



(19) 대한민국특허청(KR)
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0135230
 (43) 공개일자 2016년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/357 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(71) 출원인
 에자이 알앤디 매니지먼트 가부시키가이샤
 일본국 도쿄도 분쿄구 코이시가와 4쵸메 6번 10고

(52) CPC특허분류
A61K 31/357 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)

(72) 발명자
 리틀필드, 브루스, 에이.
 미국, 앤에이 01810, 앤도버, 트윈 브룩스 서클 4

(21) 출원번호 10-2016-7027369

후나하시, 야스히로

(22) 출원일자(국제) 2015년03월02일

미국, 앤에이 02114, 보스톤, 유닛 905, 블라썸
 스트리트 175

심사청구일자 없음

우에나카, 토시미츠

(85) 번역문제출일자 2016년09월30일

미국, 피에이 19382, 웨스트 체스터, 아파트.
 333, S. 매들랙 스트리트 890

(86) 국제출원번호 PCT/US2015/018335

(74) 대리인

(87) 국제공개번호 WO 2015/134399

공병옥

국제공개일자 2015년09월11일

(30) 우선권주장

61/947,398 2014년03월03일 미국(US)

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 암의 치료를 위한 병용 요법으로서의 에리불린 및 mTOR 억제제의 용도

(57) 요약

본 발명은 하나 또는 그 이상의 mTOR 억제제와 병용한 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및 이의 키트를 부여함에 의하여 암을 치료하기 위한 방법을 필요로 하는 환자에게 이를 제공하는 것을 특징으로 한다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/675 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

암에 걸렸거나 또는 암 발생의 위험을 가지는 대상(subject)의 치료를 위한 방법에 있어서, 상기 대상에 대하여 (i) 에리불린(eribulin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) 포유류 라파마이신(rapamycin)의 표적 단백질(mTOR)에 대한 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물(hydrate), 용매화물(solvate) 또는 비결정성 고체(amorphous solid)를 부여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 대상은 인간 환자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 대상은 암으로 진단되거나, 암으로 치료중이거나, 또는 암으로 발견되어 치료 후(post-therapy)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 암은 원발성 종양(primitive tumor)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 암은 전이성(metastasis)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 암은 고형 종양(solid tumor)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 암은 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 원시 신경외배엽성 종양(primitive neuroectodermal tumors), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 식도암(esophageal cancer), 및 육종(sarcoma)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항의 방법에 있어서, 상기 암은 유방암 및 폐암으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린의 약학적으로 허용 가능한 염은 에리불린 메실산(mesylate)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 정맥내 주입(intravenous infusion)을 통해 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항의 방법에 있어서, 상기 정맥내 주입은 1 내지 20분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항의 방법에 있어서, 상기 정맥내 주입은 2 내지 5분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $20 \text{ mg}/\text{m}^2$ 범위의 양으로 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $1.4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 범위의 양으로 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 21-일 주기의 1 및 8일에, 또는 28-일 주기의 1 및 15일에 각 1회 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스(everolimus), 리다포롤리무스(ridaforolimus), 및 템시롤리무스(temsirolimus), 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 17 항의 방법에 있어서, 상기 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 경구투여(orally)를 통해 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 18 항의 방법에 있어서, 상기 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 0.1 mg 내지 30 mg 범위의 양으로 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 19 항의 방법에 있어서, 상기 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 10 mg의 양으로 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 21-일 주기 또는 28-일 주기 동안 하루 1회 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 대체로 동시에 또는 연속적으로 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 22 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체보다 먼저 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 단독 항암제(anti-cancer agents)로 부여되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 24 항의 방법에 있어서, 상기 에리불린의 약학적으로 허용 가능한 염은 에리불린 메실산(mesylate)이고 및/ 또는 상기 mTOR 억제제의 약학적으로 허용 가능한 염은 에베롤리무스인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 1 항의 방법에 있어서, 상기 치료는 아래와 같은 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 방법: (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 암세포의 부피를 감소시키며; (iii) 종양의 퇴행 비율(regression rate)을 증가시키고; (iv) 암세포의 주변 장기로의 침투(infiltration)를 감소시키거나 둔화시키며; (v) 종양의 전이를 감소시키거나 둔화시키고; (vi) 종양의 성장을 감소시키거나 억제하며; (vii) 암의 발생 및/또는 재발을 막거나 연기시키고 및/또는 무질병 또는 무종양(disease- or tumor-free) 생존 시간을 확장하고; (viii) 종합적으로 생존 시간을 증가시키며; (ix) 치료의 빈도를 감소시키고; 및/또는 (x) 암과 결부된 하나 또는 그 이상의 증상을 완화시킨다.

청구항 27

대상 내 종양의 크기를 감소시키는 방법에 있어서, (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체를 상기 대상에 부여하는 것을 포함하는 상기 방법.

청구항 28

제 27 항의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

암의 치료 또는 종양 크기의 감소에 이용하기 위한 키트에 있어서, (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체를 포함하는 키트.

청구항 30

제 29 항의 키트에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 31

제 29 항의 키트에 있어서, 상기 (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 (ii) mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 제형화(in dosage form)된 것을 특징으로 하는 키트.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

본 발명은 하나 또는 그 이상의 mTOR 억제제와 병용한 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및 이의 키트를 부여함에 의하여 암을 치료하기 위한 방법을 필요로 하는 환자에게 이를 제공하는 것을 특징으로 한다.

배경 기술

[0002]

암은 세포의 특정한 유형의 조절불가한 성장에 의해 각각 특성화된 넓고 다양한 질병을 아우른다. 이는 이러한 세포들을 포함하는 조직에서 시작되고, 만약 진단 당시 그 암이 다른 추가적인 조직으로 확산(spread)되지 않았다면, 아마도, 예를 들어, 수술(surgery), 방사선 치료(radiation), 또는 다른 유형의 국부적인(localized) 요법에 의해 치료된다. 그러나, 암이 원발 조직(tissue of origin)으로부터 전이된 증거가 있다면, 치료를 위해 다른 접근들(approaches)이 일반적으로 이용된다. 사실, 전이의 확장(extent)을 확실성을 가지고 결정하는 것은 불가능하기 때문에, 확산의 증거가 발견되면 치료를 위한 시스템적인 접근에 보통 착수한다. 이러한 접근은, 암 세포와 같이 빠르게 분열하는 세포의 성장을 방해하는 화학치료의 약제(chemotherapeutic drugs) 부여를 수반할 수 있다. 다른 접근들은, 대상 내에서 유발되거나 또는 강화된 암성 세포에 대한 면역 반응인 면역 요법(immunotherapy)의 이용을 수반한다.

[0003]

헬리콘드린 B(halichondrin B)는 구조적으로 복잡하고, 해면동물(marine sponge)인 검정해변해면(Halichondria okadae)으로부터 분리되어 기원한 큰 고리 모양 화합물(macrocyclic compound)이며, 후에 해면 속(Axinella sp.), 파켈리아 카르테리(Phakellia carteri) 및 리소덴도릭스 속(Lissodendoryx sp.)에서 발견되었다. 헬리콘

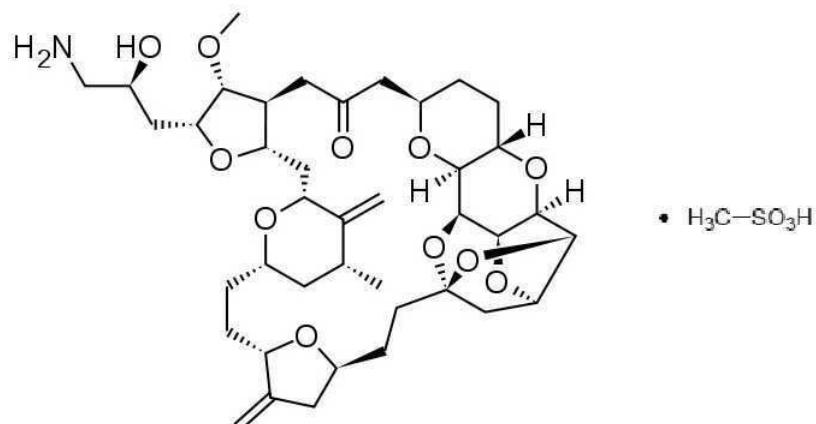
드린 B의 전합성(total synthesis)은 1992년에 출판되었다(Aicher et al., J. Am. Chem. Soc. 114:3162-3164, 1992). 헬리콘드린 B는 체외에서(in vitro) 투불린 중합(tubulin polymerization), 미세소관 조립(microtubule assembly), 베타S-튜불린 교차결합(betaS-tubulin crosslinking), GTP 및 빈블라스틴(vinblastine)의 투불린에의 결합(tubulin) 및 투불린-의존적 GTP의 가수분해(hydrolysis)를 억제하는 것으로 보여졌다. 이 분자는 또한 체외 및 체내에서 항암 특성(properties)을 가지는 것으로 보여졌다. 미국등록특허 제6214865호(U.S. Patent No. 6,214,865 B1)에서 헬리콘드린 B 유사체(analogs)는 항암 활성(activities)을 가지는 것으로 제시되었다.

[0004]

에리볼린은 헬리콘드린 B의 인공적(synthetic) 유사체이다. 에리볼린은 또한 ER-086526으로도 알려져 있고, CAS 번호(CAS number) 253128-41-5 및 미국 NCI 지정 번호(designation number) NSC-707389를 할당받았다(assigned). 에리볼린의 메실산염(mesylate salt)(HALAVEN®)이라는 상품명으로 상용화된 에리볼린 메실산은, 또한 E7389로도 알려져 있다)은 어느 보조제(adjuvant) 또는 전이성 세팅에서든 안트라사이클린(anthracycline) 및 탁산(taxane)을 포함했어야만 했던 전이성(metastatic) 질병의 치료를 위한 적어도 두 번의 화학치료 요법(chemotherapeutic regimens) 경험이 있는(previously received) 유방암 환자들의 치료를 위해 공인되었다(approved).

[0005]

에리볼린 메실산의 화학명은 에리볼린 메실산의 화학명은 11,15:18,21:24,28-트라이에폭시-7,9-에타노-12,15-메타노-9H,15H-퓨로[3,2-i]퓨로[2',3':5,6]파이라노[4,3-b][1,4]다이옥사사이클로펜타코신-5(4H)-온, 2-[(2S)-3-아미노-2-하이드록시프로필]헥사코사하이드로-3-메톡시-26-메틸-20,27-비스(메틸렌)-(2R,3R,3aS,7R,8aS,9S,10aR,11S,12R,13aR,13bS,15S,18S,21S,24S,26R,28R,29aS)-페탄설포네이트(salt)이고, 다음과 같이 표시된다:



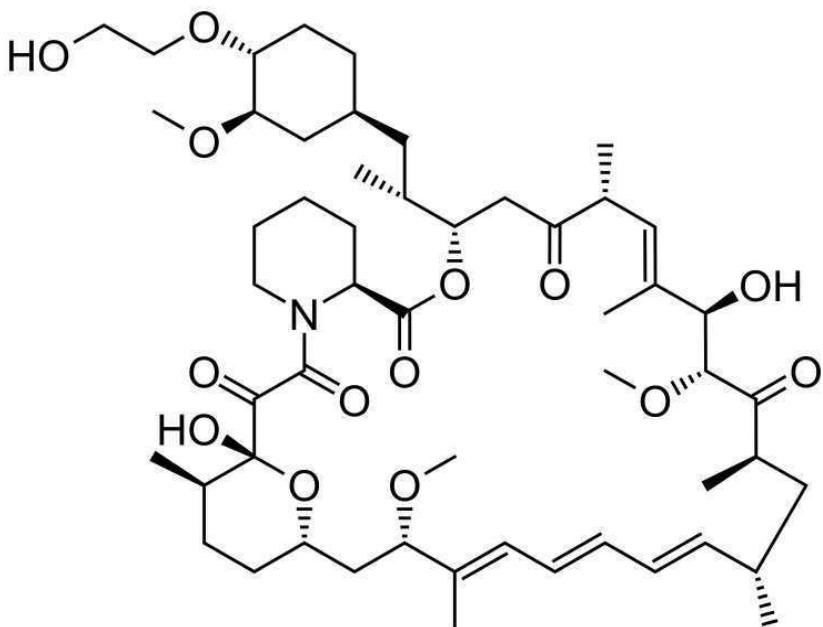
[0006]

[0007]

mTOR(또한 포유류 라파마이신(rapamycin)의 표적단백질로 알려진, 라파마이신의 기계론적(mechanistic) 표적단백질, 및 FK506-결합 단백질 12-라파마이신-관련 단백질 1(FK506-binding protein 12-rapamycin-associated protein 1))은 세포 성장, 세포 증식, 세포 운동(motility), 세포 생존, 단백질 합성, 및 전사(transcription)를 조절하는 세린(serine)/트레오닌(threonine) 인산화효소(kinase)이다. mTOR은 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol) 3-인산화효소-관련의 인산화효소 단백질 패밀리에 속한다. mTOR 복합체(Complex) 1(mTORC1)는 mTOR, mTOR의 조절-관련 단백질(regulatory-associated protein of mTOR, raptor), MLST8(mammalian lethal with SEC13 protein 8), 및 논코어(non-core) 성분 PRAS40 및 Deptor로 구성된다. 상기 복합체는 영양/에너지/산화환원(redox) 센서로 기능하고 및 또는 단백질의 합성을 조절하는 역할을 한다.

[0008]

에베롤리무스(RAD-001)는 mTOR의 억제제이고 mTORC1 복합체에 이의 효과를 가한다(exert). 에베롤리무스는 종양학 연구에서(in oncology) 아피니토(Afinitor)라는 상품명으로 노바티스(Novartis)에 의해 제공되었다. 에베롤리무스의 화학명은 다이하이드록시-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-하이드록시에톡시)-3-메톡시사이클로헥실]프로판-2-일]-19,30-다이메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-11,36-다이옥사-4-아자트라이사이클로[30.3.1.0]헥사트라이아콘타-16,24,26,28-테트라엔-2,3,10,14,20-펜톤이고, 다음과 같이 표시될 수 있다:



[0009]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명은 에리불린 메실산(eribulin mesylate) 및 mTOR 억제제, 에베롤리무스(everolimus)의 병용이 개선된(가령, 상승적인(synergistic)) 항암 효과를 보임을 관찰함에 근거한다. 그러므로, 상기 본 발명은 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및 하나 또는 그 이상의 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)의 병용 사용에 의한 암의 예방 및 치료 방법을 특징으로 한다.

[0011]

본 명세서 상의 용어 "에리불린"은, 문맥상 달리 표시되지 않는 한(unless the context indicates otherwise), 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염(에리불린 메실산과 같은)을 지칭하는 것으로 간주한다. 유사하게, 본 명세서 상의 용어 "mTOR 억제제"(또는 mTOR 억제제의 특정 명칭으로, 에베롤리무스 같은)는, 문맥상 달리 표시되지 않는 한 mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물(hydrate), 용매화물(solvate) 또는 이의 비결정성 고체(amorphous solid)를 지칭하는 것으로 간주한다.

[0012]

본 발명은 암 발생의 위험을 가지는 대상(subject)(가령, 인간 환자)을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 상기 방법은 (i) 에리불린(eribulin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염(가령, 에리불린 메실산), 및 (ii) 포유류 라파마이신(rapamycin)의 표적단백질(mTOR)에 대한 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스(ridaforolimus), 또는 템시롤리무스(temsirolimus)) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물 또는 비결정성 고체를 부여하는 것을 포함한다. 상기 대상은 암으로 진단되거나, 암으로 치료중이거나, 또는 암으로 발견되어 치료 후(post-therapy)일 수 있다. 다양한 구현예(embodiments)에서, 상기 암은 원발성 종양(primary tumor) 또는 전이성(metastasis)일 수 있고, 및 선택적으로(optionally) 고형 종양(solid tumor)일 수 있다. 다른 구현예에서, 상기 암은 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 원시 신경외배엽성 종양(primitive neuroectodermal tumors), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 식도암(esophageal cancer), 및 육종(sarcoma)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0013]

에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염(가령, 에리불린 메실산)은, 가령, 1 내지 20분 동안, 가령, 2 내지 5 분 동안, 정맥내 주입(intravenous infusion)을 통해 부여될 수 있다. 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염(가령, 에리불린 메실산)의 양은 $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $20 \text{ mg}/\text{m}^2$ (가령, $1.4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 또는 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$) 범위 내일 수 있고, 선택적으로 21-일 주기의 1 및 8일에 하루(daily) 1회, 또는 28-일 주기의 1 및 15일에 하루 1회 부여할 수 있다.

[0014]

상기 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 또는 템시롤리무스)는 경구투여(orally)를 통해 부여될 수 있고, 가령, 0.1 mg 내지 30 mg (가령, 10 mg) 범위 내의 양으로, 및 선택적으로 21-일 주기 또는 28-일 주기

동안 하루 1회 부여될 수 있다.

[0015] 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 또는 템시롤리무스), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 대체로 동시에 또는 연속적으로 부여될 수 있다. 예를 들어, 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 또는 템시롤리무스), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체보다 먼저 부여될 수 있다.

[0016] 뿐만 아니라(Furthermore), 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염(가령, 에리불린 메실산), 및 상기 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 또는 템시롤리무스), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 단독 항암제(anti-cancer agents)로서 선택적으로 부여될 수 있다.

[0017] 본 발명의 방법에 따른 치료: (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 암세포의 부피를 감소시키며; (iii) 종양의 퇴행 비율(regression rate)을 증가시키고; (iv) 암세포의 주변 장기로의 침투(infiltration)를 감소시키거나 둔화시키며; (v) 종양의 전이를 감소시키거나 둔화시키고; (vi) 종양의 성장을 감소시키거나 억제하며; (vii) 암의 발생 및/또는 재발을 막거나 연기시키고 및/또는 무질병 또는 무종양(disease- or tumor-free) 생존 시간을 확장하고; (viii) 종합적으로 생존 시간을 증가시키며; (ix) 치료의 빈도를 감소시키고; 및/또는 (x) 암과 결부된 하나 또는 그 이상의 증상들을 완화시킨다.

[0018] 본 발명은 또한 대상(가령, 인간 환자) 내의 종양의 크기를 감소시키는 방법을 제공한다. 상기 방법은 대상에 대한 (i) 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 또는 템시롤리무스) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체 부여를 포함한다. 상기 방법은 부여 요법(regimens) 및 상기 제시된(described) 암 및 본 명세서에 기재된 내용을 수반할 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은 암의 예방 또는 치료 또는 종양 크기(또한, 가령, 상기 목록화된 효과에서 알 수 있듯이)의 감소에 이용하기 위한 키트를 포함한다. 상기 키트는 (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스, 리다포롤리무스, 또는 템시롤리무스) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체를 포함할 수 있고, 선택적으로 제형화(in dosage form)될 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한 질병 및 병태(conditions)의 예방 및 치료에 이용하기 위해 본 명세서에 기재된 물질을 포함하는 약학적 조성물(pharmaceutical compositions)을 포함한다. 뿐만 아니라, 본 발명은 약제(medicaments)를 준비하기 위해 및/또는 질병 및 병태를 예방 및 치료하기 위해 본 명세서에 기재된 물질의 용도를 포함한다.

[0021] 본 발명의 상기 방법은 암에 대한 개선된 효과를 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 제시된 복용 치료 방법은 이로써 상승적인 효과를 얻기 위해 이용될 수 있고, 예를 들어, 상기 효과는 개별적으로(individually)부여된 약제의 효과의 합보다 더 클 수 있으며, 당업자(skill in the art)에 의해 결정될 수 있다. 상가효과(Additive effects) 또한 유익하다.

[0022] 본 발명의 다른 특징 및 이점(advantage)은 후술되는(following) 상세한 설명(description), 도면, 및 청구항으로부터 명확히(apparent) 하였다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명은 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염(가령, 에리불린 메실산) 및 하나 또는 그 이상의 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스) 부여를 수반하는 암의 예방 및 치료 방법을 제공한다. 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염(가령, 에리불린 메실산) 및 에베롤리무스 부여에 의한 암의 치료는, 본 발명의 방법에 따르면, 암과 관련하여 (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 암세포의 부피를 감소시키며; (iii) 종양의 퇴행 비율(regression rate)을 증가시키고; (iv) 암세포의 주변 장기로의 침투(infiltration)를 감소시키거나 둔화시키며; (v) 종양의 전이를 감소시키거나 둔화시키고; (vi) 종양의 성장을 감소시키거나 억제하며; (vii) 암의 발생 및/또는 재발을 막거나 연기시키고 및/또는 무질병 또는 무종양(disease- or tumor-free) 생존 시간을 확장하고; (viii) 종합적으로 생존 시간을 증가시키며; (ix) 치료의 빈도를 감소시키고; 및/또는 (x) 암과 결부된 하나 또는 그 이상의 증상들을 완화시킬 수 있다.

약학적 조성물, 복용량, 및 방법

[0025] 에리불린의 합성을 위한 방법을 제시함에 있어서, 예를 들어, 본 명세서에 참고문헌으로 기재된 U.S. Patent

No. 6,214,865; U.S. Patent No. 7,982,060; U.S. Patent No. 8,350,067; 및 U.S. Patent No. 8,093,410이 있다. 상기 기재된 바와 같이, 에리불린 메실산은 HALAVEN®으로 상용화되어 상업적으로 이용가능(available commercially)하다. 에베롤리무스와 관련한 방법 및 이의 합성을 제시함에 있어서, 본 명세서에 참고문헌으로 기재된 U.S. Patent Nos. 5,665,772, 6,004,973, 7,297,703, 8,410,131, 8,436,010이 있다. 또한, 상기 기재된 바와 같이, 에베롤리무스는 AFINITOR®로 상용화되었다. 훨씬 아래에(further below) 논의된 바와 같이, 에베롤리무스에 추가된 mTOR 억제제는 또한 본 발명에서 이용될 수 있고 및 상업적으로 이용가능하며 또한 업계에 공지된(known in the art) 방법을 이용하여 야기될 수 있다.

[0026] 상기 기재된 바와 같이, 에리불린 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)는 본 발명에서 선택적으로 염의 형태(salt forms)로 이용될 수 있다. 염을 이용함에 있어, 무기산염(inorganic acid salt)인지 또는 유기산염(organic acid salt)인지의 특별한 제한(particular limitations)은 없다. 예를 들어, 상기 염은 메실산염(mesylic acid salt)(가령, 에리불린 메실산), 염산염(hydrochloric acid salt), 황산염(sulfuric acid salt), 구연산염(citrate), 브롬화수소산염(hydrobromic acid salt), 요오드화수소산염(hydroiodine acid salt), 질산염(nitric acid salt), 중황산염(bisulfate), 인산염(phosphoric acid salt), 고도인산염(super phosphoric acid salt), 아이소니코틴산염(isonicotinic acid salt), 아세트산염(acetic acid salt), 젖산염(lactic acid salt), 살리실산염(salicic acid salt), 주석산염(tartaric acid salt), 판토텐산염(pantotenic acid salt), 아스코르브산염(ascorbic acid salt), 숙신산염(succinic acid salt), 말레산염(maleic acid salt), 푸마르산염(fumaric acid salt), 글루콘산염(gluconic acid salt), 사카린산염(saccharinic acid salt), 포름산염(formic acid salt), 벤조산염(benzoic acid salt), 글루타민산염(glutaminic acid salt), 메탄설폰산염(methanesulfonic acid salt), 에탄설폰산염(ethanesulfonic acid salt), 벤젠설폰산염(benzenesulfonic acid salt), p-톨루엔설폰산염(p-toluenesulfonic acid salt), 팜산염(pamoic acid salt, pamoate), 및 등등으로부터 선택될 수 있다. 게다가(Moreover), 알루미늄(aluminum), 칼슘(calciun), 리튬(lithium), 마그네슘(magnesium), 소듐(sodium), 아연(zinc), 및 디에탄올아민(diethanolamine)의 염의 이용이 허용가능하다.

[0027] 에리불린 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)를 포함하는 약학적 조성물은 업계에 공지된(가령, 상기 기재된 특허문헌들에서 알 수 있듯이) 통상적인(standard) 방법을 이용하여 준비될 수 있다. 일반적으로(Typically), 본 발명에서 이용된 에리불린 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)는 분리된 약학적 조성물 내에 포함되나, 선택적으로, 단일(single) 조성물 내에 포함될 수 있다. mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)가, 경구부여를 위하여 일반적으로 알약(tablet) 형태로 제공되는 데 반하여, 에리불린은, 정맥내 부여를 위하여 일반적으로 액체 형태로 제공된다.

[0028] 본 발명에서 이용되는 약학적 조성물은, 예를 들어, 유효 성분(active ingredient)(들)을 혼합 또는 용해(dissolving)하거나, 이상적인 정도(desired degree)의 순도를 가지거나, 생리학적으로(physiologically) 허용가능한 희석액(diluent), 운반체(carrier), 첨가제(excipient), 또는 안정제(stabilizer)가 준비될 수 있다(가령, Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA). 허용가능한 희석액은 물 및 식염수를 포함하고, 선택적으로 인산염(phosphate), 구연산염, 또는 다른 유기산과 같은 벼파; BHT(butylated hydroxytoluene), BHA(butylated hydroxyanisole), 아스코르브산을 포함하는 산화 방지제(antioxidant); 저분자량(약 10 잔기(residues)보다 적은) 폴리펩타이드; 혈청 알부민(serum albumin), 젤라틴 또는 면역 글로불린 항체(immunoglobulins)와 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈(polyvinylpyrrolidone)과 같은 친수성 폴리머(hydrophilic polymers), 글라이신(glycine), 글루타민(glutamine), 아스파라긴(asparagines), 아르기닌(arginine) 또는 라이신(lysine)과 같은 아미노산; 단당류(monosaccharides), 이당류(disaccharides), 또는 글루코스(glucose), 만노스(mannose) 또는 텍스트린(dextrins)을 포함하는 다른 탄수화물(carbohydrates); EDTA와 같은 칠레이팅 물질(chelating agents); 만니톨(mannitol) 또는 소르비톨(sorbitol)과 같은 당알코올(sugar alcohols); 소듐과 같은 염-형성(salt-forming) 반대이온(counterions); 및/또는 TWEEN, PLURONICS, 또는 PEG와 같은 비이온 계면활성제(nonionic surfactants)를 포함한다.

[0029] 경구 복용 형태(가령, 에베롤리무스와 같은, mTOR 억제제를 포함하는 조성물)를 위한 조성물의 준비에 있어서, 보통 약학적 매체(media)가 사용되고(employed), 예를 들어, 물, 글라이콜(glycols), 오일, 알코올, 착향료(flavoring agents), 보존료(preservatives), 착색제(coloring agents)일 수 있다. 추가적으로, 전분, 당, 마이크로크리스탈린 셀룰로오즈(microcrystalline cellulose), 희석액, 입화제(granulating agents), 윤활유(lubricants), 결합제(binders), 분해제(disintegrating agents)와 같은 운반체, 및 이와 같이, 예를 들어, 분말, 캡슐, 및 알약(tablet)과 같은 경구 고체 복용(solid preparations)의 경우에 이용될 수 있다.

[0030]

선택적으로, 본 발명의 제제(formulations)는 약학적으로 허용가능한 방부제(preservative)를 포함한다. 어떤 구현예에서 상기 방부제의 농도 범위는 0.1 내지 2.0%이고, 일반적으로 v/v를 기준으로 한다. 적합한(Suitable) 방부제는 제약 당업자(pharmaceutical arts)들에게 공지된, 벤질 알코올, 페놀, m-크레졸(m-cresol), 메틸파라벤(methylparaben), 및 프로필파라벤(propylparaben)과 같은 것을 포함한다. 또한, 상기 에리불린 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스) 제제는 선택적으로, 예를 들어, 생리학적 농도(physiological concentrations)의 염화나트륨(sodium chloride)과 같은 약학적으로 허용가능한 염을 포함할 수 있다. 따라서(Thus), 한 예에서, 에리불린(가령, 에리불린 메실산)은 0.9%의 생리식염주사액(Sodium Chloride Injection)으로 만들어질(formulated) 수 있다.

[0031]

상기(또는 본 명세서에(and others)) 기재된 제제는 약제의 비경구적(parenteral)인 부여로 이용될 수 있다. 따라서, 상기 약제는 정맥내(intravenous), 종양내(intra-tumoral), 종양주위(peri-tumoral), 혈관내(intra-arterial), 피내(intra-dermal), 방광내(intra-vesical), 눈(ophthalmic), 근육내(intramuscular), 피내(intradermal), 복강내(intraperitoneal), 폐(pulmonary), 피하(subcutaneous), 및 경피(transcutaneous) 방식을 포함하는 방식(routes)으로 부여될 수 있다. 또한, 예를 들어, 점막(transmucosal), 경피(transdermal), 흡입(inhalation), 질내(intravaginal), 직장(rectal), 및 경구 부여 방식을 포함하는 다른 방식이 이용될 수 있다.

[0032]

부여되는 에리불린 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스) 조성물의 복용량은 표적 질병의 타입, 전달(delivery)방법의 선택, 이에 더하여(as well as) 환자의 나이, 성별, 및 체중, 증상의 강도(severity), 마찬가지로 다른 요인(factors)에 의존적으로 현저하게(markedly) 상이할(differ) 수 있다.

[0033]

에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 하루 복용량은, 가령 $0.001 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ (가령, $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $50 \text{ mg}/\text{m}^2$ 범위 또는 $0.7 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $1.5 \text{ mg}/\text{m}^2$ 범위, 또는 상기 범위 이내의 단일 양(가령, $1.4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 또는 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$) 범위 내일 수 있다. 에리불린은 일, 주, 격주(bi-week), 월, 또는 연 1회 단일 복용량으로 부여될 수 있고, 또한 에리불린의 1회 복용량 이상은 일, 주, 격주, 월, 또는 연마다 부여될 수 있다. 상기 부여는 선택적으로 정맥내 주입일 수 있고, 가령, 1 내지 20분 동안, 또한 2 내지 5분 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 어느 부여 프로토콜(protocol)에 있어서, 에리불린은 21-일 주기의 1 및 8일에 1회 부여될 수 있다. 더 구체적으로 (More specifically), 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 바람직한(recommended) 복용량은 $1.4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를 2 내지 5분 동안 21-일 주기의 1 및 8일에 정맥내 주입된다. 보통(moderate)의 간 장애(moderate hepatic impairment, Child-Pugh B) 환자에 대한 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 바람직한(recommended) 복용량은 $0.7 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를 2 내지 5분 동안 21-일 주기의 1 및 8일에 정맥내 주입되는 반면에, 경증의 간 장애(mild hepatic impairment, Child-Pugh A) 환자에 대한 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 바람직한 복용량은 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를 2 내지 5분 동안 21-일 주기의 1 및 8일에 정맥내 주입된다. 또한, 보통의 신장 장애(moderate renal impairment)(크레아티닌 청소율(creatinine clearance) 30-50 mL/min) 환자에 대한 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 바람직한 복용량으로는 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를 2 내지 5분 동안 21-일 주기의 1 및 8일에 정맥내 주입된다. 다른 구현예에서, 에리불린(가령, 에리불린 메실산)은 격주 일정(bi-weekly schedule), 가령, 28-일 주기의 1 및 15일에 각 1회로 부여될 수 있다. 더 구체적으로, 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 모범적인(exemplary) 복용량은 $1.4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를 2 내지 5분 동안 28-일 주기의 1 및 15일에 정맥내 주입된다. 상기 기재된 정량 투약(dosage reductions)에 있어서, 경증의 간 장애 또는 보통의 신장 장애 환자의 경우 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를, 및 보통의 간 장애 환자의 경우 $0.7 \text{ mg}/\text{m}^2$ 를, 또한 격주 요법으로 이용할 수 있다. 본 발명의 방법에 따라, 상기 또는 다른 낮은 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 복용량은 부정적인(adverse) 반응(가령, 혈액학적(hematologic) 또는 다른 부정적인 반응)을 가지는 환자의 상황(context) 또는 병용 치료에서 선택적으로 이용될 수 있다.

[0034]

mTOR 억제제는 업계에 공지된 통상적인 접근 및 복용 요법을 이용하여 부여될 수 있다. 에베롤리무스는, 예를 들어, $1 \text{ mg}/\text{day}$ 및 $20 \text{ mg}/\text{day}$ (가령, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 또는 $15 \text{ mg}/\text{day}$) 범위로, 단일 또는 분할된(divided) 복용량으로 경구 부여될 수 있다. 에베롤리무스는 일, 주, 월, 또는 연 1회 단일 복용량으로 부여될 수 있고, 또는 에리불린의 1회 복용량 이상은 일 주, 월, 또는 연마다 부여될 수 있다. 예를 들어, 어느 부여 프로토콜에 있어서, 에베롤리무스는 에리불린(상기에서 알 수 있듯이)으로의 치료 과정(course) 동안 매일 부여될 수 있고, 선택적으로, 에베롤리무스 부여는 에리불린 치료 요법 이후(beyond) 연속될 수 있다. 다른 구현예에서, 에베롤

리무스는, 부여된 두 번째 및 다음(subsequent) 복용량이 처음, 및 이전(preceding)의 복용량에 비하여 상대적으로 감소한, 단계적으로 감소하는 복용량(decreasing step doses)으로 부여될 수 있다. mTOR 억제제의 다른 구현예의 경우에, 템시롤리무스(Pfizer Inc.)는 25 mg의 양으로 30-60 분간 주(week)마다 1회 주입(infuse)하여 부여될 수 있는 반면, 리다포롤리무스(Merck & Company and Ariad Pharmaceuticals)는, 예를 들어, 40 mg QDx5/week로 부여될 수 있다. 상기 양 및 요법은 당업자에 의해 적절하게 결정함으로써 다양화(varied)될 수 있다.

[0035] 에리불린 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스) 조성물은 환자에게 대체로 동시에 또는 연속적으로 및 다른 순서로(in either order)(가령, mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)보다 먼저 에리불린 부여, 또는 반대로(vice versa))부여될 수 있다. 한 예에서, 에리불린은 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)의 부여 시작 전에(가령, 1-12 시간 또는 1-3일 전에) 부여될 수 있다. 화학치료의 약제를 부여하기 위해 이용되는 많은 요법들은, 예를 들어, 환자로부터 치료의 어떤 부정적인 부작용이라도 발견하는 동안의 기간(가령, 1-4주) 이후 상기 치료의 반복에 따른 약제(또는 약제들)의 정맥내 부여를 수반한다. 각 부여에 있어서 에리불린 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스) 모두 또는, 그 대신(alternatively), mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)만을 포함하는 치료의 일부(또는 전체)를 가지는 것이 이상적일 수 있다.

[0036] 구체적으로, 본 발명에 포함되는 치료 요법의 비제한적인(non-limiting) 예에 있어서, 에베롤리무스와 같은 mTOR 억제제가 하루(가령, 1-20 mg 또는 10 mg) 21-일 주기의 1 및 8일에(또는 28-일 주기의 1 및 15일에) 1 내지 20분간(가령, 2 내지 5분 이상) 정맥내 주입에 의해 환자에게 부여되는 반면, 에리불린(가령, 0.01-5 mg/m², 가령, 1.1 mg/m² 또는 1.4 mg/m²)은 같은 주기로 부여된다. 상기 치료의 과정은 당업자에 의해 용인할 수 있도록(tolerable) 효과적으로 결정되어 반복(가령, 1-8, 2-6, 또는 4-5회)될 수 있다.

[0037] 에리불린 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)뿐 아니라 본 발명의 방법은 또한 하나 또는 그 이상의 추가적인 치료 요법의 부여를 포함한다. 상기 요법들 중에 있어서, 면역조절(immunomodulatory) 요법(가령, 항체 또는 백신), 화학치료/항종양(chemotherapeutic/antitumor) 요법, 항균(antibacterial) 요법, 구토억제(anti-emetics), 및 항염증(anti-inflammatory) 요법이 적합하다. 한 특정 예에서, 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)는 경구투여 가능(ORALLY bioavailable)하며, 지질 인산화효소(lipid kinases)의 PI3K(pan-class I phosphatidylinositol 3-kinase) 패밀리의 특정 경구 억제제인, BKM-120(Buparlisib)과 병용하여 부여된다. 상기 예에서, BKM-120은, 0.01 mg 내지 200 mg, 가령, 50 mg 내지 150 mg, 또는 상기 범위 이내의 단일 양(가령, 100 mg) 범위 내에서, 일, 주, 또는 월 1회 단일 복용량으로, 과정 동안, 또는 에리불린 및 mTOR 치료의 이후 부여될 수 있는 반면, 상기 에리불린 및 mTOR 억제제는 상기 기재된 것과 같이 선택적으로 부여될 수 있다. 다른 사례(instance)에서, 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)는 치료 요법에서 단독(sole) 치료(가령, 단독 항암) 요법으로 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 상기 방법은 (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염(가령, 에리불린 메실산), 및 (ii) mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)의 부여로 구성될 수 있다.

[0038] 본 발명의 상기 방법은 대상(가령, 인간 환자)에서 암의 치료(가령, 진행 지연(delay progression)을 포함하여) 또는 예방 및/또는 종양 크기의 감소에 이용될 수 있다. 상기 대상은 암으로 진단되거나, 암 발생의 위험을 가지고거나, 암으로 치료중이거나, 또는 암으로 발견되어 치료 후(post-therapy)일 수 있다. 또한, 상기 방법은 전이 및/또는 재발(recurrence)의 치료 또는 예방을 위해 이용될 수 있다. 상기 치료는 화학치료만일 수 있으나, 종양의 제거 또는 크기의 감소를 위한 수술 절차(surgical procedure), 방사선 치료(radiation therapy), 면역 치료(immunotherapy), 및/또는 절제(ablation) 치료와의 병용 치료 또한 구상된다(envisioned).

[0039] 본 방법에 따른 암의 타입은, 예를 들어, 유방암(가령, 에스트로겐 수용체 양성 또는 음성, 프로게스테론 수용체 양성 또는 음성, HER-2 양성 또는 음성, 또는 삼중-음성(triple-negative) 유방암), 폐암(가령, 대세포(non-small cell) 폐암), 난소암, 인두암, 식도암, 육종을 포함하는 것으로 여겨질 수 있다.

키트

[0041] 본 발명은 또한 에리불린(가령, 에리불린 메실산)의 용기(container) 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)의 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 키트의 상기 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)는 이를 필요로 하는(가령, 단일 부여 또는 다중(multiple) 부여를 위한 를 위한 충분한 양) 환자의 암을 치료하기 위한 충분한(sufficient) 양으로 제공된다. 상기 키트는 따라서 각각 효과적인 양의 단일-복용량 에리불린(가령, 에리불린 메실산) 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스) 약학 조성물(들)을 포함하는 다중 용기를 포함한다. 선택적으로, 약학적 조성물(들)의 부여에 필수적인(necessary) 기구

(instrument) 및 장치(devices) 또한 키트에 포함될 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 키트는, 에리볼린(가령, 에리볼린 메실산) 및/또는 mTOR 억제제(가령, 에베롤리무스)로 암 환자를 치료하기 위해 지시(instructions) 또는 부여 일정과 같은 추가적인 요소(component)를 포함할 수 있다.

[0042] 상기 본 발명은, 결코 본 발명의 제한을 의미하지 않는 후술되는 예에 의해 도시된다(illustrated).

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 MX-1 유선 종양(mammary tumor) 이종식피(xenografts)를 피하(subcutaneously, SC)에 이식한 암컷 흉선제거(athymic) 누드 마우스의 평균 체중에서 E7389의 치료 효과를 보여주는 그래프이다.

도 2는 피하 이식된 MX-1 유선 종양 이종식피로부터 E7389의 치료에 대한 반응을 보여주는 그래프이다.

도 3은 MX-1 유선 종양 이종식피를 피하에 이식한 암컷 흉선제거 누드 마우스의 평균 체중에서 에베롤리무스의 치료 효과를 보여주는 그래프이다.

도 4는 피하 이식된 MX-1 유선 종양 이종식피로부터 에베롤리무스의 치료에 대한 반응을 보여주는 그래프이다.

도 5는 MX-1 유선 종양 이종식피를 피하에 이식한 암컷 흉선제거 누드 마우스의 평균 체중에서 에베롤리무스(40 mg/kg/dose)와 병용한 E7389의 치료 효과를 보여주는 그래프이다.

도 6은 MX-1 유선 종양 이종식피를 피하에 이식한 암컷 흉선제거 누드 마우스의 평균 체중에서 에베롤리무스(20 mg/kg/dose)와 병용한 E7389의 치료 효과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 피하 이식된 MX-1 유선 종양 이종식피로부터 에베롤리무스와 병용한 E7389(0.6 mg/kg/inj)의 치료에 대한 반응을 보여주는 그래프이다.

도 8은 피하 이식된 MX-1 유선 종양 이종식피로부터 에베롤리무스와 병용한 E7389(0.4 mg/kg/inj)의 치료에 대한 반응을 보여주는 그래프이다.

도 9는 피하 이식된 MX-1 유선 종양 이종식피로부터 에베롤리무스와 병용한 E7389(0.2 mg/kg/inj)의 치료에 대한 반응을 보여주는 그래프이다.

도 10은 로에베 상가성(Loewe Additivity)을 이용한 로에베 볼륨(Loewe Volume)의 수량화를 도시(illustrate)한다. 시너지 효과는 단일 물질(agent) 복용량(dose)의 반응으로부터 구축된 로에베 상가성 형태 모델에 관하여 수량화될 수 있다. 상가성 모델은 "귀무가설(null-hypothesis)"을 제공하고 화합물 A 및 B 사이의 무 시너지 상호작용(no synergistic interaction)을 추정한다. 상기 도면에 기재된 바와 같이, 어떤 농도에서도 가장 높은 효과 수치가 상기 모델의 형태를 시사한다. 로에베 볼륨을 수량화하기 위해서, 상가성 형태 모델로부터 실증적 데이터 표면(data surface)이 빠진다. 로에베 볼륨은 복용된 복용량의 매트릭스를 획단하는 어떤 잔류(residual) 접근 활성의 총체(summation)이다.

도 11은 스물다섯 개 세포주의 패널을 획단(across)하는 에리볼린의 GI₅₀을 보여준다. 세포주의 패널을 획단하는 상기 GI₅₀의 중앙값은 0.51 nM이다. 단일 물질 복용량 분석은 1536-웰(well) 및 384-웰 플레이트 포맷에서 3배 수(three-fold)로, 십-포인트 평균 복용량 적정(ten-point dose titration)을 수행하였다.

도 12는 6x6 복용량 매트릭스 포맷을 도시한다. 인핸서(enhancer) 단일 물질 복용량 곡선은 수직축(vertical axis)에 나타난다. 인핸시(enhancee) 단일 물질 복용량 곡선은 수평축(horizontal axis)을 따라 나타난다. 전체 스물다섯인 복용 복용량 비율 포인트가 6x6 복용량 매트릭스 내에 수집되는 반면, 각 인핸서 및 인핸시는 5 포인트의 단일 물질 복용량 시리즈로 수집된다.

도 13은 에베롤리무스에 대한 시너지 효과 스코어(score)의 히트 맵(heat map) 값을 보여준다. 분석은 6개의 유방암 세포주(MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, SK-BR-3, 및 T47D), 6개의 폐암 세포주(A549, NCI-H1650, NCI-H460, NCI-H522, NCI-H526, 및 NCI-H69), 2개의 난소암 세포주(A2780 및 SK-OV-3), 및 다른 종양 타입의 샘플링한 단일 대표 세포주를 이용하여 수행하였다. 스물다섯 개의 세포주는 수평축을 획단하도록 도시되었다. 상기 분석을 위하여 시너지 효과 스코어는 4.42에서 컷-오프(cut-off)하였다. MDA-MB-468, T47D, NCI-H69, A2780, FaDu, 및 HT-1080 세포에서의 에베롤리무스 x 에리볼린 복용에 대한 복용 활성(성장 억제 데이터)이 도시되었다.

도 14는 제시된 세포 타입에 있어서 에베롤리무스에 대한 시너지 효과 스코어 및 로에베 볼륨 스코어를 보여준

다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 실험예

[0045] 실시예 1

[0046] 요약

[0047] 상기 연구(study)의 목적(objective)은 암컷 흉선제거 NCr-nu/nu 마우스에 피하-이식된(subcutaneously-implanted) 인간 MX-1 유선 종양 이종식피의 성장에 있어서 에베롤리무스와 병용 부여했을 때의 E7389(에리불린 메실산)의 효과를 결정하는 것이다. 종양 보유 마우스(tumor bearing mice) 총 120마리를 10마리씩 12 그룹으로 분할하였다. 그룹 1에는 E7389 및 에베롤리무스 혼탁액(vehicles)[2.5% DMSO/97.5% 식염수(saline), 정맥내 주입 (IV), 총 4번 주입하기 위해 4시간마다 1회 (Q4Dx4) 및 주입을 위한 0.5% 메틸 세룰로오즈(methyl cellulose)/ 0.2% 폴리소르베이트(polysorbate) 80의 물 희석액(in water), 경구 위관(oral gavage, PO), 16 연일(consecutive days) 하루 1회 (Q1Dx16)]을 각각 처리하였다. 그룹 2, 3, 및 4는 Q4Dx4 일정의 IV로 부여하여 E7389를 세 가지 복용량(0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection)으로 처리하였다. 그룹 5 및 6은 Q1Dx16 일정의 PO로 부여하여 에베롤리무스를 두 가지 복용량(40 및 20 mg/kg/dose)로 처리하였다. 그룹 7, 8, 및 9는 40 mg/kg/dose인 에베롤리무스와 병용하여 0.6, 0.4, 또는 0.2 mg/kg/injection인 복용량의 E7389를 처리하였다. 그룹 10, 11, 및 12는 20 mg/kg/dose인 에베롤리무스와 병용하여 0.6, 0.4, 또는 0.2 mg/kg/injection인 복용량의 E7389를 처리하였다. 에베롤리무스는 E7389보다 6시간 후에 부여되었다. 모든 치료는 종양 이종식피의 이식 10일 후에 시작하였다. MX-1 인간 유선 종양 이종식피의 성장은 0.6, 0.4, 또는 0.2 mg/kg/injection의 복용량으로 Q4Dx4 일정의 IV로 부여된 E7389의 처리에 민감(sensitive)했고, 전체 세 그룹에서 종양의 성장을 통계적으로(statistically) 유의미하게(significant) 억제하는 결과를 나타냈다. 0.6 mg/kg/injection의 복용량인 E7389의 부여는 여섯 개의 완전한(complete) 종양 감소 및 다섯 개의 무종양(tumor-free) 생존자를 야기했다. Q1Dx16 일정의 40 및 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스의 PO 부여는 최소(in minimal) 통계적으로 유의미하게 시험한 두 복용량 모두에서 종양의 성장을 억제하는 결과를 나타냈다. 상기 40 및 20 mg/kg/dose인 복용량의 에베롤리무스와 병용하여 0.6, 0.4, 또는 0.2 mg/kg/injection인 복용량의 E7389으로의 치료는 용인되었고 통계적으로 유의미하게 MX-1 유선 종양 이종식피의 성장을 억제하는 결과를 나타냈다.

[0048] 40 또는 20 mg/kg/dose인 복용량의 에베롤리무스와 병용하여 0.6 mg/kg/injection인 복용량의 E7389가 부여된 두 병용 그룹 내의 종양의 성장은 개별 동물(individual)의 네 종양 질량(four tumor mass)이 두 배로 증가(doublings)되는 데 걸리는 시간(times to reach four tumor mass doublings) 및 62일차에서의 개별 동물의 종양 무게에서 E7389 단독 기반(alone based) 처리된 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 다르지 않았다. 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간과 비교하였을 때 40 또는 20 mg/kg/dose인 복용량의 에베롤리무스와 병용하여 0.4 mg/kg/injection인 복용량의 E7389가 부여된 상기 그룹 내의 종양의 성장이 E7389 단독으로 처리된 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 다른 반면에, 상기 52일차에서의 개별 동물의 종양 무게의 차이를 비교하였을 때 이는 유의성에 도달하지 못하였다. 각 화합물의 단독 기반 부여에 의해 야기된 두 병용 치료의 항암 활성은 중간(median) 종양 성장 지연으로 비교되었다. 40 또는 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스와 병용하여 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 두 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간 및 41일차에서의 개별 동물의 종양 무게를 비교했을 때 E7389를 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장으로부터 통계적으로 차이가 있었다. 두 병용 치료의 항암 활성은 추가적으로 각 화합물 단독 기반 부여에 의해 야기된 항암 활성으로 중간 종양 성장 지연으로 비교되었다.

[0049] 에베롤리무스의 부여는 동물 피부의 일시적인 건조함(temporary dryness)(이러한 피부의 건조함은 대조군 또는 E7389-처리 그룹으로부터 발견(note)된 바 없다)을 결과로 나타냈다. 모든 병용 그룹에서 피부 건조의 강도는 에베롤리무스 단독으로 처리된 그룹에서보다 적게 나타났다.

[0050] MX-1 인간 유선 종양 이종식피가 피하에 이식된(SC) 암컷 흉선제거 NCr-nu/nu 마우스에 대한 mTOR(포유류 라파 마이신의 표적단백질) 억제제, 에베롤리무스와 병용하여 부여된 E7389의 항암 효과는, 본 연구에서 평가되었다.

[0051] 재료 및 실험방법

[0052] 동물 관리

[0053] 6주령 암컷, 흉선제거 NCr-nu/nu 마우스는 찰스 리버 실험실(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)에

서 구매하였고 실험실에서 실험 전 10일 동안 적응시켰다(acclimated). 상기 동물은 케이지(microislator cage)에 12시간 명/암 주기(light/dark cycle) 조건으로 케이지마다 다섯 마리씩 들어갔다(housed). 상기 동물은 정수된 물(Birmingham municipal water) 및 살균된(sterilized) Teklad Global 16% protein rodent diet(2016S, Harlan Laboratories, Inc.)로 무제한 급이하였다(ad libitum). 가연성(consumable) 물질은 제공하지 않았다. 각 케이지에 페이퍼 룸(Enrich-n'Nest paper rolls, the Andersons Lab Bedding Products, Maumee, OH)가 협응기기(manipulanda)로 제공되었다. 케이지는 매주 두 번 교체하였다. 상기 동물은 매일 관찰되었고 임상적(clinical) 신호를 기록하였다.

[0054] 종양 모델

각 마우스는 13-가우지 니들(13-gauge needle)을 이용한 생체 통로(in vivo passage)로부터 MX-1 인간 유선 종양의 30-40 mg의 조각(fragment)을 우측 옆구리 근처에 피하(SC) 이식하였다. 종양 조각 이식일은 0일차로 지정(designed)한다. 120 마리의 개별 종양은 치료 시작의 날인, 종양 조각 이식 이후 10일차에 100-245 mg의 중량(weight)으로 성장한다(100-245 mm³의 크기). 적절한(proper) 크기의 종양으로 선택된 상기 동물은 12개 치료 그룹으로 할당되고 치료 첫째 날 모든 그룹에서 평균 및 중간 종양 중량은 각각 가능한한 서로 가깝게 하였다(평균 종양 중량 범위는 160 내지 168 mg, 중간 종양 중량은 153 또는 162 mg).

[0056] 약품(Drug Storage)

E7389 분말(에리불린 메실산, 10.1 mg)의 바이알(vial)은 Eisai Inc. frozen (shipped on dry ice)으로부터 받아 수령 후 건조하게(desiccant) 암조건(in the dark)의 -70°C 이하에서 보관하였다. 에베롤리무스(>99%, 카탈로그 번호 E4040)는 LC Laboratories로부터 구매하여 수령 후 -20°C 이하에서 보관하였다. DriSolv® 메틸 솔푸사이드(methyl sulfoxide, DMSO, anhydrous, catalog no. MX 1457-7)는 EMD 화학(EMD Chemicals, Inc.)으로부터 구매하여 수령 후 실온 보관하였다. DMSO의 병은 개봉(opened) 후 질소 분위기하(under nitrogen)의 실온에서 보관하였다. 식염수(생리 식염수 용액, 소독완료, 방부제 무첨가, 동물에만 사용할 것) 및 주사용 증류수(Water for Injection) USP(WFI, 소독완료 - 비발열성(nonpyrogenic), 동물에만 사용할 것)는 노바테크(Nova-Tech, Inc.)에 의해 제조되었고 실온 보관하였다. 배합 기간(formulation period) 동안, 식염수 및 WFI는 4°C에서 보관하였다. 메틸 셀룰로오즈(MC, 4,000 cP 20°C에서 점도가 2%인 수용액)는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구매하여 실온에서 보관하였다. 폴리소르베이트 80(T80, Fisher Scientific)은 실온 보관하였다. 0.5% MC/0.2% T80의 WFI 용액은 4°C에서 보관하였다.

[0058] 약제 제제(Drug Formulation)

100% DMSO 내 2.4 mg/mL의 E7389 원액(stock solution)은 4.21 mL의 100% DMSO(미개봉 병으로부터)를 10.1 mg의 E7389 바이알에 첨가하고 부드럽게 흔들어(gentle vortexing) E7389를 100% DMSO 내에 용해시킴으로써 제제하였다. 완전히 용액에 용해되었음을 확실히 하기 위해 상기 용액을 2-3분 동안 방치하는 것이 허용된다. 상기 2.4 mg/mL 원액은 치료의 전체 4일을 위해 분취(aliquoted)하고, 분취액(aliquots) 및 2.4 mg/mL 원액 바이알 내의 공기는 질소로 대체하였으며, 분취액 및 잔여(remaining) 원액 바이알은 -70°C에서 냉동하였다. 각 치료일에, 분취액은 실온에서 해동(thawed)하고 식염수에 희석하여 2.5% DMSO/97.5% 식염수 내의 0.06 mg/mL의 농도로 수득(yield)하였다. 0.04 및 0.02 mg/mL의 더 낮은 농도는 0.06 mg/mL 용액의 부분을 2.5% DMSO/97.5% 식염수와 희석하여 수득하였다. 제제 및 부여 사이의 복용 용액 병은 4°C에서 보관하였다.

[0060] 100% DMSO는 매일의 치료를 위해 분취하였고, 바이알 내의 공기는 질소로 대체하였으며, 및 상기 바이알은 -70°C에서 냉동하였다. 각 치료일에 DMSO의 분취액은 실온에서 해동하고 식염수에 희석하여 2.5% DMSO/97.5% 식염수를 수득하였다. 상기 용액은 그룹 1 내의 마우스의 치료에 이용되었다(E7389 혼탁액).

[0061] 0.5% MC/0.2% T80의 WFI 용액이 만들어졌고 상기 용액은 4°C에서 보관하였다. 4 mg/mL 농도의 에베롤리무스는 각 치료일에 0.5% MC/0.2% T80의 WFI 용액으로 만들어졌다. 4 mg/mL의 탁한 용액(cloudy solution)은 0.5% MC/0.2% T80의 WFI 용액으로 2 mg/mL로 희석하였다. 제제 및 부여 사이의 복용 용액 병은 4°C에서 보관하였다.

[0062] 모든 E7389 복용 용액에 있어서, 각 치료일의 정확한 개체의 체중에 의해 에베롤리무스 복용 용액, 및 혼탁액을, 0.1 mL/10 g 체중 대비 부피로 주입하여 마우스에 부여하였다.

[0063] 약물 치료(Drug Treatment)

상기 실험은 치료 첫날에 총 120마리의 마우스를 위해 그룹마다 마우스가 10마리인 혼탁액-처리 대조 그룹 및 11개의 약제-처리 그룹으로 구성된다. 모든 치료는 10일차에 시작된다.

[0065] E7389는 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 단독 복용량으로(각각 그룹 2-4), 및 에베롤리무스와 병용하여(그룹 7-12) 총 4회 주입(모든 도면에 있어서 Q4Dx4; 10, 14, 18, 및 22일차, 또한 Q4Dx4(10) -(0)로 나타낸다)을 위해 4일마다 1회 정맥내(IV) 부여된다. 에베롤리무스는 40 and 20 mg/kg/dose의 단독 복용량으로(각각 그룹 5 및 6) 및 E7389과 병용하여(그룹 7-12) 16 연일 하루 1회 경구 위관(PO)에 의해(모든 도면에 있어서 QIDxI6; 10-25일차, 또한 Q1Dx16(10) -(6)로 나타낸다) 부여된다. 두 화합물이 모두 부여되는 날, E7389는 모든 병용 그룹에 처음으로 [-(-)] 부여(10:05, 8:45, 8:40, 및 8:32 a.m.에 주입 시작, 각각 10, 14, 18, 및 22일차)하였고 이후 에베롤리무스를 6시간 후에 부여하였다 [-(6)]. 에베롤리스만을 부여하는 날에 치료는, 상기 치료가 11:11am에 시작된 15일차를 제외하고 하루 중 두 번째 시점(second part of the day)(1:15 및 2:45 pm의 사이)에 수행되었다. 대조 그룹(그룹 1)은 E7389 및 에베롤리무스 혼탁액(각각 2.5% DMSO/97.5% 식염수, IV, Q4Dx4 및 0.5% MC/0.2% T80의 WFI 용액, PO, Q1Dx16)으로 처리하였다.

종양 측정 및 체중

[0066] 동물의 사망률(mortality) 및 질병률(morbidity)을 하루 1회 관찰하였다. 치료 첫째 날, 종양 조각의 이식 이후 10일차부터 매주 두 번씩 상기 SC 종양의 측정 및 상기 동물의 체중 측정을 시작하였다. 종양의 부피는 캘리퍼스 측정(caliper measurements)(mm)에 의해 결정되었고 타원 구(ellipsoid sphere)를 위한 공식(formula)을 이용하였다: $I \times w^2 / 2 = mm^3$ 에서 I 및 w는 각 측정을 통해 수집된 더 크고 및 더 작은 직각(perpendicular)의 면적(dimensions)을 나타낸다. 상기 공식은 또한 종양의 질량을, 단위 밀도(unit density)($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ mg}$)로 가정(assuming)하고, 계산하기 위해서도 이용된다. 종양 검출의 한계는 $4 \times 4 \text{ mm}(32 \text{ mg})$ 이다.

연구 기간

[0067] 상기 연구는 종양 조각 이식 이후 62일차에 종료되었다(terminated). 종양이 4,000 mg의 무게에 도달하거나 또는 궤양이 발생한(ulcerated) 모든 동물 또는 체중이 14g 아래로 감소한 모든 동물은 인도적으로(humane reasons) 상기 연구 일정의 종료보다 먼저 안락사시켰다.

파라미터(parameters)의 평가

[0068] 비특이적인 사멸의 수, 완전한 종양 감소의 수, 62일차에서 무종양 생존의 수, 및 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 각 그룹의 종양에 있어서의 일 수 중위수(median number of days)를 계산하였다. 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 중위시간(median time)은 중간 종양의 성장에서의 종합적 지연의 계산에 이용되었다(T-C, days). 34일차(대조 그룹에서 50% 이상의 동물이 여전히 생존한 데이터 수집의 마지막 날)에서 치료 그룹의 중간 종양 질량(T)의 대조 그룹의 중간 종양 질량($T/C \times 100\%$)과의 비교는 항종양 효능(efficacy)의 추가적인 평가에 이용되었다. 추가적으로, 수집 데이터에서 매일의 그룹 평균 체중 변화는 각 그룹에 대하여 계산된 10일차(그램 및 백분율로)의 그룹 평균 체중과 관련된다.

데이터 분석

[0069] 개별 종양 측정 및 체중은 수집되어 남부 연구소(Southern Research Institute)에서 개발된 소프트웨어 ADAS(Automated Data Acquisition System)를 이용하여 가공되었다(processed). 체중 및 종양 질량 데이터를 도표로 제공(present)하기 위해 SigmaPlot™ 9.0 소프트웨어가 이용되었다. 종양 성장 데이터를 통계적으로 비교하기 위해서는 SigmaStat 버전 3.5 통계 소프트웨어(SigmaStat version 3.5 statistical software)가 이용되었다. 상기 그룹들 간의 차이는 P 값(P value)이 0.05와 동일하거나 더 적으면 유의미한 것으로 간주되었다. 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간은 생명표 분석(life tables analysis)에서 종료점(endpoint)으로 이용되었다(Kaplan-Meier survival analysis followed by a log-rank test). 생명표 분석은 종양이 평가포인트(evaluation point)까지 도달하지 못한 동물들을 이용한 상기 그룹들 사이의 성장 데이터의 비교를, 겸열(censoring)에 의하여 가능하게 한다(allows). 0.6 mg/kg/injection의 복용량(단독 또는 에베롤리무스와 병용하여)인 E7389로 처리된 세 그룹에서의 62일차에서의, 0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389로 처리된 세 그룹에서의 41일차에서의 개별 동물들의 종양 무게를 t-test(또는 Mann-Whitney rank sum test)를 통해 비교하였다. 데이터 세트가 정규성 검정(normality test)을 통과하지 못하면 비모수적(Nonparametric) 테스트가 이용되었다. 분석을 위해 선택된 일자는 모든 세 그룹에서 적어도 50% 이상의 동물이 생존한 데이터 수집의 마지막 날이었다.

결과

[0070] 혼탁액-처리된 대조 그룹(그룹 1)의 종양은 모든 열 마리의 마우스에서 잘 성장하였다. 한 종양은 네 종양 질량

이 두 배로 증가하는 데 도달하기 전에 발생하였다. 중간 종양은 18.2일 안에 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 도달하였고 34일차에서 4,513 mg의 질량에 도달하였다. 동물의 질량이 실험의 과정에서 초과되었다.

[0076]

Q4Dx4 일정(각각 그룹 2, 3, 및 4)으로의 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389의 정맥내 부여는 치료-연관 사망(treatment-related death) 없이 용인되었다. 치료는, 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여되었을 때 평균 체중 감소가 나타나지 않았던 반면, 각각, 0.6, 및 0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여되었을 때, 1%(0.2-0.3 g)의 최대 평균 체중 감소와 관련되었다(associated). 또한, 상기 실험에서는 Q4Dx4 일정으로 IV 부여한 E7389의 최대허용용량(maximum tolerated dose)(TD, 그룹 내 동물의 10% 이상의 사망 또는 20% 이상의 평균 체중 감소를 나타내지 않는 복용량으로 정의된)에 도달하지 않았다. 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389로의 IV 치료는 MX-1 유선 종양 이종식피의 성장 억제에서 매우 효과적이었다. 0.6 mg/kg/injection의 복용량으로 처리된 그룹 내의 열 마리로부터의 여섯 개의 종양은 완전히 감소하였고 다섯 마리의 동물은 연구 종료일에 무종양이었다. 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량으로 처리된 그룹 내의 중간 종양 성장 지연은, 각각 >33.8, 17.7, 및 >6.3일이었다. 34일차에서의 T/C 값은, 각각 0%, 13%, 및 51%였다. 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389로 처리된 종양의 성장은, 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간과 비교하였을 때 대조 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 차이가 있음이 발견되었다(그룹 1 대비 그룹 2: P<0.001, 그룹 1 대비 그룹 3: P<0.001, 그룹 1 대비 그룹 4: P=0.001). 실험 동안 E7389로 처리된 동물들의 평균 체중의 변화는 도 1에 도표로 제공되었다. E7389의 처리에 대한 SC-이식된 인간 MX-1 유선 종양 조각의 반응은 도 2에 도표로 제공되었다(평균 종양 질량).

[0077]

Q1Dx16 일정(각각 그룹 5 및 6)으로의 40 및 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스의 경구 부여는 치료-연관 사망 없이 용인되었다. 40 mg/kg/dose의 복용량으로의 치료는, 24일차의 관찰 결과 8%(1.8 g)의 최대 평균 체중 감소와 관련되었다. 20 mg/kg/dose의 복용량으로 처리된 그룹 내의 네 마리의 동물은 21일차에 사망하였다. 상기 죽음은 전날 밤 케이지가 침수된 결과이다(상기 동물들은 모든 종양 성장 계산으로부터 제외되었다). 20 mg/kg/dose의 복용량으로의 치료는, 20일차의 관찰 결과 2%(0.4 g)의 최대 평균 체중 감소와 관련되었다. 따라서, 상기 실험에서는 Q1Dx16 일정으로 PO 부여하였을 때의 에베롤리무스의 MTD에 도달하지 않았다. 두 그룹의 모든 동물들이 20일차부터 건조한 피부를 가지는 것이 발견되었다. 31일차에는 상기 피부가 정상으로 나타났다. 두 복용량으로의 에베롤리무스의 PO 처리는 MX-1 유선 종양 이종식피의 성장 억제에서 최소 효과적이었고, 각각, 6.1 및 4.0일의 중간 종양 성장 지연을 야기했다. 34일차에서의 T/C 값은, 각각 46%, 및 74%였다. 40 및 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스로 처리된 그룹 내의 종양의 성장은, 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간과 비교하였을 때 대조 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 차이가 있음이 발견되었다(그룹 1 대비 그룹 5: P<0.001, 그룹 1 대비 그룹 6: P=0.019). 실험 동안 에베롤리무스로 처리된 동물들의 평균 체중의 변화는 도 3에 도표로 제공되었다. 에베롤리무스의 처리에 대한 SC-이식된 인간 MX-1 유선 종양 조각의 반응은 도 4에 도표로 제공되었다(평균 종양 질량).

[0078]

Q4Dx4 일정으로의 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389의 IV에 더하여(plus) Q1Dx16 일정으로의 40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스의 PO 부여(각각 그룹 7, 8, 및 9)는 치료-연관 사망 없이 용인되었다. 0.6 mg/kg/injection의 복용량인 E7389에 더하여 40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스로 처리된 그룹 내 한 마리의 동물은 지나친 체중 감소로 24일차에 안락사시켰다(euthanized). 이는 치료-연관 안락사(treatment-related euthanasia)로 간주된다. 병용 치료는, 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389를 부여하였을 때, 각각 9%(2.1 g), 5%(1.2 g), 및 8%(1.8 g)의 최대 평균 체중 감소와 관련되었다. 따라서, 상기 실험에서는 Q1Dx16 일정으로 PO 부여한 에베롤리무스와 병용하여 Q4Dx4 일정으로 IV 부여하였을 때의 E7389의 MTD에 도달하지 않았다. 세 그룹의 모든 동물들이 20일차부터 건조한 피부를 가지는 것이 발견되었다. 상기 피부 건조함의 강도는 그룹 5(40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스 단독)에서 보여진 것보다 적은 것으로 나타났다. 27일차에는 상기 피부 병태가 개선되었다. 병용 치료는 복용량-의존적(dose-dependent) 항종양 활성을 입증하였고(exhibited), 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 그룹에서, 각각 >33.8, 30.0, 및 13.4일의 중간 종양 성장 지연을 야기했다. 0.6, 및 0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 그룹 내의 아홉 및 네 마리의 동물의 종양은, 각각, 연구 종료일에 무종양이었다. 34일차에서 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹 내의 T/C 값은, 각각 0%, 2%, 및 19%였다. 모든 세 병용 그룹 내의 종양의 성장은, 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간과 비교하였을 때 통계적으로 대조 그룹(모든 세 그룹에서 P<0.001) 내의 종양의 성장과 차이가 있었다.

[0079]

0.6 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(그룹 2 대비 그룹 7: P=0.285) 및 62일차에서의 개별 동물의 종양 질량(그룹

2 대비 그룹 7: P=0.567)과 비교하였을 때 E7389 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 차이가 없었다. 0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(그룹 3 대비 그룹 8: P=0.032)과 비교하였을 때 E7389 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 차이가 없었고, 52일차에서의 개별 동물의 종양 질량(그룹 3 대비 그룹 8: P=0.083)과 비교하였을 때 그 차이가 유의미함에 도달하지 못하였다. 각 화합물의 단독 부여에 의해 야기된 항종양 활성보다 추가적으로(additive) 비교한 상기 병용 치료의 항종양 활성이 더 컸다: 그룹 3(0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 = 17.7일, 그룹 5(40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 = 6.1일인 것과 비교하여, 그룹 8(0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389에 더하여 40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스)에서의 중간 종양 성장 지연 = 30.0일. 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(그룹 4 대비 그룹 9: P<0.001) 및 41일차에서의 개별 동물의 종양 질량(그룹 4 대비 그룹 9: P<0.001)과 비교하였을 때 E7389 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장과 통계적인 차이가 있었다. 각 화합물의 단독 부여에 의해 야기된 항종양 활성과 추가적으로(additive) 비교한 상기 병용 치료의 항종양 활성: 그룹 4(0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 >6.3일, 그룹 5(40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 = 6.1일인 것과 비교하여, 그룹 9(0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389에 더하여 40 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스)에서의 중간 종양 성장 지연 = 13.4일.

[0080]

Q4Dx4 일정으로의 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389의 IV에 더하여(plus) Q1Dx16 일정으로의 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스의 PO 부여(각각 그룹 10, 11, 및 12)는 치료-연관 사망 없이 용인되었다. 병용 치료는, 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389를 부여하였을 때, 각각 1%(0.3 g), 2%(0.4 g), 및 3%(0.8 g)의 최대 평균 체중 감소와 관련되었다. 세 그룹의 모든 동물들이 20일차부터 견조한 피부를 가지는 것이 발견되었다. 상기 피부 견조함의 강도는 그룹 6(20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스 단독)에서 보여진 것보다 적은 것으로 나타났다. 병용 치료는 복용량-의존적 항종양 활성을 입증하였고, 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 그룹에서, 각각 >33.8, 25.1, 및 12.9일의 중간 종양 성장 지연을 야기했다. 0.6, 및 0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 그룹 내의 여덟 및 한 마리의 동물의 종양은, 각각, 완전히 감소하였고 각 그룹의 한 마리씩의 동물은 연구 종료일에 무종양이었다. 34일차에서의 0.6, 0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹 내의 T/C 값은, 각각 0%, 3%, 및 23%였다. 모든 세 병용 그룹 내의 종양의 성장은, 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간과 비교하였을 때 통계적으로 대조 그룹(모든 세 그룹에서 P<0.001) 내의 종양의 성장과 차이가 있었다.

[0081]

0.6 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(그룹 2 대비 그룹 10: P=0.985) 및 62일차에서의 개별 동물의 종양 질량(그룹 2 대비 그룹 10: P=0.161)과 비교하였을 때 E7389 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 차이가 없었다. 0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(그룹 3 대비 그룹 11: P=0.05)과 비교하였을 때 E7389 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 차이가 있었던 반면에, 52일차에서의 개별 동물의 종양 질량(그룹 3 대비 그룹 11: P=0.180)과 비교하였을 때 그 차이가 유의미함에 도달하지 못하였다. 각 화합물의 단독 부여에 의해 야기된 항종양 활성보다 추가적으로(additive) 비교한 상기 병용 치료의 항종양 활성이 더 컸다: 그룹 3(0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 = 17.7일, 그룹 6(20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 = 4.0일인 것과 비교하여, 그룹 11(0.4 mg/kg/injection의 복용량인 E7389에 더하여 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스)에서의 중간 종양 성장 지연 = 25.1일. 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 병용 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(그룹 4 대비 그룹 12: P<0.001) 및 41일차에서의 개별 동물의 종양 질량(그룹 4 대비 그룹 9: P=0.029)과 비교하였을 때 E7389 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장과 통계적인 차이가 있었다. 각 화합물의 단독 부여에 의해 야기된 항종양 활성과 추가적으로(additive) 비교한 상기 병용 치료의 항종양 활성: 그룹 4(0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 >6.3일, 그룹 6(20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스 단독)에서의 중간 종양 성장 지연 = 4.0일인 것과 비교하여, 그룹 12(0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389에 더하여 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스)에서의 중간 종양 성장 지연 = 12.9일. 실험 동안 40 또는 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스와의 세 가지 병용으로 처리된 동물들의 평균 체중의 변화는, 각각, 도 5 및 도 6에 도표로 제공되었다. E7389의 처리에 대한 SC-이식된 인간 MX-1 유선 종양 조각의 반응은 도 2에 도표로 제공되었다. 두 가지 복용량인 에베롤리무스와 병용하여 0.6,

0.4, 및 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389의 처리에 대한 SC-이식된 인간 MX-1 유선 종양 조각의 반응은, 각각 도 7, 도 8, 및 도 9에 도표로 제공되었다(평균 종양 질량).

[0082] 결론

MX-1 인간 유선 종양 이종식피의 성장은 0.6, 0.4, 또는 0.2 mg/kg/injection의 복용량으로 Q4Dx4 일정의 IV로 부여되었을 때의 E7389의 처리에 민감했고, 전체 세 그룹 내의 종양의 성장을 통계적으로 유의미하게 억제하는 결과를 나타냈다. 0.6 mg/kg/injection의 복용량인 E7389의 부여는 여섯 개의 완전한(complete) 종양 감소 및 다섯 개의 무종양(tumor-free) 생존자를 야기했다. Q1Dx16 일정의 40 및 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스의 PO 부여는 최소(in minimal) 통계적으로 유의미하게 시험한 두 복용량 모두에서 종양의 성장을 억제하는 결과를 나타냈다. 상기 40 및 20 mg/kg/dose인 복용량의 에베롤리무스와 병용하여 0.6, 0.4, 또는 0.2 mg/kg/injection인 복용량의 E7389으로의 치료는 용인되었고 통계적으로 유의미하게 MX-1 유선 종양 이종식피의 성장을 억제하는 결과를 나타냈다.

40 또는 20 mg/kg/dose인 복용량의 에베롤리무스와 병용하여 0.6 mg/kg/injection인 복용량의 E7389가 부여된 두 병용 그룹 내의 종양의 성장은 개별 동물(individual)의 네 종양 질량(four tumor mass)이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간(times to reach four tumor mass doublings) 및 62일차에서의 개별 동물의 종양 무게에서 E7389 단독 기반(alone based) 처리된 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 다르지 않았다. 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간과 비교하였을 때 40 또는 20 mg/kg/dose인 복용량의 에베롤리무스와 병용하여 0.4 mg/kg/injection인 복용량의 E7389가 부여된 상기 그룹 내의 종양의 성장이 E7389 단독으로 처리된 그룹 내의 종양의 성장과 통계적으로 다른 반면에, 상기 52일차에서의 개별 동물의 종양 무게의 차이를 비교하였을 때 이는 유의성에 도달하지 못하였다. 상기 병용 치료의 항종양 활성을 추가적으로(additive) 비교한 각 화합물의 단독 부여에 의해 야기된 항종양 활성보다 더 컸다. 40 또는 20 mg/kg/dose의 복용량인 에베롤리무스와 병용하여 0.2 mg/kg/injection의 복용량인 E7389가 부여된 두 그룹에서의 종양의 성장은 개별 동물의 네 종양 질량이 두 배로 증가하는 데 걸리는 시간 및 41일차에서의 개별 동물의 종양 무게를 비교했을 때 E7389를 단독으로 처리한 그룹 내의 종양의 성장으로부터 통계적으로 차이가 있었다. 두 병용 치료의 항암 활성을 추가적으로 각 화합물 단독 기반 부여에 의해 야기된 항암 활성으로 중간 종양 성장 지연으로 비교되었다. 상기 병용 치료의 항종양 활성을 각 화합물의 단독 부여에 의해 야기된 항종양 활성과 추가적으로(additive) 비교하였다.

에베롤리무스의 부여는 동물 피부의 일시적인 건조함(temporary dryness)(이러한 피부의 건조함은 대조군 또는 E7389-처리 그룹으로부터 발견(note)된 바 없다)을 결과로 나타냈다. 모든 병용 그룹에서 피부 건조의 강도는 에베롤리무스 단독으로 처리된 그룹에서보다 적게 나타났다.

[0086] 실시예 2

[0087] 실험방법

[0088] 항증식 검증(Anti-Proliferation Assay)

아래 제시된 것과 같이 이행된 본 예에서 실험을 위한 높은 처리량의 스크린에 의한 방법을 제시하였다.

세포를 액체 질소(liquid nitrogen)에 보존된 상태로부터 해동하였다. 세포가 더블링 시기(times)로 예상될 때 한 번 커지고 분할되면, 스크리닝(screening)이 시작된다. 세포를 384-웰(well) 및 1536-웰 조직 배양 처리 플레이트(tissue culture treated plates)의 성장 배지(growth media)에 접종(seeded)하였다. 세포는 원심분리(centrifugation)를 통하여 검증 플레이트에서 평형을 유지(equilibrated)하였고 치료 전 24시간 동안 37°C에서 약물주입 모듈(dosing modules)을 부가(attached)하여 배양기(incubators)에 배치하였다. 치료 시간에, 검증 플레이트 세트(처리되지 않은 것)를 수집하고 추가된 ATPLite(Perkin Elmer)에 의하여 ATP 수치를 측정하였다. Envision Plate Readers의 고감도 발광(ultra-sensitive luminescence)을 이용하여 Tzero(T0) 플레이트를 판독(read)하였다. 처리된 검증 플레이트는 72시간 동안 화합물과 배양하였다. 72시간 후, 플레이트는 ATPLite를 이용한 종점 분석(endpoint analysis)을 위해 발달(developed)하였다. 모든 데이터 포인트는 자동화된 프로세스(automated processes), 품질(quality) 조절, 및 소프트웨어를 이용한 분석을 통해 수집되었다. 검증 플레이트는 만약 후술되는 품질 조절 표준(standards)을 통과한다면 허용된다: 전체 실험에 걸쳐 관련 루시퍼레이즈(luciferase) 값이 일관적(consistent)이고, Z-요인(Z-factor) 스코어가 0.6보다 크고, 및 미처리(untreated)/현탁액이 플레이트 위의 현상(behave)을 일관적으로 조절한다. 시너지 스코어의 계산은 아래에 기재(provide)된다.

[0091] 성장 억제(GI)를 세포 생존도(cell viability)의 측정에 이용하였다. 혼탁액에서의 세포 생존도는 약물주입(T0)

및 72시간 이후(T72) 시기에 측정되었다. 0%로 판독된 GI는 성장 억제가 없음을 나타내고, 즉, 화합물로 처리된 세포 및 T72 혼탁액 신호가 일치한다. GI 100%는 완전한 성장 억제를 나타내고, 즉, 화합물에 의해 처리된 세포 및 T0 혼탁액 신호가 일치한다. GI 100%인 웰 내에서의 처리 기간 동안에 세포의 수는 증가하지 않았고 상기 효과 수치의 정체기(plateau)에 도달하기 위하여 화합물의 세포분열억제(cytostatic) 효과를 제안(suggest)할 수 있다. GI 200%는 배양 웰 내의 모든 세포의 완전한 사멸을 나타낸다. GI 200%의 활성 정체기에 도달한 화합물은 세포독성이 있는 것으로 간주된다. GI는 후술되는 시험 및 방정식(equation)의 적용에 의하여 계산된다:

$$\text{If } T < V_0 : 100 * \left(1 - \frac{T-V_0}{V_0}\right)$$

$$\text{If } T \geq V_0 : 100 * \left(1 - \frac{T-V_0}{V-V_0}\right)$$

[0092]

[0093] T는 시험 샘플(test article)을 위한 신호 측정(signal measure), V는 혼탁액-처리 대조 측정, 및 V_0 은 영점시간(time zero)에서의 혼탁액 대조 측정. 본 공식은 미국 국립암연구소의 높은 처리량의 스크린(National Cancer Institute's NCI-60 high throughput screen)에서 이용되는 성장 억제 계산(Growth Inhibition calculation)으로부터 유도(derive)된다. 모든 단일 물질 및 병용 데이터 분석이 성장 억제에 대하여 수행되었다.

[0094]

시너지 스코어 분석

[0095]

로에베 상가성의 초과(excess)에서 병용 효과를 측정하기 위하여, 시너지 스코어라고 불리는(termed) 시너지 상호작용의 강도를 특징짓기(characterize) 위한 스칼라(scalar) 측정이 이용되었다. 시너지 스코어는 이와 같이 계산된다:

[0096]

$$\text{시너지 스코어} = \log f_x \log f_y \sum \max(0, I_{\text{data}} - I_{\text{Loewe}})$$

[0097]

매트릭스 내의 각 요소 물질 및 병용 포인트에 대한 단편적인(fractional) 억제는 모든 혼탁액-처리 대조 웰의 중위에 관하여 계산되었다. 시너지 스코어 방정식은 상가성을 위해 로에베 모델(Loewe model)을 이용하여 요소 성분의 활성으로부터 유도되어 모델 표면(model surface)을 계수적으로(numerically) 초과한 매트릭스 내의 각 포인트에서 실험적-관찰된 활성 볼륨을 통합시킨다(integrate). 시너지 스코어 방정식(상기)에서 추가적인 항목(Additional terms)은 개별 물질에 이용되는 다양한 회색 요인을 정상화(normalize)시키고 전체 실험을 획단하여 시너지 스코어의 비교를 가능하게 하기 위해 이용한다. 양성적인(positive) 억제의 제어(gating) 또는 I 데이터 승수(multiplier)의 포함(inclusion)은 노이즈(noise)를 효과 수치 영에 가깝게 제거하고, 및 높은 활성 수치에서 일어난 시너지 상호작용을 위한 결과를 편향시킨다(biases).

[0098]

효력(Potency) 변화(shifting)는 아이소볼로그램(isobogram)을 이용하여 평가하였고, 이는 그 효과에 도달하기 위해 필요한 단일 물질 복용량과 비교할 때 희망하는(desired) 효과 수치를 성취하기 위한 병용에서 얼마나 적은 억제가 요구되는지 실증(demonstrates)하였다. 아이소볼로그램은 표시된 억제 수치를 획단(crossing)하기 위해 부합하는(correspond) 농도의 궤적(locus) 감별(identify)에 의해 그려진다. 이는 다른 단일 물질들의 상기 농도를 획단하는 복용량 매트릭스에서 각 단일 물질 농도를 위한 획단 포인트를 발견함에 의해 완료된다. 사실상, 반응 표면 Z(CX, CY)에서 선택된 효과 수치를 주는 수직 복용량과의 병용에서 수평 농도 CX의 확인에 이분법(bisection algorithm)이 이용되는 반면 각 수직 농도 CY는 특정되어 고정(held fixed)된다. 이 때 상기 농도는 아이소볼로그램 그림을 발생시키기 위해 선형보간법(linear interpolation)에 의해 연결된다. 시너지 상호작용에 있어서, 아이소볼로그램 윤곽(contour)이 상기 상가성 역치의 아래로 내려가고 시발점(origin)을 성취하며, 및 길항적인(antagonistic) 상호작용이 상가성 역치의 위에 있을 수 있다. 상기 에러 바(error bars)는 아이소볼로그램을 발생시키기 위해 이용되는 개별 데이터 포인트로부터 발생하는(arising) 불확실성(uncertainty)을 나타낸다. 각 획단 포인트의 불확실성은 효과 스케일(scale)에서 $Z - \sigma Z(CX, CY)$ 및 $Z + \sigma Z(CX, CY)$ 가 I_{cut} 을 획단하는 지점, σZ 가 잔차 오차(residual error)의 표준편차인 지점의 농도를 찾기 위한 이분법에 이용되는 응답 오류(response errors)로부터 추정(estimate)된다.

[0099]

로에베 볼륨 스코어 분석

[0100]

로에베 볼륨은 로에베 상가성 모델을 초과한 병용 상호작용의 종합적인(overall) 규모(magnitude)를 감정(assess)하기 위해 이용된다. 로에베 볼륨은 표현형(phenotypic) 활성(양성적인 로에베 볼륨)에서의 시너지 증가 대비 시너지 길항작용(음성적인(negative) 로에베 볼륨)의 구별(distinguishing)에 특히(particularly) 유용하다. 길항작용이 관찰되면, 로에베 볼륨은 길항작용 및 특정 억제 표적-활성 또는 세포의 유전형 사이에 어

면 연관성(correlation)이 있는지 조사하기 위해 접근해야 한다. 상기 모델은 스스로 교차된 어느 하나의 약제로부터 병용 복용량 매트릭스 표면을 구별하기 어려운(indistinguishable) 지점에서 상가성을 무-시너지 병용 상호작용으로 정의한다.

[0101] 상기 상가성의 계산은:

[0102] $(X/X_I) + (Y/Y_I) = 1$ 를 만족하는 [Loewe]이고,

[0103] 상기 X_I 및 Y_I 는 관찰되는 병용 효과 I을 위한 단일 물질 효과적 농도이다. 예를 들어, 만약 50% 억제가 약제 A의 $1 \mu M$ 또는 약제 B의 $1 \mu M$ 에 의해 별도로 성취되었다면, A의 $0.5 \mu M$ 및 B의 $0.5 \mu M$ 의 병용 또한 50%만큼 억제해야 한다.

[0104] 로에베 상가성을 초과하여 관찰된 활성은 잠재적인(potential) 시너지 상호작용을 감별한다. 이 분석을 위하여, 경험적으로(empirically) 유도된 병용 매트릭스는 실험적으로 수집된 단일 물질 복용량 반응 곡선으로부터 구축된 그들의 각 로에베 상가성 모델들과 비교된다. 상기 복용량 반응 매트릭스로부터 상가성 모델을 뺀(subtraction) 이후 관찰되는 모든 활성은 시너지를 표시한다(도 10). 음성적인 로에베 볼륨은 길항작용을 표시한다. 복용량 반응 매트릭스를 횡단하는 상기 초과 상가성 총체는 로에베 볼륨을 나타낸다.

단일 물질 복용량 반응 분석

[0105] 에리볼린은 25개 세포주 패널(panel)을 횡단하는 다양한 활성을 가진다. 단일 물질 활성에는 3배수, 십-포인트 평균 복용량 적정을 이용하여 접근하였다. 23개 세포주가 1536-웰 플레이트 포맷(format)에서 평가되었다. 두 개의 추가적인 세포주는 384-웰 플레이트 포맷에서 평가되었다. 세포주에 있어서 GI50이 50 퍼센트보다 큰 억제 수치에 도달하는 지점에서, 중위 GI50은 $0.51 nM$ 이다(도 11).

병용 스크린의 설계(Design)

[0106] 병용 분석 데이터는 6×6 복용량 매트릭스 내에 수집되었다(도 12). 5개 세포주가 384-웰 플레이트 포맷 내에 보여진(screened) 반면, 20개 세포주는 1536-웰 플레이트 포맷 내에 보여졌다. 35개 인핸서 화합물은, BKM-120을 포함하고, 25개 세포주 패널을 횡단하는 인핸서 분자 에리볼린과 결합(combine)되었다. 게다가, 12개 화합물은 각 세포주를 위한 자가교차(selfcross) 분석 내에서 결합되었다. 인핸서를 위한 시작 농도(starting concentration)는 에리볼린의 EC90 중심으로 하였다.

자가-교차-기반 병용 스크린 분석

[0107] 병용 스크린 분석을 위한 히트 기준(criteria)을 객관적으로(objectively) 설정(establish)하기 위하여, 시너지 반응 없이, 상가적 기선(baseline additive)을 경험적으로 결정한 평균으로 25개 세포주 패널을 횡단하여 자가 교차(self-crossed)되기 위한 12개 화합물을 선택하였다. 12개 자가교차 화합물의 특성은 최대 반응값 및 단일 물질 복용량 반응 기울기(steepleness)가 다양한 화합물의 선택에 의하여 결정되었다. 통계적으로 상가적 기선 값으로 대체된(superseded) 효과 수치를 산출(yielded)하는 상기 약제 병용은 시너지가 있는 것으로 간주되었다.

[0108] 시너지 스코어 측정은 자가교차 분석에 이용되었다. 자가교차의 시너지 스코어는 정의에 의해 상가적일 것으로 예측되었고 및, 그러므로, 시너지 스코어를 영으로 유지하였다. 그러나, 어떤 자가교차 시너지 스코어가 영에 가까운 반면, 다수는 실험적 노이즈 또는 최적이 아닌 단일 물질 복용량 반응의 곡선 부분(fitting)을 크게 제안하고 및 스코어 내의 경미한(slight) 동요(perturbations)에 기여(contributing)하였다. 25개 세포주 패널에 덧씌운(Overlay) 자가교차 데이터는 1.55로 국제적인(global) 평균 시너지 스코어를 실증한다. 국제적인 중위값(median)은 상기 1.15의 자가교차 시너지 스코어를 산출한 세포주 패널을 횡단하고, 외진(outlying) 값에 의한 최소의 영향을 제안한다. 에리볼린 병용 활성에 민감한 세포주 내에서 잠재적인 차이가 주어짐에 있어서, 개별 세포주 내에서 자가교차 행태(behavior) 대비 세포주 패널 활성의 국제적인 심의(review)에 포커스를 둔, 자가교차 기반의 병용 스크린 분석을 위하여 우리는 세포주 중심 전략(centric strategy)을 이용하는 것을 선택하였다. 95% 및 99% 신뢰수준(confidence levels)에서 평균 자가교차에 더하여 두 표준편차(2σ 's) 또는 세 표준편차(3σ 's)보다 시너지 스코어가 더 큰 지점의 병용은, 각각 후보(candidate) 시너지로 간주된다.

[0109] 2σ 's 및 3σ 's에서 세포주 특이적인 평균 자가교차 역치를 초과한 시너지 스코어가 결정되었다. 또한 평균 이상의 2σ 's 및 3σ 's에서 로에베 볼륨 컷오프(cutoffs)는 세포주 기반(cell line basis)마다 계산되었다. 통계적인 자가교차 컷오프에 기초를 두고(based upon), 개연성 있는(probable) 시너지의 세포주 패널 횡단을 보여주는 약제 병용을 위한 데이터는 필터링되었다(filtered). 평균 위의 2σ 's 및 3σ 's에서 로에베 볼륨 및 시너

지 스코어를 각각의 자가교차 컷오프와 비교하는 병용 데이터는 세포주 기반마다 분석되었다. 어떤 로에베 볼륨 또는 시너지 스코어라도 히트로 간주되는 자가교차 컷오프보다 더 크거나 같다.

[0113] 에베롤리무스

포스파티딜이노시톨 3-인산화효소(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 신호 경로(signaling pathway)는 세포의 증식에서의 주요 요인(primary driver)이고 많은 인간 암에서의 특질(hallmark)이다. PI3K 경로의 조절장애(Dysregulation)는 구조 활성화(constitutive activation)의 영향(virtue), 궁극적으로, 세포 증식 및 전-세포사멸(pro-apoptotic) 신호 억제(suppression)의 자극에 의해 변형적일(transformative) 수 있다. 에베롤리무스는 IC₅₀이 1.6-2.4 nM인 알로스테릭(allosteric)한 mTOR(TORC1) 억제제이다. 보여지는 것과 같이 시너지 스코어 히트 맵을 이용하여(도 13), 병용 활성의 양질의 폭(good breadth)이 에베롤리무스에 대한 세포주 패널을 횡단하는 것이 관찰되었다. 도 14는 에베롤리무스에 대한 시너지 스코어 값 및 로에베 볼륨 스코어를 제공한다.

[0115] 다른 구현예

본 발명이 이의 특정 구현예와 연관되어 기술되어 있지만, 추가적인 변경이 가능하고 본 명세서는 모든 변이(variation), 용도, 또는, 일반적으로 본 명세서 상에 기재된 필수적 특징들에 관계되고, 적용될 수 있는 선행 기술 내에서 알려진 내용 또는 관행 내에서 도출되는 본 공개 내용들로부터 출발되는 것들을 포함하는 후속 발명(invention following)들의 적용을 포함하기 위해 의도된 것으로 이해되어야 할 것이다.

[0117] 각각의 독립적인 공개문헌 또는 특히 출원이, 그들 전체가 참조로서 통합되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시되는 것과 같은 정도로서 본 명세서 상에 언급된 모든 공개문헌 및 특히 출원들은 본 명세서 상에 참조로서 통합된다.

[0118] 이 문서에서 단수형(singular forms)을 이용함에 있어서, 예를 들어 "a" 및 "the"는, 문맥상 반대로 표시되지 않는 한 상응하는 복수형(plural form)을 제외하여 표시하지 않는다. 유사하게, 복수형의 이용은 문맥상 반대로 표시되지 않는 한 단수형을 제외하여 표시하지 않는다.

[0119] 본 발명은 또한 다음의 번호가 붙은 단락에서 덧붙여(further) 제시된다.

[0120] 1. 암에 걸렸거나 또는 암 발생의 위험을 가지는 대상(subject)의 치료를 위한 방법에 있어서, 상기 대상에 대하여 (i) 에리불린(eribulin) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) 포유류 라파마이신(rapamycin)의 표적단백질(mTOR)에 대한 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물(hydrate), 용매화물(solvate) 또는 비결정성 고체(amorphous solid)를 부여하는 단계를 포함하는 방법.

[0121] 2. 단락 1의 방법에 있어서, 상기 대상은 인간 환자이다.

[0122] 3. 단락 1 또는 2의 방법에 있어서, 상기 대상은 암으로 진단되거나, 암으로 치료중이거나, 또는 암으로 발견되어 치료 후(post-therapy)이다.

[0123] 4. 단락 1 내지 3 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 암은 원발성 종양(primitive tumor)이다.

[0124] 5. 단락 1 내지 3 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 암은 전이성(metastasis)이다.

[0125] 6. 단락 1 내지 5 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 암은 고형 종양(solid tumor)이다.

[0126] 7. 단락 1 내지 6 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 암은 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 원시 신경외배엽성 종양(primitive neuroectodermal tumors), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 식도암(esophageal cancer), 및 육종(sarcoma)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0127] 8. 단락 7의 방법에 있어서, 상기 암은 유방암 및 폐암으로부터 선택된다.

[0128] 9. 단락 1 내지 8 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 에리불린의 약학적으로 허용 가능한 염은 에리불린 메실산(mesylate)이다.

[0129] 10. 단락 1 내지 9 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 정맥내 주입(intravenous infusion)을 통해 부여된다.

[0130] 11. 단락 10의 방법에 있어서, 상기 정맥내 주입은 1 내지 20분 동안 수행된다.

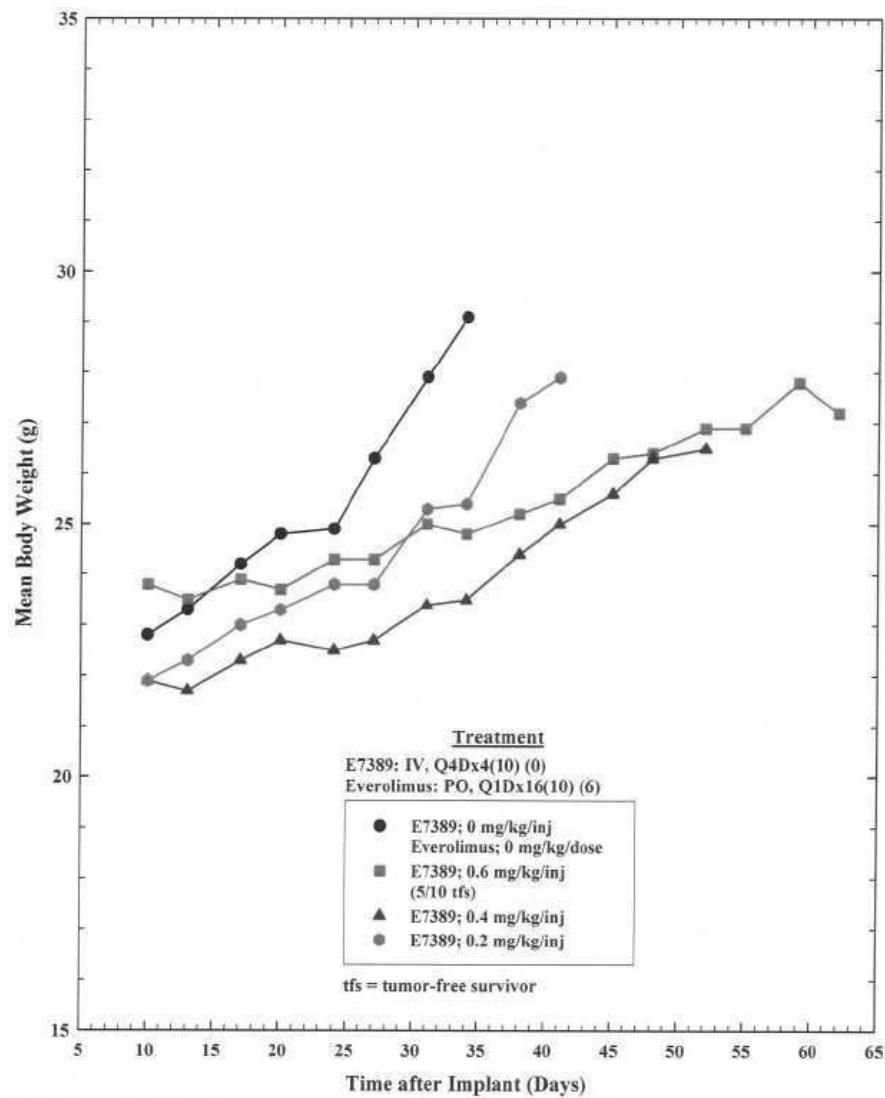
[0131] 12. 단락 11의 방법에 있어서, 상기 정맥내 주입은 2 내지 5분 동안 수행된다.

- [0132] 13. 단락 1 내지 12 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 $0.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $20 \text{ mg}/\text{m}^2$ 범위의 양으로 부여된다.
- [0133] 14. 단락 13의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 $1.1 \text{ mg}/\text{m}^2$ 내지 $1.4 \text{ mg}/\text{m}^2$ 범위의 양으로 부여된다.
- [0134] 15. 단락 1 내지 14 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 21-일 주기의 1 및 8일에, 또는 28-일 주기의 1 및 15일에 각 1회 부여된다.
- [0135] 16. 단락 1 내지 15 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스(everolimus), 리다포롤리무스(ridaforolimus), 및 템시롤리무스(temsirolimus), 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0136] 17. 단락 1 내지 16 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체이다.
- [0137] 18. 단락 17의 방법에 있어서, 상기 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 경구투여(orally)를 통해 부여된다.
- [0138] 19. 단락 18의 방법에 있어서, 상기 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 0.1 mg 내지 30 mg 범위의 양으로 부여된다.
- [0139] 20. 단락 19의 방법에 있어서, 상기 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 10 mg 의 양으로 부여된다.
- [0140] 21. 단락 1 내지 20 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 21-일 주기 또는 28-일 주기 동안 하루 1회 부여된다.
- [0141] 22. 단락 1 내지 21 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 대체로 동시에 또는 연속적으로 부여된다.
- [0142] 23. 단락 22의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체보다 먼저 부여된다.
- [0143] 24. 단락 1 내지 23 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 mTOR 억제제, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는, 단독 항암제(anti-cancer agents)로 부여된다.
- [0144] 25. 단락 24의 방법에 있어서, 상기 에리불린의 약학적으로 허용 가능한 염은 에리불린 메실산(mesylate)이고 및/또는 상기 mTOR 억제제의 약학적으로 허용 가능한 염은 에베롤리무스이다.
- [0145] 26. 단락 1 내지 25 중 어느 하나의 방법에 있어서, 상기 치료는: (i) 암세포의 수를 감소시키고; (ii) 암세포의 부피를 감소시키며; (iii) 종양의 퇴행 비율(regression rate)을 증가시키고; (iv) 암세포의 주변 장기로의 침투(infiltration)를 감소시키거나 둔화시키며; (v) 종양의 전이를 감소시키거나 둔화시키고; (vi) 종양의 성장을 감소시키거나 억제하며; (vii) 암의 발생 및/또는 재발을 막거나 연기시키고 및/또는 무질병 또는 무종양(disease- or tumor-free) 생존 시간을 확장하고; (viii) 종합적으로 생존 시간을 증가시키며; (ix) 치료의 빈도를 감소시키고; 및/또는 (x) 암과 결부된 하나 또는 그 이상의 증상들을 완화시킨다.
- [0146] 27. 대상 내 종양의 크기를 감소시키는 방법에 있어서, 상기 방법은 (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체를 상기 대상에 부여하는 것을 포함한다.
- [0147] 28. 단락 27의 방법에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체이다.
- [0148] 29. 암의 치료 또는 종양 크기의 감소에 이용하기 위한 키트에 있어서, 상기 키트는 (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 (ii) mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체를 포함한다.

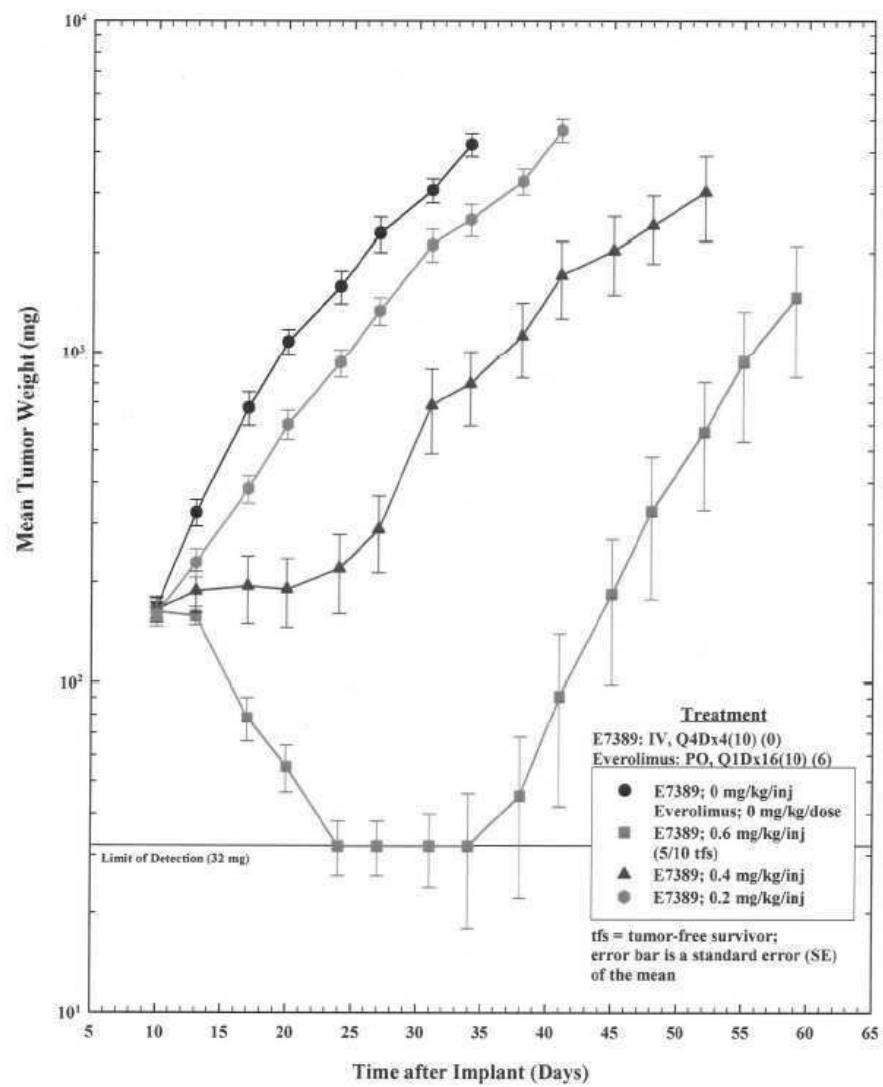
- [0149] 30. 단락 28의 키트에 있어서, 상기 mTOR 억제제는 에베롤리무스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체이다.
- [0150] 31. 단락 29 또는 30의 키트에 있어서, 상기 (i) 에리불린 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 상기 (ii) mTOR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물, 또는 비결정성 고체는 제형화(in dosage form)된다.

도면

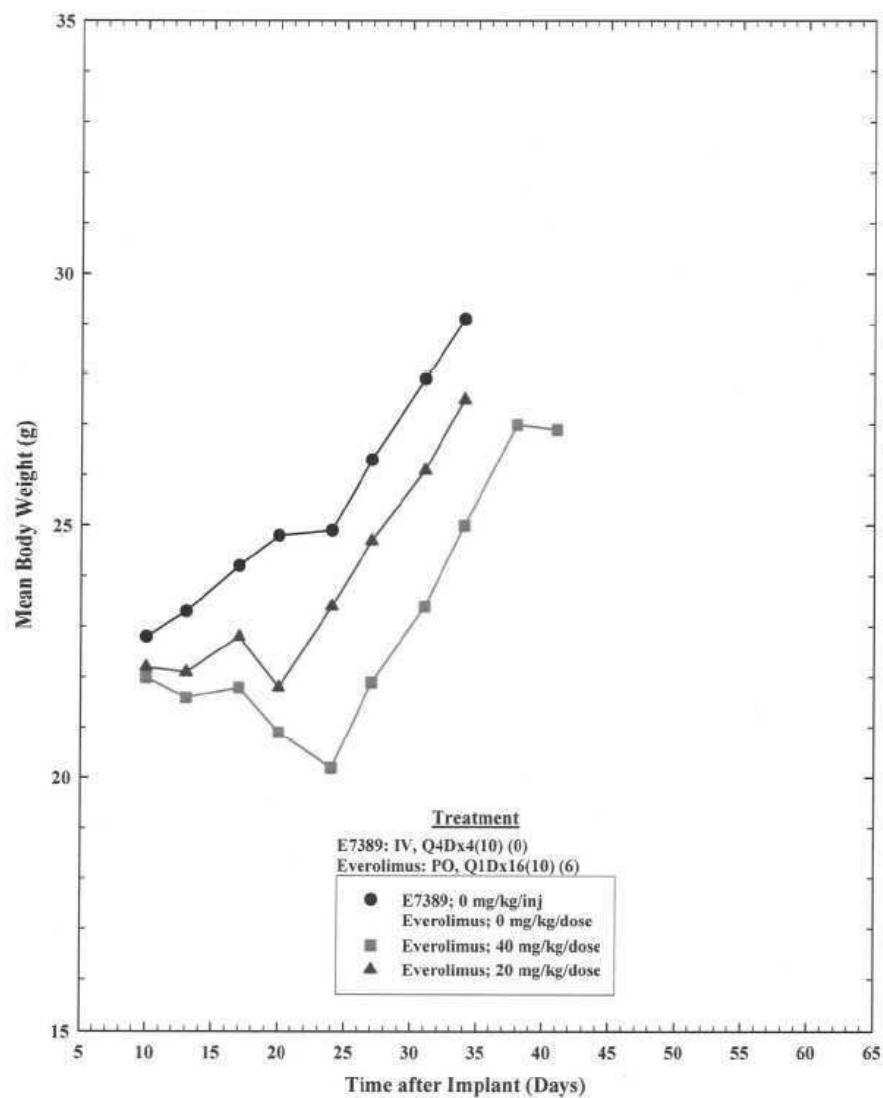
도면1



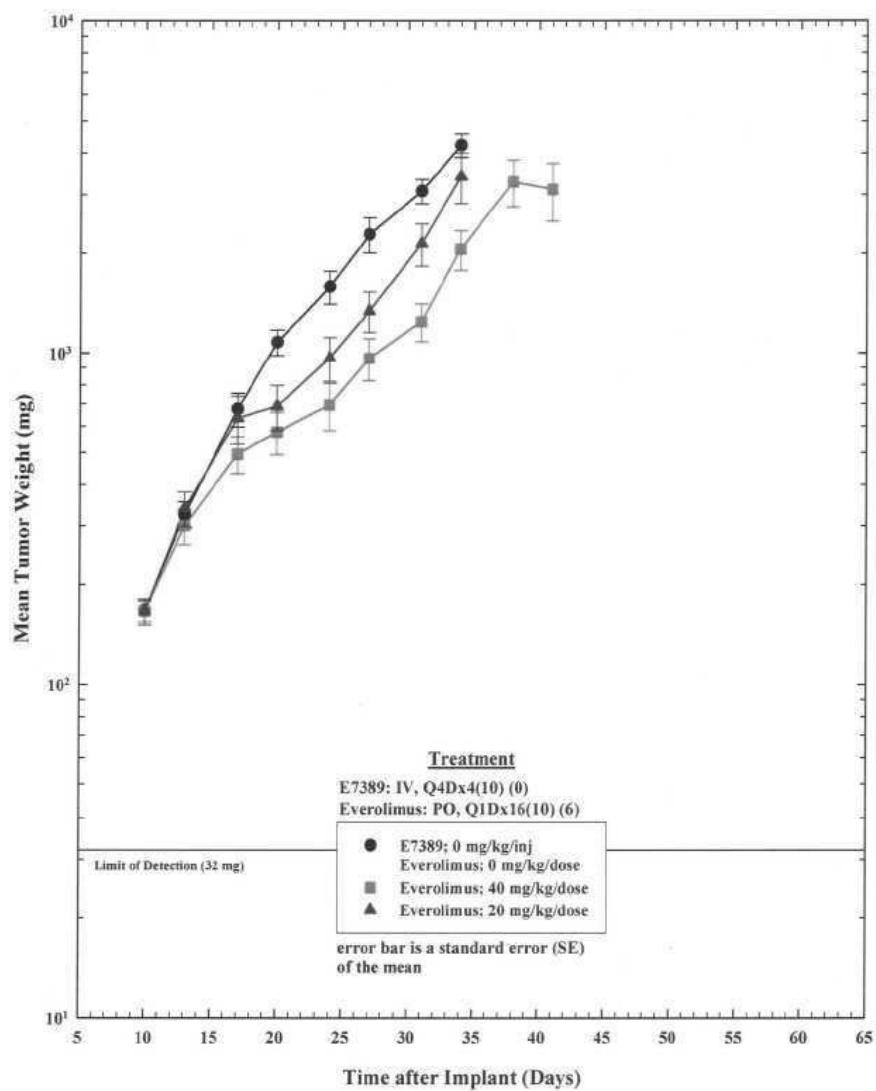
도면2



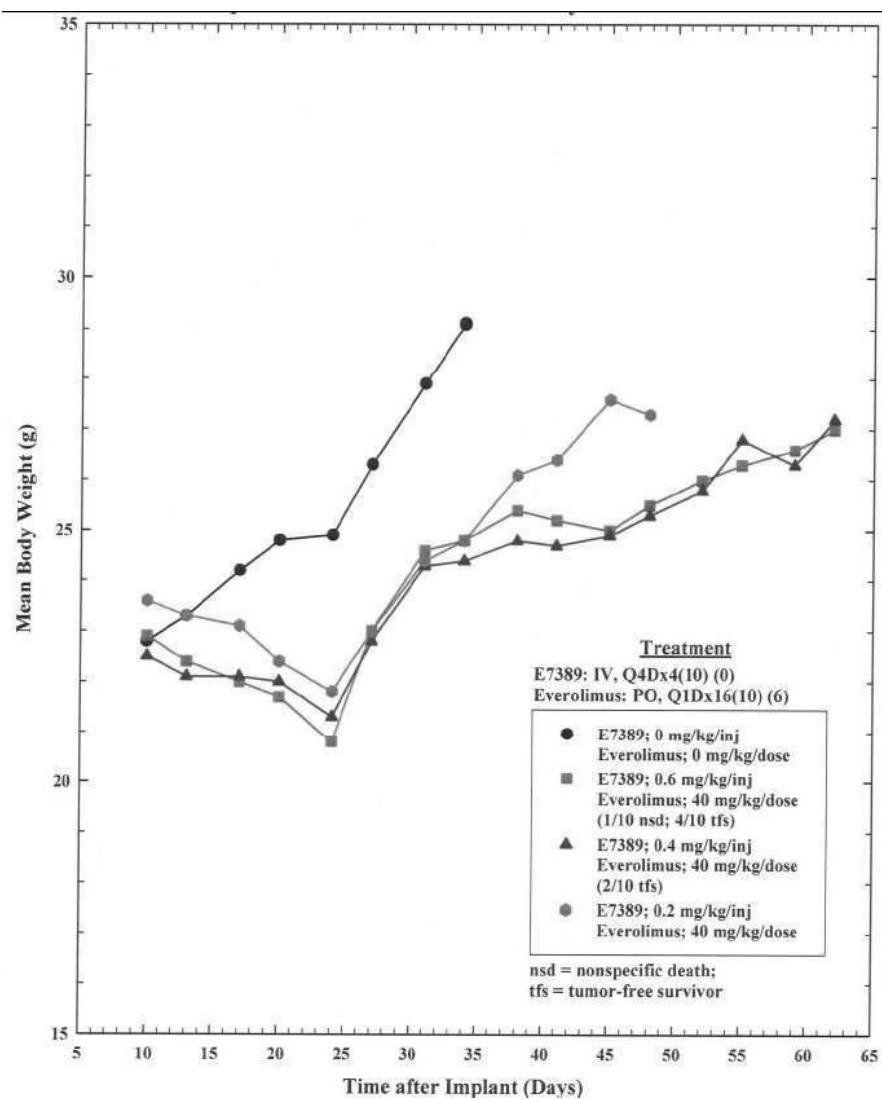
도면3



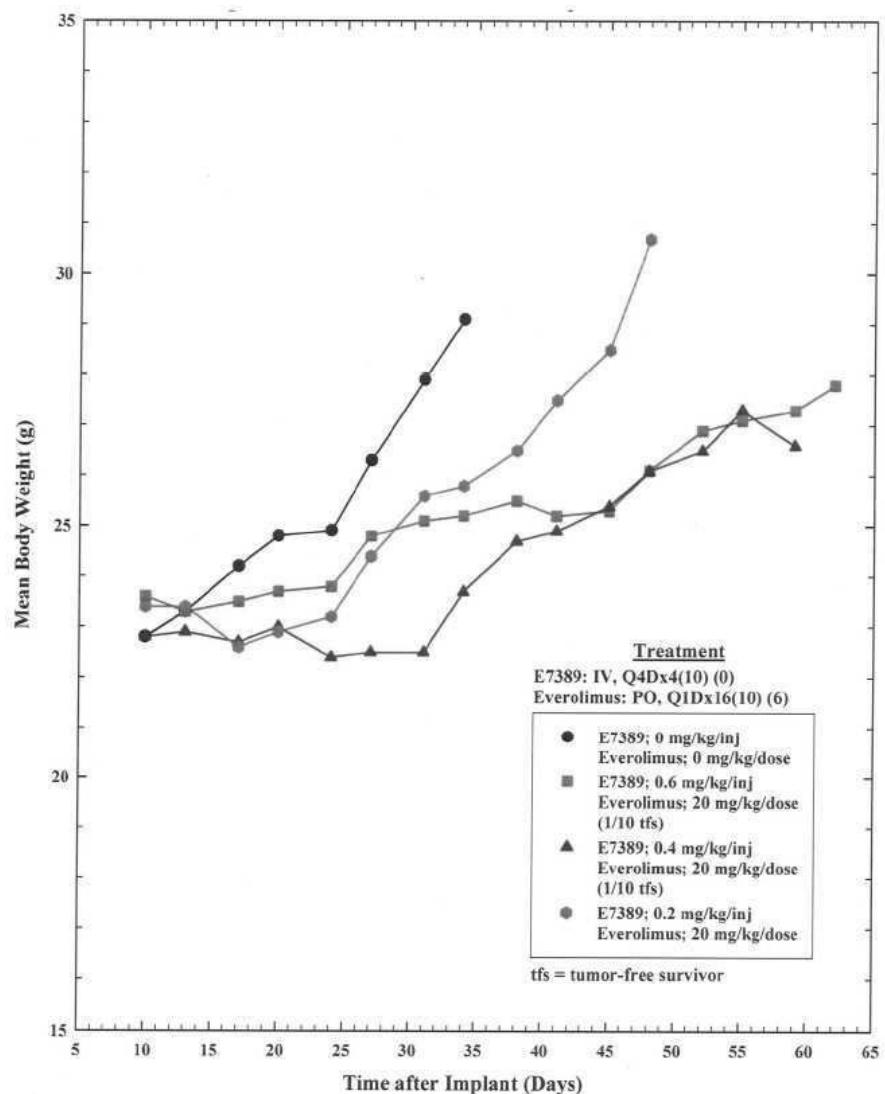
도면4



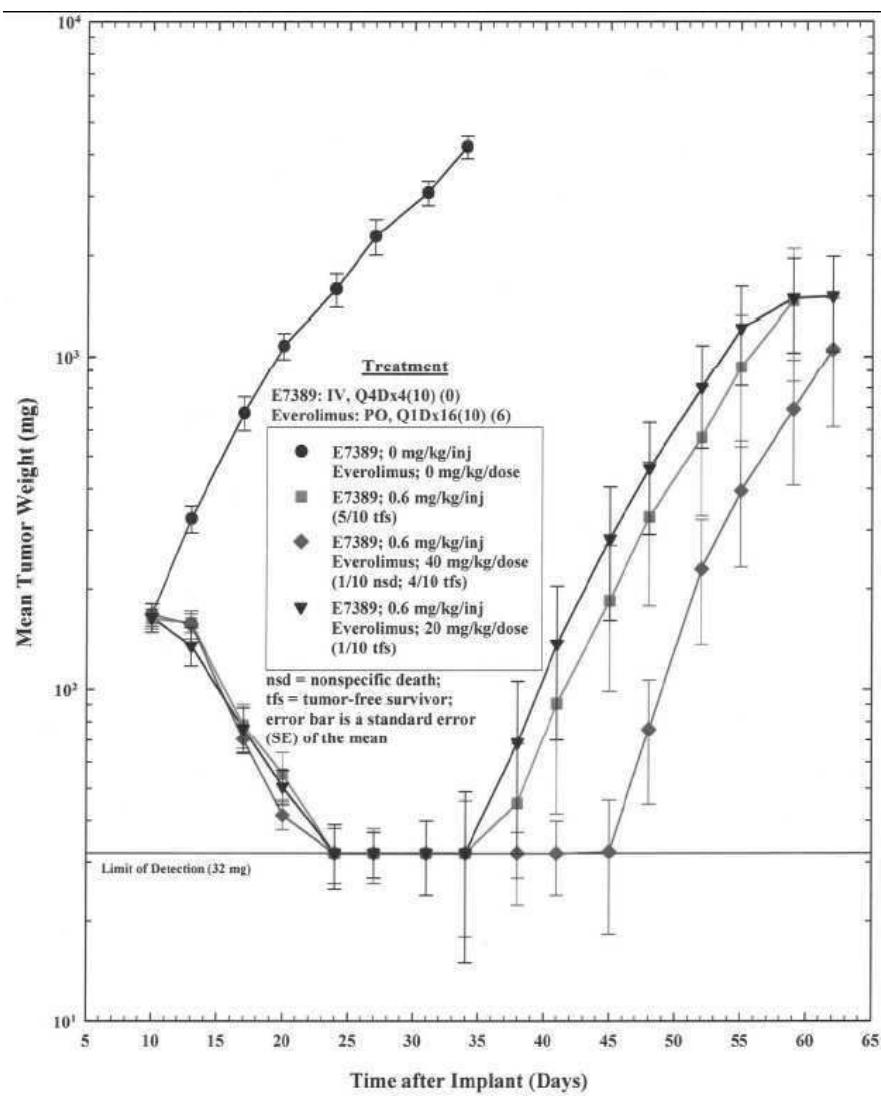
도면5



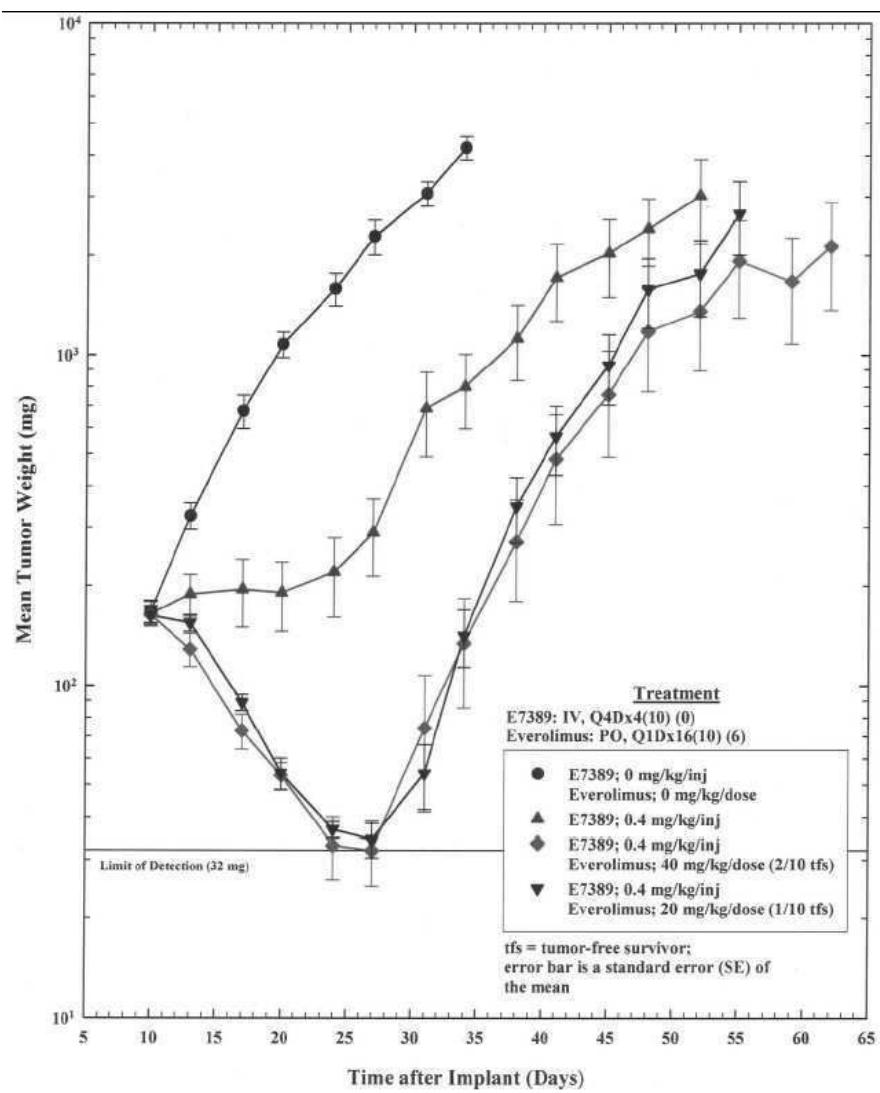
도면6



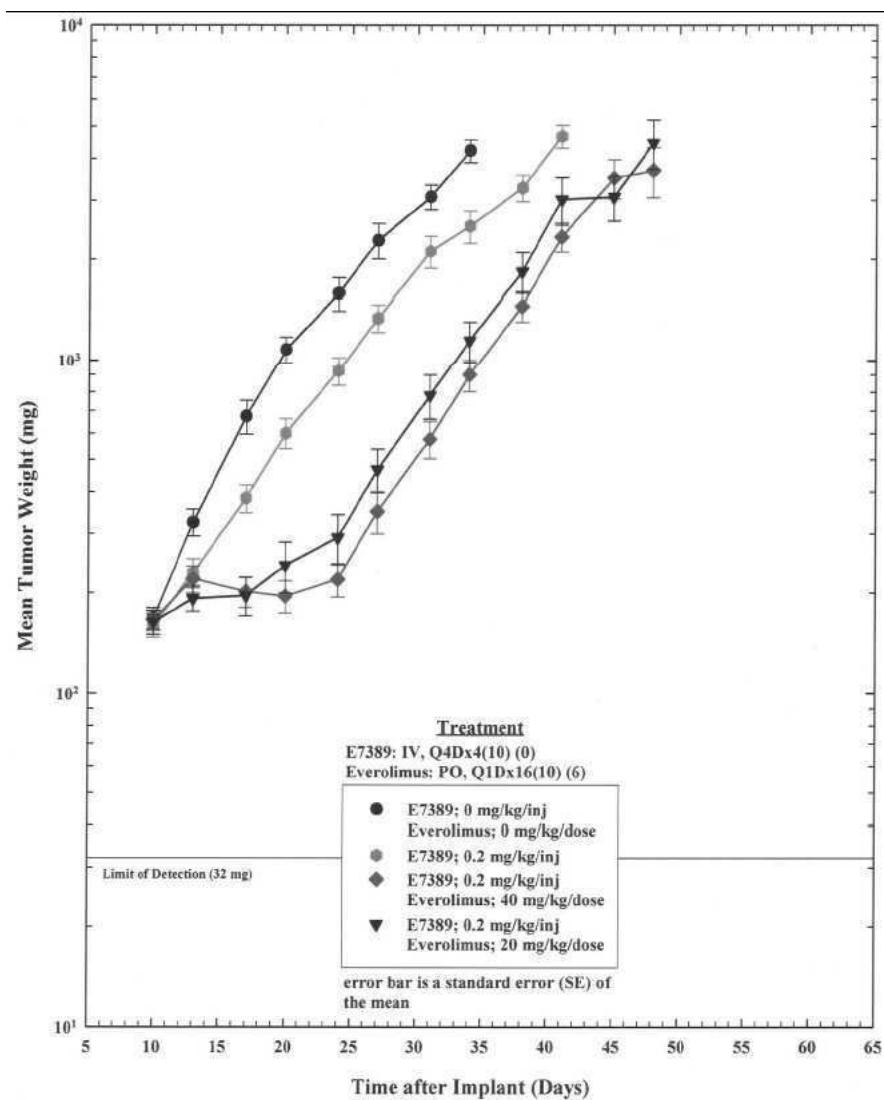
도면7



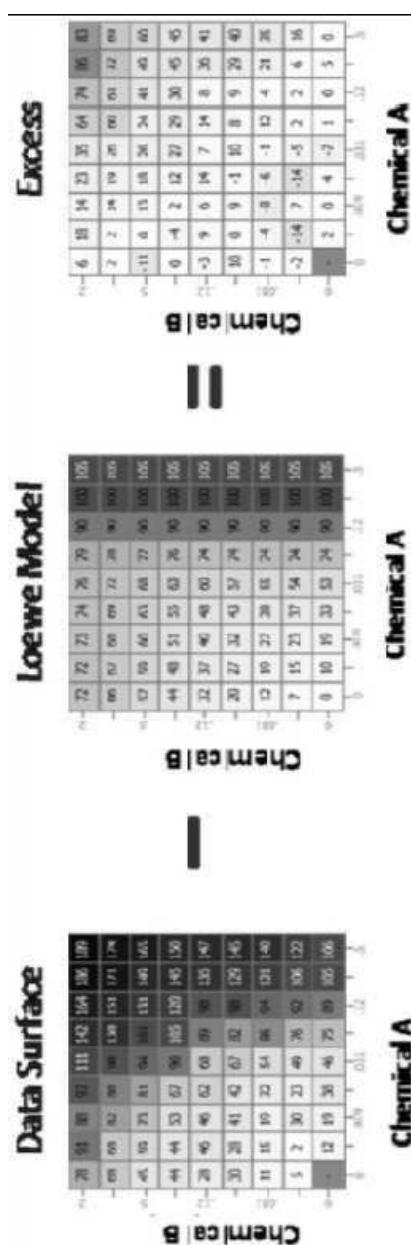
도면8



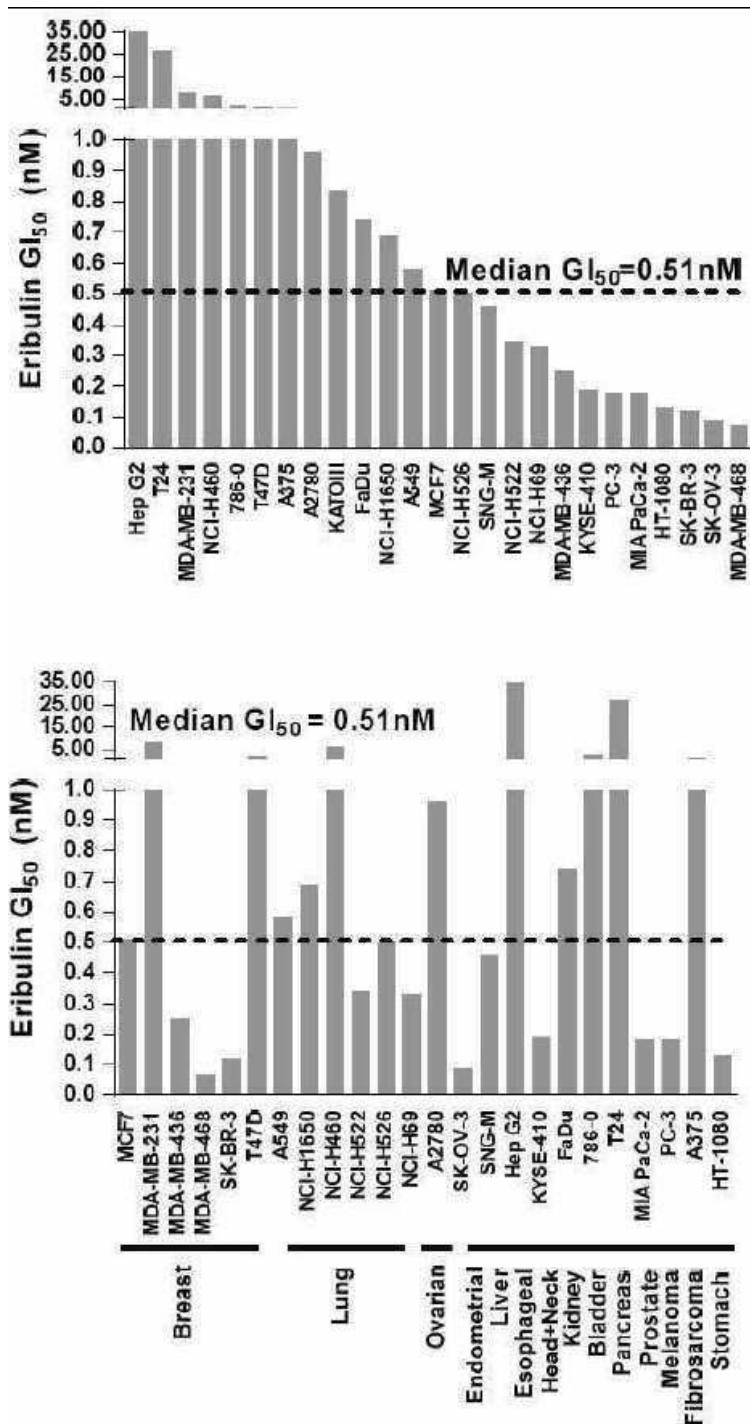
도면9



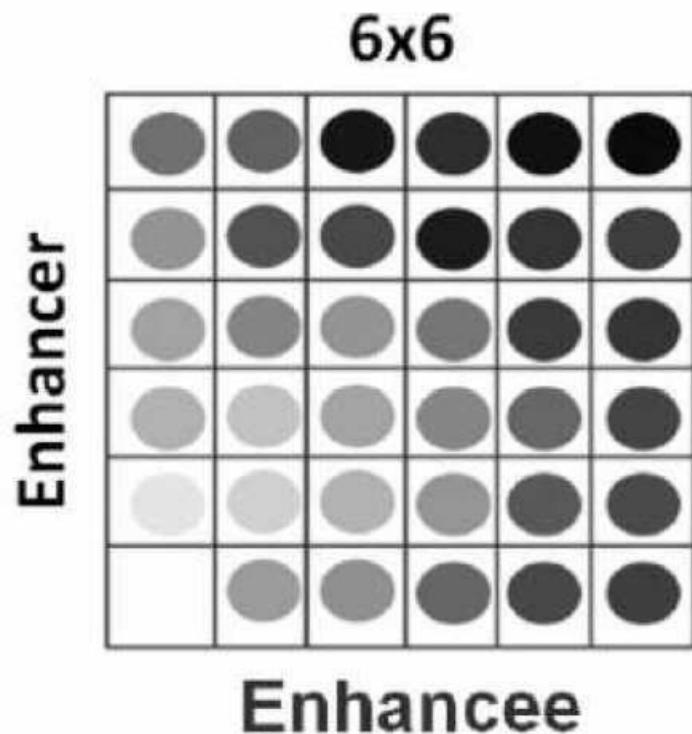
도면10



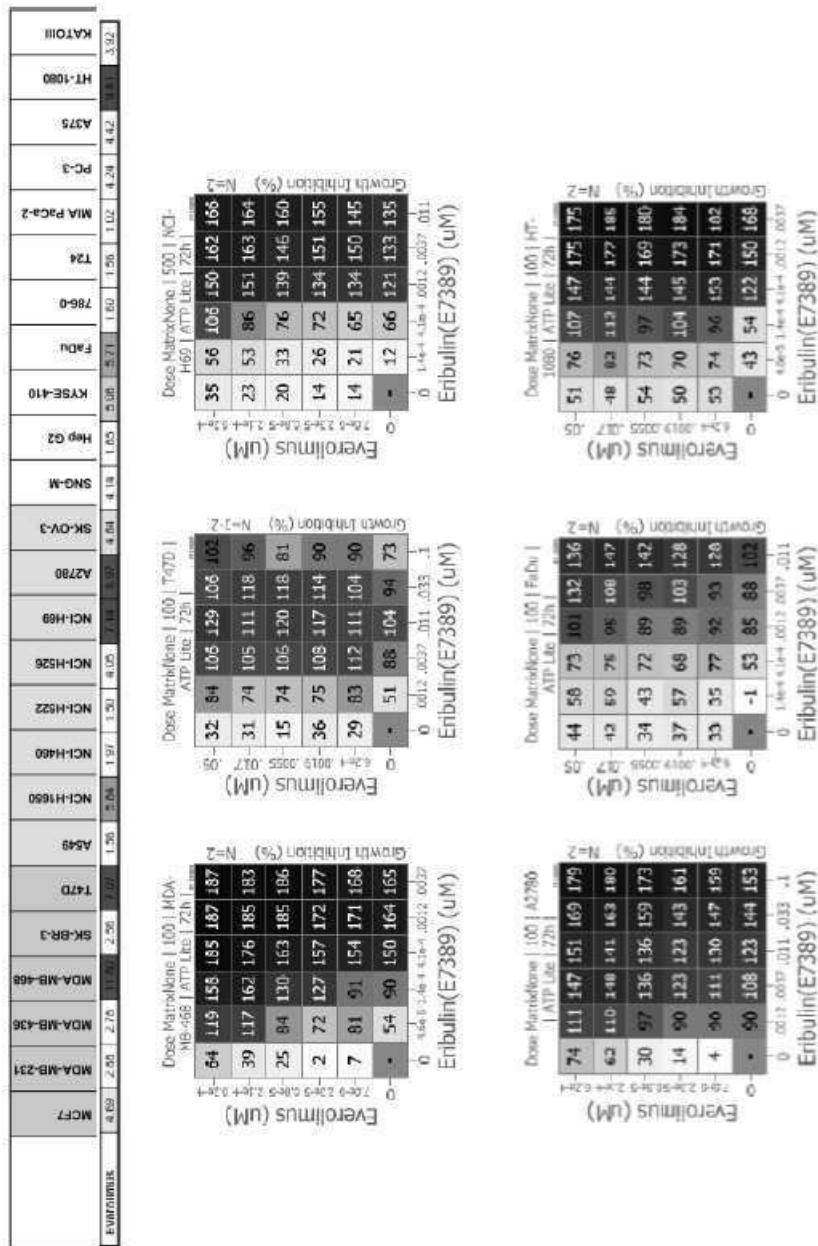
도면11



도면12



도면13



도면14

Synergy Score Values

	MCF7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	MDA-MB-453	MDA-MB-221	MDA-MB-466	SGC-GPR-3	T47D	A549	NCI-H460	NCI-H522	NCI-H562	NCI-H585	NCI-H589	AZ290	SGC-V3	KYSE-410	F980	T24	PC-3	HT-1080	KATOIII				
camptothecin	2.33	2.70	14.81	1.55	7.07	1.35	5.84	1.37	5.05	1.50	4.37	7.14	6.37	4.34	4.14	7.35	5.03	5.71	1.60	1.55	1.02	4.74	4.42	3.81	3.93	
etoposide	2.11	2.32	2.45	6.88	2.32	2.45	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03
paclitaxel	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11
vinorelbine	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33

Loewe Volume Scores

	MCF7	MDA-MB-221	MDA-MB-468	MDA-MB-453	MDA-MB-231	MDA-MB-466	SGC-GPR-3	T47D	A549	NCI-H460	NCI-H522	NCI-H562	NCI-H585	NCI-H589	AZ290	SGC-V3	KYSE-410	F980	T24	PC-3	HT-1080	KATOIII				
camptothecin	2.33	2.70	14.81	1.55	7.07	1.35	5.84	1.37	5.05	1.50	4.37	7.14	6.37	4.34	4.14	7.35	5.03	5.71	1.60	1.55	1.02	4.74	4.42	3.81	3.93	
etoposide	2.11	2.32	2.45	6.88	2.32	2.45	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	1.63	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03
paclitaxel	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11	2.11
vinorelbine	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33	2.33