치 글리콜레이트가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 계면 활성제로는 소듐 라우릴 설페이트가 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 공지된 희석제로는 칼슘 카보네이트, 소듐 카보네이트, 락토스, 미세결정형 셀룰로스, 칼슘 포스페이트, 칼슘 하이드로젠 포스페이트 및 소듐 포스페이트가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 과립화제 및 붕괴제로는 옥수수 전분(corn starch) 및 알긴산이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 결합제로는 젤라틴, 아카시아, 미리-젤라틴화한 옥수수 전분(pre-gelatinized maize starch), 폴리비닐피롤리돈 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 윤활제로는 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산, 실리카 및 탈크가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0299] 정제는 코팅하지 않거나, 또는 공지 방법으로 코팅하여, 개체의 위장관에서 지연성 분해를 달성함으로써 활성 성분의 지속적인 방출 및 흡수를 제공할 수 있다. 예로, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 다이스테아레이트와 같은 물질을 이용하여 정제를 코팅할 수 있다. 다른 예로, 정제는 삼투성으로 조절되는 방출형 정제로 제조하기 위해, 미국 특허 4,256,108; 4,160,452; 및 4,265,874에 언급된 방법으로, 정제를 코팅할 수 있다. 정제는 또한, 약제학적으로 세련되고 입맛에 맞는 조제물로 제공하기 위해, 감미제, 향료, 착색제, 보존제 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다.
- [0300] 활성 성분을 포함하는 경질 캡슐제는 젤라틴과 같은 생리적으로 분해가능한 조성물을 이용하여 제조할 수 있다.

이러한 경질 캡슐은 활성 성분을 포함하며, 예컨대 칼슘 카보네이트, 칼슘 포스페이트 또는 카올린과 같은 불활성의 고휘 회색제 등의 추가적인 성분을 더 포함할 수도 있다.

- [0301] 활성 성분을 포함하는 연질 젤라틴 캡슐제는 젤라틴과 같은 생리적으로 분해가능한 조성물을 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 연질 캡슐은 활성 성분을 포함하며, 이를 물이나 오일 매질, 예컨대 땅콩유, 액상 파라핀 또는 올리브 오일과 혼합할 수 있다.
- [0302] 경구 투여에 적합한 본 발명의 약학 조성물의 액체 제형은 사용하기 전에 물이나 다른 적정 비히클로 재구성하도록 의도된 건조 산물의 형태로, 또는 액체 형태로, 제조, 포장 및 판매될 수 있다.
- [0303] 또한, 락툴로오스를 자유 붕괴성 충전제(freely erodible filler)로 사용할 수 있으며, 이 물질은 본 발명의 화합물을 캡슐 형태로 제조할 때 유용하다.
- [0304] 경구 투여에 적합한 본 발명에 대한 약학 조성물의 액체 제형은 액체 형태로 또는 사용 전에 물 또는 다른 적정 비히클을 사용하여 재구성하기 위한 용도의 건조 산물 형태로 제조, 포장 및 판매할 수 있다.
- [0305] 액체 현탁액은 통상적인 방법으로 제조하여, 수성 또는 오일성 비히클 중의 활성 성분 현탁제를 만들 수 있다. 수성 비히클의 예로는 물과 등장성 염수가 있다. 오일성 비히클의 예로는 아몬드 오일, 오일성 에스테르, 에틸 알코올, 아라키스(arachis) 오일, 올리브 오일, 참깨 오일 또는 코코넛 오일과 같은 식물성 오일, 식물성 분별 오일 및 액상 파라핀과 같은 미네랄 오일이 있다. 액체 현탁제는 현탁화제, 분산제 또는 습윤제, 유화제, 완화제, 보존제, 완충제, 염, 향료, 착색제 및 감미제 등의 한가지 이상의 부가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 오일성 현탁제는 증점제를 더 포함할 수 있다. 공지된 현탁화제로는 소르비톨 시럽, 수소화된 식용 지방, 소듐 알기네이트, 폴리비닐피롤리돈, 트라가칸트 검, 아카시아 검, 및 소듐 카복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스 등의 셀룰로스 유도체가 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 분산제 또는 습윤제로는 레시틴과 같은 천연 포스파티드, 알킬렌 옥사이드와, 지방산, 장쇄 지방족 알코올, 지방산 및 헥시톨로부터 유래된 부분 에스테르 또는 지방산 및 헥시톨 무수화물로부터 유래된 부분 에스테르와의 축합 산물(예, 각각 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 헵타데카에틸렌옥시세탄올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올레이트 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트)이 있으나, 이들로 한정되는 것은 아니다. 공지된 유화제로는 레시틴과 아카시아가 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 공지된 보존제로는 메틸, 에틸, 또는 n-프로필 파라 하이드록시벤조에이트, 아스코르브산 및 소르브산이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 공지된 감미제로는, 예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 소르비톨, 슈크로스 및 사카린을 포함한다. 오일성 현탁제에 대한 공지된 증점제로는, 예컨대, 밀랍, 경질 파라핀 및 세틸 알코올을 포함한다.
- [0306] 일 측면에서, 점적제 형태로 투여하기 위한 또는 시럽제 또는 엘릭서제 형태의 조제물은, 바람직하게는 칼로리가 없는 감미제와 함께 활성 성분을 포함할 수 있으며, 살균제로서 메틸파라벤 또는 프로필파라벤, 향료 및 적정 색소를 추가로 포함할 수 있다.
- [0307] 수성 또는 오일성 용매 중의 활성 성분의 액체 (liquid solution)는 액체 현탁제와 실질적으로 동일한 방식으로 제조할 수 있으며, 가장 큰 차이는 활성 성분이 용매에 현탁되는 것이 아니라 용해된다는 것이다. 본 발명의 약학 조성물의 액체는 액체 현탁제에 대해서 언급된 각 성분을 포함할 수 있으며, 현탁화제는 용매내 활성 성분의 용해에 반드시 도움이 되는 것은 아닐 것으로 이해된다. 수성 용매의 예로는 물과 등장성 염수가 있다. 오일성 용매의 예로는 아몬드 오일, 오일성 에스테르, 에틸 알코올, 아라키스 오일, 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일과 같은 식물성 오일, 식물성 분별 오일, 액상 파라핀과 같은 미네랄 오일이 있다.
- [0308] 본 발명의 약학 조제물의 산제 및 과립제 제형들은 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 이러한 제형은 사용 개체에 직접 투여할 수 있으며, 예컨대 정제로 만들거나, 캡슐에 충전하거나, 또는 수성 또는 오일성 비히클에 첨가함으로써 수성 현탁제, 오일성 현탁제 또는 용액제를 제조할 수 있다. 이들 제형들은 각각은 한가지 이상의 분산제, 습윤제, 현탁화제 및 보존제를 더 포함할 수 있다. 충전제, 감미제, 향료 또는 착색제 등의 추가적인 부형제도 이들 제형들에 함유될 수 있다.
- [0309] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 수중유 에멀전 또는 유중수 에멀전 형태로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 오일상은 올리브 오일 또는 아라키스 오일과 같은 식물성 오일, 액상 파라핀과 같은 미네랄 오일 또는 이들의 조합일 수 있다. 이러한 조성물은, 하나 이상의 유화제, 예를 들어, 아카시아 검 또는 트라가칸트 검과 같은 천연 검, 콩 또는 레시틴 포스파티드와 같은 천연 포스파티드, 소르비탄 모노올레이트 등의, 지방산과 헥시톨 무수화물의 조합으로부터 유래된 에스테르 또는 부분 에스테르, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 등의 에틸렌 옥사이드와 상기한 부분 에스테르의 축합 산물을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 이들 에멀전은 예를 들

어, 감미제 또는 향료 등의 추가적인 성분을 포함할 수도 있다.

- [0310] 본 발명의 약학 조성물은 직장 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 이러한 조성물은, 예를 들어, 좌제, 정제 관장제(retention enema preparation), 및 직장 또는 결장 세척용 용액제 형태일 수 있다.
- [0311] 좌제 제형은, 활성 성분을, 일반적인 실온 (즉, 약 20°C)에서는 고체이지만 개체의 직장 온도 (즉, 건강한 인간의 경우에는 약 37°C)에서는 액체인 무-자극성의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 조합하여 제조할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용가능한 부형제로는, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 및 다양한 글리세라이드를 포함하나, 이들로 한정되지 않는다. 좌제 제형은 비제한적인 예로 항산화제 및 보존제를 비롯하여 다양한 추가적인 성분들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0312] 정제 관장제 또는 직장 또는 결장 세척용 용액제는 활성 성분을 약제학적으로 허용가능한 액체 담체와 조합하여 제조할 수 있다. 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 관장제는 개체의 직장 해부 구조에 맞는 전달 기구를 이용하여 투여할 수 있으며, 상기 전달 기구 안에 넣어 포장할 수 있다. 관장제는 비제한적인 예로 항산화제 및 보존제를 비롯하여 다양한 추가적인 성분들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0313] 본 발명의 약학 조성물은 질 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 이러한 조성물은, 예컨대, 좌제, 함침된 또는 코팅된 질-삽입용 물질, 예컨대 탐폰, 질 세정제(douche preparation), 젤, 크림 또는 질 세정을 위한 용액의 형태일 수 있다.
- [0314] 화학 조성물로 물질을 함침 또는 코팅하는 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 비제한적인 예로, 표면에 화학 조성물을 증착 또는 결합시키는 방법, (즉, 생리학적으로 분해가능한 물질 등으로) 물질을 합성하면서 물질의 구조에 화학 조성물 병합하는 방법 (즉, 생리학적으로 분해가능한 물질), 및 후처리 건조를 수반하거나 수반하지 않으면서 흡수체에 수용액, 오일성 용액 또는 현탁제를 흡수시키는 방법을 포함한다.
- [0315] 질 세정제 또는 질 세정용 용액제는 활성 성분을 약제학적으로 허용가능한 액체 담체와 조합하여 제조할 수 있다. 당해 기술 분야에 잘 알려져 있는 바와 같이, 질 세정제는 개체의 질 해부 구조에 맞는 전달 기구를 이용하여 투여할 수 있으며, 상기 기구 안에 넣어 포장할 수 있다. 질 세정제는 비제한적인 예로 항산화제, 항생제, 항진균제 및 보존제를 비롯하여 다양한 추가적인 성분들을 추가로 포함할 수 있다.
- [0316] 본원에서, 약학 조성물의 "비경구 투여"는 개체 조직의 물리적인 침투로 특정되는 투여 및 조직내 침투를 통한 약학 조성물의 투여 중 임의의 경로를 포함한다. 즉, 비경구 투여는, 비제한적으로, 조성물의 주입, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직-침투성 비-외과적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한, 약학 조성물의 투여를 포함한다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복막내, 근육내, 및 흉골내 주입, 및 신장 투석 주입 기법 등을 포함하는 것으로 고려되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다.
- [0317] 비경구 투여에 적합한 약학 조성물의 제형은, 멸균수나 멸균 증장성 염수 등의 약제학적으로 허용가능한 담체와 조합된 활성 성분을 포함한다. 이러한 제형은 볼루스 투여 또는 지속적인 투여에 적합한 형태로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 주입용 제형은 보존제가 든 앰플 등의 1회분 형태나 다회 투약 용기내로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 비경구 투여용 제형으로는 오일성 또는 수성 비히클, 페이스트제 및 이식용 서방형 제형 (implantable sustained-release formulation) 또는 생분해성 제형을 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다. 이러한 제형은, 비제한적인 예로, 현탁화제, 안정제 또는 분산제 등의 한가지 이상의 부가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제형에 대한 일 구현예에서, 활성 성분은 재구성한 조성물을 비경구 투여하기 전에 적정 비히클 (예, 멸균 발열원 무함유 수)로 재구성하기 위한 건조 (즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다.
- [0318] 약학 조성물은 주사용 멸균 수성 또는 오일성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 이들 현탁액 또는 용액은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있으며, 활성 성분 이외에도, 본원에 언급된 분산제, 습윤제, 또는 현탁화제와 같은 추가적인 성분을 포함할 수 있다. 이러한 주사용 멸균 제형은 예를 들어 물 또는 1,3 부탄 다이올과 같은, 무독성의 비경구로 허용가능한 희석제 또는 용매를 이용하여 제조할 수 있다. 그외 허용가능한 희석제 및 용매로는 링거액, 등장성 소듐 클로라이드 용액 및 합성 모노 또는 다이-글리세라이드와 같은 고정화된 오일이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 이용가능한 비경구 투여용 기타 제형으로는, 미세결정 형태로, 리포솜 조제물 내에 또는 생분해성 폴리머 시스템의 성분으로서 활성 성분을 포함하는 것을 포함한다. 서방형 또는 이식용 조성물은 에멀전, 이온 교환 수지, 난용성 폴리머 또는 난용성 염 등의 약제학적으로 허용가능한 폴리머성 또는 소수성 물질을 포함할 수 있다.
- [0319] 국소 투여에 적합한 제형은 액체 또는 반-액체 조제물, 예를 들어, 도포제, 로션, 수중유 에멀전 또는 유중수

에멀전, 예로, 크림, 연고 또는 페이스트제, 및 용액제 또는 현탁제를 포함하지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 국소 투여용 제형은, 활성 성분의 농도가 용매에서의 활성 성분의 가용성 한계 수준으로 높을 수도 있지만, 활성 성분을 예컨대, 약 1% 내지 약 10%(w/w)로 포함할 수 있다. 국소 투여용 제형은 본원에 기재된 하나 이상의 부가적인 성분을 추가로 포함할 수 있다.

- [0320] 본 발명의 약학 조성물은 구강(buccal cavity)을 통한 폐 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하며 직경이 약 0.5 내지 약 7 nm, 바람직하기로는 약 1 내지 약 6 nm인, 건조 입자를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은, 편리하게는, 분말을 분산시키도록 추진제의 기류를 인가할 수 있는 건조 분말 저장소를 포함하는 장치를 이용하거나, 또는 밀폐된 용기 안에 저비점 추진제에 용해 또는 현탁된 활성 성분을 포함하고 있는 장치와 같은 자가 추진성 용매/분말 분산성 용기를 이용하여, 투여하기 위한 건조 분말 형태이다. 바람직하게는, 이러한 분말은 입자의 98% 이상이 직경 0.5 nm 보다 크고, 입자의 95% 이상이 직경 7 nm 미만인, 입자를 포함한다. 보다 바람직하게는, 입자의 95% 이상은 1 nm 보다 큰 직경을 가지며, 입자의 90% 이상은 6 nm 미만의 직경을 가진다. 건조 분말 조성물은 바람직하게는 당과 같은 미세 고형 분말 희석제를 포함하며, 편리하게는 1회 투약 형태로 제공된다.
- [0321] 저비점 추진제는 일반적으로 대기압에서의 비점이 65°F 미만인 액체 추진제를 포함한다. 통상, 상기 추진제는 조성물의 50 - 99.9% (w/w)를 구성할 수 있으며, 활성 성분은 조성물의 0.1 내지 20% (w/w)를 구성할 수 있다. 추진제는 액상 비이온성 또는 고상 음이온성 계면활성제 또는 고형 희석제 (바람직하게는 활성 성분을 포함하는 입자와 동일한 차수(order)의 입자 크기를 가짐)와 같은 추가적인 성분을 추가로 포함할 수 있다.
- [0322] 또한, 본 발명의 폐 전달용으로 제형화된 약학 조성물은 용액 또는 현탁제의 액적(droplet)의 형태로 활성 성분을 제공할 수 있다. 이들 제형은 활성 성분을 포함하는, 수성 또는 희석 알코올 용액 또는 현탁액, 선택적으로 멸균된 형태로 제조, 포장 또는 판매할 수 있으며, 임의의 분무 또는 원자화(atomization) 장치를 이용하여 편리하게 투여할 수 있다. 이러한 제형은 비제한적인 예로 사카린 소듐과 같은 향료, 휘발성 오일, 완충제, 계면활성제 또는 메틸하이드록시벤조에이트와 같은 보존제를 비롯하여, 한가지 이상의 추가적인 성분을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 투여 경로로 제공되는 액적은, 바람직하게는, 평균 직경이 약 0.1 내지 약 200 nm이다.
- [0323] 폐 전달을 위해 사용가능한 것으로 본원에 언급된 제형은 본 발명의 약학 조성물을 비강내 전달하는데에도 사용가능하다.
- [0324] 비강 투여에 적합한 다른 제형은 활성 성분을 포함하며 평균 입자 크기가 약 0.2 내지 500 μm인, 조대 분말(coarse powder)이다. 이러한 제형은 코로 들이마시는 방식으로, 즉 분말이 든 용기를 비공에 가까이하여 코 통로를 통해 순간 흡입하는 방식으로 투여한다.
- [0325] 코 투여용으로 적합한 제형은, 예컨대 활성 성분을 적게는 약 0.1% (w/w)에서 많게는 100% (w/w)로 포함할 수 있으며, 본원에 언급된 추가적인 성분을 한가지 이상 추가로 포함할 수 있다.
- [0326] 본 발명의 약학 조성물은 볼 투여(buccal administration)에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 이러한 제형은 예컨대, 통상적인 방법을 이용하여 제조된 정제 또는 로젠제의 형태일 수 있으며, 예를 들어 활성 성분 약 0.1 내지 약 20% (w/w), 잔량의 경구적으로 용해가능한 또는 분해가능한 조성물, 및 선택적으로 본원에 언급된 하나 이상의 부가적인 성분을 포함할 수 있다. 다른 예로, 볼 투여에 적합한 제형은 활성 성분을 포함하는 분말 또는 에어로졸화되거나 또는 원자화된 용액이나 현탁액을 포함할 수 있다. 이러한 분말화된, 에어로졸화된 또는 원자화된 제형은, 분산시, 바람직하게는, 약 0.1 내지 약 200 nm 범위의 평균 입자 또는 액적 크기이며, 본원에 언급된 추가적인 성분 한가지 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0327] 본 발명의 약학 조성물은 눈 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 이러한 제형은, 예컨대 수성 또는 오일성 액체 담체 중의 활성 성분이 0.1 내지 1.0% (w/w)인 용액 또는 현탁액 등의 점안제 형태일 수 있다. 이러한 점안제는 완충제, 염 또는 본원에 언급된 하나 이상의 다른 추가적인 성분을 더 포함할 수 있다. 그의 사용가능한 눈 투여용 제형은 미세결정 형태로 또는 리포솜 조제물 내에 활성 성분을 포함하는 제형을 포함한다.
- [0328] 본 발명의 약학 조성물은 점막내 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매할 수 있다. 본 발명은 화합물이 점막을 통과하거나 점막에 흡수할 수 있도록, 화합물의 점막내 투여를 제공한다. 이러한 투여 유형은 경구(있몸, 설하, 볼 등), 직장, 질, 폐, 코 등으로 흡수시키기 위해 사용가능하다.
- [0329] 일부 측면들에서, 설하 투여는, 일부 경우들에서, 경구로 제공되었을 때, 간을 통한 실질적인 1차 통과 대사와 효소적 분해를 통과하여, 빨리 대사되고, 분자를 불활성 대사산물로 변환하는 간 효소의 활성과 관련있거나 또

는 생체변환으로 인한 활성 감소와 관련된 치료학적 활성의 감소가 발생되는, 활성 성분에서 유용하다.

- [0330] 일부 경우에, 설하 투여 경로는 볼 점막의 상당한 투과성과 혈관화(vascularization)로 인해 빠른 작용 개시를 발생시킬 수 있다. 아울러, 설하 투여는 경구 투여한 후 위장 점막 또는 소화기 점막 수준에서는 정상적으로 흡수되지 않거나, 또는 다른 예로 예를 들어 정제를 먹은 후 산성 배질에서 일부 또는 완전히 분해되는, 활성 성분의 투여를 가능하게 한다.
- [0331] 종래 기술 분야에 공지된 설하 정제 조제 기법은 통상적으로 활성 성분과 압착용 부형제, 예컨대 희석제, 결합제, 붕괴제 및 보강제를 포함하는 분말 혼합물을 직접 압착함으로써 제조한다. 다른 조제 방법에서는, 활성 성분과 압착 부형제를 미리 건조-과립화하거나 습식-과립화할 수 있다. 일 측면에서, 활성 성분은 정제 덩어리 전체에 분포된다. WO 00/16750에는, 신속하게 분해되며, 활성 성분이 미세입자 형태로서, 활성 미세입자에 대한 지지체를 구성하는 실질적으로 크기가 큰 수용성 입자의 표면에 부착된 미세입자 형태인, 규칙 혼합물(ordered mixture)을 포함하며, 조성물이 또한 점막 부착제를 포함하는, 설하용 정제가 기술되어 있다. WO 00/57858에는, 흡수를 촉진시키기 위해 고안된 발포 시스템과 조합된 활성 성분을 포함하며, 아울러 pH-조절제를 포함하는, 설하용 정제가 기술되어 있다.
- [0332] 본 발명의 화합물은 점막을 통한 흡수를 허용하거나 강화하는 투여에 적합한 제형 또는 약학 조성물로 제조될 수 있다. 점막 흡수 강화제로는, 담즙산염, 지방산, 계면활성제 또는 알코올을 포함하나, 이들로 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 침투 강화제는 소듐 콜레이트, 소듐 도데실 설페이트, 소듐 데옥시콜레이트, 타우로데옥시콜레이트, 소듐 글리코콜레이트, 다이메틸설폭사이드 또는 에탄올을 포함하나, 이들로 한정되지 않는다. 다른 구현예로, 본 발명의 화합물은 화합물의 전달을 용이하게 하기 위해 점막 침투 강화제와 함께 제형화될 수 있다. 또한, 제형은 코 점막, 구강 점막, 질 점막, 호흡기 및 장 점막 등의 점막에서의 용해성, 약물 안정성 및 흡수성을 위해 pH 최적화하여 제조할 수 있다.
- [0333] 본 발명의 약학 제제의 점막 전달을 추가로 강화하기 위해, 활성 제제를 포함하는 제형은 베이스 또는 부형제로서 친수성의 저분자량 화합물을 포함할 수도 있다. 이러한 친수성의 저분자량 화합물은 생리 활성 펩타이드 또는 단백질 등의 수용성 활성 제제가 활성 제제가 흡수되는 신체 표면에서 베이스를 통해 확산할 수 있는 통과 매체 (passage medium)를 제공한다. 친수성의 저분자량 화합물은 선택적으로는 점막 또는 투여 환경 (administration atmosphere)으로부터 수분을 흡수하여, 수용성 활성 펩타이드를 용해시킨다. 친수성의 저분자량 화합물의 분자량은, 일반적으로, 10000 이하이며, 바람직하게는 3000 이하이다. 친수성의 저분자량 화합물의 예로는, 폴리올 화합물, 예컨대 올리고-, 다이- 및 모노사카라이드, 예를 들어, 슈크로스, 만니톨, 락토스, L-아라비노스, D-에리트로스, D-리보스, D-자일로스, D-만노스, D-갈락토스, 락툴로스, 셀로바이오스, 젠티바이오스, 글리세린 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 본 발명에서 담체로서 이용가능한 친수성의 저분자량 화합물에 대한 다른 예로는 N-메틸피롤리돈과 알코올 (예, 올리고비닐 알코올, 에탄올, 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 등)을 포함한다. 이들 친수성의 저분자량 화합물은 단독으로, 서로 조합하여, 또는 코내 제형의 다른 활성 또는 불활성 성분과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0334] 본 발명의 조절 방출형 약학 조제물이 친수성 베이스를 추가로 포함하는 경우, 포함에 많은 옵션들을 적용할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜과 폴리비닐 피롤리돈 등의 친수성 폴리머, D-소르비톨과 자일리톨 등의 당 알코올, 슈크로스, 말토스, 락툴로스, D-프럭토스, 텍스트란 및 글루코스 등의 사카라이드, 폴리옥시에틸렌-수소화된 캐스터 오일, 폴리옥시에틸렌 폴리옥시프로필렌 글리콜 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 고급 지방산 에스테르 등의 계면활성제, 소듐 클로라이드 및 마그네슘 클로라이드 등의 염, 시트르산 및 타르타르산 등의 유기산, 글리신, β-알라닌 및 라이신 하이드로클로라이드 등의 아미노산, 및 메글루민 등의 아미노사카라이드는 친수성 베이스의 예로서 제시된다. 폴리에틸렌 글리콜, 슈크로스 및 폴리비닐 피롤리돈이 바람직하며, 폴리에틸렌 글리콜이 보다 바람직하다. 2종 이상의 친수성 베이스를 조합하거나 또는 한가지를 본 발명에 사용할 수 있다.
- [0335] 본 발명은 흡입기를 통한 폐, 코 또는 경구 투여를 포함한다. 일 구현예에서, 흡입기로부터의 전달은 정량 흡입 (metered dose)일 수 있다.
- [0336] 흡입기는, 본 발명의 하나 이상의 화합물과 약제학적으로 허용가능한 분산제로 구성된 에어로졸 스프레이 제형이 든 스프레이 흡입기 (예, 코, 구강 또는 폐 스프레이 흡입기)를 포함하는, 본 발명의 하나 이상의 화합물을 환자가 자가-투여하기 위한 기구이다. 일 측면에서, 이 기구는 본 발명에 포함되는 질환 또는 장애를 치료하는데 유효한 용량으로 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함하는 스프레이를 구성함으로써, 에어로졸 제형을 상당량 분무하도록 계량된다. 분산제는 계면활성제, 비계면활성 예로, 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르, 폴리옥시에틸렌 지방산 알코올, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르일 수 있다. 인지질-기계의 계면활성제도

사용될 수 있다.

- [0337] 다른 구현예들에서, 에어로졸 제형은 본 발명의 화합물이 미분된 분말로서 존재하는 건조 분말 에어로졸 제형으로서 제공된다. 건조 분말 제형은 벌킹제, 비제한적인 예로서, 락토스, 소르비톨, 슈크로스 및 만니톨을 추가로 포함할 수 있다.
- [0338] 다른 구체적인 구현예에서, 에어로졸 제형은 약제학적으로 허용가능한 희석제, 비제한적인 예로서, 멸균수, 염수, 완충화된 염수 및 텍스트로스 용액을 추가로 포함하는 액체 에어로졸 제형이다.
- [0339] 다른 구현예에서, 에어로졸 제형은, 적어도 본 발명의 제1 또는 제2 화합물과 조합 사용하였을 때 본원에 언급된 질환 또는 장애의 증상들을 완화시키는데 유효한 계량된 양으로 부가적인 화합물이 기구에 의해 분무되는 에어로졸 제형의 계량된 양에 포함되는 농도로, 본 발명의 하나 이상의 부가적인 화합물을 추가로 포함한다.
- [0340] 이에, 본 발명은 알코올 관련 질환 또는 장애 등의 중독 관련 질환 또는 장애를 외래 치료 (outpatient treatment)하기 위한 자가 투여 방법을 제공한다. 이러한 투여는 병원에서, 건강 센터에서 또는 병원 또는 건강 센터 이외에서 비-의학 종사자가 자가 투여로 이용할 수 있다.
- [0341] 본 발명의 화합물은 코 투여에 적합한 제형 또는 약학 조성물로 제조될 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명의 화합물은 약물의 전달을 촉진시키기 위해 점막 침투 강화제와 함께 제형화할 수 있다. 또한, 제형은 코 점막을 통한 흡수, 용해성, 약물 안정성 및 기타 고려 사항을 위해 pH 최적화하여 제조할 수 있다.
- [0342] 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 캡슐제, 블리스터(blisters) 및 카트리지는 본원에 제공된 약학 조성물; 적정 분말 베이스, 예를 들어, 락토스 또는 전분; 및 성능 개변제, 예컨대 1-루신, 만니톨 또는 마그네슘 스테아레이트의 분말 믹스를 포함하도록 고안될 수 있다. 락토스는 무수물이거나 또는 일수화물 형태일 수 있다. 그 외 적합한 부형제로는 텍스트란, 글루코스, 말토스, 소르비톨, 자일리톨, 프럭토스, 슈크로스 및 트레할로스를 포함한다. 본원에 제시된 흡입/코내 투여용 약학 조성물은 적정 향료, 예를 들어 멘톨 및 레보멘톨, 또는 감미제, 예컨대 사카린 또는 사카린 소듐을 추가로 포함할 수 있다.
- [0343] 흡입에 의한 투여에 있어, 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위한 화합물들은, 적절한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 탄소 다이옥사이드 또는 기타 적정 가스를 사용하여, 가압 캡 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이를 제시하는 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 구비함으로써 측정할 수 있다. 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 예를 들어 젤라틴 캡슐제 및 카트리지는 락토스 또는 전분 등의 적정 분말 베이스와 약물의 분말 믹스를 포함하도록 고안될 수 있다.
- [0344] 본원에서, "부가적인 성분"은, 비제한적인 예로, 다음과 같은 성분들 중 하나 이상을 포함한다: 부형제; 계면활성제; 분산제; 불활성 희석제; 과립화제 및 붕괴제; 결합제; 윤활제; 감미제; 향료; 착색제; 보존제; 생리 분해성 조성물, 예컨대 젤라틴; 수성 비히클 및 용매; 오일성 비히클 및 용매; 현탁화제; 분산제 또는 습윤제; 유화제, 완화제; 완충제; 염; 증점제; 충전제; 유화제; 항산화제; 항생제; 항진균제; 안정제 및 약제학적으로 허용가능한 폴리머성 또는 소수성 물질. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 그의 "부가적인 성분"은 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 Genaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA에 개시되어 있으며, 이는 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0345] 전형적으로, 본 발명에 따른 화합물의 투여량은 동물, 바람직하기로는 인간에게, 동물의 체중 1 kg 당 1.0 μ g 내지 약 100 g으로 투여될 수 있다. 투여되는 정확한 투여량은, 비제한적인 예로서, 동물의 유형, 치료 중인 질병 상태의 유형, 동물의 나이와 투여 경로 등의, 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 바람직하기로는, 화합물의 투여량은 동물의 체중 1 kg 당 약 1 mg 내지 약 10 g으로 다양할 수 있다. 더 바람직하기로는, 투여량은 동물의 체중 1 kg 당 약 10 mg 내지 약 1 g으로 다양할 수 있다.
- [0346] 화합물은 매일 수차례씩 자주 개체에게 투여하거나, 또는 하루에 한번, 일주일에 한번, 2주마다 1번, 한달에 한번 또는 수 개월 마다 한번 또는 일년 미만으로 한번과 같이 보다 드문 빈도로 투여할 수 있다. 투약 횟수는 당업자라면 쉽게 알 것이며, 비제한적인 예로서, 치료 중인 질병의 유형과 중증도, 동물의 유형과 나이 등의 다양한 인자에 의해 결정될 것이다.
- [0347] 또한, 본 발명은 본 발명의 화합물과, 화합물의 투여를 나타낸 설명서를 포함하는 키트를 포함한다. 다른 구현예에서, 이러한 키트는 화합물을 포유류에게 투여하기 전에 본 발명의 조성물을 용해 또는 현탁시키는데 적합한 (바람직하게는 멸균) 용매를 포함한다.

[0348] 본원에서, "교시 자료"는, 본원에 인용된 다양한 질환 또는 장애를 완화시키기 위한 키트에서, 본 발명의 화합물의 유용성을 전달하기 위해 사용할 수 있는, 간행물, 기록, 도표 또는 기타 모든 표시 매체를 포함한다. 선택적으로, 또는 다른 예로, 상기 교시 자료는 질환 또는 장애를 완화하는 한가지 이상의 방법을 설명할 수 있다. 본 발명에 따른 키트의 교시 자료는, 예를 들어, 화합물이 든 용기에 부착되거나 또는 화합물이 든 용기와 함께 수송될 수 있다. 다른 예로, 교시 자료는, 수용자에게 교시 자료와 화합물이 함께 사용되도록 하는 의도로 용기와는 별도로 수송될 수 있다.

[0349] 추가적인 설명 없이도, 당업자라면 전술한 상세한 설명과 하기 예시된 실시예를 이용하여 본 발명의 화합물을 제조 및 이용하고 청구된 방법을 실시할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서, 하기 실무적인 실시예들은 본 발명의 바람직한 예를 구체적으로 나타내는 것일 뿐, 어떠한 방식으로든 나머지 내용을 제한하는 것으로 해석되지는 않는다.

[0350] **실시예들**

[0351] 재료 및 방법

[0352] 약물 및 화합물

[0353] S-트랜스, 트랜스-파르네실티오살리실산 (FTS, 살리라십)은 공지된 Ras 저해제로서, Concordia Pharmaceuticals, Inc. Ft. Lauderdale, FL로부터 입수하였다. 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-하이드록시부탄아미드 (CMH) (5809354)와 이의 불활성 유사체인 4-(4-클로로-2-메틸페녹시)-N-(3-에톡시프로필) 부탄아미드 (CMB) (6094911)는 ChemBridge Corporation (San Diego, CA) 사에서 구입하였다. TMS는 기존에 개시된 방법에 따라 합성하였다 (Kim S, Ko H, Park JE, Jung S, Lee SK, Chun YJ: Design, synthesis, and discovery of novel trans-stilbene analogues as potent and selective human cytochrome P450 1B1 inhibitors. *J Med Chem* 2002, **45**: 160-164). 17β-에스트라디올은 Steraloids, Inc. (Newport, RI) 사로부터 입수하였다. T-DM1은 Genentech, San Francisco, CA. 사로부터 선물 받았다. 타목시펜과 델타-토코트리엔올은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO) 사에서 구입하였다.

[0354] 세포 배양 조건

[0355] 모 세포 MCF-7은 5% FBS가 첨가된 IMEM에서 배양하였다. T47D 세포는 10% FBS가 첨가된 RPMI160에서 배양하였다. 타목시펜-내성 폐경기 세포 (Tamoxifen-resistant postmenopausal cell)는 5% DCC가 첨가된 페놀-무첨가 IMEM에서 배양하였고, 1년 이상 타목시펜 (10^{-7} M)을 처리한 것이다 [5]. 장기간 에스트로겐 고갈된 세포는 5% DCC가 첨가된 페놀-무첨가 IMEM에서 배양하였다 [6]. 아로마타제를 과다 발현하는 LTEDaro 세포는 첸 [7] 박사로부터 친절하게 선물받아, 10% DCC, 100 mg/L 소듐 피루베이트, 2 mM 1-글루타민 및 200 mg/L G418이 첨가된 페놀-레드 무첨가 MEM에서 배양하였다.

[0356] 증식 저해 및 약물 상호작용 분석

[0357] 세포를 웰 당 세포 수 60,000개의 밀도로 6웰 플레이트에 접종하였다. 2일 후, 세포에 도면들 설명에 기술된 바와 같이 3 세트로 처리하였다. 처리 종료시, 세포를 염수로 2회 세척하였다. 1 mL HEPES-MgCl₂ 용액 (0.01mol/L HEPES 및 1.5mmol/L MgCl₂)과 0.1 mL ZAP 용액 [3% 빙초산 (v/v) 중의 0.13 mol/L 에틸헥사테실다이메틸암모늄 브로마이드]을 순차적으로 첨가하여, 핵을 준비한 다음, 쿨터 계수기(Coulter counter) (BeckmanCoulter, Inc., Fullerton, CA)로 계수하였다. 농도 반응 곡선은 3세트 샘플들로부터 구하고, 반수-효과 농도 D₅₀를 Compusyn 소프트웨어로 계산하였다 [8,9]. 조합 인덱스와 평균 및 표준편차의 값을 Biosoft (Cambridge, U.K.) 사의 컴퓨터 소프트웨어 CalcuSyn을 이용한 몬테 카를로 시뮬레이션으로 계산하였다 [10].

[0358] 면역침강

[0359] 100 mm 디쉬에 배양한 세포를 차가운 PBS로 행군 다음 1 ml 세포용해 완충액 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 25 mM NaF, 2 mM NaVO₄, 5% 글리세롤, 1% Triton X-100, 10 mg/ml 류펩틴, 아프로티닌 및 펩스타틴)으로 추출하였다. 샘플을 얼음 위에 30분간 둔 다음, 초음파 처리하고, 4°C에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 총 단백질 0.5 mg이 포함된 상층액을 타겟 단백질에 대한 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션한 다음, 40 μl 단백질 G 비드 (Invitrogen)를 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 계속 인큐베이션하였다. 면역복합체가 결합된 단백질 G 비드를 20초간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하였다.

비드를 1 ml 완충액 II (20 mM MOPS, 2 mM EGTA, 5 mM EDTA, 25 mM NaF, 40 mM β-글리세로포스페이트, 10 mM 소듐 피로포스페이트, 2 mM NaVO₄, 0.5% Triton X-100, 1 mM PMSF, 10 mg/ml 류펩틴, 아프로티닌 및 펩스타틴)으로 2번 헹군 다음, 50 μl 2x 램나이(Laemmlli) 완충액 중에서 끓였다. 샘플을 10% SDS 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동한 다음 면역블롯팅하였다.

[0360] 조합 인덱스 및 약효등효도 분석

[0361] 물질들간의 상호작용 특성을 Chou & Talalay [8,9]의 조합 인덱스 방법에 따라 평가하였다. 이 방법은 반수 효과 공식을 기반으로 한다:

[0362]
$$f_a/f_u (D/D_m)^m \quad (1)$$

[0363] 상기 식에서, D는 농도이고, D_m은 증식을 50% 저해하는 농도이고, f_a는 농도 D에 의해 영향을 받는 세포 분획 (cell fraction)이고, f_u는 영향을 받지 않는 분획이며, m은 농도 효과 곡선의 시그모이드성(sigmoidicity)을 규정하는 계수이다. 이러한 상관관계와 질량 작용의 법칙으로 복수의 저해제들의 상호작용에 대한 일반식이 유추된다:

[0364]
$$(f_a)_{A,B}/(f_u)_{A,B} = (f_a)_A/(f_u)_B + (f_a)_B/(f_u)_B + a(f_a)_A(f_a)_B/(f_u)_A(f_u)_B \quad (2)$$

[0365] 상기에서, (f_a)_A, (f_u)_B 및 (f_a)_{A,B}는 물질 A와 B의 각각의 단독 및 조합에 의해 영향을 받는 분획이다. 등식 1과 2로부터, 조합 인덱스 (CI)를 다음과 같이 유추할 수 있다:

[0366]
$$CI = (D)_A/(D_x)_A + (D)_B/(D_x)_B + a (D)_A(D)_B/(D_x)_A(D_x)_B \quad (3)$$

[0367] 상기에서, D는 증식을 x% 저해하는 농도이고, 상호 배타적인 약물인 경우 α = 0이고, 상호 비-배타적인 약물인 경우에는 α = 1이다. CalcuSyn 소프트웨어에 따라 상승 작용은 CI < 1로서 계산 및 정의되며; 상가 작용은 CI = 1이고, 길항 작용은 CI > 1이다 [10].

[0368] 통계 분석

[0369] 조합 인덱스의 평균 + 표준편차 값들은 몬테 카를로 알고리즘과 CalcuSyn 프로그램을 이용하여 계산하였다 [10].

[0370] 본 발명의 구현예들:

[0371] 1. 암 치료 방법으로서,

[0372] 단일클론 항체 모이어티와 그것에 연결된 제1 세포자살 유발성 약물(pro-apoptotic drug) 모이어티를 포함하는 면역접합체(immunoconjugate)를 유효량으로 암 환자에게 투여하는 단계; 및

[0373] 제2 세포자살 유발성 약물을 유효량으로 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.

[0374] 2. 제1 구현예에 있어서, 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티가 단일클론 항체 모이어티에 공유 결합된 것임을 특징으로 하는 방법.

[0375] 3. 제1 또는 제2 구현예에 있어서, 상기 암이 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

[0376] 4. 제3 구현예에 있어서, 상기 유방암이 아로마타제 내성 유방암 (aromatase-resistant breast cancer)인 것을 특징으로 하는 방법.

[0377] 5. 제3 구현예에 있어서, 상기 유방암이 타목시펜 내성 유방암 (tamoxifen-resistant breast cancer)인 것을 특징으로 하는 방법.

[0378] 6. 제3 구현예에 있어서, 상기 유방암이 ER+ 호르몬 불응성 유방암 (ER+ hormone refractory breast cancer)인 것을 특징으로 하는 방법.

[0379] 7. 제3 구현예에 있어서, 상기 유방암이 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

[0380] 8. 제5 구현예에 있어서, 상기 유방암이 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 하는 방법.

[0381] 9. 제3 구현예에 있어서, 상기 유방암이 HER2 발현이 상향 조절된 암 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는

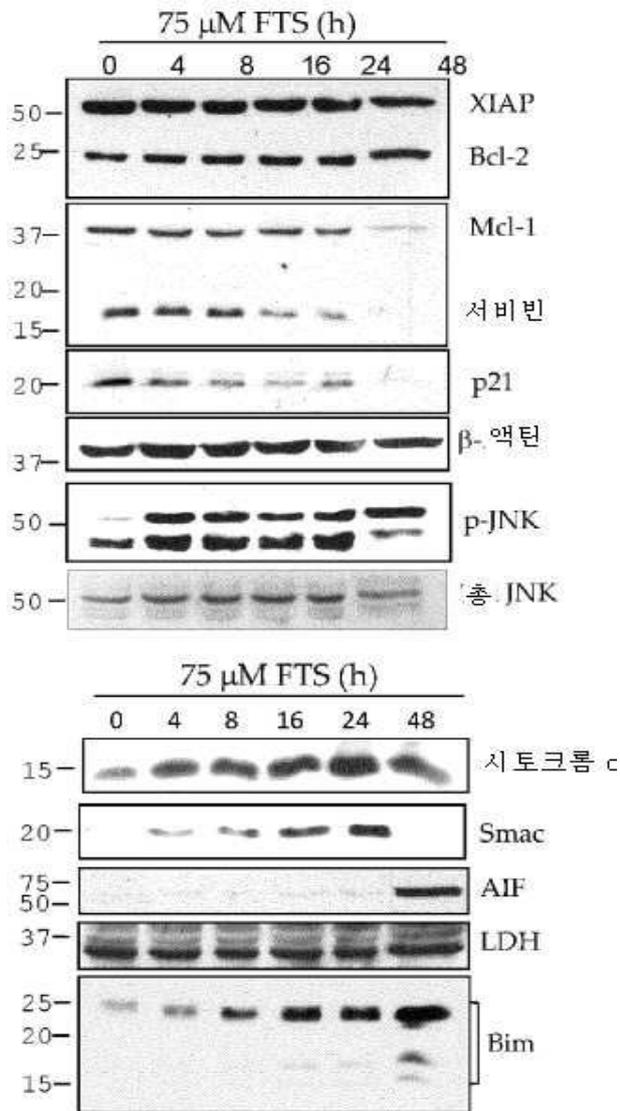
방법.

- [0382] 10. 제1 내지 제9 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역접합체가 HER2에 결합하는 것임을 특징으로 하는 방법.
- [0383] 11. 제9 구현예에 있어서, 단일클론 항체 모이어티가 트라스투주맵 (trastuzumab)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0384] 12. 제1 내지 제11 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티가 미소관 탈중합제(microtubule depolymerization agent)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0385] 13. 제12 구현예에 있어서, 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티가 메이탄시노이드(maytansinoid) 또는 아우리스타틴(auristatin)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0386] 14. 제1 내지 제12 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역접합체가 링커를 통해 메이탄시노이드 세포자살 유발성 약물 모이어티에 공유적으로 커플링된 트라스투주맵인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0387] 15. 제14 구현예에 있어서, 면역접합체가 T-DM1인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0388] 16. 제1 내지 제15 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티에 의해 발휘되는 세포독성의 분자 기전과는 다른 분자 기전을 통해 세포독성을 발휘하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0389] 17. 제1 내지 제16 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역접합체와 제2 세포자살 유발성 약물의 투여가 상승 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0390] 18. 제16 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 외인성 경로(extrinsic pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 약물인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0391] 19. 제18 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 Fas 경로를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0392] 20. 제18 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 c-FLIP 경로를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0393] 21. 제18 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 CMH, E2 또는 δ -토코트리에놀인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0394] 22. 제16 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 내인성 경로(intrinsic pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 약물인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0395] 23. 제22 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 카스파제-비의존형 경로(caspase-independent pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0396] 24. 제22 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 카스파제-의존형 경로(caspase-dependent pathway)를 통해 세포자살을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0397] 25. 제22 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 E2, FTS 또는 δ -토코트리에놀인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0398] 26. 제1 내지 제25 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 항암제가 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀 또는 커큐민인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0399] 27. 제1 내지 제26 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 면역접합체가 T-DM1이고, 제2 세포자살 유발성 약물이 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀 또는 커큐민인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0400] 28. 제27 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 E2, FTS, δ -토코트리에놀 또는 TMS인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0401] 29. 제27 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 약물이 FTS인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0402] 30. 제27 구현예에 있어서, 면역접합체와 제2 세포자살 유발성 약물의 투여가 상승 작용을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

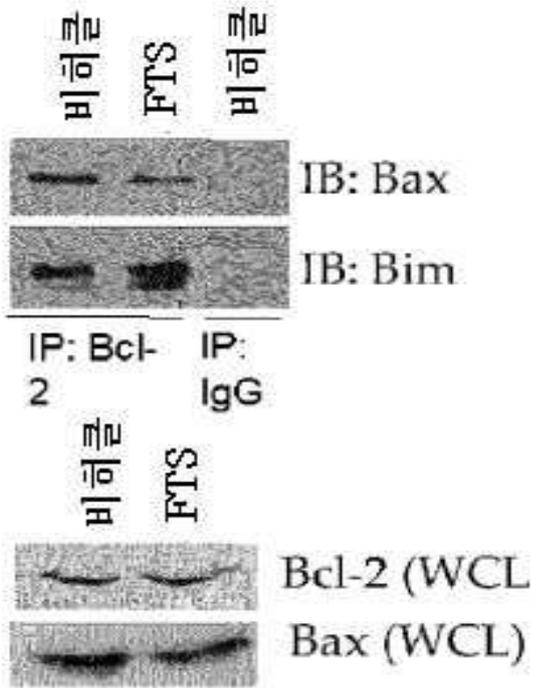
- [0403] 31. 제1 내지 제30 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역접합체를 투여한 후, 링커 모이어티가 HER2 내성의 유방암 세포 안에서 생체내 절단되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0404] 32. 제1 구현예에 있어서,
- [0405] 환자에게, 유효량의 T-DM1을, FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀, 커큐민 또는 이들의 임의 조합의 유효량과 병용 (conjunction) 투여하는 단계를 포함하는, 암 환자에서 아로마타제 내성 유방암을 치료하는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0406] 33. 제1 내지 제32 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법이 보조 요법 (adjuvant therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0407] 34. 제1 내지 제32 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법이 1차 치료법(first-line therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0408] 35. 제1 내지 제32 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 방법이 2차 치료법(second-line therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.
- [0409] 36. 제1 내지 제35 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서, 면역접합체와 제2 세포자살 유발성 약물이 조합 제형(combined formulation)으로 또는 서로 교대로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0410] 37. 제1 내지 제36 구현예들 중 어느 한 구현예에 있어서,
- [0411] 상기 환자에게, 선택적으로, 상기 제1 세포자살 유발성 항암제 모이어티의 분자 기전 및 상기 제2 세포자살 유발성 항암제의 분자 기전과 상이한 분자 기전을 통해 발휘되는, 부가적인 항암제를 투여하는 단계; 또는
- [0412] 상기 환자에게, X선, 감마선, 방사선헤중 방출 또는 원자 수준 미만 입자(subatomic particle)를 포함하는 이온화 방사선을 투여하는 단계;
- [0413] 또는 이들 단계들의 조합을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0414] 38. (a) 제1 세포자살 유발성 약물 모이어티에 연결된 단일클론 항체 모이어티를 포함하는 면역접합체, 및
- [0415] (b) 제2 세포자살 유발성 약물
- [0416] 을 포함하는 치료 조성물.
- [0417] 39. 제38 구현예에 있어서, 상기 공유 면역접합체가 T-DM1인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [0418] 40. 제38 구현예에 있어서, 제2 세포자살 유발성 항암제가 FTS, CMH, E2, TMS, δ -토코트리에놀 또는 커큐민인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [0419] 본원에 언급된 특허, 특허 출원 및 공개문헌들 각각 및 전부는, 그 전체 내용이 원용에 의해 본 명세서에 포함된다.
- [0420] 참조를 위해, 그리고 특정 섹션을 찾을 수 있도록, 표제가 기재된다. 이들 표제는 본원에 언급된 개념의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니며, 이들 개념은 명세서 전체에 걸쳐 다른 섹션들에서도 적용가능할 수 있다.
- [0421] 본 발명은 구체적인 구현예를 들어 기술되어 있지만, 당해 기술 분야의 당업자라면 본 발명의 진정한 사상과 범위 내에서 본 발명에 대한 다른 구현예들과 변형을 계획할 수 있음은 자명하다.

도면

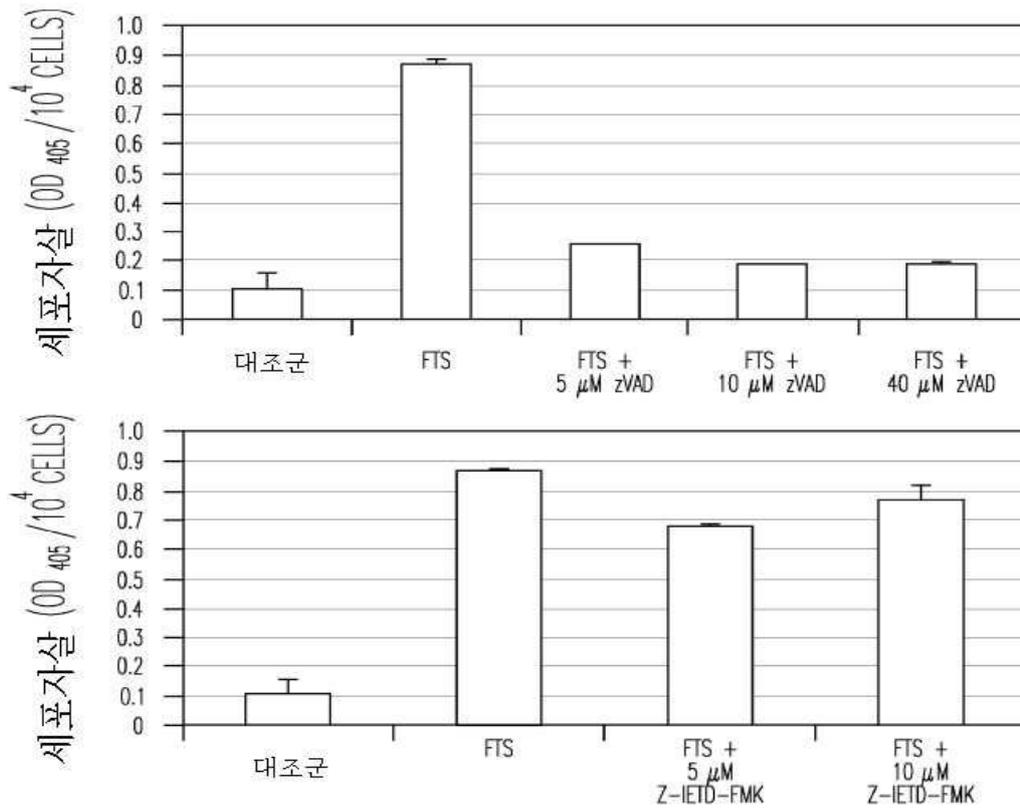
도면1a



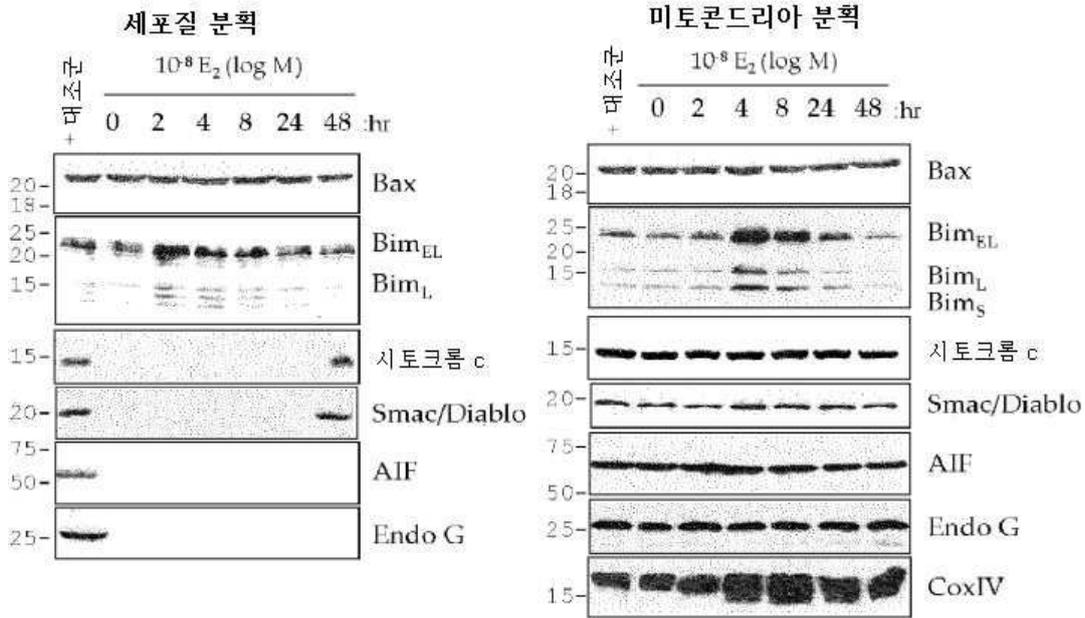
도면1b



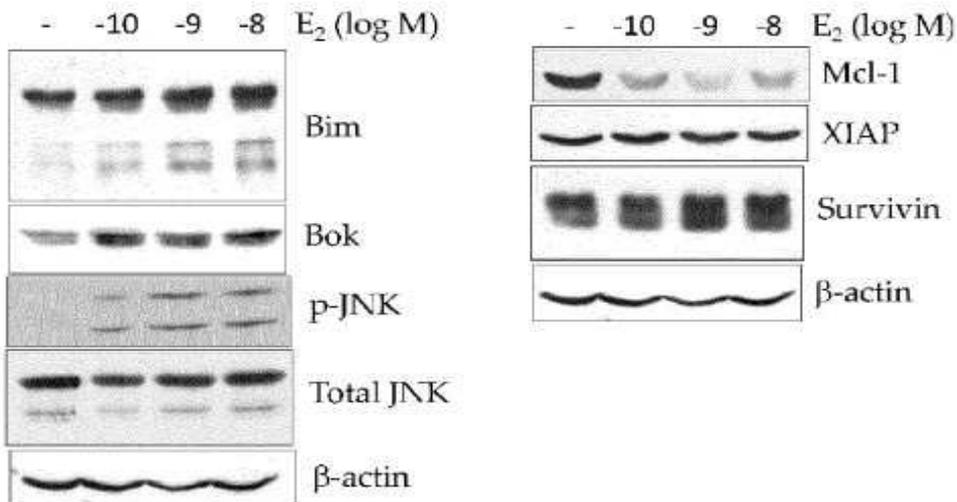
도면1c



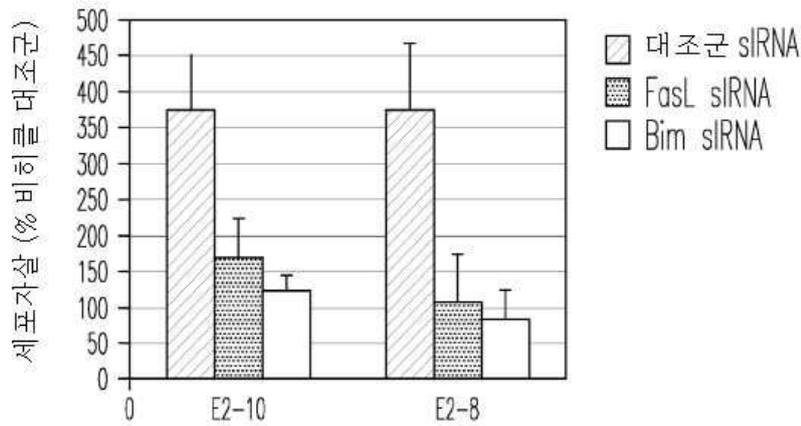
도면1d



도면1e

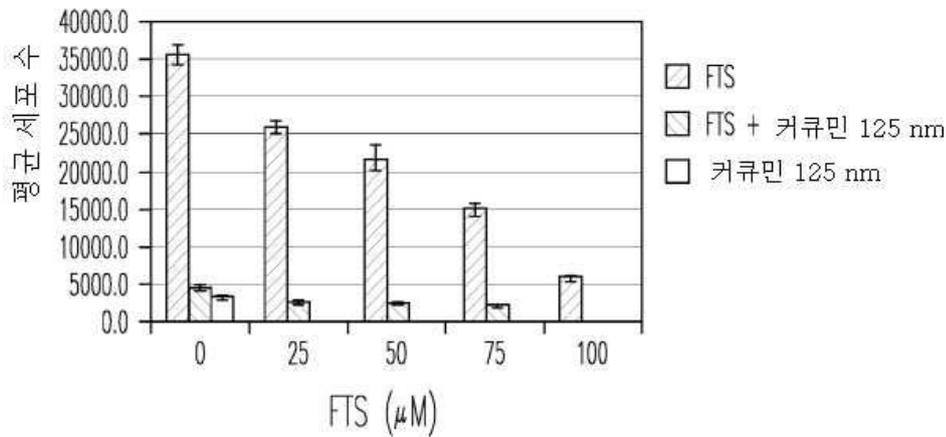


도면1f



도면2a

5일간 표시된 바와 같이 MCF-7 세포 처리

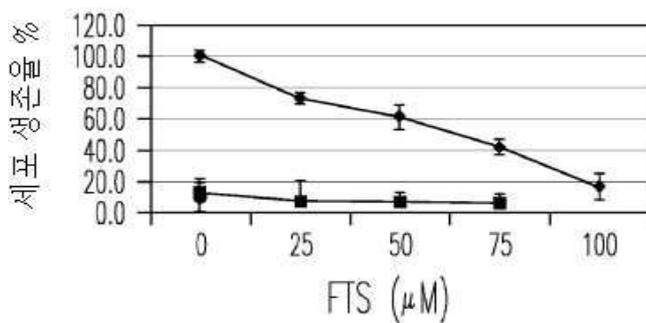


도면2b

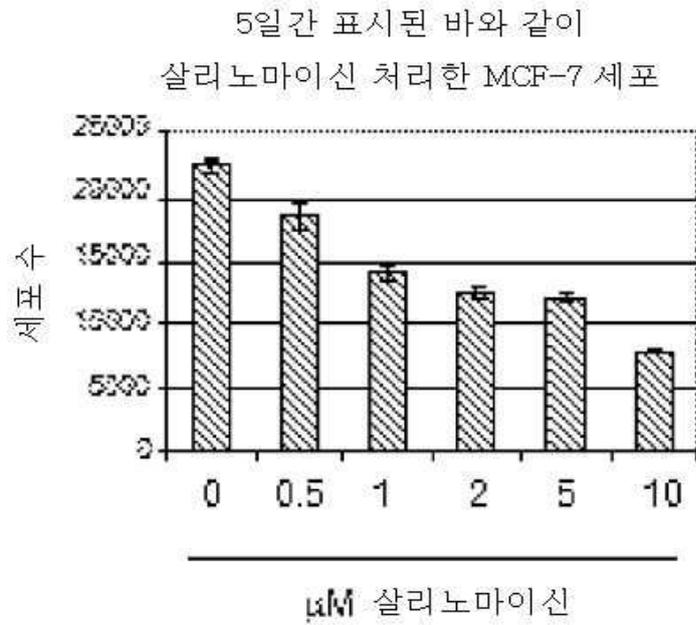
5일간 표시된 바와 같이

MCF-7 세포 처리

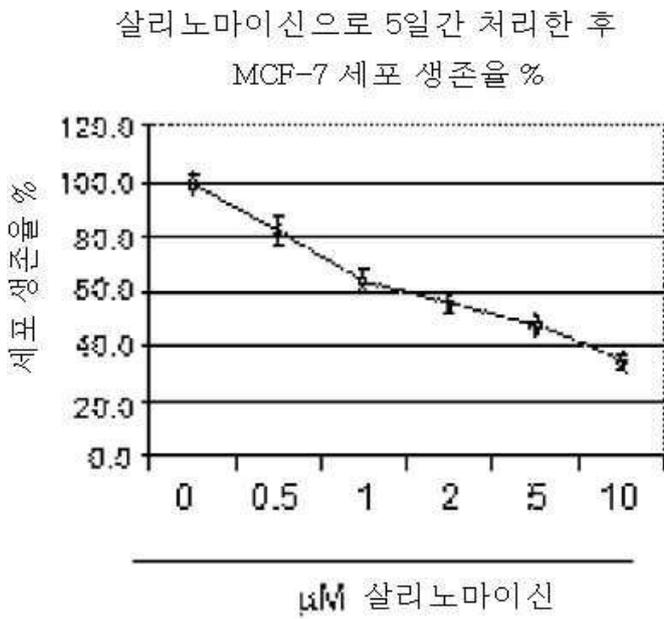
- ◆ FTS
- FTS + 커큐민 125 nm
- 커큐민 125 nm



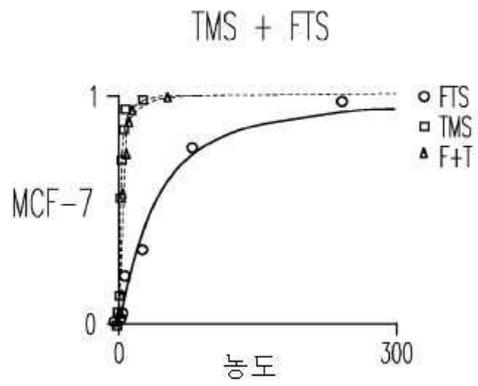
도면3a



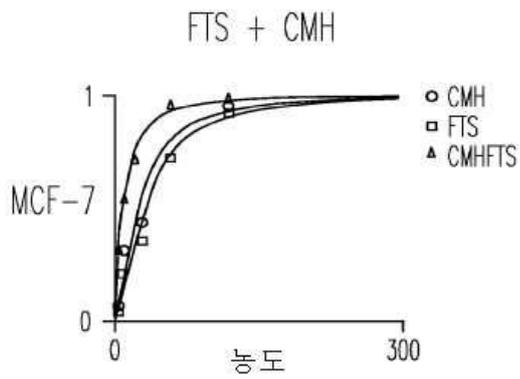
도면3b



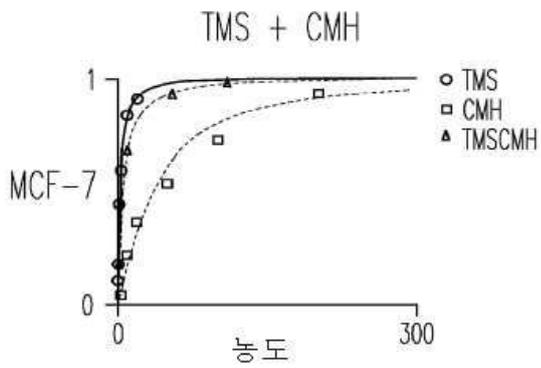
도면4a



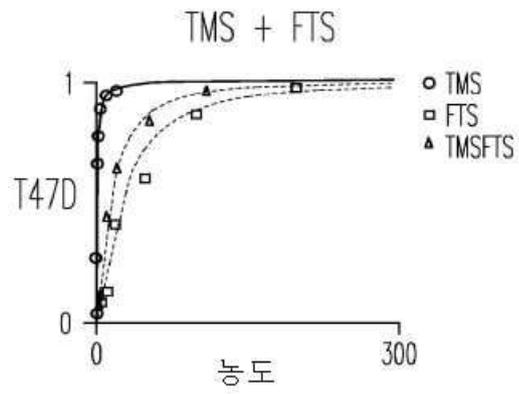
도면4b



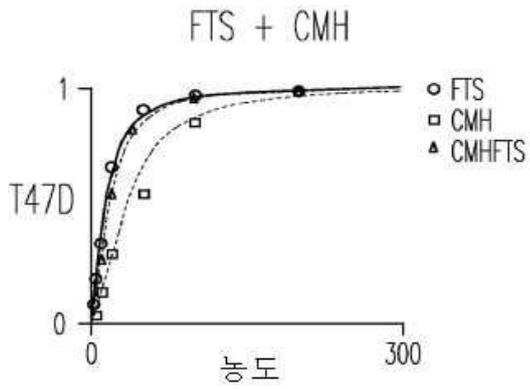
도면4c



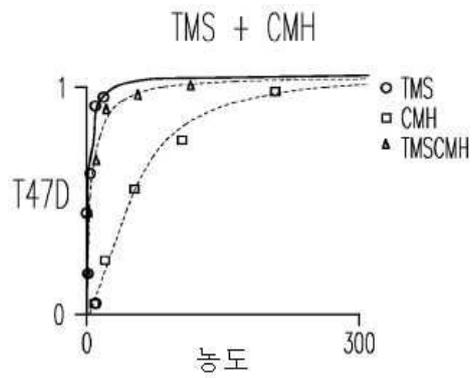
도면4d



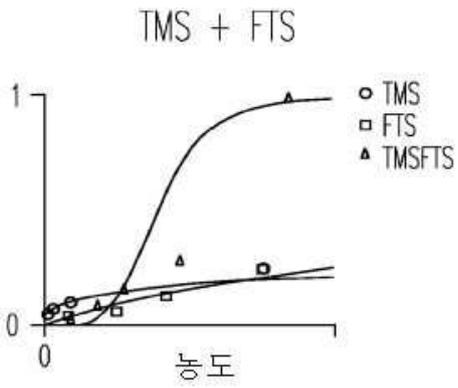
도면4e



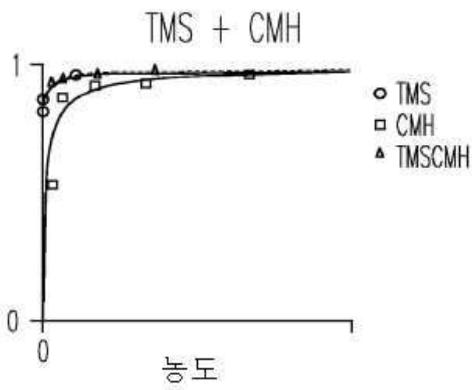
도면4f



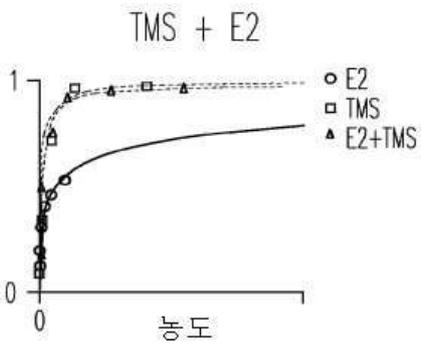
도면5a



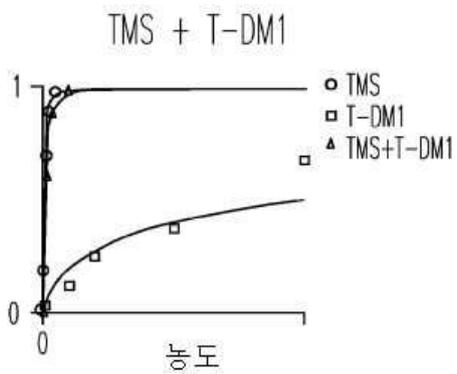
도면5b



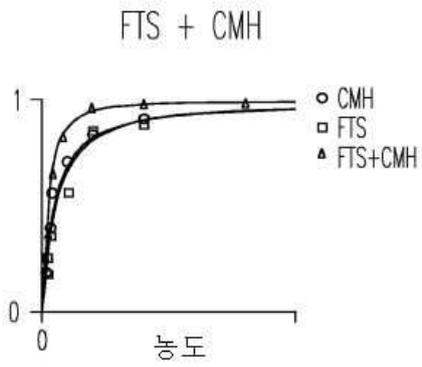
도면5c



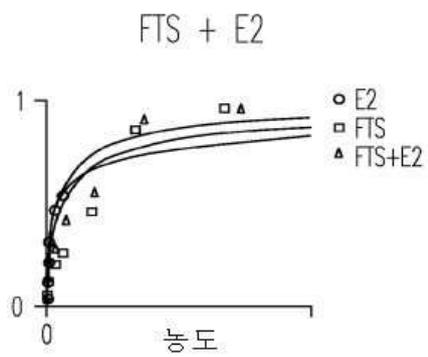
도면5d



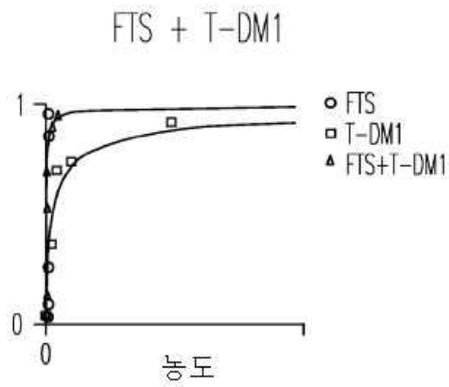
도면5e



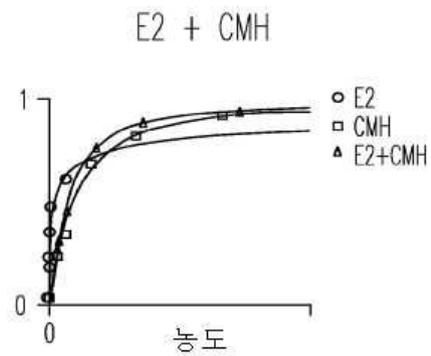
도면5f



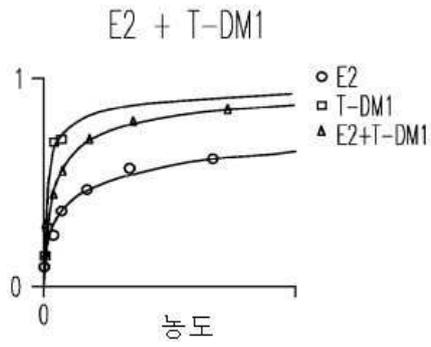
도면5g



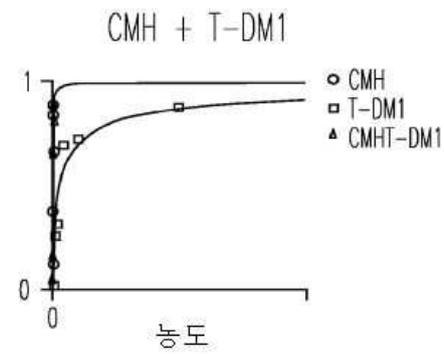
도면5h



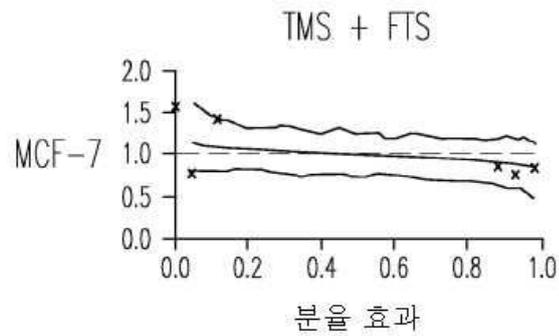
도면5i



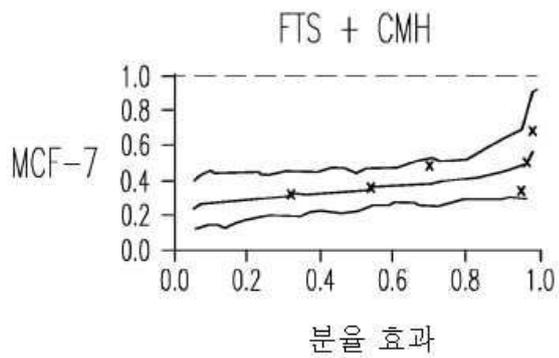
도면5j



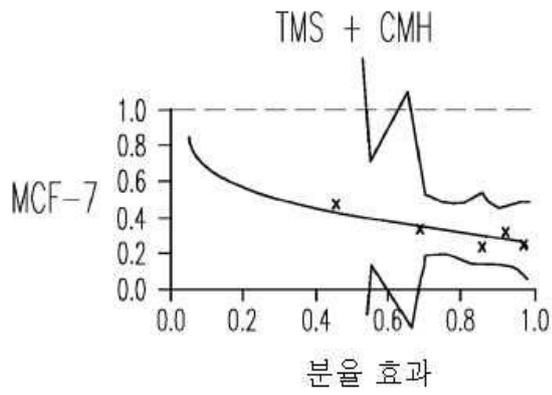
도면6a



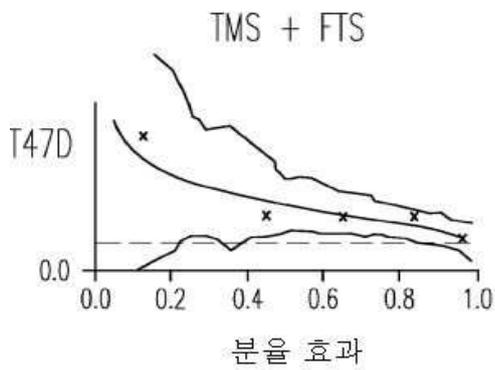
도면6b



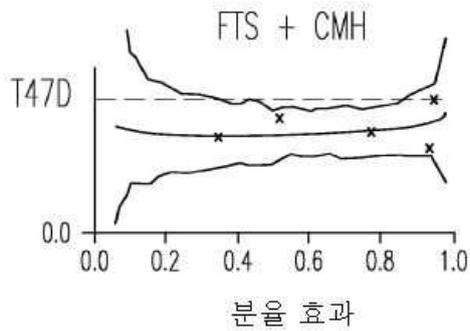
도면6c



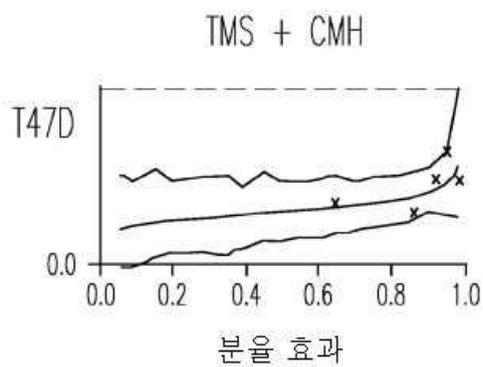
도면6d



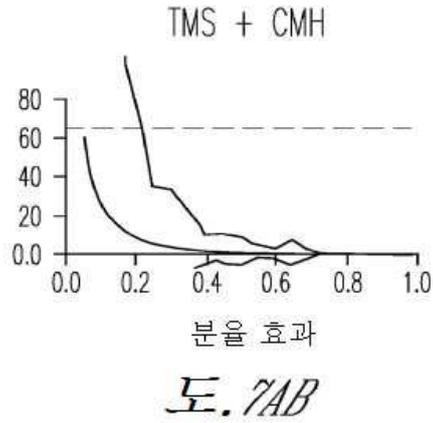
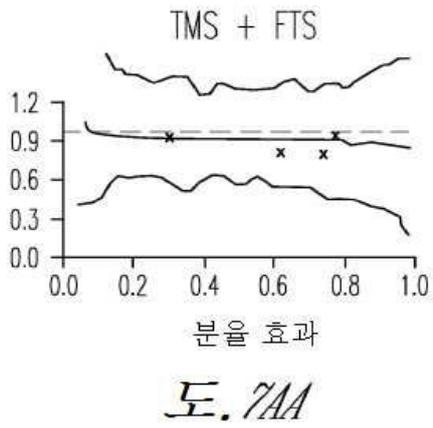
도면6e



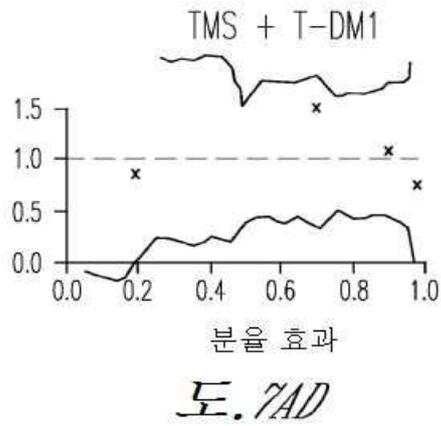
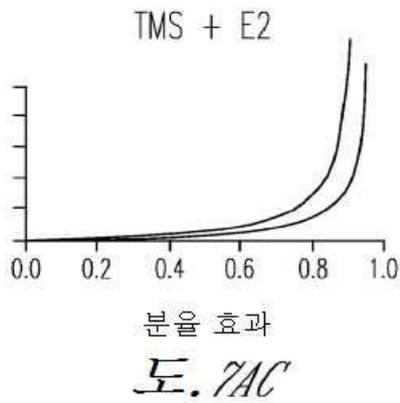
도면6f



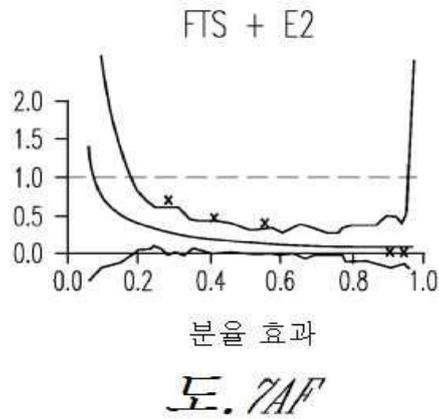
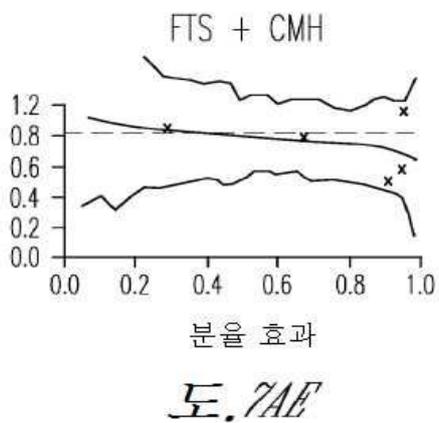
도면7a



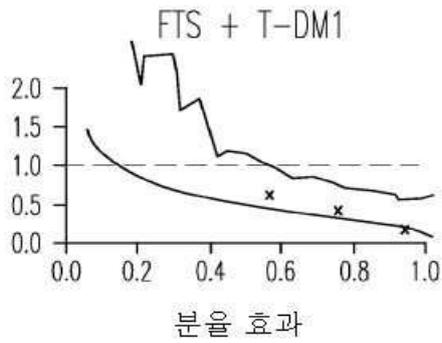
도면7b



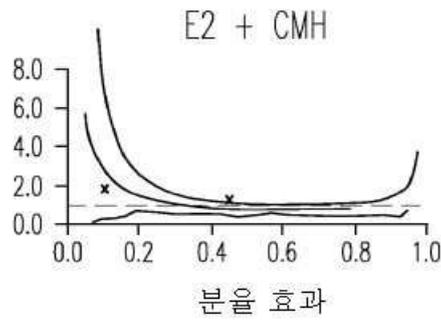
도면7c



도면7d

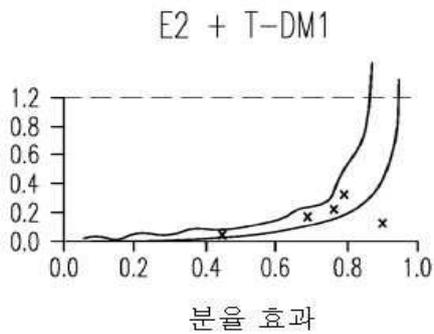


도. 7AG

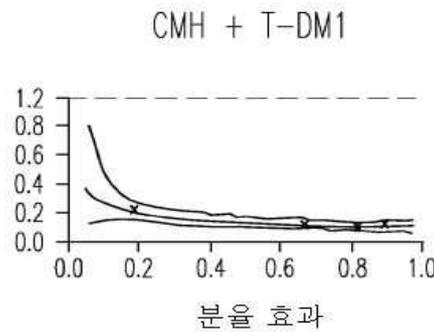


도. 7AH1

도면7e



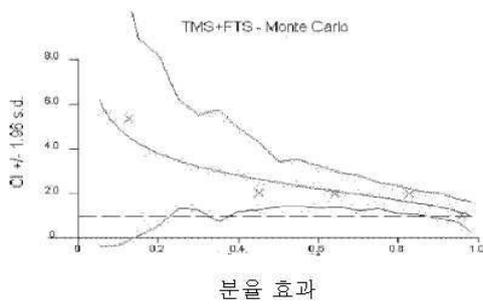
도. 7H2



도. 7AI

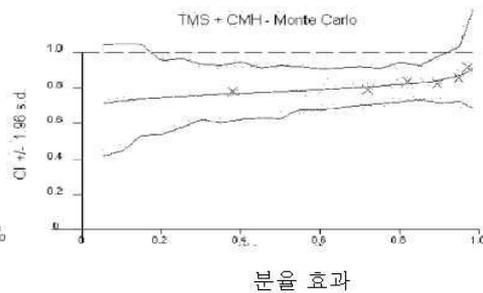
도면7f

j. TMS + FTS



도. 7BJ

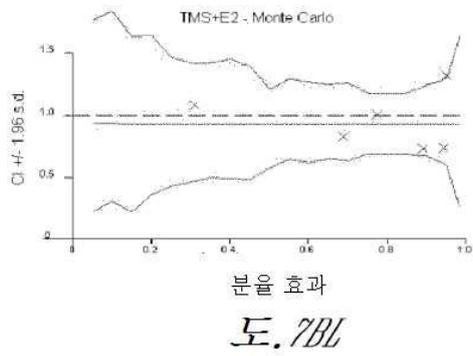
k. TMS + CMH



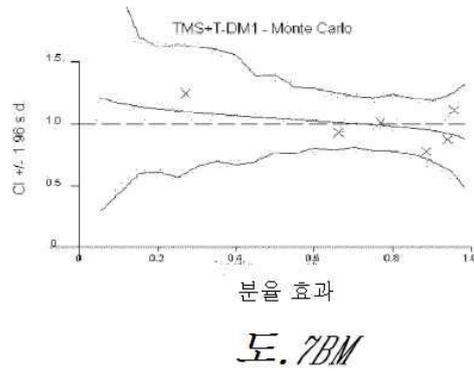
도. 7BK

도면7g

l. TMS + E2

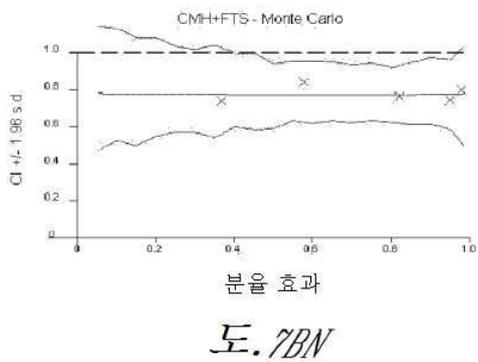


m. TMS + T-DM1

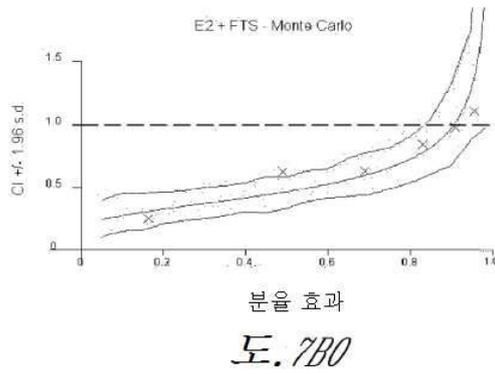


도면7h

n. FTS + CMH

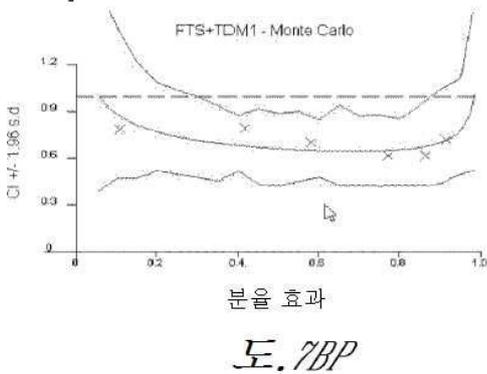


o. FTS + E2

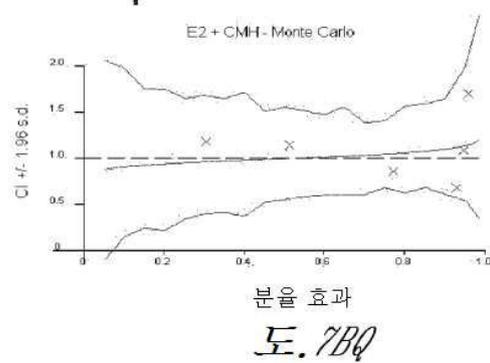


도면7i

p. FTS + T-DM1

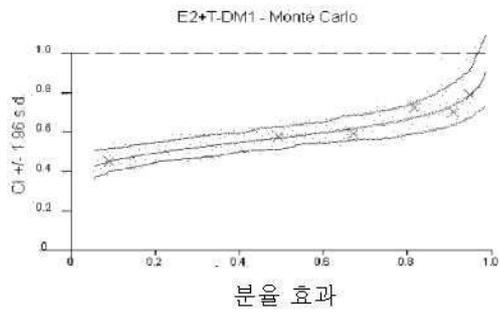


q. E2 + CMH



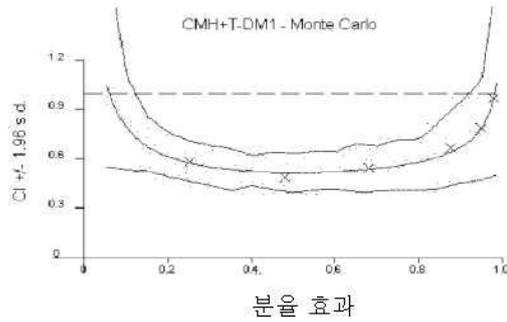
도면7j

r. E2 + T-DM1



도. 7BR

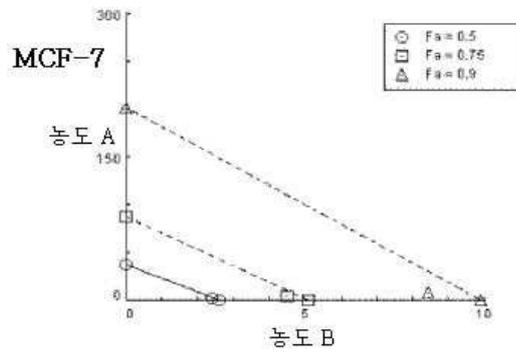
s. CMH + T-DM1



도. 7BS

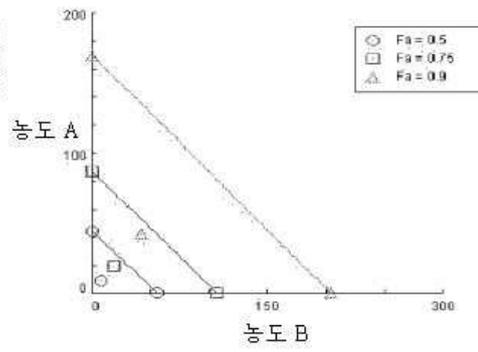
도면8a

a. TMS + FTS



도 8A

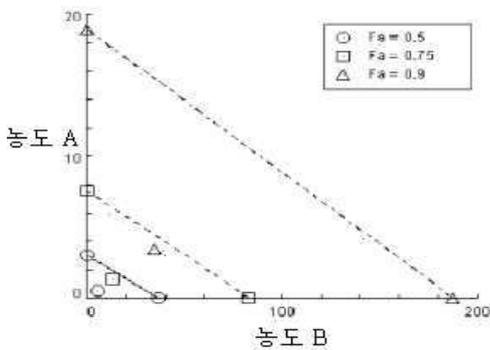
b. FTS + CMH



도 8B

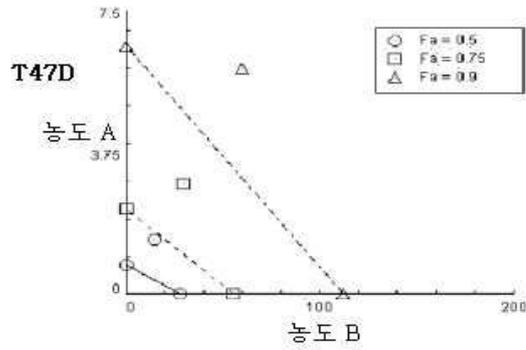
도면8b

c. TMS + CMH



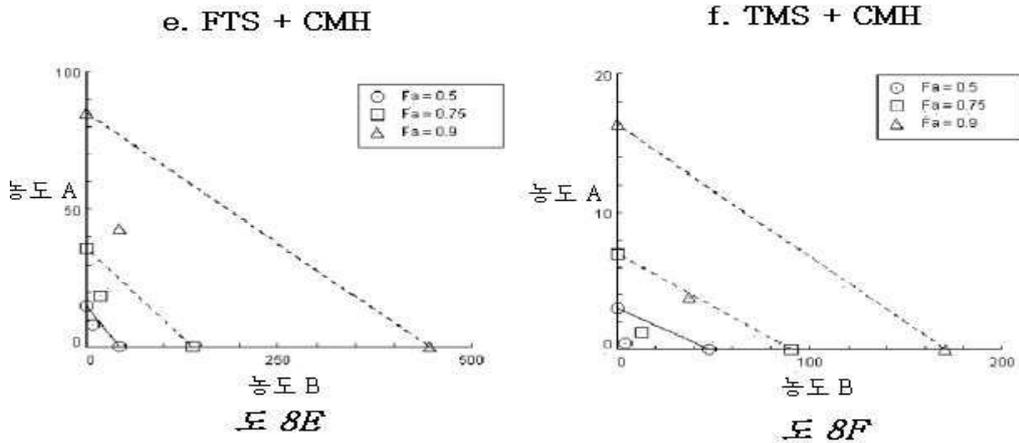
도 8C

d. TMS + FTS

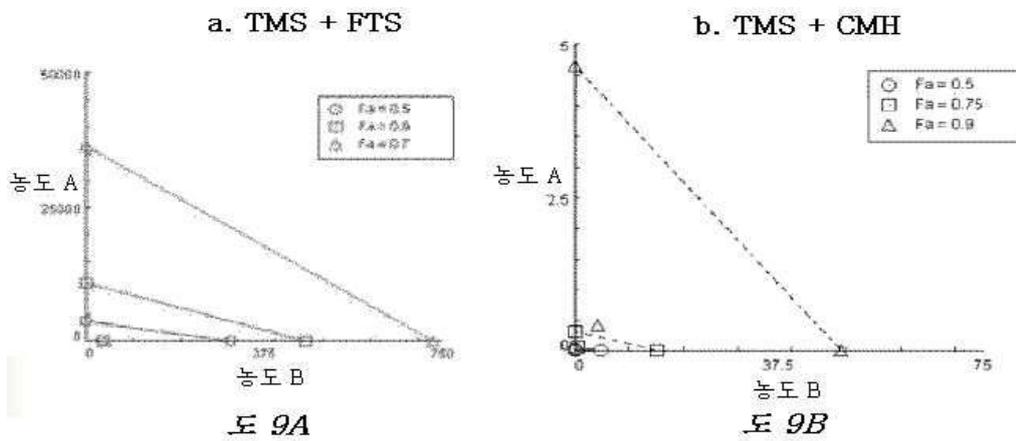


도 8D

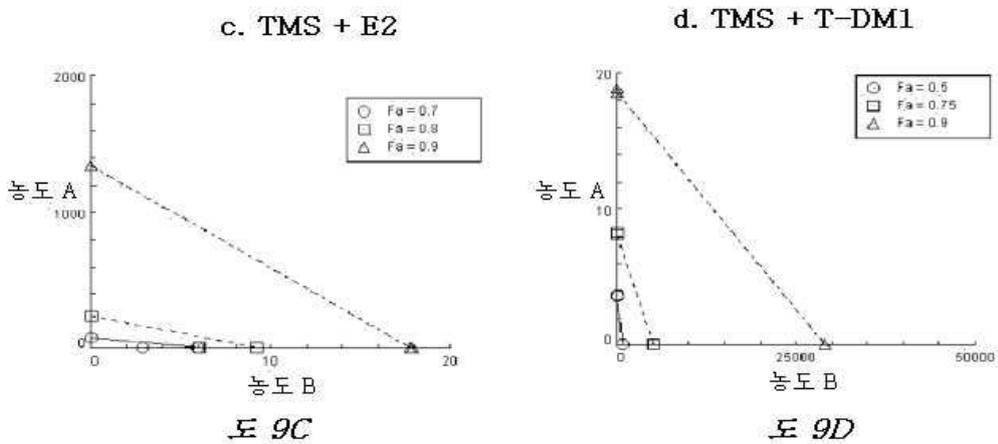
도면8c



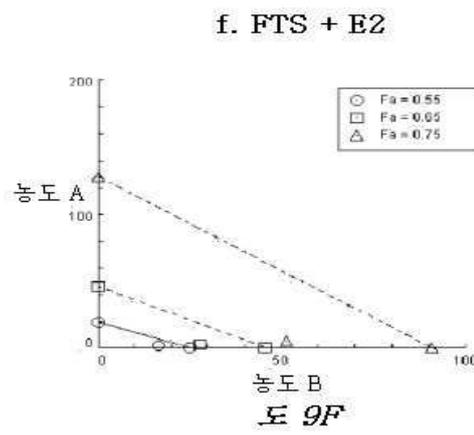
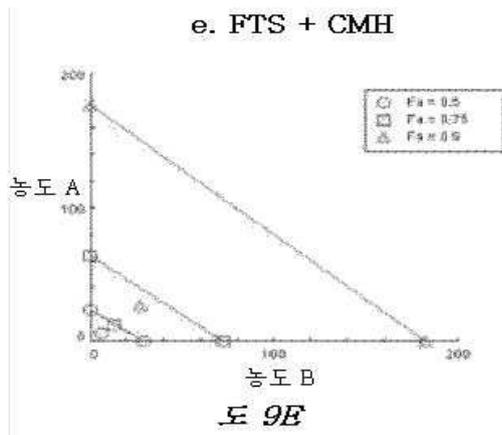
도면9a



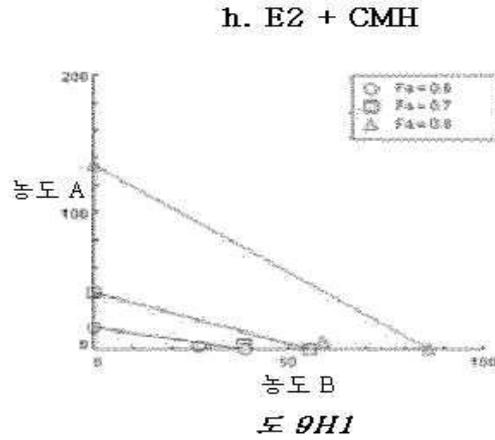
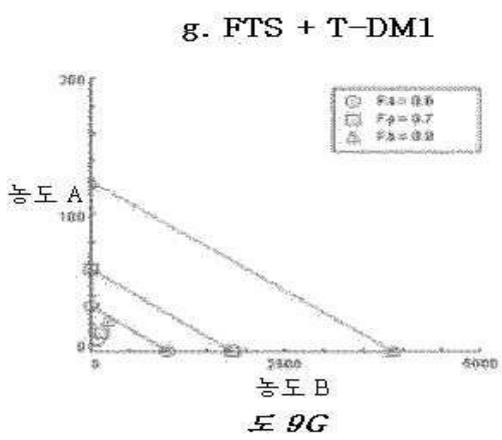
도면9b



도면9c



도면9d



도면9e

