



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. A61K 31/495 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년05월16일 10-0718946 2007년05월10일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2003-7006228	(65) 공개번호	10-2003-0048127
(22) 출원일자	2003년05월06일	(43) 공개일자	2003년06월18일
심사청구일자	2004년10월26일		
번역문 제출일자	2003년05월06일		
(86) 국제출원번호	PCT/GB2001/004902	(87) 국제공개번호	WO 2002/36135
국제출원일자	2001년11월06일	국제공개일자	2002년05월09일

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 리히텐슈타인, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크, 에쿠아도르, 필리핀, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 오만,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 아이프러스, 터어키,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니,

(30) 우선권주장	60/246,233	2000년11월06일	미국(US)
	60/248,095	2000년11월13일	미국(US)
	60/345,982	2001년10월19일	미국(US)

(73) 특허권자

파르마 마르, 에스.에이.
스페인, 01-28760 트레 칸토스, 폴리곤느, 인더스트리알 드 트레 칸토스, 칼르 드 라 칼레라 3

(72) 발명자

다카하시나오토
미국뉴욕10021뉴욕메모리얼슬로언캐터링요크에비뉴1275

웨이트맨스티브

미국텍사스78245-3217샌안토니오오미크론14960캔서썬라피앤드리서
치센터인스티튜트포드러그디벨롭먼트

딘칼씨마우리지오
이탈리아아이-밀란인스티튜트드레세르체파르마콜로기체마리오네그리

패이클로쓰글린토마스
미국매사추세츠02139-4616캠브리지풋남애비뉴320파르마마르유에스
에이인코포레이티드

지아바지라파엘라
이탈리아아이-밀란인스티튜트드레세르체파르마콜로기체마리오네그
리

게쉬어안드레아스
영국우드하우스이브스엘이128에스에스브랜드힐스위쓰랜드코트7

(74) 대리인 리엔목록특허법인

(56) 선행기술조사문헌
US 5256663

심사관 : 이재정

전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 효과적인 항종양 치료

(57) 요약

ET-743은 ET-743과 다른 약물을 채용하는 조합 요법에 의하여 종양의 효과적인 치료용 약제의 제조에 사용된다.

특허청구의 범위

청구항 1.

엑티나시딘 743 및 상기 엑티나시딘 743과 상승적으로 조합되는 항암제를 포함하는 종양 치료용 조성물로서, 상기 항암제는 독소루비신, 에피루비신, 시스플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 5'-플루오로우라실, 시타라빈, 짐시타빈, 펜토스타틴, 메토트렉세이트, 7-에틸-10-히드록시캄프토테신, 트리메트렉세이트, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 텍사메타손으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 2.

삭제

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신인 것인 조성물.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 항암제는 독소루비신이고, 상기 종양은 육종(sarcoma)의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 7.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴인 것인 조성물.

청구항 8.

제 7항에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴이고, 상기 종양은 육종, 결장암, 장암 또는 폐암의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 파클리탁셀인 것인 조성물.

청구항 12.

제 11항에 있어서, 상기 항암제는 파클리탁셀이고 상기 종양은 육종의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 13.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 잼시타빈인 것인 조성물.

청구항 14.

제 13항에 있어서, 상기 항암제는 잼시타빈이고 상기 종양은 유방암의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 15.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 7-에틸-10-히드록시캄프토테신인 것인 조성물.

청구항 16.

제 15항에 있어서, 상기 항암제는 7-에틸-10-히드록시캄프토테신이고 상기 종양은 폐암 또는 결장암의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 17.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 트리메트렉세이트인 것인 조성물.

청구항 18.

제 17항에 있어서, 상기 항암제는 트리메트렉세이트이고 상기 종양은 육종의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 19.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 빈블라스틴인 것인 조성물.

청구항 20.

제 19항에 있어서, 상기 항암제는 빈블라스틴이고 상기 종양은 신장암의 결과로 존재하는 것인 조성물.

청구항 21.

제 1항, 제 5항 내지 제8항 또는 제 11항 내지 제 20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 액티나시딘 743 및 상기 항암제는 단일 약제로서 제공되는 것인 조성물.

청구항 22.

제 1항, 제 5항 내지 제8항 또는 제 11항 내지 제 20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 액티나시딘 743 및 상기 항암제는 별개의 약제들로서 제공되는 것인 조성물.

청구항 23.

제 22항에 있어서, 상기 액티나시딘 743을 포함하는 별개의 약제는 상기 항암제를 포함하는 약제와 동시에 투여되는 것인 조성물.

청구항 24.

제 22항에 있어서, 상기 액티나시딘 743을 포함하는 별개의 약제는 상기 항암제를 포함하는 약제와 상이한 때에 투여되는 것인 조성물.

청구항 25.

제 1항, 제 5항 내지 제8항 또는 제 11항 내지 제 20항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항암제 또는 상기 항암제와 액티나시딘 743의 조합은 리포솜 또는 나노구 포집체(nanosphere encapsulation)에 의해 전달되는 것인 조성물.

청구항 26.

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 텍사메타손인 것인 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 효과적인 항종양 치료에 관한 것이다.

액티나시딘 743(Ecteinascidin 743), ET-743은 해양(marine source)으로부터 유래한 항암제이다.

배경기술

암 치료용 ET-743의 조성물 및 그 용도에 대한 정보는 2000년 11월 23일에 공개된 WO0069441를 참조하기 바라며, 상기 공개 특허의 본문은 원용에 의하여 본 명세서에 포함된다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 한 양상에 따르면, 다른 약물을 사용한, 액티나시딘 743에 근거한 효과적인 조합 요법을 제공한다.

상기 다른 약물은 동시 또는 다른 시기에 투여하기 위하여 동일 조성물의 일부분을 구성하거나, 별도의 조성물로서 제공될 수 있다. 상기 다른 약물은 특별히 제한되지 않으며, 바람직한 후보에는 다음의 약물이 포함된다:

- a) 항유사분열 효과(antimitotic effect)를 갖는 약물, 특히 (탁솔, 파클리탁솔, 탁소티어(taxotere), 독세탁셀(docetaxel)과 같은) 탁산 약물, 포도필로톡신 또는 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴)과 같은 미세관 조절제(microtubule modulator)를 포함하는, 세포골격 요소를 표적으로 하는 약물;
- b) 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 펜토스타틴, 메톡스렉세이트와 같은 퓨린 유사체(analogue)와 같은 항대사산물 약물(antimetabolite drug);
- c) (시클로포스파미드 또는 이포스파미드와 같은) 질소 겨자(nitrogen mustard)와 같은 알킬화제;
- d) 아드리아마이신, 독소루비신, 파르모루비신 또는 에피루비신과 같은 안트라시클린 약물과 같은 DNA를 표적으로 하는 약물;
- e) 에토포사이드와 같은 토포이소머라제를 표적으로 하는 약물;
- f) 에스트로겐, 안티에스트로겐(타목시펜 및 관련 화합물) 및 안드로겐, 플루타미드, 루프로렐린, 고세렐린, 시프로트론 또는 옥트레오타이드와 같은 호르몬 및 호르몬 아고니스트 또는 안타고니스트;
- g) 헤르셉틴과 같은 항체 유도체를 포함하는 종양세포의 신호전달(signal transduction)을 표적으로 하는 약물;
- h) 백금 약물(시스-플라틴, 카르보플라틴, 옥살리플라틴, 파라플라틴) 또는 니트로소우레아와 같은 알킬화 약물.
- i) 매질 메탈로프로티나제 저해제(matrix metalloproteinase inhibitor)와 같은 종양의 전이에 잠재적으로 영향을 미치는 약물;

- j) 유전자 치료 및 안티센스제;
- k) 항체 치료제;
- l) 해양 유래의 다른 생물활성 화합물, 특히, 아플리딘(aplidine)과 같은 디렘닌(didemnin);
- m) 스테로이드 유사체, 특히 텍사메타손; 및
- n) 항-염증제, 특히 텍사메타손.

본 특허 명세서의 일부분으로서, 일련의 실시예를 제공하며 이들을 참조하여 이하 설명한다. 이들 실시예는 다른 약물과 조합하여 사용될 때 ET-743의 증가된 효능을 예시적으로 설명하고, ET-743를 사용한 여러 조합에 관한 것이다.

실시예1은 가슴샘없는생쥐(athymic mice)에서 생쥐 및 인간 육종(sarcoma)에 대한 종양성장 억제제용 ET-743 및 독소루비신의 효과적인 조합에 관한 것이다.

실시예2는 액티나시딘 743(ET-743)과 독소루비신이 연조직 육종 세포주 HT-1080 및 HS-18에서 상승적(synergistic) 세포독성 효과를 생성시킨다는 것을 나타내고 있다.

이들 두 실시예는 인간 종양(본 특정적 실험에서는 육종)에 대하여 어느 하나만을 투여하였을 때보다 더 효과적인 안트라시클린(특히 독소루비신)과 ET-743의 조합이 더 높은 상가 효과(additive effect)를 생성시키고, 상기 상가 효과는 투여의 순서와는 독립적이라는 것을 나타낸다. 그러한 결과에 의하면, 환자의 치료용으로 명확히 전망이 있음을 나타낸다.

실시예3은 ET-743과 시트플라틴의 상가적 세포독성 효과를 나타낸다.

실시예4는 한 패널(panel)의 인간 종양 세포주에 대하여 조합화학요법제와 ET-743의 조합, 특히, 독소루비신, 탁솔, 7-에틸-10-히드록시캄프토테신(SN-38), 시스플라틴, 및 젬시타빈과 ET-743 조합의 순서 평가(sequencing evaluation) 결과를 제공한다.

이들 두 실시예는 ET-743과 백금 항종양 화합물, 뉴클레오시드 유사체 젬시타빈(gemcitabine)(특히 시스-플라틴) 및 토포이소머라제 II의 제해제(SN-38, 캄토테신 그룹의 약물인 전구약물 CPT-11로부터 생성된 활성제(active agent))와의 ET-743 조합물이 더 높은 상가 효과가 있음을 나타낸다. 또한, 이들 두 조합물은 인간 종양(본 특정적 실험에서는 다양한 종양세포에 대하여: 난소, 결장, 폐, 유방, 뼈, 육종)에 대하여 어느 하나만을 투여하였을 때보다 더 효과적이고, 상기 효과는 일부의 경우에 있어서 노출의 순서에 의존적이다. 또한, 상기 조합물은 환자 치료용으로 전망이 있다.

상승 작용은 명확하게 예측가능한 것은 아니다: 실시예4에 의하면, 대부분의 시험된 조합에 있어서, 어떠한 상승작용도 관찰되지 않았다(사실, 길항작용(antagonism)은 일부의 경우에 보고되었다).

실시예5는 독소루비신 또는 트리메트렉세이트 또는 팍클리탁셀과 ET-743의 조합의 평가에 대한 것이다.

이들 두 실시예는 인간 종양(본 특정적 실험에서는 육종)에 대하여 어느 하나만을 투여하였을 때보다 더 효과적인 안트라시클린(특히 독소루비신)과 ET-743의 조합이 더 높은 상가 효과(additive effect)를 생성시키고, 상기 상가 효과는 투여의 순서와는 독립적이라는 것을 나타낸다. 그러한 결과에 의하면, 환자의 치료용으로 명확히 전망이 있음을 나타낸다.

실시예6 내지 8은 이전의 실시예를 강화 및 보충하고, 특히 ET-743과 독소루비신의 상승작용과 ET-743과 시스플라틴의 상승작용을 나타낸다.

실시예9는 고용량(high-dose) 텍사메타손이 액티나시딘 743(ET-743)의 간독성에 대하여 보호함을 보이며, 이는 본 발명의 조합의 여러 종류의 효능을 예시적으로 설명하는 것이다.

그러므로 요약하면, 본 발명은 치료용 조성물, 치료 방법, 그 조성물을 제조하는 방법 및 관련 구체예를 제공한다.

본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 치료 방법의 용도 및 암치료용 조성물의 제조에의 상기 조성물의 용도를 제공한다.

따라서, 본 발명은 치료학적으로 효과적인 양의 본 발명의 화합물, 또는 그들의 약제학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암에 걸린 포유동물, 특히 인간을 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 본 발명의 화합물 또는 화합물들을 활성 성분으로서 포함하는, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

약제학적 조성물에는 적절한 조성을 가지거나 경구, 국부 또는 비경구(parenteral) 투여의 임의의 고체상(정제, 알약, 캡슐, 과립 등) 또는 액상(액제, 현탁액 또는 유탁액(emulsion))의 것이 포함되고, 순수한 화합물 또는 다른 담체 또는 다른 약리학적으로 활성인 화합물과의 조합으로 포함될 수 있다. 이들 조성물은 비경구 투여되는 경우 멸균될 필요가 있다.

본 발명의 조성물의 상기 화합물 또는 조성물의 투여는 정맥내 주입, 경구 조성물(preparation), 복막내 및 정맥내 투여와 같은 임의의 적당한 방법에 의하여 이루어질 수 있다. 주입 시간은 바람직하게는, 24시간이하이고, 더욱 바람직하게는 2-12시간, 가장 바람직하게는 2-6시간이다. 병원에서 밤새 체류할 필요없이 치료를 수행할 수 있도록 하는 단기 주입시간이 특히 바람직하다. 그러나, 필요하다면, 주입 시간은 12-24시간, 심지어는 이보다 더 길어질 수 있다. 주입은 적당한 간격, 예를 들면 2 내지 4주의 간격으로 수행될 수 있다. 본 발명의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 서방성 제제 또는 다른 표준 전달 수단에 의하여, 리포솜 또는 나노구 포집체(nanosphere encapsulation)에 의하여 전달될 수 있다.

상기 화합물의 올바른 투여량은 특정 제제, 적용 방법, 및 특정한 위치(*situs*), 치료될 숙주 및 종양에 따라 달라질 수 있다. 나이, 체중, 성별, 음식, 투여 시간, 배출 속도, 숙주의 조건, 약물 조합, 반응 민감도 및 질병의 경과와 같은 다른 인자들이 고려되어야 한다. 투여는 최대 허용 용량의 한도내에서 연속적으로 또는 주기적으로 수행되어질 수 있다.

본 발명의 상기 조합물은 저항성 환자(refractory patient)에게도 사용될 수 있다. ET-743에 투여 방법(dosing scheme)에 대한 정보 및 본 발명의 조합 요법에의 사용에 관한 다른 정보에 대하여는 WO0069441을 참조하라.

실시예

실시예1

가슴샘없는생쥐에서 생쥐 및 인간 육종에 대한 종양성장 억제에 대한 ET-743 및 독소루비신의 효과적인 조성물

ET-743은 종래의 독소루비신(Dx) 및 이소스파미드를 포함한 화학치료에 대하여 저항성인 연한조직(soft) 및 뼈 육종을 가진 환자에서 임상적 활성을 갖는 것으로 확인되었다. ET-743과 Dx 조합의 잠재적 임상 가치의 관점에서, 생쥐 섬유육종(fibrosarcoma) UV2237, 그 mdr-저항성 부세포주(subline) UV2237/ADR 및 인간 횡문근 육종 제노그라프트(rabdomyosarcoma xenograft) TE671에 대하여 본 조합물을 조사하였다. ET-743 및 Dx 단독으로는 둘 모두 생쥐 UV2237 섬유육종에 대하여 효과적인 반면, 각각은 UV2237/ADR 및 TE671 모두에 대하여 불활성이거나 약간의 활성만이 있었다. 그러나, ET-743과 Dx의 조합물은 3 모델 모두에서 효과적이었다. 상기 상승작용은 특히 인간 횡문근 육종 TE671에서 현저하였고, 약물 순서와 조합에 무관하였다.

종양 TE671가 약 100mg일 때 단일 정맥내(i.v.) 투여 치료를 수행한 후, 종양 무게 저해(tumor weight inhibition)(TWI) 및 로그10 세포 치사(LCK)(Log10 cell kill) 값은 각각, ET-743(0.1mg/kg) 단독의 경우 46% 및 0.132이고, Dx (10mg/kg) 단독일 경우 50% 및 0.33이고, ET-743 (0.1 mg/kg) 및 Dx (10 mg/kg)을 동시에 투여한 경우 77% 및 0.924이고, Dx (10 mg/kg) 투여전 1시간 전에 ET-743 (0.1 mg/kg)을 투여된 조합의 경우 82% 및 1.12이고, 및 Dx (10 mg/kg) 투여 1시간 후 ET-743 (0.1 mg/kg)를 투여한 조합의 경우 75% 및 0.85이었다.

이들 데이터는 ET-743 및 Dx의 조합은 이들 약물을 단독으로 투여하였을 경우 민감하지 않거나 약간 민감한 종양에서 또한 효과적일 수 있고, 따라서 이 조합물을 사용한 임상적 조사를 수행해볼 강한 논리를 제공하고 있음을 나타낸다.

실시예2

엑티나시딘 743(ET-743) 및 독소루비신은 연한조직 육종 세포주 HT-1080 및 HS-18에서 상승적 세포독성 효과를 일으킨다.

두 개의 육종 세포주, ET-743 (IC₅₀=10ppm)에 민감한 섬유육종 세포주 HT 1080 및 ET-743 (IC₅₀=270ppm)에 덜 민감한 HS-18, 리포사코마 세포주에 대하여 독소루비신, 트리메트렉세이트 또는 팍클리탁셀 중 어느 하나와 ET-743의 조합의 독성을 평가하였다. ET-743을 일정한 몰 비율로 이들 약물과 조합하여 사용하고, 차우 및 탈랄레이 법(Chou and Talalay method)으로 분석하였을 때, ET-743-독소루비신 조합물에 대하여는 상승 효과가 얻어졌으나(72시간 배양), 트리메트렉세이트 또는 팍클리탁셀과 ET-743의 조합물에 대하여는 상승효과가 얻어지지 않았다. 세포가 72시간 동안 ET-743에 노출되고, 배양의 마지막 48시간 동안 독소루비신, 트리메트렉세이트 또는 탁솔 중 어느 하나에 노출되었을 때, 두 육종 세포주 모두에 대하여 상승 효과는 또한 독소루비신과의 조합물에 대하여 얻어졌다. 흥미로운 것은, 팍클리탁셀 다음에 ET-743을 투여하는 순서가 그 반대의 순서보다 더 효과적이었다. 이들 결과는 ET-743과 독소루비신 모두가 항육종 활성을 갖는 것으로 알려진, 연한 조직 육종을 가진 환자를 치료하기 위하여, ET-743과 독소루비신의 조합물을 임상 시험하는 것에 대한 기대를 높여주는 것이다.

실시예3

ET-743과 시스플라틴의 상승적 세포독성 효과

엑티나시딘 743(ET-743)은 여러 전임상 체제에 뛰어난 항종양 활성 및 가능성이 있는 임상 활성을 갖는 것으로 밝혀졌다. ET-743는 마이너 그루브(minor groove)의 N2 구아닌에 결합하고, 전사 조절에 영향을 미친다(미누조(Minuzzo) 등, PNAS, Vol.97, 6780-84, 2000).

종래의 연구 결과에 의하면, 불일치 복구(mismatch repair)(MMR) 결여 세포는 복구가 능숙한 세포(proficient cell)와 동등하게 민감한 것으로 나타났다. 시스플라틴에 아주 민감한 NER 결여 세포는 ET-743에 6 내지 8 배 덜 민감하다. ET-743과 시스플라틴의 복구와 관련되는 다른 기작에 근거하고 본 발명의 잠재적 임상적 가치 때문에, 본 발명자들은 여러 인간 세포주에서 ET-743과 시스플라틴의 세포독성 효과를 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 인간 난소 암 Igrove-1 세포주, ET-743 (IG/PSC/ET)에 저항성인 부세포주, 인간 결장 세포 HCT 116, (MMR 결여) 및 HCT11-ch3 (MMR 능숙) 세포주가 본 연구에 사용되었다.

상기 세포를 단독 또는 조합 상태의, 다른 농도의 ET-743 또는 cisDDP로 1 내지 24시간 동안 처리하고, 설포로다민 B 염색 후, 발색 분석법(colorimetric assay)법을 이용하여 세포독성을 평가하였다. 모든 세포주에서 1시간 또는 24시간 노출 모두에 대하여 상승 효과가 얻어졌다. 흥미롭게도, cisDDP에 저항성인 HCT1 16에서, ET-743은 단독으로는 거의 효과가 없는(magnally) 농도에서조차도 민감도를 외견상 역전시킬 수 있었다. 상기 데이터를 종합하면, ET-743 및 cisDDP 조합물에 대하여 임상 연구를 수행할 근거는 제공된다.

실시예4

독소루비신, 탁솔, Sn-38, 시스플라틴 및 켄시타빈과 ET-743의 조합

독소루비신, 탁솔, Sn-38, 시스플라틴 및 켄시타빈과 ET-743의 조합물을 한 패널의 인간 종양 세포주에 대하여 평가하였다. 본 실시예는 ET-743과 표준 화학요법제 사이의 약물-약물 상호작용의 형태 및 노출의 순서가 항종양 활성에 미치는 영향을 결정하기 위하여 고안되었다. 표준 세포독성 약제와 ET-743의 복수 조합물(multiple combination)이 상기 약물-약물 상호작용의 형태를 기술하기 위하여 무-모델 고안(model-free design)(Laska 등, Biometiics 50:834, 1994)으로 사용되었다. 이들 연구에 의하면, 노출에 상관없이, 약물-약물 상호작용의 상기 패턴은 가장 보편적으로 관찰되었다.

ET-743이 비-소세포 폐(non-small cell lung)(SN-38에 전노출), 골육종(ET-743 후, 시스플라틴으로 전노출), 유방(ET-743 후, 켄시타빈으로 전노출), 결장(ET-743 후, SN-38로 전노출 및 SN-38와 동시에 노출) 종양 세포주에 대하여 조합되었을 때 상승적 약물-약물 상호작용이 얻어졌다. 약물-약물 상호작용의 상가/상승적(NSCL에 대하여 ET-743후, SN-38 전노출; 결장 및 NSCL에 대하여 SN-38 전노출; 골육종에 대하여 시스플라틴과 동시 노출; 및 NSCL 세포주에 대하여 SN-38과의 동시 노출) 패턴이 얻어졌다. 탁솔을 두개 NSCL 세포주에 대하여 동시에 사용하였을 때 및 독소루비신을 횡문근 육종 세포주에 대하여 동시에 사용하였을 때 길항작용의 증거가 관찰되었다.

이들 연구 결과에 의하면, 임상시험 II 단계에 있는 ET-743은 광범위 종양 형태에 대한 여러 세포독성제와 조합되어질 수 있다.

재료 및 방법

세포 배양:

인간 유방 (MDA-435, MDA-231, T-470), 비-소 세포 폐 (NCI-H522, NC1-H226, NCI-H23), 결장 (HCT-116, HT-29, Colo-320), 골육종 (HOS, U-2, OS, SaOS-2), 횡문근 육종 (RH1, RH30, RD) 종양 세포주들을 10% 소 태아 혈청 및 2mM L-글루타민으로 보충된 RPMI-1640 배지에서 배양하였다. 모든 스톱 배양물들을 37°C에서 5% CO₂-95% 공기 분위기로 가습된 배양기에서 75 cm²-플라스크 내에 유지하였다.

IC₅₀ 분석:

미리 정해진 숫자의 지수적으로 성장하는 종양 세포들을 96-웰 조직 배양 플레이트 중에 접종시키고, 24시간 동안 안정화 되도록 하였다. 그 후에, 연속적으로 희석화된 농도의 ET-743 또는 표준 화학 요법 시약으로 구성된 약물 플레이트를 세포들에 가하였다. 세포들을 3일 동안 24시간 노출시킨 후, MTT를 4시간 동안 가하여 줌으로써 배양하였다. 결과물인 포르마잔 결정들을 산/알코올로 용해시켰으며, 흡광도 (570 nm-시험군/630 nm-대조군)는 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 측정하였다. 결과들을 배지 대조군과 비교하여 종양 세포 사멸의 백분율로 표시하였다.

조합 연구:

조합 연구를 위해서, 상호 작용의 유형을 특성화하는 데에 사용된 농도 (개별적인 시약들의 IC₅₀의 백분율로 표현) 개요는 하기와 같다:

약물농도 (IC ₅₀ 의 %로 나타냄)	
ET-743	표준물질
100	0
75	25
60	40
50	50
40	60
25	75
0	100
0	0

조합 연구의 통계적 분석:

각각의 시험 조합 (75:25-ET-743/표준 시약들) 및 종말점들 (100:0-ET-743 및 0:100-표준 시약들)에 대하여 통계적 비교를 수행하였다. 통계적으로 유의성 있는 관찰은, 조합 (ET-743 및 표준 시약들) 흡광도 수치 및 양 종말점 수치들 (ET-743 및 표준 시약들 단독) 사이에 차이가 존재할 것이 요구된다. 만약 대다수 (>5개 중 3개 이상)의 수치들이 통계적으로 라인 이상 또는 이하인 경우에는, 각각 길항 또는 상승 작용이 있는 것으로 볼 수 있다. 만약 종말점들을 연결하는 선에 상당한 기울기가 존재하는 경우에는 해석이 매우 어렵게 된다. 개개 시약들에 대한 IC₅₀ 곡선의 기울기가 동일하다면 (그럴 가능성은 크지 않지만), 때때로, 상호작용의 유형을 결정할 수 있다.

ET-743과 화학요법제와의 조합 순서		
종양 형태/세포주	노출조건/물질	관찰된 약물-약물 상호작용
골육종(Osteosarcoma)		
NOS	24시간 ET-743 후 24시간 시스플라틴에 노출	상승
	24시간 시스플라틴 후 24시간 ET-743에 노출	상가
	24시간 ET-743/시스플라틴 동시노출	상가

U2-0S	24시간 ET-743 후 24시간 시스플라틴에 노출 24시간 시스플라틴 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/시스플라틴 동시노출	상가 상가 상가
Sa06	24시간 ET-743 후 24시간 시스플라틴에 노출 24시간 시스플라틴 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/시스플라틴 동시노출	상가 상가 상가/상승
비-소세포(Non-Small Cell) 폐		
NCB-H226	24시간 ET-743 후 24시간 탁솔에 노출 24시간 탁솔 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/탁솔 동시노출 24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 SN-38 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/SN-38 동시노출	상가 상가 길항 상가/상승 상가/상승 상가
NCB-N522	24시간 ET-743 후 24시간 탁솔에 노출 24시간 탁솔 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/탁솔 동시노출 24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 SN-38 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/SN-38 동시노출	상가 상가 길항 상가/상승 상가/상승 상가
NCB-N23	24시간 ET-743 후 24시간 탁솔에 노출 24시간 탁솔 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/탁솔 동시노출 24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 SN-38 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/SN-38 동시노출	상가/길항 상가 길항 상가 상승 상가/길항
유방(Breast)		
MDA-435	24시간 ET-743 후 24시간 쟈시타빈(gemcitabine)에 노출 24시간 쟈시타빈 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/쟁시타빈 동시노출	상가 상가 상가
MDA-231	24시간 ET-743 후 24시간 쟈시타빈에 노출 24시간 쟈시타빈 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/쟁시타빈 동시노출	상가 상가 상가
T47-8	24시간 ET-743 후 24시간 쟈시타빈에 노출 24시간 쟈시타빈 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/쟁시타빈 동시노출	상가 상가 상가
결장(Colon)		

MCT-116	24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 ET-743/SN-38 동시노출	상승 상가 상가
NT-29	24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 ET-743/SN-38 동시노출	상가 상가 상가

Colo-320	24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 ET-743 후 24시간 SN-38에 노출 24시간 ET-743/SN-38 동시노출	상가 상가/상승 상승
횡문근육종 (rhabdomyosarcoma)		
RN1	24시간 ET-743 후 24시간 독소루비신에 노출 24시간 독소루비신 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/독소루비신 동시노출	상가 상가 길항
RD	24시간 ET-743 후 24시간 독소루비신에 노출 24시간 독소루비신 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/독소루비신 동시노출	상가 상가 상가/길항
RN30	24시간 ET-743 후 24시간 독소루비신에 노출 24시간 독소루비신 후 24시간 ET-743에 노출 24시간 ET-743/독소루비신 동시노출	상가 상가 길항

결론-요약

이러한 연구들은, ET-743 및 표준 화학요법제들의 노출 순서에 관계 없이, 약물-약물 상호 작용의 상가적인 패턴이 가장 통상적으로 관찰된다는 것을 암시한다.

상승 효과의 증거는, NC1-H522 및 NC1-H23 NSCL 세포주들이 SN-38에 사전 노출된 경우, HOS 골육종에 대하여 시스플라틴으로 ET-743에 사전 노출된 경우, T-470 유방 세포주를 젬시타빈으로 처리한 경우, HCT-116 결장에 대하여 SN-38로 처리한 경우, Colo-320 결장암 세포주에 대하여 SN-38로 동시 노출시킨 경우에 관찰되었다.

길항 효과의 증거는, NC1-H226 및 NC1-H23 NSCL 세포주에 대하여 탁솔이 동시에 사용된 경우 및 RHI 횡문근 육종 세포주에 대하여 독소루비신이 사용된 경우에 관찰되었다.

실시예 5

Et-743 및 다른 항암제들 사이의 상호작용

비록 현재 ET-743이 인간 암들에 대하여 임상적 시험 단계에 있지만, ET-743의 항암 활성의 메카니즘은 완전히 해독되지 않았다. 본 연구의 목적은, Chou 및 Talalay의 조합 지수 (Combination Index, CI) 방법을 사용하여 ET-743 및 다른 항암제들 (독소루비신; DXR, 트리메트렉세이트; TMTX 및 과클리탁셀; 탁솔) 사이의 상호작용의 본질을 분석하는 것이다. ET-743이 임상적으로 어떻게 사용될 수 있는가를 더 잘 이해하기 위하여, 본 연구는 시험관내에서 두 가지 연조직 육종 세포주들, 즉 HT-1080 및 HS-18에 다른 투여 스케줄로, ET-743을 다른 3가지의 항암제들과 조합하는 것으로부터

야기되는 세포독성을 검사하기 위하여 SRB 분석을 사용하였다. ET-743과 조합되는 경우에, 순서에 무관하게 상승 효과를 나타내는 유일한 시약은 DXR이었다. ET-743 및 DXR의 동시 노출은 양 세포주들 모두에서 상승적 상호작용들을 야기하였다.

CI_s (평균)은 HT-1080 세포들에서 각각, 50, 75, 90 및 95% 세포사멸시에 0.86, 0.83, 0.84 및 0.85이었으며, HS-18 세포들에서 각각, 50, 75, 90 및 95% 세포사멸시에 0.89, 0.74, 0.64 및 0.60이었다. DXR 이전에 ET-743으로 24시간 동안 처리하는 순서가, 양 세포주들 모두에 대하여 가장 효과적인 요법이었으며; 이는 양 세포주 모두에 대하여 약 90% 세포사멸 수준까지의 시종일관 낮은 CI를 야기하였다. ET-743 이전에 탁술에 노출시키는 것 또한 효과적인 요법이었다. 이러한 결과들은 ET-743 및 DXR의 조합이 연조직 육종의 치료를 위한 임상 시험들에서 더욱 개척되어야 한다는 것을 암시한다.

재료 및 방법

화학물질

ET-743은 Pharma-Mar S.A (Tres Cantos, 마드리드, 스페인)에 의하여 제공되었으며, 디메틸 술폭사이드 2 mM 스톱 용액으로서 제조되었다. 파클리탁셀 및 DXR은 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. TMTX는 Warner-Lambert (ParkeDavis, Ann Arbor, Mich)에 의하여 제공되었다.

세포 배양

연조직 육종 세포주들, HT-1080 및 HS-18을 단층 배양물로서 10% 소 태아 혈청을 포함하는 RPMI-1640 중에 유지하였다.

SRB 세포독성 분석

약물들에 대한 세포독성을 서술된 바와 같이 96-웰 미세역가 플레이트 중에서 SRB 세포독성 분석에 의하여 측정하였다. 세포들을 이중 웰 (5000 세포들/웰)에 도말하고, 다른 농도들에서 약물들에 노출시켰다. 세포들을 50% TCA 용액으로 1 시간 동안 고정하고, 각각의 웰에 0.4% SRB (Sigma)를 첨가하였다. 30분 동안 배양한 후에, 플레이트를 1% 아세트산으로 세척하고, Biowhitaker microplate reader 2001 상에서 570 nm에서 판독하였다. 약물을 함유하지 않은 세포들을 포함하는 웰들 및 배지에 약물들을 함유하지만 세포들을 포함하지 않는 웰들을 각각 양성 및 음성 대조군들로 사용하였다.

ET-743 및 DXR, TMTX 또는 파클리탁셀에의 동시 노출

세포들을 96-웰 플레이트에 상기 서술한 바와 같이 접종(seed)하였다. 세포들을 단일 약물에 대한 7가지의 다른 농도들 또는 1:100 (ET-743:다른 약물들)의 물 비율로 조합한 혼합물로 처리하였다. 72시간 동안 노출시킨 후, SRB 분석을 사용하여 성장 저해를 측정하였다.

ET-743 및 DXR, TMTX 또는 파클리탁셀에의 연속적인 노출

상기 서술된 동일한 실험 방법을 사용하여, 세포들을, 각각 ET-743, DXR, TMTX 및 파클리탁셀의 IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅를 나타내는 약물들의 3가지 다른 농도들에 노출시켰다. ET-743 또는 조합 약물로 24시간 동안 사전 처리한 후, 두 번째 약물을 각각의 웰들에 48시간 동안 가하였다. SRB 분석을 사용하여 성장 저해를 측정하였다.

세포 주기 분석

지수적으로 성장하는 세포들을 수 시간 동안 약물들로, 또는 약물들 없이 처리하였다. 세포들을 수집하고, 얼음 냉각된 70% 메탄올로 고정시켰다. DNA를 상기 서술된 바와 같이 프로피듐 요오드로 염색하였다. 10,000개의 염색된 세포들을 Becton Dickinson 형광-활성화 세포 분류기 (fluorescence-activated cell sorter, FACS)상에서 분석하였다.

상승 및 길항의 결정 및 이소볼로그래프 (Isobologram)의 작성

효능 (Dm 또는 IC₅₀) 및 용량 효과 곡선(dose effect curve)의 형태 (m 수치) 모두를 고려하는, 차우-탈랄레이(Chou-Talalay) 방정식에 의하여 CI를 계산하였다. 전통적인 이소볼로그래프 (CI=1)에 대한 일반 방정식은:

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 \quad (A)$$

이며, 상기 식에서 분모의 $(Dx)_1$ 및 $(Dx)_2$ 는 X% 저해를 나타내는 D_1 (ET-743) 및 D_2 (다른 약물) 단독에 대한 용량(dose) (또는 농도)이며, 반면에 분자의 $(D)_1$ 및 $(D)_2$ 는 또한 X% (즉, 동등효과) 저해시키는 조합된 ET-743 및 다른 약물의 용량(dose)이다. $CI < 1$, $CI = 1$, $CI > 1$ 은, 각각 상승, 상가 및 길항 효과를 나타낸다.

$(Dx)_1$ 또는 $(Dx)_2$ 는 Chou 및 Chou 등의 중간값-효과 방정식 (median-effect equation)으로부터 용이하게 계산될 수 있으며:

$$Dx = Dm [fa / (1 - fa)]^{1/m} \quad (B)$$

상기 식에서, Dm은 중간값-효과 플롯, X-log (D) 대 Y-log[fa / (1 - fa)] 또는 $Dm = 10^{-(Y\text{-인터셉트})/m}$ 의 X-인터셉트의 안티-로그로부터 얻어지는 중간값-효과 용량이며, m은 중간값-효과 플롯의 기울기이다. Chou 및 Chou의 컴퓨터 소프트웨어는 m, Dm, Dx, 및 CI 수치들의 자동화된 계산을 가능하게 한다. $(Dm)_1$, $(Dx)_2$ 및 $D_1 + D_2$ 로부터, A 방정식에 기초하여 이소볼로그래를 용이하게 자동적으로 작성할 수 있다.

두 가지 시약들의 보존적 상호 비배타적 이소볼로그래를 작성하기 위해서는, 세 번째 항,

$$(D_1) (D_2) / (DX)_1 (DX)_2 \quad (C)$$

가 방정식 A에 더해진다.

단순함을 위하여, 세 번째 항은 대개 삭제되며, 따라서 상호 배타적 가정 또는 전통적 이소볼로그래가 표현된다. 결과 2 및 3에서, 전통적 (상호 배타적) 계산으로부터 얻어진 CI 수치들을 나타내었다.

결과 1

HT-1080 및 S18에 대한 4 약물의 세포독성			
		인간 연조직 육종 세포에 대한 IC ₅₀	
		HT-1080	HS-18
ET-743	(nM)	0.01	0.27
DXR	(nM)	25	225
TMTX	(nM)	6	70000
파클리탁셀	(nM)	1.3	10

상기 표는 HT-1080 및 S18 세포주 모두가 다른 항암제들에 비하여 ET-743에 더욱 민감하다는 것을 보여준다.

근접 IC ₅₀ 용량으로 처리 후 24시간 및 72시간 후에 HS-18에 대한 세포 주기 분포에 대한 각 물질의 영향					
약물	용량	HR	%G1	%S 기	%G2-M
대조군			76.3	11.2	12.5
ET-743	270 pM	24	32.4	47.6	20.0
		72	86.7	8.4	4.9
DXR	225 nM	24	10.1	64.9	25.0
		72	1.3	63.8	34.9
TMTX	70 uM	24	44.2	53.8	1.9
		72	35.5	57.6	7.0
파클리탁셀	10 nM	24	32.8	52.5	15.5
		72	23.5	58.7	26.2

근접 IC ₅₀ 용량으로 처리 후 24시간 및 72시간 후에 HT-1080에 대한 세포 주기 분포에 대한 각 물질의 영향					
약물	용량	Hr	%G1	%S 기	%G2-M
대조군			47.5	35.8	16.7
ET-743	10 pM	24	42.6	36.1	21.3
		72	83.1	10.2	6.7
DXR	25 nM	24	36.1	17.5	46.4
		72	46.2	5.3	48.5
TMTX	6 nM	24	31.9	56.8	11.3
		72	32.0	53.7	14.4
파클리탁셀	1.3 nM	24	45.4	37.3	17.3
		72	86.0	9.0	5.0

결과 2는, 각각 HT-1080 및 HS-18 세포들에 대한 CI를 나타내며, 각각의 세포들은, 1 내지 100 몰비율 조합 혼합물로 ET-743 및 DXR, TMTX, 또는 파클리탁셀과 같은 항암제 약물들 중의 하나에 동시 노출된 것이다. 세포들이 ET-743 및 DXR로 처리된 경우에는, CI 수치들은 모두 1 이하이었고, 이는 양 세포주 모두에서 상승 효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 이러한 스케줄에 의한 CI (평균) 수치는, HT-1080 세포들에서, 각각 50, 75, 90 및 95% 세포 사멸에서 0.86, 0.83, 0.84 및 0.85이었고, HS-18 세포들에서, 각각 50, 75, 90 및 95% 세포 사멸에서 0.89, 0.74, 0.64 및 0.60이었다. 이러한 결과는 ET-743 및 DXR의 동시 처리는 상승적 세포독성 효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 이와는 대조적으로, 세포들이 ET-743 및 TMTX 또는 파클리탁셀로 처리된 경우에는, 길항적 세포독성 효과가 관찰되었다.

초기에 ET-743에 24시간 동안 노출된 후, DXR에 의하여 48시간 동안 노출된 양 세포주들로부터 얻은 CI 플롯을 얻었다. 양 세포주들 모두에서, ET-743 처리 후 DXR 처리한 경우에는 상승적 세포독성 효과를 나타내었고, HT-1080의 CI 수준은 80% 세포 사멸 수준에서 0.64 ± 0.12 이었고, HS-18의 그것은 88% 세포 사멸 수준에서 0.24 ± 0.06 이었다. 이와는 대조적으로, DXR 처리 후 ET-743 처리한 경우 (결과 3a, 아래 수치)에는 초기 관찰시에는 우수한 CI 수치를 나타내었으나, 80% 세포 사멸에서 HT-1080의 CI 수치는 1.00 ± 0.03 으로서, 두 시약들의 효과가 상가적이라는 것을 나타내며, 부가적으로, 양 세포들 모두에서 높은 비율로 세포가 사멸하는 때의 CI는 중간 정도의 비율로 세포가 사멸하는 경우에 비하여 나쁘다는 것을 보여 준다.

세포들이 ET-743에 노출된 후 TMTX에 노출되는 경우에는, HT-1080의 CI 수치들은 거의 1 또는 1 이상으로 나타났고, 이는 두 시약들의 효과가 길항적 또는 상가적이라는 것을 나타낸다. 이와는 대조적으로, HS-18의 CI 수치들은, 모두 0.6 이하이었고, 이는 이러한 두 가지 약물들이 상승 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. 세포들이 TMTX로 처리된 후 ET-743으로 처리되는 경우에는, HT-1080 및 HS-18 세포주들 모두에서 상가적 효과가 관찰되었다.

파클리탁셀로 처리 후 ET-743으로 처리하는 경우에는, 상승적 세포 독성 효과를 나타내었다. 세포들이 파클리탁셀에 노출된 후 ET-743에 노출되는 경우에는, 89% 세포 사멸 수준에서 HT-1080의 CI 수준은 0.92 ± 0.06 이었고, 78% 세포 사멸 수준에서 HS-18의 CI 수준은 0.38 ± 0.13 이었다.

요약

ET-743은 인간 연조직 육종 세포들, 특히 악성 섬유육종 세포주 HT-1080에 대하여 매우 높은 활성을 갖는다.

DXR은, ET-743과 조합되는 경우에는 순서-의존성 상승 효과를 나타내었으나, ET-743 처리 후 DXR로 처리하는 것이 양 세포주들 모두에서 더욱 효과적이었다.

파클리탁셀 노출 후 ET-743에 노출시키는 것 또한 인간 연조직 육종 세포들에 대하여 효과적인 요법이었으나, 동시 노출은 길항적이었다.

실시예 6

고형 종양들에 대한 액티나시딘 743 (Ecteinascidin 743, Et 743)에 의한 화학요법제들의 생체내 조합.

Et 743에 대한 몇몇 독특한 작용 메카니즘들이 서술되어 있으며, 이는 DNA 마이너 그루브에의 결합, 구아닌 N2의 알킬화, MDR1 유전자의 전사 저해 (Jin 등, PNAS 97, 6775, 2000; Minuzzo 등, PNAS 97, 6780, 2000) 및 핵 수용체 SXR의 활성 중화 (Synold 등, Nature Med. 7, 584, 2001)를 포함한다. 단일 시약으로서, Et743은 생체내 종양 성장을 저해하며,

이는 흑색종 (MEXF 989), NSCL (LXFL 529), 난소 (HOC 22) 및 유방 육종 (MX-1)을 포함하는 몇몇 인간 종양 세포주들 (Hendriks 등, Ann. Oncol. 10, 1233, 1999)에 대한 완전한 완화 (complete remission, CR)를 달성한다. 대체적 메카니즘으로 작용하는 다른 약물들과 조합하는 경우의 Et 743의 효율성은, 내성 또는 재발성 암들에 있어서 약물의 독성을 감소시키기 위한 또는 약물의 효율성을 효능화하기 위한 기회를 제공할 수 있다.

이러한 평가를 위하여, 독소루비신 (DOX; 8mg/Kg), 시스플라틴 (DDP; 12mg/Kg) 및 빈블라스틴 (VINB; 6mg/Kg)을 포함하는 몇몇 약물들을, 하기 종양들 중의 하나 또는 그 이상에, qdx5로 1 시간 사전 처리하며, Et 743 (0.2mg/Kg)의 이전/이후에 투여하였다; 연골육종 (CSHA), 골육종 (OSA-FH), 섬유육종 (SW684), 난소 종양 (MRIH-1834), NSCL (LX-1) 및 < 50% T/C로서 정의된 활성을 갖는 신장 종양 (MRI-H-121).

중공 섬유(hollow fiber) (HF) 모델에서, DOX, Et 743 1시간 사전 처리의 순서가, Et 743 단독보다, 연골육종 (6% vs. 10%), 섬유육종 (33% vs. 48%) 및 골육종 (20% vs. 34%)에서 일관되게 더 효율적이었다. 골육종 제노그래프트는, 17% vs. 43%의 유사한 결과를 생산하였다. DPP에 의한 HF 연구들은 Et 743, 사전처리 DDP가 난소 (28% vs. 100%) 및 연골육종 (15% vs. 19%)에서 Et 743 단독에 비하여 더 효과적임을 나타내었고, 골육종에서 동등한 활성을 (36% T/C) 나타냄을 보여 주었다. 제노그래프트 데이터는 Et 743 사전처리-DDP의 순서가 Et 743 단독에 비하여 더욱 효과적임을 입증한다 (35% vs. 66%). 한 가지 예외는 NSCL에서였으며, 여기에서는 Et 743 단독은 활성을 갖지 않았으나 (62% T/C), DPP 이후 Et 743은 CR (<1% T/C)을 나타내었다. 신장 제노그래프트 Et 743 단독은 매우 높은 활성을 나타내었으나 (22% T/C), Et 743 이후 VINB 또한 CR (<1% T/C)을 나타내었다. 개별적인 연구들이 다른 표준 시약들에 대하여, 가슴, 신장, 흑색종 및 위장 종양 제노그래프트들에서 진행되어지고 있다.

실시에 7

엑티나시딘 743 (ET-743) 및 독소루비신 (DOX) 조합들의 인간 횡문근 육종에 있어서의 전임상적 활성 및 생물분포 (biodistribution).

ET-743은 항암 활성을 나타내는 항암제의 새로운 군으로서 선두 주자이다. ET-743은 DOX 및 이포스파미드에 저항성 (refractory)인 육종들을 갖는 환자들에서 활성을 보인다. 효율적인 약물로서의 그 효능 관점에서, 본 발명자들은 (1) ET-743/DOX 조합의 인간 횡문근 육종 TE671에 대한 전임상적 항암 활성 및 (2) nude 생쥐 및 종양 제노그래프트들 중에서의 약물들 사이의 가능한 상호작용 및 그들의 생물분포(biodistribution)에 대하여 조사하였다.

시험관내: 1시간 노출 이후의 각각의 약물 또는 조합의 효과를 클로노제닉 분석에 의하여 평가하였다. ET-743 또는 DOX 단독은 TE 671 세포들에 대하여 항암 활성을 나타내었다. 이소볼로그람 분석 및 조합 지수에 따른 조합은, 적어도 TE 671을 포함하는 몇몇 종양 세포주들에서 상가적이었다.

생체내: 제노그래프트 종양들이 대략 100mg 무게일 때, 단일 iv 처리들 (ET-743, 0.1mg/Kg; DOX, 10mg/Kg)을 nude 생쥐에 투여하였다. 종양 무게 저해/로그10 세포 사멸 수치들은 ET 단독에 대하여 46%/0.132, DOX 단독에 대하여 50%/0.33, ET-743 및 DOX 동시 투여에 대하여 77%/0.924, DOX 투여 1시간 이전에 ET-743 투여 조합에 대하여 82%/1.12, 및 DOX 투여 1시간 이후에 ET-743 투여 조합에 대하여 75%/0.85이었다. 상승 효과가 또한 생쥐 섬유육종 UV2237 및 그의 다중 약물 내성 부세포주 UV2237/ADR에 대하여 관찰되었다.

이러한 데이터들은 ET-743/DOX의 상승 효과를 나타내며, 지금까지 연구된 시나리오에서는 약물 순서 또는 조합과 무관한 것으로 보인다. DOX의 혈장 또는 종양 농도 모두, DOX가 단독으로 투여되거나 또는 ET-743과 조합되어 투여되는 경우에 현저하게 다른 것으로 나타나지 않았다. ET-743 단독으로 투여된 경우 또는 DOX와 조합되어 투여된 경우의 약물동태학적 (PK) 평가가 진행 중이다. ET-743 및 DOX의 조합은 시험관내에서는 상가적이지만, 횡문근육종 TE 671 중의 생체내에서는 상승적인 것으로 나타났다. DOX의 PK 프로파일은 ET-743의 동시적 처리에 의하여 영향을 받지 않았다. 이러한 데이터들은 초기 임상 시도들에 있어서 이러한 조합을 사용하는 것에 대한 이론적 근거를 제공한다.

실시에 8

ET-743 및 시스플라틴 (DDP)는 인간 육종 및 난소암 세포주들에 대하여 시험관내 및 생체내 상승 활성을 나타낸다.

본 실시예에서는, ET-743이 시험관내 및 생체내 모두에서 DDP의 활성을 강화하는 것을 보여 준다. 인간 소장 육종 (HCT116), 난소 육종 (Igrov-1, A2780), 그들의 내성 부세포주들 (각각, Igrov-1/PSC-ET 및 1A9), 및 횡문근육종

(TE671)을 포함하는 몇몇 종양 세포주들에서, 단일 시약으로서 사용된 저농도의 ET-743이 DDP 활성을 최소한 2배 증가시킬 수 있었다. ET743의 IC₃₀/IC₅₀에 대응되는 농도들은 상가적 또는 상승적 효과를 야기하였다. 이러한 결과들은 ET-743과의 효과적인 약물 조합들을 연구하기 위한 제노그라프트 모델들을 사용한 생체내 연구로 이어졌다.

ET-743 및 DDP에 부분적으로 민감한, sc 이식된 TE671에서, 두 가지 약물들의 조합은 그들의 각각의 MTD 수준들에서 사용된 어느 하나의 약물로 달성되는 것보다 훨씬 더 큰 항암 효과를 일으켰다. 통상적으로 단독 시약들로서의 ET-743 및 DDP 모두에 대하여 내성을 갖는 난소 1A9 종양은, 조합으로는 50% 이상의 종양 성장 저해를 나타내었다. 근막염(ascitis)을 앓는 복강(peritoneal cavity) 내 종양 노들을 발생시키는, ET-743에 내성을 갖고, DDP에 부분적으로 민감한, 직생적으로(orthotopically) 이식된 인간 난소 육종 HOC8은, 조합에 대하여는, ET-743 0.05mg/Kg (1/4MTD)의 용량에서도 극적인 생존율 증가를 보였으며, 어떠한 유의성 있는 독성도 유발하지 않았다. 0.15mg/Kg의 ET-743 용량은, 체중 감소로 나타나는 독성의 증가가 또한 존재하였으나, 생존율을 현저하게 증가시켰으며, 이는 각 약물의 처리 이후에 관찰되는 것보다 유의성 있게 높았다.

이러한 발견들은 ET-743 및 DDP의 조합을 육종들 및 난소암들에 대하여 사용하는 임상적 시도들을 고안하기 위한 강한 이론적 근거를 제공한다. 이러한 암 유형들에서 ET-743 및 DDP 사이의 상승효과에 대한 기본이 되는 메카니즘을 해석하기 위한 시험관내 및 생체내 연구들이 진행 중이다.

실시예9

고용량(high-dose) 텍사메타손(dex)은 랫트에서 엑티나시딘 743(ET-743)의 간독성(hepatotoxicity)에 대하여 보호한다.

해양 멧게(tunicate)로부터 유래한 약제인, ET-743은 현재 임상시험 II 단계에 있다. 상기 화합물은 육종에 대하여 임상적 활성을 보였으며, 예비적 데이터에 의하면 유방 및 난소 카시노마에 대하여도 활성을 갖는 것이 암시되고 있다. 그러나, 가역적 트랜스아미테이션(transamination)에 의하여 특징지워지는 간독성은 대분의 처리된 환자 및 일부 쓸개즙정체(cholestasis)에서 일어난다. 대부분의 민감성 동물 종인 랫트에 있어서, ET-743의 독성은 간 괴사(hepatic necrosis) 및 쓸개관 염증에 의하여 특징지워진다. dex의 항염증 활성의 관점에서, 본 발명자들은 상기 dex가 랫트에서 ET-743에 의하여 유도되는 간 손상(liver damage)에 미치는 영향을 조사하였다. 암컷 위스타르(Wistar) 랫트에 ET-743 (40 µg/kg)의 단일 정맥내(iv) 용량(dose)을 투여하였다. 일부 랫트는 ET-743 처리 24시간 전에 1, 5, 10 또는 20mg/kg의 dex 단일 경구 용량(dose)으로 전처리하였다. ET-743 투여 3일까지 알칼라인 포스파타제(ALP), 아스파테이트 아미노트란스퍼라제(GOT) 및 총빌리루빈(TB)의 간 병리학 및 혈장 농도를 분석하였다. 상기 간의 통상적인 조직학적 단편을 광학 현미경으로 조사하였다.

ET-743 처리 2일 후, ET-743만을 투여받은 랫트로부터 유래한 간은 쓸개관 염증, 쓸개성 표피세포(biliary epithelial cell) 및 간 괴사 영역에 현저한 퇴행성 변화를 보였다. ALP 및 GOP의 혈장 수준은 2일 후 현저하게 증가하였다. 쓸개즙정체는 ET-743 투여 2일 후 시작한 혈장 TB 농도의 현저한 증가에 의하여 조사되었다. 조직병리학적 변화에 의하여 유도된 -ET-743 및 혈장 ALP, GOT 및 TB의 증가는 10 또는 20 mg/kg dex로 전처리된 랫트에서 완전히 사라졌다.

1mg/kg에서 dex는 거의 보호를 나타내지 않았지만, 5mg/kg에서는 적절히 보호하였다. ET-743 투여전 3일 동안 매일 dex (50mg/kg)을 투여받은 랫트의 ET-743의 혈장수준은 ET-743 단독으로 투여한 랫트에 비하여 감소하였다. 더욱이, 생쥐에 이식된 B16 멜라노마에 대한 ET-743의 활성은 텍사메타손에 의하여 저해되지 않았다. 이들 발견은 ET-743 투여 계획(regimen)에 대한 고용량 텍사메타손은 암 환자에서의 간독성을 개선할 수 있다.