



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0096065
(43) 공개일자 2017년08월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4995 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01) A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 31/4375 (2006.01) A61K 31/513 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/69 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01) A61K 38/15 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4995 (2013.01)
A61K 31/337 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7022535(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년11월11일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2016-7019709
원출원일자(국제) 2011년11월11일
심사청구일자 2016년11월10일
(85) 번역문제출일자 2017년08월11일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/069976
(87) 국제공개번호 WO 2012/062920
국제공개일자 2012년05월18일
(30) 우선권주장
10382300.1 2010년11월12일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
파르마 마르 에스.에이.
스페인 이-28770 마드리드 콜메나르 비에호 애브다. 드 로스 리에스 1 폴리고노 인터스트리얼 라 미나
(72) 발명자
모네오 오카나, 빅토리아
스페인, 이-28770 콜메나르 비에호-마드리드, 폴리고노 인터스트리얼 라 미나-노르페, 1, 에브다. 드 로스 리에스, 파르마 마르, 에스.에이.
산타마리아 누네즈, 게마
스페인, 이-28770 콜메나르 비에호-마드리드, 폴리고노 인터스트리얼 라 미나-노르페, 1, 에브다. 드 로스 리에스, 파르마 마르, 에스.에이.
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인주원

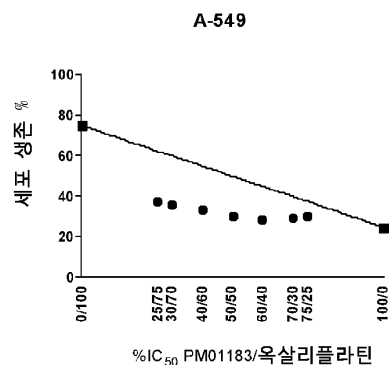
전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 발명의 명칭 **항종양 알칼로이드를 이용한 병용요법**

(57) 요약

본 발명은 PM01183과 몇몇 항암 약물, 특히 항종양 백금 배위 착화합물, 항대사물질, 유사분열 억제제, 항암 항생제, 토포아이스로머라아제 I 및/또는 II 억제제, 프로테아좀 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 비고전적 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안티고니스트, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 및 아플리딘, ET-743, PM02734, 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 항암 약물과의 조합 및 암 치료에서의 이들의 조합 이용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4164 (2013.01)
A61K 31/4188 (2013.01)
A61K 31/4375 (2013.01)
A61K 31/513 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/69 (2013.01)
A61K 31/7068 (2013.01)
A61K 38/15 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)

(72) 발명자

가르시아 페르난데즈, 루이스 프란시스코

스페인, 이-28770 콜메나르 비에호-마드리드, 폴리
 고노 인터스트리얼 라 미나-노르페, 1, 에브다. 드
 로스 리에스, 파르마 마르, 에스.에이.

갈마리니, 카를로스 마리아

스페인, 이-28770 콜메나르 비에호-마드리드, 폴리
 고노 인터스트리얼 라 미나-노르페, 1, 에브다. 드
 로스 리에스, 파르마 마르, 에스.에이.

구일렌 나바로, 마리아 호세

스페인, 이-28770 콜메나르 비에호-마드리드, 피.
 아이. 라 미나 노르페, 1, 에브다. 드 로스
 리에스, 파르마 마르, 에스.에이.

아비레스 마린, 빠블로 마누엘

스페인, 이-28770 콜메나르 비에호-마드리드, 폴리
 고노 인터스트리얼 라 미나-노르페, 1, 에브다. 드
 로스 리에스, 파르마 마르, 에스.에이.

명세서

청구범위

청구항 1

암치료를 필요로 하는 환자에게 치료유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 프로테아좀 억제제, 비고전적(nonclassical) 알킬화제, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 항대사물질, 항암 항생제, 항종양 백금 배위 착화합물, 유사분열 억제제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104으로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 치료유효량의 또다른 항암 약물을 투여하는 것을 포함하는 암치료 방법.

청구항 2

암치료에서, 프로테아좀 억제제, 비고전적 알킬화제, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 항대사물질, 항암 항생제, 항종양 백금 배위 착화합물, 유사분열 억제제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104으로부터 선택되는 기타 약제로부터 선택된 항암 약물의 치료효능을 증가시키는 방법으로, 치료유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 상기 항암 약물과 조합하여 암치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 프로테아좀 저해제, 비고전적 알킬화제, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 항대사물질, 항암 항생제, 항종양 백금 배위 착화합물, 유사분열 억제제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 다른 항암 약물이 동일 의약의 일부를 형성하는 것인 방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 프로테아좀 저해제, 비고전적 알킬화제, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 항대사물질, 항암 항생제, 항종양 백금 배위 착화합물, 유사분열 억제제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 다른 항암 약물은 동시에 또는 상이한 시기에서의 투여를 위해 별개의 의약으로서 제공되는 것인 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 프로테아좀 저해제, 비고전적 알킬화제, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 항대사물질, 항암 항생제, 항종양 백금 배위 착화합물, 유사분열 억제제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 다른 항암 약물은 상이한 시기에서의 투여를 위해 별개의 의약으로서 제공되는 것인 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 프로테아좀 저해제인 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 프로테아좀 저해제는 보테조밋, 다이술피람, 에피갈로카테킨 갈레이트, 및 살리노스포라미드 A로부터 선택되는 방법.

청구항 8

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 비교전적 알킬화제인 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 비교전적인 알킬화제는 프로카르바진, 다카르바진, 테모졸로미드 및 알트레타민으로 선택되는 방법.

청구항 10

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 mTOR 저해제인 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, mTOR 저해제는 사이롤리무스, 템시롤리무스, 에버롤리무스, 리다폴로리무스, KU-0063794 및 WYE-354로부터 선택되는 방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 티로신 키나아제 저해제인 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 티로신 키나아제 저해제는 예를로티닙, 소라페닙, 악시티닙, 보수티닙, 세디라닙, 크라이조티닙, 다사티닙, 제피티닙, 이마티닙, 카네르티닙, 라파티닙, 레스타우르티닙, 네라티닙, 닐로티닙, 세막사닙, 수니티닙, 마탈라닙 및 반데타닙으로부터 선택되는 방법.

청구항 14

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 히스톤 데아세틸라아제 저해제인 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 히스톤 데아세틸라아제는 로미렙신, 파노비노스텐, 보리노스텐, 모세티노스텐, 벨리노스텐, 엔티노스텐, 레스미노스텐, PCI-24781, AR-42, CUDC-101 및 발프론산으로부터 선택되는 방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 항대사물질인 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 항대사물질은 5-플루오로우라실, 젤시타빈, 시타라빈, 카페시타빈, 데시타빈, 플록수리딘, 플루다라빈, 아미놈테린, 메토틱세이트, 페메트렉시드, 칼티트렉시드, 클라드리빈, 클로파라빈, 머캅토피린, 펜토스타틴 및 티오구아닌으로부터 선택되는 방법.

청구항 18

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 항암 항생제인 방법.

청구항 19

제 18항에 있어서, 항암 항생제는 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 마이토잔트론, 파이잔트론, 발루비신, 마이토마이신 C, 블레오마이신, 악티노마이신 A 및 미트라마이신으로부터 선택되는 방법.

청구항 20

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 항종양 백금 배위 착화합물인 방법.

청구항 21

제 20항에 있어서, 항종양 백금 배위 착화합물은 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 트라이플라틴 테트라니트레이트, 사트라플라틴, 테트라플라틴, 오르미플라틴, 아이프로플라틴, 네달플라틴 및 로바플라틴으로부터 선택되는 방법.

청구항 22

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 유사분열 억제제인 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서, 유사분열 억제제는 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 및 비노렐빈으로부터 선택되는 방법.

청구항 24

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 저해제인 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 저해제는 토포테칸, SN-38, 이리노테칸, 캄프토테신, 루비테칸, 에토포사이드, 암사크린 및 테니포사이드로부터 선택되는 방법.

청구항 26

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 질소 머스타드 알킬화제인 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, 질소 머스타드 알킬화제는 멜팔란, 이포스파미드, 클로람부실, 시클로포스파미드, 메클로레타민, 우라무스틴, 에스트라무스틴 및 벤다무스틴으로부터 선택되는 방법.

청구항 28

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 니트로소우레아 알킬화제인 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서, 니트로소우레아 알킬화제는 로무스틴, 세무스틴, 카무스틴, 포테무스틴 및 스트렙토조토신으로부터 선택되는 방법.

청구항 30

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 에스트로겐 안타고니스트인 방법.

청구항 31

제 30항에 있어서, 에스트로겐 안타고니스트는 토레미펜, 풀베스트랜트, 타목시펜 및 나폭시딘으로부터 선택되는 방법.

청구항 32

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 안드로겐 안타고니스트인 방법.

청구항 33

제 32항에 있어서, 안드로겐 안타고니스트는 바이칼루타미드, 플루타미드, MDV3100 및 닐루타미드로부터 선택되는 방법.

청구항 34

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 조합된 항암 약물은 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택되는 방법.

청구항 35

제 1항 내지 제 34항 중 어느 한 항에 있어서, 치료될 암은 폐암, 육종, 악성 흑색종, 방광 암종, 전립선암, 췌장 암종, 갑상선암, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 식도암, 신경아세포종, 뇌암, 자궁 경부암, 항문암, 정소암, 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종으로부터 선택되는 방법.

청구항 36

제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에서 정의된 것과 같은 치료 용도의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 37

PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의, 제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에서 정의된 것과 같은 치료용 약제 제조에의 용도.

청구항 38

제 1항 내지 제 35항 중 어느 한 항에 기재된 것과 같은, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제형, 및/또는 프로테아좀 저해제, 비고전적 알킬화제, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 항대사물질, 항암 항생제, 항종양 백금 배위 착화합물, 유사분열 억제제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 또다른 항암 약물의 제형 및 조합되는 두 약물 모두의 이용에 대한 설명서를 포함하는 암치료용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 PM01183과 다른 항암 약물과의 조합, 특히 항종양 백금 배위 착화합물, 항대사물질, 유사분열(mitotic) 억제제, 항암 항생제, 토포아이스머라아제(topoisomerase) I 및/또는 II 억제제, 프로테아좀(proteasome) 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 질소 머스타드(nitrogen mustard) 알킬화제, 니트로소우레아(nitrosourea) 알킬화제, 비고전적(nonclassical) 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 및 아플리딘(아플리딘), ET-743, PM02734, 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 항암 약물과의 조합 및 암 치료에서의 이들의 조합 이용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

암은 신체의 일부에서 세포가 통제되지 않고 성장하기 시작하는 경우 발생한다. 많은 종류의 암이 존재하지만,

이들은 모두 비정상 세포들의, 통제를 벗어난 성장으로부터 발생한다. 암세포는 주변 조직을 침입하며, 혈류 및 림프계를 통하여 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다. 몇가지 주요 유형의 암이 존재한다. 암종은 악성 신 생물로, 상피세포로부터 일어나는 통제되지 않은 진행성의 비정상 성장이다. 상피세포는, 장기, 혈관 라이닝, 및 기타 작은 신체강(cavities)을 포함한 신체의 내부 표면 및 외부 표면을 덮고 있다. 육종은 뼈, 연골, 지방, 근육, 혈관, 또는 기타 결합 또는 지지 조직에서의 세포에서 일어나는 암이다. 백혈병은 골수와 같은 혈액 형성 조직에서 일어나는 암으로, 많은 수의 비정상 혈액 세포들이 생성되어 혈류로 들어가도록 유발한다. 림프종 및 다발성 골수종은 면역계의 세포들로부터 일어나는 암이다.

[0003] 추가적으로, 암은 침습성이고, 주변 조직에 침윤하여 전이를 일으키는 성향이 있다. 이는 주변 조직 내로 직접 퍼질 수 있으며, 또한 림프계 및 순환계를 통하여 신체의 다른 부분으로 퍼질 수도 있다.

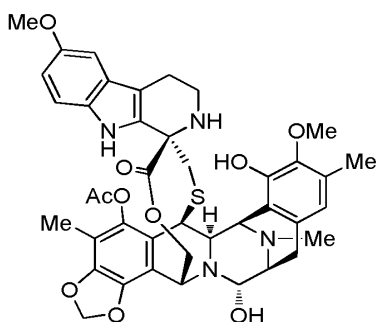
[0004] 국소화된 질병에 대한 수술 및 방사선 조사, 및 화학요법을 포함하는, 많은 치료들이 암에 이용가능하다. 그러나, 많은 암의 유형에 대하여 이용가능한 치료의 효능은 제한되며, 임상적 장점을 나타내는 신규의 개선된 치료 형태가 필요하다. 이는 진단된 병 및/또는 전이 질병을 나타내는 환자들 및 내성의 획득으로 인해 또는 관련된 독성으로 인한 치료의 적용에서의 제한으로 인해 무효하거나 또는 견딜수 없게된 확립된 치료법으로 이전에 치료받은 후, 진행성 질병이 재발된 환자들에 경우에 특히 요구된다.

[0005] 1950년대 이래로, 암의 화학치료 이용에서 현저한 발전이 이루어져 왔다. 유감스럽게도, 모든 암환자의 50%는 최초 치료에 반응하지 않거나 또는 치료에 대한 초기 반응 후 재발을 경험하고 최종적으로는 진행성 전이성 질병으로 인해 사망한다. 따라서, 신규 항암제의 설계 및 발견에 대한 꾸준한 집중은 극히 중요하다.

[0006] 고전적인 형태의 화학요법은, DNA, RNA 및 단백질 생합성을 포함한 일반적인 세포 대사 과정을 표적함으로써 급속히 증식하는 암세포들을 죽이는데 우선적으로 집중되어 왔다. 화학요법 약물들은, 그들이 암세포 내에서 특정 화학 성분에 어떻게 영향을 미치는지, 그 약물이 간섭하는 세포 활성 또는 과정이 무엇인지, 및 약물이 영향을 미치는 세포 주기의 특정 시기가 무엇인지에 근거하여 몇 개의 군으로 분류된다. 가장 흔하게 사용되는 유형의 화학요법 약물은 다음을 포함한다: DNA-알킬화 약물 (예컨대, 시클로포스파미드, 이포스파미드, 시스플라틴, 카보플라틴, 다카르바진), 항대사물질 (5-플루오로우라실, 카페시타빈, 6-머캅토피딘, 메토트렉세이트, 젬시타빈, 시타라빈, 플루다라빈), 유사분열 억제제 (예컨대, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 빈크리스틴), 항암 항생제 (예컨대, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 마이토잔트론), 토포아이소머라아제 I 및/또는 II 억제제 (예컨대, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 테니포사이드), 및 호르몬 요법 (예컨대, 타목시펜, 플루타미드).

[0007] 이상적인 항종양 약물은 암세포를 선택적으로 죽이면서, 비-암세포들에 대한 그의 독성에 대하여 폭넓은 지수를 갖고, 약물에의 장기간 노출 후에도 암세포들에 대한 그의 효능을 지속할 수 있을 것이다. 유감스럽게도, 현재 이러한 약제들을 이용한 화학치료법들 중 어떤 것도 이상적인 프로파일을 갖지 않는다. 대부분은 매우 좁은 치료 지수를 가지며, 추가적으로 화학치료제에 거의 치사량에 가까운 농도로 노출된 암세포들은 이러한 약제에 대하여 내성을 일으킬 수 있으며, 몇몇 다른 항종양 약제에 대해서도 종종 상호내성이다.

[0008] 트립타미시딘으로도 알려진 PM01183은 암치료용 현재 임상 시험 중에 있는 합성 알칼로이드로, 하기 화학식을 갖는다:



[0009]

[0010] PM01183은 고체 및 비고체 종양 세포주에 대한 매우 유효한 시험관 내 활성 및 마우스에서 몇몇 인간 종양 세포주, 예컨대 유방암, 신장 및 난소암 세포주들에서의 현저한 생체 내 활성을 나타내었다. PM01183은, 결과적으로는 DNA 이중가닥 파괴, S-상 포획 및 암세포에서의 아포토시스를 일으키는 DNA의 작은 홈(minor groove)에서 구아닌의 공유결합 변경을 통하여 그의 항암 효과를 나타낸다. 이 화합물에 대한 추가의 정보는 문헌 [WO

03/01427; 2009년 4월 18~22일, 콜로라도 덴버에서 열린, 100회차 AACR 연간회의에서의 초록번호 2679 및 초록번호 4525; 및 Leal JFM 등, Br. J. Pharmacol. 2010, 161, 1099~1110]에서 찾을 수 있다.

[0011] 암은 동물 및 인간에서의 주요 사망 원인이므로, 암으로 고통받는 환자에 투여되기에 치료활성 및 안전성을 얻기 위한 몇가지 노력이 있어왔으며, 아직까지 진행되어오고 있다. 본 발명에 의하여 해결하고자 하는 문제는 암치료를 유용한 항암 치료를 제공하고자 하는 것이다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 PM01183이 다른 항암 약물, 특히 항종양 백금 배위 착화합물, 항대사물질, 유사분열 억제제, 항암 항생제, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제, 프로테아좀 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 비고전적 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안티고니스트, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택된 다른 약제로부터 선택된 항암 약물의 항종양 활성에 효력을 더한다는 것을 확증하였다. 따라서, PM01183 및 상기 다른 항암제는 암치료를 위한 병용요법(combination therapy)으로 성공적으로 사용될 수 있다.

[0013] 따라서, 본 발명은 이들 병용요법을 이용하는 암 치료용 약학 조성물, 키트, 방법 및 암치료 및 병용요법용 의약의 제조에서 두 약물 모두의 이용에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 한 측면에 따라, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 기초로 하고, 상기 정의된 것과 같은 또다른 항암 약물을 이용하는 효과적인 암 치료용 병용요법이 제공된다.

[0015] 또다른 구체예에서, 본 발명은 암치료에서의 이용을 위한 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것으로, 치료유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 또다른 치료유효량의 항암 약물과 함께 투여하는 것을 포함한다.

[0016] 또다른 구체예에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 치료유효량의 또다른 항암약물을 투여하는 것을 포함하는 암치료 방법을 포함한다.

[0017] 또다른 측면에서, 본 발명은 암치료에서 항암 약물의 치료 효능을 증가시키거나 강화하는 방법을 포함하며, 이는 암치료를 필요로 하는 환자에게 치료유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 함께 이러한 다른 항암 약물을 투여하는 것을 포함한다.

[0018] 또다른 구체예에서, 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 또다른 항암 약물과 사용하는 병용요법에 의한 암치료용 의약 제조를 위한 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 이용을 포함한다.

[0019] 추가의 측면에서, 본 발명은 암치료용 병용요법에서 사용되는 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및/또는 또다른 항암 약물, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 포함한다.

[0020] 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제형, 및/또는 또다른 항암 약물의 제형, 및 조합되는 두 약물 모두의 이용에 대한 설명서를 포함하는 암치료용 키트도 포함한다.

[0021] 바람직한 한 측면에서, 본 발명은 또다른 항암 약물과, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 상승작용적인 조합에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] **도 1~20.** A549 세포에 대하여, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신, 마이토마이신 C, 악티노마이신 D, 토포테칸, 에토포사이드, 보테조밋(bortezomib), 보리노스탯(vorinostat), 시클로포스파미드, 카무스틴(carmustine), 다카르바진, 템시롤리무스(temsirolimus), 에를로티닙(erlotinib), ET-743 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 21~41. A673 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시타라빈, 젬시타빈, 도세탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈(vinorelbine), 다우노루비신, 마이토마이신 C, 악티노마이신 D, 토포테칸, 에토포사이드, 보리노스탯, 시클로포스파미드, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 42~56. SK-MEL-2 세포에 대하여, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 메토타렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 마이토마이신 C, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 다카르바진, 템시롤리무스, ET-743,

PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 57-80. PC-3 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 도세탁셀, 파클리탁셀, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 마이토마이신 C, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 보리노스탤, 플루타미드, 템시롤리무스, 에를로티닙, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 81-98. PANC-1 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 보리노스탤, 템시롤리무스, 에를로티닙, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 99-123. HGC-27 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 보리노스탤, 시클로포스파미드, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 124-150. IGROV-1 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 도세탁셀, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 악티노마이신 D, 마이토마이신 C, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보리노스탤, 시클로포스파미드, 카무스틴, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 151-170. HEP-G2 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 도세탁셀, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 시클로포스파미드, 에를로티닙, ET-743 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 171-197. MDA-MB-231 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 도세탁셀, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 악티노마이신 D, 마이토마이신 C, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보리노스탤, 시클로포스파미드, 카무스틴, 다카르바진, 타목시펜, 템시롤리무스, 에를로티닙, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 198-219. HT-29 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 도세탁셀, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 악티노마이신 D, 마이토마이신 C, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 보리노스탤, 시클로포스파미드, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘 및 PM02734과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 220-242. RXF-393 세포에 대하여, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 시타라빈, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 도세탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 독소루비신, 악티노마이신 D, 마이토마이신 C, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보리노스탤, 시클로포스파미드, 다카르바진, 에를로티닙, 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 243-262. U87-MG 세포에 대하여, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 메토트렉세이트, 도세탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신, 독소루비신, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 보리노스탤, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘, ET-743 및 PM02734과 각각 조합된 PM01183의 시험관 내 활성 데이터.

도 263. 위약, PM01183, 파클리탁셀 및 PM01183과 파클리탁셀로 처리된 마우스에서의 A2780 종양의 종양 부피 평가.

도 264. 위약, PM01183, 비노렐빈 및 PM01183과 비노렐빈으로 처리된 마우스에서의 A2780 종양의 종양 부피 평가.

도 265. 위약, PM01183, 독소루비신 및 PM01183과 독소루비신으로 처리된 마우스에서의 A2780 종양의 종양 부피 평가.

도 266. 위약, PM01183, 시스플라틴 및 PM01183과 시스플라틴으로 처리된 마우스에서의 HGC-27 종양의 종양 부피 평가.

- 도 267. 위약, PM01183, 5-플루오로우라실 및 PM01183과 5-플루오로우라실로 처리된 마우스에서의 HGC-27 종양의 종양 부피 평가.
- 도 268. 위약, PM01183, 켄시타빈 및 PM01183과 켄시타빈으로 처리된 마우스에서의 SW1990 종양의 종양 부피 평가.
- 도 269. 위약, PM01183, 테모졸로미드(temozolomide) 및 PM01183과 테모졸로미드로 처리된 마우스에서의 U87-MG 종양의 종양 부피 평가.
- 도 270. 위약, PM01183, 이리노테칸 및 PM01183과 이리노테칸으로 처리된 마우스에서의 H460 종양의 종양 부피 평가.
- 도 271. 위약, PM01183, 다카르바진 및 PM01183과 다카르바진으로 처리된 마우스에서의 HT1080 종양의 종양 부피 평가.
- 도 272. 위약, PM01183, 이리노테칸 및 PM01183과 이리노테칸으로 처리된 마우스에서의 HT-29 종양의 종양 부피 평가.
- 도 273. JURKAT 세포주에서 메토티렉세이트와 PM01183의 조합 효과.
- 도 274. MOLT-4 세포주에서 메토티렉세이트와 PM01183의 조합 효과.
- 도 275. JURKAT 세포주에서 다우노루비신과 PM01183의 조합 효과.
- 도 276. JURKAT 세포주에서 아플리딘과 PM01183의 조합 효과.
- 도 277. MOLT-4 세포주에서 아플리딘과 PM01183의 조합 효과.
- 도 278. JURKAT 세포주에서 ET-743과 PM01183의 조합 효과.
- 도 279. MOLT-4 세포주에서 ET-743과 PM01183의 조합 효과.
- 도 280. JURKAT 세포주에서 PM00104와 PM01183의 조합 효과.
- 도 281. MOLT-4 세포주에서 PM00104와 PM01183의 조합 효과.
- 도 282. JURKAT 세포주에서 PM02734와 PM01183의 조합 효과.
- 도 283. MOLT-4 세포주에서 PM02734와 PM01183의 조합 효과.
- 도 284. RAMOS 세포주에서 시타라빈과 PM01183의 조합 효과.
- 도 285. RAMOS 세포주에서 메토티렉세이트와 PM01183의 조합 효과.
- 도 286. U-937 세포주에서 메토티렉세이트와 PM01183의 조합 효과.
- 도 287. RAMOS 세포주에서 켄시타빈과 PM01183의 조합 효과.
- 도 288. U-937 세포주에서 켄시타빈과 PM01183의 조합 효과.
- 도 289. RAMOS 세포주에서 다우노루비신과 PM01183의 조합 효과.
- 도 290. U-937 세포주에서 다우노루비신과 PM01183의 조합 효과.
- 도 291. RAMOS 세포주에서 ET-743과 PM01183의 조합 효과.
- 도 292. U-937 세포주에서 ET-743과 PM01183의 조합 효과.
- 도 293. RAMOS 세포주에서 PM00104와 PM01183의 조합 효과.
- 도 294. U-937 세포주에서 PM00104와 PM01183의 조합 효과.
- 도 295. RAMOS 세포주에서 PM02734와 PM01183의 조합 효과.
- 도 296. U-937 세포주에서 PM02734와 PM01183의 조합 효과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] **발명의 상세한 설명**

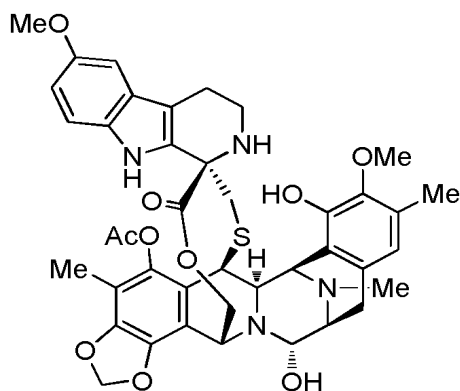
[0024] 본 발명자들은 이들 항암 약물이 PM01183과 조합되는 경우, PM01183이 다른 항암 약물들의 항암 활성을 크게 증진시킨다는 것을 놀랍게도 발견하였다. 따라서, 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 또 다른 항암 약물과의 조합에 기초하여 효과적인 암치료를 제공하는 것에 관한 것이다.

[0025] 본 명세서에서, "암"이라 함은 종양, 신생물, 및 악성 조직 또는 세포를 유발하는 임의의 기타 악성 질병을 의미하는 것이다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 것과 같은, "치료하는(treating)"이라는 용어는 달리 나타내지 않는 한, 질병 또는 이러한 용어가 적용되는 상태, 또는 그러한 장애 또는 상태의 하나 이상의 증상들의 진전의 역전, 완화 또는 억제를 의미한다. 본 명세서에서 사용된 "치료"라는 용어는 바로 위에서 정의된 "치료하는"과 같은 치료 행위를 지칭한다.

[0027] 본 명세서 전반에서 사용된 것과 같은 "조합"이라는 용어는 암으로 고통받는 환자에게 지칭된 치료제를 동일한 또는 별개의 약학 제형으로, 동시에 또는 다른 시기에 투여하는 것을 포함하고자 하는 것이다. 치료제를 상이한 시기에 투여하는 경우, 유효하거나 또는 상승작용적인 반응이 일어나도록 하기에 충분히 가까운 시기에 투여되어야 한다.

[0028] 상기 언급된 것과 같이, PM01183은 하기 구조를 갖는 합성 알칼로이드이다:



[0029]

[0030] 본 명세서에서 "PM01183"이라는 용어는 임의의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 수화물, 전구약물, 또는 환자에게 투여시 본 명세서에서 기재된 것과 같은 화합물을 (직접적 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 기타 화합물을 망라하고자 하는 것이다. 염, 용매화물, 수화물 및 전구약물(prodrug)의 제조는 당 분야에서 알려진 방법에 의하여 실시될 수 있다.

[0031] 약학적으로 허용가능한 염은, 통상의 화학적인 방법에 의하여, 염기성 또는 산성 부분을 포함하는 부모 화합물로부터 합성될 수 있다. 일반적으로, 이러한 염은 예로서, 자유 산 또는 염기 형태의 이들 화합물을 화학양론적 양의 적절한 염기 또는 산과, 물 또는 유기 용매 또는 이들의 혼합물 중에서 반응시키므로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 아이소프로판올 또는 아세토니트릴과 같은 비수성 매질이 바람직하다. 산 부가염의 예는 예로서, 염산염, 브롬산염, 요오드산염, 술페이트, 질산염, 인산염과 같은 무기산 부가염, 및 예로서 아세테이트, 트라이플루오로아세테이트, 말레이트, 푸마레이트, 시트레이트, 옥살레이트, 숙시네이트, 타르타레이트, 말레이트, 만델레이트, 메탄술포네이트 및 p-톨루엔술포네이트와 같은 유기산 부가염을 포함한다. 알칼리 부가염의 예는, 예로서 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 암모늄 염과 같은 무기 염들, 및 예로서 에틸렌다이아민, 에탄올아민, N,N-다이알킬렌에탄올아민, 트라이에탄올아민 및 염기성 아미노산 염과 같은 유기 알칼리염들을 포함한다.

[0032] PM01183의 전구약물인 임의의 화합물은 본 발명의 범주 및 기술사상 내에 포함된다. "전구약물"이라는 용어는 그의 가장 넓은 의미로 사용되며, 생체 내에서 PM01183으로 전환되는 유도체들을 포괄한다. 전구약물은 가수분해, 산화 또는 다르게는 생물학적 조건 하에서 반응하여 PM01183을 제공할 수 있다. 전구약물의 예들은 이에 제한되지는 않지만, PM01183의 유도체 및 대사산물들을 포함하며, 이는 생가수분해성 아마이드, 생가수분해성 에스테르, 생가수분해성 카르바메이트, 생가수분해성 카르보네이트, 생가수분해성 유레이드(ureides) 및 생가수분해성 인산염 유사체들과 같은 생가수분해성 부분들을 포함한다. 전구약물은 Burger에 의한 "Medicinal

Chemistry and Drug Discovery" 제 6판 (Donald J. Abraham ed., 2001, Wiley) 및 "Design and Applications of prodrugs" (H. Bundgaard ed., 1985, Harwood Academic Publishers)에서 설명된 것과 같이 공지된 방법을 이용하여 전형적으로 제조될 수 있다.

- [0033] 추가적으로, 본 명세서에서 언급된 임의의 약물은 자유 화합물 또는 용매화물 (예로서, 수화물)로서 무정형 형태 또는 결정성 형태일 수 있으며, 이 두 형태 모두 본 발명의 범주 내에 속함을 의도하는 것이다.
- [0034] 또한, 본 발명에 따른 용도를 위한 PM01183은, 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된 WO 03/014127에 개시된 것과 같은 합성 공정에 따라 제조될 수 있다.
- [0035] 사용될 수 있는 PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 약학 조성물은, 정맥 투여에 적당한 부형제를 갖는 용액, 현탁액, 에멀션, 동결건조 조성물, 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는, PM01183은 치료 용도에 적당한 제형 중에 PM01183 및 부형제를 포함하는 멸균된 동결건조 생성물로서 공급 및 저장될 수 있다. PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의 약학 조성물에 대한 추가적인 지침은, 예로서 본 명세서에 참고문헌으로서 통합된 WO 2006/046079에 기재된 제형들을 참조할 수 있다.
- [0036] PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 이 화합물을 포함하는 약학 조성물의 투여는 바람직하게는 정맥 주입에 의한 것이다. 72시간에 달하는 주입 시간이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 이는 1 내지 24시간, 더욱 바람직하게는 1 내지 24시간이고, 약 1시간 또는 약 3시간이 가장 바람직하다. 병원에서 하룻밤 머물지 않고 치료받을 수 있는 짧은 주입 시간이 특히 바람직하다. 그러나, 주입은 필요한 경우 약 24시간 또는 그 이상일 수 있다.
- [0037] 바람직하게는, PM01183의 투여는 사이클(cycles) 방식으로 수행된다. 바람직한 투여 스케줄에서, PM01183의 정맥 주입은 각 사이클의 첫주에 환자에게 제공되며, 환자들은 사이클의 나머지 기간 동안 회복되도록 한다. 각 사이클의 바람직한 기간은 3 또는 4주이다. 필요에 따라 다수의 사이클이 제공될 수 있다. PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염의, 매 3주 1회 약 1시간 동안 정맥 주입에 의한 투여가 가장 바람직한 투여 스케줄이지만, 다른 프로토콜도 변화되어 고안될 수 있다.
- [0038] 본 발명에서, PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과, 항종양 백금 배위 착화합물, 항대사물질, 유사분열 억제제, 항암 항생제, 토포아이스오머라아제 I 및/또는 II 억제제, 프로테아좀 억제제, 히스톤 데아세틸라제 억제제, 질소 머스타드 알킬화제, 니트로소우레아 알킬화제, 비고전적 알킬화제, 에스트로겐 안타고니스트, 안드로겐 안타고니스트, mTOR 억제제, 티로신 키나아제 억제제, 및 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104로부터 선택된 기타 약제로부터 선택된 항암 약물과의 조합이 암치료에 특히 바람직하다.
- [0039] 특히 바람직한 암 유형은, 폐암, 육종, 악성 흑색종, 방광 암종, 전립선암, 췌장 암종, 갑상선암, 위 암종, 난소암, 간종양 (간암으로도 알려짐), 유방암, 결장직장암, 신장암, 식도암, 신경아세포종, 뇌암, 자궁경부암, 항문암, 정소암, 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종으로부터 선택된 것들이다.
- [0040] 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 보다 구체적으로, 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 뇌암 및 림프종으로부터 선택되는 암 치료에서, PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과, 항종양 백금 배위 착화합물과의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 트라이플라틴 테트라니트레이트 (BBR3464), 사트라플라틴, 테트라플라틴, 오르미플라틴, 아이프로플라틴, 네달플라틴(nedaplatin) 및 로바플라틴을 포함한다. 암치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암으로부터 선택된 암의 치료에서, PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 트라이플라틴 테트라니트레이트, 사트라플라틴, 테트라플라틴, 오르미플라틴, 아이프로플라틴, 네달플라틴 및 로바플라틴과의 조합이 특히 바람직하며, 시스플라틴 및 옥살리플라틴과의 조합이 더욱 바람직하다.
- [0041] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 방광 암종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 식도암, 뇌암, 항문암, 백혈병 및 림프종으로부터 선택된 암의 치료에서 PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과, 항대사물질의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 시타라빈, 카페시타빈, 데시타빈, 플록수리딘(floxuridine), 플루다라빈, 아미놉테린(aminopterin), 메토틱렉세이트, 페메트렉시드(pemetrexed), 랄티트렉시드(raltitrexed), 클라드리빈, 클로파라빈, 머캅토피딘, 펜토스타틴 및 티오구아닌을 포함한다. 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방

암, 결장직장암, 신장암, 뇌암, 백혈병 및 림프종에서 선택되는 암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 시타라빈, 카페시타빈, 데시타빈, 플록수리딘, 플루다라빈, 아미놈테린, 메토틱렉세이트, 페메트렉시드, 알티트렉시드, 클라드리빈, 클로파라빈, 머캅토포린, 펜토스타틴 및 티오구아닌과의 조합이 특히 바람직하며, 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 시타라빈 및 메토틱렉세이트와의 조합이 더욱 더 바람직하다.

[0042] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 더욱 구체적으로는 폐암, 육종, 전립선암, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 뇌암, 백혈병 및 림프종으로부터 선택되는 암의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 유사분열 억제제와의 조합에 관한 것이다. 본 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신(vindesine) 및 비노렐빈을 포함한다. 암치료에서, 특히 폐암, 육종, 전립선암, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암으로부터 선택된 암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈의 조합이 특히 바람직하며, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴 및 비노렐빈과의 조합이 더욱 바람직하다.

[0043] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 방광 암종, 전립선암, 췌장 암종, 갑상선암, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 신경아세포종, 뇌암, 항문암, 정소암, 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 항암 항생제와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 마이토잔트론, 파이잔트론(pixantrone), 발루비신, 마이토마이신 C, 블레오마이신, 악티노마이신 A 및 미트라마이신(mithramycin)을 포함한다. 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 뇌암, 백혈병 및 림프종의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 마이토잔트론, 파이잔트론, 발루비신, 마이토마이신 C, 블레오마이신, 악티노마이신 D 및 미트라마이신과의 조합이 특히 바람직하고, 다우노루비신, 독소루비신, 마이토마이신 C 및 악티노마이신 D와의 조합이 더욱 바람직하다.

[0044] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 신경아세포종, 뇌암, 자궁경부암, 정소암, 백혈병 및 림프종의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과, 토포아이스머라아제 I 및/또는 II 억제제의 조합에 관한 것이다. 본 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 토포테칸, SN-38, 이리노테칸, 캄프토테신, 루비테칸, 에토포사이드, 암사크린(amsacrine) 및 테니포사이드를 포함한다. 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암의 치료에서, PM00104 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염과, 토포테칸, SN-38, 이리노테칸, 캄프토테신, 루비테칸, 에토포사이드, 암사크린 및 테니포사이드의 조합이 특히 바람직하며, 토포테칸, 이리노테칸 및 에토포사이드와의 조합이 더욱 바람직하다.

[0045] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 특히 폐암, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 간종양, 결장직장암, 뇌암, 다발성 골수종 및 림프종의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 프로테오솜 저해제의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 보테조밋, 다이술피람(disulfiram), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate) 및 살리노스포라미드 A(salinosporamide A)를 포함한다. 암치료에서, 특히 폐암, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 간종양, 결장직장암 및 뇌암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 보테조밋, 다이술피람, 에피갈로카테킨 갈레이트 및 살리노스포라 A와의 조합이 바람직하며, 보테조밋과의 조합이 더욱 바람직하다.

[0046] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 특히 폐암, 육종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 뇌암 및 림프종의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 히스톤 데아세틸라제와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 로미덱신(romidepsin), 파노비노스탯(panobinostat), 보리노스탯, 모세티노스탯(mocetinostat), 벨리노스탯, 엔티노스탯, 레스미노스탯, PCI-24781, AR-42, CUDC-101 및 발프론산을 포함한다. 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 로미덱신, 파노비노스탯, 보리노스탯, 모세티노스탯, 벨리노스탯, 엔티노스탯, 레스미노스탯, PCI-24781, AR-42, CUDC-101, 및 발프론산과의 조합이 특히 바람직하고, 특히 보리노스탯과의 조합이 바람직하다.

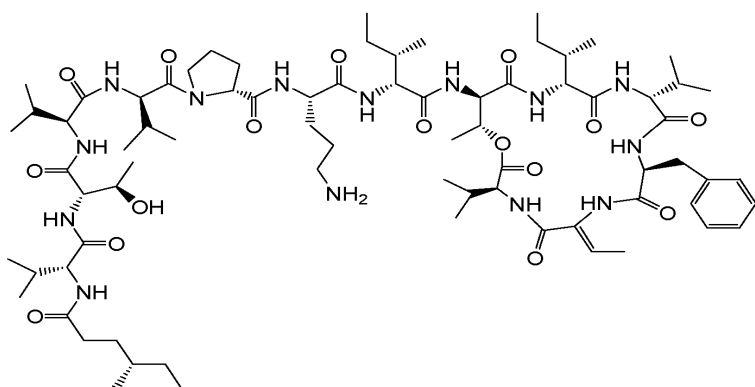
- [0047] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 방광 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 질소 머스타드 알킬화제와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 멜팔란, 이포스파미드, 클로람부실, 시클로포스파미드, 메클로레타민, 우라무스틴(uramustine), 에스트라무스틴 및 벤다무스틴을 포함한다. 암치료에서, 특히 폐암, 육종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암 및 신장암에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 멜팔란, 이포스파미드, 클로람부실, 시클로포스파미드, 메클로레타민, 우라무스틴, 에스트라무스틴 및 벤다무스틴과의 조합이 특히 바람직하고, 시클로포스파미드와의 조합이 더욱 바람직하다.
- [0048] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 특히 폐암, 난소암, 유방암, 뇌암, 다발성 골수종 및 림프종에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 니트로소우레아 알킬화제와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 로무스틴(lomustine), 세무스틴, 카무스틴, 포테무스틴 및 스트렙토조토신을 포함한다. 암 치료에서, 특히 폐암, 난소암 및 유방암 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 로무스틴, 세무스틴, 카무스틴, 포테무스틴 및 스트렙토조토신과의 조합이 특히 바람직하고, 특히 카무스틴과의 조합이 더 바람직하다.
- [0049] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 뇌암, 백혈병 및 림프종의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 비고전적인 알킬화제와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 프로카르바진, 다카르바진, 테모졸로미드 및 알트레타민을 포함한다. 폐암, 육종, 악성 흑색종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암의 치료에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 프로카르바진, 다카르바진, 테모졸로미드 및 알트레타민의 조합이 특히 바람직하며, 다카르바진과 테모졸로미드의 조합이 더욱 바람직하다.
- [0050] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 특히 유방암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과, 에스트로겐 안타고니스트와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 토레미펜, 풀베스트랜트(fulvestrant), 타목시펜 및 나폭시딘을 포함한다. 유방암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 토레미펜, 풀베스트랜트, 타목시펜 및 나폭시딘의 조합이 특히 바람직하며, 특히 타목시펜과의 조합이 더욱 바람직하다.
- [0051] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 특히 전립선암 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 안드로겐 안타고니스트의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 바이칼루타미드(bicalutamide), 플루타미드, MDV3100 및 닐루타미드(nilutamide)를 포함한다. 전립선암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 바이칼루타미드, 플루타미드, MDV3100 및 닐루타미드와의 조합이 특히 바람직하고, 플루타미드와의 조합이 더욱 바람직하다.
- [0052] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 특히 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암의 치료에 있어서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 mTOR 저해제와의 조합에 관한 것이다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 사이롤리무스(sirolimus), 템시롤리무스, 에버롤리무스, 리다폴로리무스, KU-0063794 및 WYE-354을 포함한다. 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암 및 뇌암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 사이롤리무스, 템시롤리무스, 에버롤리무스, 리다폴로리무스, KU-0063794 및 WYE-354의 조합이 특히 바람직하고, 템시롤리무스와의 조합이 특히 바람직하다.
- [0053] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 더욱 구체적으로는 폐암, 육종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암으로부터 선택된 암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 티로신 키나아제 억제제와의 조합이 바람직하다. 이러한 화학치료제 군은 이에 제한되지는 않지만, 에를로티닙, 소라페닙, 악시티닙, 보수티닙, 세디라닙, 크라이조티닙(crizotinib), 다사티닙, 제피티닙, 이마티닙, 카네르티닙, 라파티닙, 레스타우르티닙, 네라티닙, 닐로티닙, 세막사닙(semaxanib), 수니티닙, 바탈라닙 및 반데타닙을 포함한다. 암치료에서, 더욱 구체적으로는 폐암, 육종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암 및 뇌암으로부터 선택된 암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 에를로티닙, 소라페닙, 악시티닙, 보수티닙, 세디라닙, 크라이조티닙, 다사티닙, 제피티닙, 이마티닙, 카네르티닙, 라파티닙, 레스타우르티닙, 네라티닙, 닐로티닙, 세막사닙, 수니티닙, 바탈라닙 및 반데타닙과의 조합이 특히 바람직하고, 에를로티닙과의 조합이 더욱 바람직하다.

[0054] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암치료에서, 더욱 구체적으로는 육종, 위 암종, 난소암, 결장직장암, 신장암, 뇌암 및 백혈병으로부터 선택된 암의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 아플리딘의 조합에 관한 것이다.

[0055] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 본 발명은 암치료에서, 더욱 구체적으로는 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 신장암, 백혈병 및 림프종으로부터 선택된 암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 ET-743 (트라벡테딘(trabectedin))의 조합에 관한 것이다.

[0056] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 더욱 구체적으로 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 유방암, 결장직장암, 신장암, 뇌암, 백혈병 및 림프종으로부터 선택된 암의 치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 PM02734의 조합에 관한 것이다.

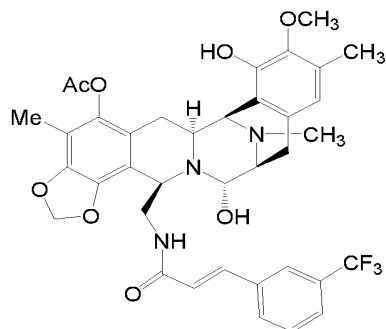
[0057] PM02734 ((4S)-MeHex-D-Val-L-Thr-L-Val-D-Val-D-Pro-L-Orn-D-알로-Ile-사이클로(D-알로-Thr-D-알로-Ile-D-Val-L-Phe-Z-Dhb-L-Val))는 카할라리드(kahalalide) 화합물 과에 관련된 합성 펩티다이드로, 이는 암 치료에 현재 임상 시험중에 있다. 이 화합물은 WO 2004/035613호의 주제로, 하기 구조를 갖는다:



[0058]

[0059] 또다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서, 더욱 구체적으로 폐암, 육종, 악성 흑색종, 전립선암, 췌장 암종, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 신장암, 백혈병 및 림프종으로부터 선택된 암의 치료에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 PM00104과의 조합에 관한 것이다.

[0060] PM00104는 조루마이신(jorumycin) 및 니에라마이신(nieramycins)에 관련되고, 또한 사프라신(safracin) 및 사프라마이신(saframycin) 화합물에도 관련된 합성 알칼로이드로, 이는 현재 암 치료를 위한 임상 시험 중에 있고, 하기 구조를 갖는다:



[0061]

[0062] PM00104에 대한 더욱 상세한 내용은 WO 01/87894 참조.

[0063] 본 발명은 본 명세서에서 언급된 임의의 약물의 임의의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하며, 이는 이전에 개시된 것과 같은 통상의 화학적 방법에 의하여 부모 화합물로부터 합성될 수 있다.

[0064] 한 구체예에서, 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과, 상기 제공된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물을 사용하는 상승작용적인 조합에 관한 것이다. 상승작용의 표지는 그 조합물을 시험하고 결과를 분석함으로써 수득될 수 있는데, 예로서 코우-탈랄레이(Chou-Talalay) 방법 또는 하기 실시예 부분에서 제공된 것과 같은, 임의의 기타 적합한 방법에 의하여 수득될 수 있다.

- [0065] 상승작용의 가능한 유리한 성과로는 다음이 포함된다: 1) 치료 효과의 효능 증가, 2) 동일 효능은 증가 또는 유지시키면서 독성을 회피하기 위하여 투약량은 감소, 3) 약물 내성의 발생을 최소화 또는 완화, 및 4) 타겟 (효능 상승작용) 대 숙주 (독성 안타고니즘)에 대한 선택적 상승작용을 제공. 이에 따라, 상승작용성을 갖는 2개의 화학치료제의 조합에서, 치료 섭생은 2개의 약물의 조합이 부가적인 효과만을 나타내는 경우와는 상이할 것이다. 이에 관하여, 상승작용이 있는 경우, 동일하거나 더욱 큰 효능을 수득하는데 약제 중 하나 또는 둘 모두 더 적은 투약량 (단일 치료에서 사용되는 양에 비교하여)이 요구될 수 있으며, 가능한 독성 부작용은 감소되거나 또는 회피될 수 있다. 대안적으로, 조합되는 두 약물의 투약량이 단독의 경우(단일 약제로서)와 동일한 경우, 조합물의 효능에서의 증가가 예상된다. 따라서, 제공된 약물 조합물에서의 상승작용의 존재는 치료 및/또는 치료 섭생의 길이를 변형시킬 것이다.
- [0066] 또다른 구체예에서, 본 발명은 암 치료에서 상기 나타낸 약물의 리스트로부터 항암 약물의 치료 효능을 증가 또는 강화시키는 방법에 관한 것으로, 이는 치료를 필요로 하는 환자에게 치료유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이러한 다른 항암 약물과 함께 투여하는 것을 포함한다. 치료 효능의 증가 또는 강화의 표시는 조합물을 시험하고, 예로서 종양 성장 억제제를 결과를 분석함으로써 수득될 수 있다. 이러한 종양 성장 억제제는 2개의 약물(PM01183 및 기타 약물)을 조합한 치료의 평균 종양 부피를 다른 약물 단일치료 방법에서의 약물들과 비교함으로써 평가할 수 있다. 이와 관련하여, 병용치료의 반응이, 병용치료에서 사용된 것과 동일한 스케줄 및 투여량에서, 단일 약제로서 투여(단일치료)된 가장 유효한 약물의 최상의 반응보다 더 큰 경우, 치료 효능이 증가 또는 강화된 것으로 판단된다. 본 발명의 이러한 측면은 실시예 부분, 특히 실시예 13~19에서 더욱 상술된다.
- [0067] 또다른 측면에서, 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과 조합함으로써, 암 치료용 의약 제조에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 이용에 관한 것이다.
- [0068] 추가의 측면에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료유효량의 PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을, 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과 조합하여 투여하는 것을 포함하는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0069] 또다른 측면에서, 본 발명은 치료유효량의 PM01183 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을, 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 치료유효량의 또다른 항암 약물과 조합하여 투여하는 것을 포함하는 암 치료방법에서의 용도를 위한, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.
- [0070] 본 발명에 따라, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 기타 항암 약물은, 동시에 또는 상이한 시점에서의 투여를 위해 동일한 의약으로 또는 별개의 의약으로 제공될 수 있다. 바람직하게는, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 기타 항암 약물은 상이한 시점에서의 투여를 위해 별개의 의약으로 제공된다. 별도로 상이한 시점에 투여되는 경우, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 다른 항암 약물 중 하나가 먼저 투여될 수 있다. 추가적으로, 두 약물 모두 동일한 일자 또는 상이한 일자에 투여될 수 있으며, 이들은 치료 사이클 동안 동일한 스케줄 또는 상이한 스케줄을 이용하여 투여될 수 있다. 추가적으로, 두 약물 모두의 투여는 동일하거나 또는 상이한 경로를 이용하여 수행될 수 있다. 예로서, 두 약물 모두 정맥 투여에 의하여 투여될 수 있거나 또는 다르게는 하나의 약물을 경구투여하고 다른 하나는 정맥 투여에 의하여 투여할 수 있다.
- [0071] 따라서, 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 1회 제형 중에 모든 성분들 (약물들)을 포함할 수 있거나, 또 다르게는 성분들은 분리 조제되어 서로 조합하여 투여될 수 있다. 각종 약학적으로 허용가능한 제제는 당 기술분야에 공지이며, 본 발명에서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에서의 이용을 위한 적절한 제형의 선택은, 당업자가 투여 경로 및 조성물의 성분들의 용해도 특성을 고려함으로써 수행될 수 있다.
- [0072] 조합되는 두 약물의 정확한 투약량은 특정 제형, 적용 방식 및 치료되는 특정 위치, 환자 및 종양에 따라 변화할 것이다. 연령, 체중, 성별, 식이, 투여 시기, 배출율, 환자 상태, 기타 약물 병용, 반응 민감도 및 질병의 심각도와 같은 다른 인자들이 고려될 수 있을 것이다. 투여는 최대내약용량(maximum tolerated dose) 내에서 연속적으로 또는 주기적으로 실시될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 조합은 단독으로 또는 하나 이상의 각종 항암제 또는 보조치치제(supportive care agents)와 조합되어 사용될 수 있다.
- [0074] 추가적으로, 종양 유형 및 질병의 발생 단계에 따라, 본 발명의 치료의 항암 효과는, 이에 제한되지는 않지만

종양 성장의 억제, 종양 성장 지연, 종양 퇴화, 종양 수축, 치료 정지시 종양의 재성장에 걸리는 시간의 증가, 질병 진전의 둔화, 및 전이의 예방을 포함한다. 치료를 필요로 하는 환자, 예컨대 인간 환자에게 본 발명의 치료가 적용되는 경우, 상기 치료는 예로서 항암 효과의 정도, 반응속도, 질병 진전 시간, 또는 생존율에 의해 측정되는 바와 같은 효과를 생성할 것임이 예측된다. 특히, 본 발명의 치료는, 인간 환자 특히 재발 환자 또는 이전의 화학치료에 대한 반응이 없는 환자들에게 적합하다. 제 1선의 치료도 구상된다.

[0075] 또다른 측면에서, 본 발명은 적어도 한 사이클을 위한 투약 단위의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 공급물, 및 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과의 조합된 이용에 대한 지시사항 인쇄물을 포함하는 암치료용 키트에 관한 것이다.

[0076] 관련 측면에서, 본 발명은 암치료용 키트에 관한 것으로, 적어도 하나의 사이클을 위한 투약 단위의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 공급물, 적어도 하나의 사이클을 위한 투약 단위의 상기 제시된 약물의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물, 및 이들 두 약물들 모두의 조합된 이용에 대한 지시사항 인쇄물을 포함하는 암치료용 키트에 관한 것이다.

[0077] 또다른 측면에서, 본 발명은 암치료에서 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과의 조합 이용을 위한, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물도 제공한다.

[0078] 추가의 측면에서, 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물, 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물도 제공한다. 이러한 약학 조성물은 암 치료에서의 용도에 바람직하다.

[0079] 또다른 측면에서, 본 발명은 암치료에서 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과 조합된 이용을 위한 조성물의 제조에서의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 더욱 제공한다.

[0080] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과의 병용요법에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 암치료용 용도를 더 제공한다.

[0081] 한 구체예에서, 암세포는 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물의 조합물과 접촉되거나 그렇지 않으면 이들로 처리된다. 암세포는 바람직하게는 인간이며, 암종 세포, 육종 세포, 백혈병 세포, 림프종 세포 및 골수종 세포를 포함한다. 보다 바람직하게는, 암세포는 폐암, 육종, 악성 흑색종, 방광 암종, 전립선암, 췌장 암종, 갑상선암, 위 암종, 난소암, 간종양, 유방암, 결장직장암, 신장암, 식도암, 신경아세포종, 뇌암, 자궁경부암, 항문암, 정소암, 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종의 세포이다. 추가적으로, 조합물은 암세포에 대한, 특히 상기 언급된 인간 암세포에 대한 상승작용적 억제 효과를 제공한다.

[0082] 예로서, 이러한 조합물은 접촉된 암세포들의 증식 또는 생존을 억제한다. 접촉되지 않은 암세포들에 비하여 접촉된 암세포의 증식 또는 생존의 더욱 낮은 수준은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물의 조합이 암환자 치료에 유효하다는 것을 뒷받침하여 주는 것이다.

[0083] 또다른 측면에서, 본 발명은 암세포와 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과 함께 유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 접촉시키는 것을 포함하는 암세포의 성장 억제방법을 제공한다.

[0084] 또다른 측면에서, 본 발명은 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물의 상승작용적 조합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는 암세포 성장 억제방법을 제공하며, 여기에서 상기 조합물은 (i) 다른 항암 약물의 부재 하의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 (ii) PM01183의 부재 하의 또다른 항암 약물에 비하여 암세포 성장에 대한 억제에 대한 증진을 제공한다.

[0085] 또다른 측면에서, 본 발명은 암세포의 성장을 억제하기 위한 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물의 상승작용적 조합물을 포함하는 약학 조성물을 제공하며, 여기에서 상기 조합물은 (i) 다른 항암 약물의 부재 하의, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 (ii) PM01183의 부재 하의, 또다른 항암 약물에 비하여 암세포 성장에 대한 억제에 대한 증진을 제공한다.

한다.

- [0086] 또다른 구체예에서, PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물의 조합물은 종양 성장을 저해하거나 또는 생체 내 종양 크기를 감소시킨다. 구체적으로, 상기 조합물은 암종, 육종, 백혈병, 림프종 및 골수종의 생체 내 성장을 억제 및/또는 크기를 감소시킨다. 바람직하게는, 상기 조합물은 폐, 육종, 악성 흑색종, 방광, 전립선, 췌장, 갑상선, 위장, 난소, 간종양, 유방, 결장직장, 신장, 식도, 신경아세포종, 뇌, 자궁경부, 항문, 정소, 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종 암종의 생체 내 종양 성장을 억제한다.
- [0087] 예로서, 이들 조합은 동물 모델에서, 종양 성장을 저해하거나 또는 인간 암 이종이식편, 특히 인간 위장, 췌장, 육종, 폐, 결장직장 및 난소 종양 이종이식편의 크기를 감소시킨다. 이들 조합물이 투여된 동물 모델에서 인간 암 이종이식편의 감소된 성장 또는 감소된 크기는 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물의 조합물이 암 환자의 치료에 유효하다는 것을 더욱 뒷받침한다.
- [0088] 따라서, 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과 함께 유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하는, 종양 크기의 감소 방법을 제공한다.
- [0089] 또다른 측면에서, 본 발명은 상기 제시된 약물들의 리스트로부터 선택된 또다른 항암 약물과 함께 유효량의 PM01183 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하는 종양 성장의 억제 방법을 제공한다.
- [0090] 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 상술한다. 이들 실시예는 본 발명의 범주를 제한하는 것으로서 해석되어서는 안된다.
- [0091] 보다 간결한 설명을 위하여, 본 명세서에서 제공된 양에 대한 몇몇 표현들은 "약"이라는 표현으로 한정되지 않는다. "약"이라는 표현이 명시적으로 사용 또는 사용되지 않은 경우에 관계없이, 본 명세서에 제시된 모든 양은 실제 제시된 값을 지칭하고 또한 이러한 제시된 값에 대한 근사값도 지칭하고자 하는 것으로 이해되어야 하며, 이는 이러한 제시된 값에 대한 실험 및/또는 측정 조건으로 인한 균등값 및 근사치를 포함하는, 당 기술분야의 일반적인 기술에 근거하여 타당하게 추론될 수 있을 것이다.
- [0093] **실시예**
- [0094] **실시예 1.** 화학치료제와 조합된 PM01183의, 인간 암종 세포주에 대한 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0095] 본 연구의 목적은 폐 암종의 치료에서 사용되는 화학치료제의 항종양 활성을 강화하는 PM01183의 능력을 결정하기 위한 것이다.
- [0096] 하기 약제들을 PM01183과 함께 평가하였다: 옥살리플라틴, 카무스틴, 시클로포스파미드, 마이토마이신 C (2회 증류시킨 멸균수 중에서 제조하고 -20℃에서 저장된 이들 화합물들의 저장 용액), 5-플루오로우라실 (5-FU), 젠시타빈, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 에토포사이드, 보테조밋, 보리노스텐, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0097] A549는 이 분석을 위해 선택된 인간 폐 암종 세포주였다. A549 세포들을 10% 우태아 혈청 (FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 둘베코 개량 이글 배지 중에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0098] 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0099] a. 첫번째 세트의 분석에서, A549 세포에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다. 간략하게는, 세포들을 수확하여, 96개 웰의 마이크로리터 플레이트에 150 μ l 중 5,000개 세포의 밀도로 접종하고, 72시간 동안 비히클 단독으로 또는 시험 화합물로 처리하기 전에 무-약물 배지 중에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0100] 세포독성 효과를 MTT 감소 분석에 의하여 측정하였으며, 여기에서 살아있는 세포의 미토콘드리아에서 보라색 포르마잔(formazan)으로 환원되는 테트라졸린 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드를 사

용하였다. MTT (50mL의 1mg/mL 저장 용액)를 웰에 추가하고, 포르마잔 결정이 형성될 때까지 37℃에서 8시간 동안 인큐베이션하였다. 배양 배지를 부드럽게 제거한 후, DMSO를 첨가하여 불용성 보라색 포르마잔 생성물을 용해시켜서 착색된 용액으로 만들었다. 웰의 흡광도를 540nm에서 광학밀도를 측정하여 정량하였다. 결과는 대조구 세포 성장의 백분율로서 나타내었다. 본 조합물 연구에 사용된 IC₅₀ 값 (50%의 세포 성장 억제제를 생성하는 약물 농도)은 Prism v5.02 소프트웨어(GraphPad)를 이용하여 계산하였다. 결과는 몰 농도로 나타내었으며, 2~4 회의 독립된 분석의 평균으로 나타내었다.

[0101] A549 종양 세포주에 대한 각각의 별개의 약제에 대한 IC₅₀ 값 (72시간의 약물 노출)을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0102]

각 약제에 대한 몰 농도 IC ₅₀ 값					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	3.60E-09	옥살리플라틴	9.00E-04	5-FU	9.23E-05
젬시타빈	2.80E-10	파클리탁셀	4.00E-08	도세탁셀	3.00E-09
빈크리스틴	2.50E-07	다우노루비신	3.55E-07	마이토마이신 C	2.49E-04
악티노마이신 D	4.70E-09	도포테칸	8.00E-07	에토포사이드	7.82E-07
보테조밋	3.10E-09	보리노스탤	6.81E-06	시클로포스파미드	1.00E-03
카무스틴	1.00E-03	다카르바진	6.00E-04	탐시폴리무스	3.29E-06
에를로티닙	1.00E-05	ET-743	2.25E-08	PM00104	7.00E-09

[0103]

b. 두번째 세트의 분석에서, A549 인간 종양 세포들을 상기 언급된 각 약제들과 함께 PM01183과 인큐베이션하였다. 앞서 수득된 IC₅₀ 값을, 각 화합물에 대한 출발 농도로서 사용하였다 (100% 농도). 초기 IC₅₀ 값(100%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 및 0%)의 백분율로서, 임의의 희석을 각 쌍의 화합물에 대하여 수행하고, 조합된 상보적인 (반대 농도) 투여-반응 곡선으로 하기와 같이 시험하였다:

PM01183의 IC ₅₀	약제의 IC ₅₀
100%	0%
75%	25%
70%	30%
60%	40%
50%	50%
40%	60%
30%	70%
25%	75%
0%	100%

[0104]

[0105]

시각적인 보조로서, 반응 값을 x-축 상에 나타낸 투여량 비와 y-축 상에 나타낸 % 반응값으로 분산 도표 상에 그래프로 나타내었다. 2개의 종말점 반응값 (예로서, 100% IC₅₀ PM01183과 100% IC₅₀ 표준 화학치료제에 대한 반응 값들)들 간에 수평선을 그렸다. 2개의 종말점에서의 반응 값들이 거의 균등한 경우, 부가의 이러한 예측된 선 초과 또는 아래에 놓인 지점들은 길항성 또는 상승작용적 약물 상호작용을 각각 나타내는 것으로서 해석될 수 있을 것이다.

[0106]

PM01183과 각각의 약물의 시험관 내 조합은, 상승작용적, 부가적 또는 길항적인 잠재능을 갖는 것이다. 종양 세포에 대한 상승작용적인 세포독성은 최적 효과이며, 또다른 약물과 PM01183의 조합이 어느 하나의 약물 단독의 경우보다 더욱 효과적이라는 것을 암시한다.

[0107]

이 분석에 따라, A549 인간 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:

[0108]

a. 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다(도 1).

[0109]

b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합 (도 2) 및 젬시타빈과 PM01183의 조합 (도 3)은 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0110]

c. 파클리탁셀과 PM01183의 조합 (도 4)은 50/50~40/60의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 도세탁셀과 PM01183의 조합은 (도 5) 75/25 및 50/50 투여량 비율에서 상승작용을 나타내었고, 빈크리스틴과 PM01183의 조합은 (도 6) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

- [0111] d. 다우노루비신 (도 7)과 PM01183, 마이토마이신 C과 PM01183 (도 8), 및 악티노마이신 D (도 9)와 PM01183의 조합은 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0112] e. 토포테칸과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타낸 한편 (도 10), 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 11) 60/40 및 25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0113] f. 보테조밋과 PM01183의 조합은(도 12) 40/60~30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0114] g. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 13) 거의 모든 투여 비율에서 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0115] h. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 14) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0116] i. 카무스틴과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 15).
- [0117] j. 다카르바진과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 16).
- [0118] k. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 (도 17) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0119] l. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 (도 18) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0120] m. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 19) 75/25~60/40 및 30/70 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0121] n. PM00104와 PM01183의 조합은 (도 20) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0122] **실시예 2.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 육종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0123] 본 연구의 목적은 육종의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0124] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이종 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 잼시타빈, 도세탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 시타라빈, 악티노마이신 D, 토포테칸, 에토포사이드, 보리노스탤, 다카르바진, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가의 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0125] A673은 본 연구를 위해 선택된 인간 횡문근 육종(rhabdomyosarcoma) 세포주였다. A673 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL 의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0126] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0127] a. 첫번째 세트의 분석에서, A673 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 각 약물에 대한 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0128] A673 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을, 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하였다.

표 2

[0129]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	2.20E-09	시스플라틴	3.03E-05	옥살리플라틴	7.80E-05
시타라빈	1.97E-07	잼시타빈	4.34E-10	도세탁셀	6.50E-10
빈크리스틴	8.60E-09	비노렐빈	5.00E-08	다우노루비신	5.20E-07
마이토마이신 C	2.99E-06	악티노마이신 D	9.56E-10	토포테칸	2.40E-08
에토포사이드	1.55E-06	보리노스탤	2.16E-06	시클로포스파미드	1.00E-03
다카르바진	3.00E-04	템시롤리무스	1.00E-06	에를로티닙	5.00E-05
아플리딘	2.16E-09	ET-743	1.90E-09	PM02734	3.60E-06
PM00104	3.00E-09				

- [0130] b. 두번째 세트의 분석에서, A673 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.
- [0131] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.
- [0132] 이 분석에 따라, A673 인간 육종 세포주에서 하기가 발견되었다:
- [0133] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합 (도 21) 및 옥살리플라틴과 PM01183의 조합 (도 22)은 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0134] b. 시타라빈과 PM01183의 조합 (도 23)은 강한 상승작용을 나타낸 한편, 켄시타빈과 PM01183의 조합은 (도 24) 75/25-70/30의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0135] c. 도세탁셀과 PM01183의 조합 (도 25), 빈크리스틴과 PM01183의 조합 (도 26) 및 비노렐빈과 PM01183의 조합 (도 27)은 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0136] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 28) 및 악티노마이신 D와 PM01183의 조합 (도 30)은 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 마이토마이신 C와 PM01183의 조합은 (도 29) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0137] e. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 31) 및 에토포사이드와 PM01183의 조합 (도 32)은 거의 모든 투여 비율에서 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0138] f. 보리노스텍과 PM01183의 조합은 (도 33) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0139] g. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 34) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0140] h. 다카르바진과 PM01183의 조합은 (도 35) 75/25-70/30 및 40/60의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0141] i. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 36).
- [0142] j. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 37).
- [0143] k. 아플리딘과 PM01183의 조합은 (도 38) 50/50-30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0144] l. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 39) 30/70-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0145] m. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 40) 75/25 및 40/60의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0146] n. PM00104과 PM01183의 조합은 상승작용을 나타내었다(도 41).
- [0147] **실시예 3.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 악성 흑색종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0148] 본 연구의 목적은 악성 흑색종의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0149] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 독소루비신, 다우노루비신, 시타라빈, 토포테칸, 이리노테칸, 메토틱세이트, 에토포사이드, 다카르바진, 템시롤리무스, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가의 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50μl의 분취액을 첨가하였다.
- [0150] SK-MEL-2는 이 분석을 위해 선택된 인간 흑색종 세포주였다. SK-MEL-2 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 최소 필수 이글 배지(MEME)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0151] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0152] a. 첫번째 세트의 분석에서, SK-MEL-2 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0153] SK-MEL-2 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한

방법을 이용하여 계산하고, 표 3에 나타내었다.

표 3

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	2.00E-09	시스플라틴	1.60E-04	5-FU	7.00E-04
시타라빈	3.89E-06	메토틱세이트	1.00E-04	다우노루비신	1.77E-07
독소루비신	3.00E-07	마이토마이신 C	9.00E-07	토포테칸	4.37E-07
이리노테칸	1.80E-05	에토포사이드	2.89E-06	다카르바진	6.30E-04
템시롤리무스	5.00E-05	ET-743	2.00E-09	PM02734	1.76E-06
PM00104	2.00E-09				

b. 두번째 세트의 분석에서, SK-MEL-2 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.

세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.

이 분석에 따라, SK-MEL-2 인간 흑색종 세포주에서 하기가 발견되었다:

a. 시스플라틴과 PM01183의 조합은 (도 42) 75/25, 50/50 및 30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합 (도 43), 시타라빈과 PM01183의 조합 (도 44), 및 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 (도 45) 강한 상승작용을 나타내었다.

c. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 46) 및 독소루비신과 PM01183의 조합 (도 47)은 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 마이토마이신 C과 PM01183의 조합은 (도 48) 강한 상승작용을 나타내었다.

d. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 49), 이리노테칸과 PM01183의 조합 (도 50), 및 에토포사이드와 PM01183의 조합 (도 51)은 상승작용을 나타내었으며, 일부 투여 비율에서는 강한 상승작용을 나타내었다.

e. 다카르바진과 PM01183의 조합은 상승작용을 나타내었다 (도 52).

f. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 53).

g. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 54) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

h. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 55) 25/75-50/50의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

i. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 56) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

실시예 4. 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 전립선 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.

본 연구의 목적은 전립선암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.

하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20°C에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 도세탁셀, 파클리탁셀, 비노렐빈, 다우노루비신, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 메토틱세이트, 에토포사이드, 보리노스텐, 템시롤리무스, 보테조밋, 에를로티닙, 플루타미드, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20°C에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.

PC-3은 본 분석을 위해 선택된 인간 전립선 선암종 세포주였다. PC-3 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 로즈웰 파크 기념 연구소 배지 (Roswell Park Memorial Institute medium: RPMI)에, 37°C, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.

[0171] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:

[0172] a. 첫번째 세트의 분석에서, PC-3 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.

[0173] PC-3 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 4에 나타내었다.

표 4

[0174]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 몰 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	2.60E-09	시스플라틴	1.10E-04	옥살리플라틴	1.71E-04
5-FU	1.00E-03	시타라빈	4.00E-05	젠타빈	4.00E-07
메토트렉세이트	1.20E-04	도세탁셀	1.86E-08	파클리탁셀	9.00E-08
비노렐빈	1.00E-05	다우노루비신	1.15E-06	독소루비신	1.48E-06
마이토마이신 C	1.00E-05	악티노마이신 D	1.00E-08	토포테칸	6.33E-07
이리노테칸	7.00E-05	에토포사이드	4.80E-05	보테조립	8.00E-07
보리노스텍	3.90E-06	플루타미드	4.90E-05	템시롤리무스	5.00E-07
에를로티닙	2.33E-04	ET-743	8.00E-09	PM02734	5.40E-07
PM00104	7.10E-09				

[0175] b. 두번째 세트의 분석에서, PC-3 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.

[0176] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.

[0177] 이 분석에 따라, PC-3 인간 전립선암 세포주에서 하기가 발견되었다:

[0178] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합은 (도 57) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 (도 58) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0179] b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합 (도 59) 및 시타라빈과 PM01183의 조합은 (도 60) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었고, 젠타빈과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 61). 마지막으로, 메토트렉세이트와 PM01183의 조합은 (도 62) 30/70-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0180] c. 도세탁셀과 PM01183의 조합은 (도 63) 거의 모든 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 파클리탁셀과 PM01183의 조합은 (도 64) 40/60-30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 비노렐빈과 PM01183의 조합은 (도 65) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0181] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 66) 및 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 67) 강한 상승작용을 나타내었다. 마이토마이신 C과 PM01183의 조합 (도 68) 및 악티노마이신 D과 PM01183의 조합은 (도 69) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0182] e. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 70) 및 이리노테칸과 PM01183의 조합은 (도 71) 강한 상승작용을 나타낸 한편, 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 72) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0183] f. 보테조립과 PM01183의 조합은 (도 73) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0184] g. 보리노스텍과 PM01183의 조합은 (도 74) 상승작용을 나타내었다.

[0185] h. 플루타미드와 PM01183의 조합은 (도 75) 40/60-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0186] i. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 76).

[0187] j. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 (도 77) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0188] k. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 78) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0189] l. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 79) 75/25-70/30 및 30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

- [0190] m. PM00104과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 80).
- [0191] **실시예 5.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 췌장 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0192] 본 연구의 목적은 췌장 암종의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0193] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 잼시타빈, 다우노루비신, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 메토틱세이트, 에토포사이드, 보리노스텍, 템시롤리무스, 보테조밋, 에클로티닙, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0194] PANC-1은 본 분석을 위해 선택된 인간 췌장 암종 세포주였다. PANC-1 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL 의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 로즈웰 파크 기념 연구소 배지 (RPMI)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0195] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0197] *a. 첫번째 세트의 분석에서, PANC-1 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0198] PANC-1 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 5에 나타내었다.

표 5

[0199]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	2.80E-09	시스플라틴	1.47E-04	옥살리플라틴	1.84E-04
시타라빈	9.00E-05	잼시타빈	1.00E-06	메토틱세이트	1.00E-05
다우노루비신	8.69E-07	독소루비신	3.45E-06	악티노마이신 D	2.20E-08
토포테칸	4.37E-06	이리노테칸	9.00E-05	에토포사이드	1.00E-05
보테조밋	4.16E-07	보리노스텍	6.05E-06	템시롤리무스	1.00E-05
에클로티닙	4.16E-07	ET-743	2.10E-08	PM02734	9.00E-06
PM00104	7.89E-09				

- [0200] b. 두번째 세트의 분석에서, PANC-1 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.
- [0201] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.
- [0202] 이 분석에 따라, PANC-1 인간 췌장 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:
- [0203] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합 (도 81) 및 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 (도 82) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0204] b. 시타라빈과 PM01183의 조합은 (도 83) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 잼시타빈과 PM01183의 조합 (도 84) 및 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 (도 85) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0205] c. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 86) 및 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 87) 상승작용을 나타낸 한편, 악티노마이신 D와 PM01183의 조합은 (도 88) 75/25 및 30/70-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0206] d. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 89) 및 이리노테칸과 PM01183의 조합은 (도 90) 강한 상승작용을 나타낸 한

편, 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 91) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

e. 보테조밋과 PM01183의 조합은 (도 92) 75/25-70/30 및 50/50의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

f. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 93) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

g. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 94).

h. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 95).

i. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 96) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

j. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 97) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

k. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 98) 75/25 및 50/50 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

실시예 6. 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 위 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.

본 연구의 목적은 위암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.

하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드 (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 다카르바진, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 메토트렉세이트, 에토포사이드, 보리노스탤, 템시롤리무스, 보테조밋, 에를로티닙, 아플리딘, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50μl의 분취액을 첨가하였다.

HGC-27은 본 분석을 위해 선택된 인간 위 암종 세포주였다. HGC-27 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 이스코브 변형 돌베코 배지(Iscove's modified Dulbecco's medium: IDMD)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.

실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:

a. 첫번째 세트의 분석에서, HGC-27 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.

HGC-27 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 6에 나타내었다.

표 6

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	8.50E-10	시스플라틴	8.00E-05	옥살리플라틴	1.06E-04
5-FU	1.00E-05	시타라빈	5.00E-05	젬시타빈	5.34E-10
메토트렉세이트	3.30E-08	파클리탁셀	5.00E-09	빈크리스틴	1.25E-08
비노렐빈	6.50E-08	다우노루비신	3.72E-07	독소루비신	5.40E-08
악티노마이신 D	3.74E-09	토포테칸	8.08E-07	이리노테칸	4.00E-06
에토포사이드	2.90E-06	보테조밋	5.60E-09	보리노스탤	1.20E-06
시클로포스파미드	1.00E-03	다카르바진	3.46E-04	템시롤리무스	1.50E-07
에를로티닙	7.50E-06	아플리딘	9.00E-09	ET-743	5.80E-09
PM02734	9.50E-07	PM00104	3.20E-09		

b. 두번째 세트의 분석에서, HGC-27 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.

세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.

- [0224] 이 분석에 따라, HGC-27 인간 위 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:
- [0225] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합은 (도 99) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 (도 100) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0226] b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합 (도 101) 및 시타라빈과 PM01183의 조합은 (도 102) 상승작용을 나타내었으며, 일부 투여 비율에서는 강한 상승작용을 나타내었다. 켄시타빈과 PM01183의 조합 (도 103) 및 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 (도 104) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0227] c. 파클리탁셀과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 105). 빈크리스틴과 PM01183의 조합 (도 106) 및 비노렐빈과 PM01183의 조합은 (도 107) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0228] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 108) 및 악티노마이신 D와 PM01183의 조합은 (도 110) 강한 상승작용을 나타내었다. 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 109) 75/25-60/40 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0229] e. 토포테칸과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 111). 이리노테칸과 PM01183의 조합은 (도 112) 70/30-60/40 및 40/60의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 113) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0230] f. 보테조밋과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 114).
- [0231] g. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 115) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0232] h. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 116).
- [0233] i. 다카르바진과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 117).
- [0234] j. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 118).
- [0235] k. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 119).
- [0236] l. 아플리딘과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 120).
- [0237] m. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 121) 50/50 및 75/25 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0238] n. PM02734과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 122).
- [0239] o. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 123) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0240] **실시예 7.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 난소 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0241] 본 연구의 목적은 난소암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0242] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드, 카무스틴, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 켄시타빈, 도세탁셀, 파클리탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 다카르바진, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 메토틱세이트, 에토포사이드, 보리노스탤, 템시롤리무스, 에를로티닙, 아플리딘, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0243] IGROV-1은 본 분석을 위해 선택된 인간 난소 선암종 세포주였다. IGROV-1 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 로즈웰 파크 기념 연구소 배지(RPMI)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0244] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0245] a. 첫번째 세트의 분석에서, IGROV-1 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0246] IGROV-1 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 7에 나타내었다.

표 7

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	3.20E-09	시스플라틴	7.00E-05	옥살리플라틴	8.50E-06
5-FU	9.00E-05	시타라빈	1.17E-05	젠타빈	6.34E-09
메토트렉세이트	1.00E-04	도세탁셀	5.01E-08	파클리탁셀	9.50E-08
빈크리스틴	3.79E-07	비노렐빈	1.39E-06	다우노루비신	3.55E-07
독소루비신	2.59E-07	악티노마이신 D	3.29E-09	마이토마이신 C	3.00E-06
토포테칸	3.00E-07	이리노테칸	1.00E-05	에토포사이드	3.06E-06
보리노스탤	2.88E-06	카무스틴	7.12E-04	시클로포스파미드	1.00E-03
다카르바진	3.98E-04	템시롤리무스	1.27E-07	에를로티닙	7.91E-06
아플리딘	1.50E-09	ET-743	6.45E-09	PM02734	3.33E-07
PM00104	3.30E-09				

[0247]

[0248]

[0249]

[0250]

[0251]

[0252]

[0253]

[0254]

[0255]

[0256]

[0257]

[0258]

[0259]

[0260]

[0261]

[0262]

[0263]

[0264]

[0265]

b. 두번째 세트의 분석에서, IGROV-1 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.

세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정하였다.

이 분석에 따라, IGROV-1 인간 난소 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:

a. 시스플라틴과 PM01183의 조합은 (도 124) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 125).

b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합 (도 126) 및 시타라빈과 PM01183의 조합은 (도 127) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 젠타빈과 PM01183의 조합 (도 128) 및 메토트렉세이트와 PM01183의 조합은 (도 129) 상승작용을 나타내었다.

c. 도세탁셀과 PM01183의 조합 (도 130), 파클리탁셀과 PM01183의 조합 (도 131), 및 빈크리스틴과 PM01183의 조합은 (도 132) 강한 상승작용을 나타낸 한편, 비노렐빈과 PM01183의 조합은 (도 133) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

d. 다우노루비신과 PM01183의 조합은 (도 134) 상승작용을 나타내었다. 독소루비신과 PM01183의 조합 (도 135) 및 악티노마이신 D와 PM01183의 조합은 (도 136) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 마이토마이신 C와 PM01183의 조합은 (도 137) 50/50 및 30/70-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

e. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 138), 이리노테칸과 PM01183의 조합 (도 139), 및 에토포사이드와 PM01183의 조합 (도 140)은 상승작용을 나타내었다.

f. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 141) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

g. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 142) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

h. 카무스틴과 PM01183의 조합은 (도 143) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

i. 다카르바진과 PM01183의 조합은 (도 144) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

j. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 상승작용을 나타내었다 (도 145).

k. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 상승작용을 나타내었다 (도 146).

l. 아플리딘과 PM01183의 조합은 (도 147) 70/30-60/40의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

m. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 148) 75/25-60/40의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

n. PM02734과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 149).

o. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 150) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

- [0266] **실시예 8.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 간세포 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0267] 본 연구의 목적은 간세포 암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0269] *하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드 (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 시타라빈, 독소루비신, 토포테칸, 이리노테칸, 메토트렉세이트, 에토포사이드, 보테조밋, 에를로티닙, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0270] HepG2는 본 분석을 위해 선택된 인간 간세포 간 암종 세포주였다. HepG2 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL 의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 최소 필수 이글 배지(MEME)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0271] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0272] a. 첫번째 세트의 분석에서, HepG2 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0273] HepG2 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 8에 나타내었다.

표 8

[0274]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	2.50E-09	시스플라틴	5.00E-05	옥살리플라틴	2.80E-05
5-FU	4.50E-06	시타라빈	2.06E-05	젬시타빈	5.34E-09
메토트렉세이트	3.96E-08	도세탁셀	5.00E-07	파클리탁셀	5.70E-08
빈크리스틴	6.00E-08	비노렐빈	1.02E-06	다우노루비신	3.00E-07
독소루비신	2.00E-07	토포테칸	1.00E-06	이리노테칸	1.00E-06
에토포사이드	1.04E-05	보테조밋	3.90E-07	시클로포스파미드	1.00E-03
에를로티닙	8.60E-06	ET-743	7.21E-09	PM00104	3.00E-09

- [0275] b. 두번째 세트의 분석에서, HepG2 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.
- [0276] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.
- [0277] 이 분석에 따라, HepG2 인간 간세포 세포주에서 하기가 발견되었다:
- [0278] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합 (도 151) 및 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 (도 152) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0279] b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합은 (도 153) 75/25, 50/50 및 30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 시타라빈과 PM01183의 조합 (도 154), 젬시타빈과 PM01183의 조합 (도 155) 및 메토트렉세이트와 PM01183의 조합은 (도 156) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0280] c. 도세탁셀과 PM01183의 조합은 (도 157) 강한 상승작용을 나타내었다. 파클리탁셀과 PM01183의 조합 (도 158) 및 빈크리스틴과 PM01183의 조합은 (도 159) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 비노렐빈과 PM01183의 조합 (도 160) 50/50 및 30/70-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0281] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 161) 및 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 162) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

- [0282] e. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 163) 및 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 165) 강한 상승작용을 나타내었다. 이리노테칸과 PM01183의 조합은 (도 164) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0283] f. 보테조밋과 PM01183의 조합은 (도 166) 75/25-60/40 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0284] g. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 167) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0285] h. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 (도 168) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0286] i. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 169) 60/40-50/50 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0287] j. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 170) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0288] **실시예 9.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 유방 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0289] 본 연구의 목적은 유방암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0290] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드, 카무스틴, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 다카르바진, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 메토트렉세이트, 에토포사이드, 보리노스탤, 템시롤리무스, 에를로티닙, 타목시펜, PM02734, ET-743 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0291] MDA-MB-231은 본 분석을 위해 선택된 인간 유방 선암종 세포주였다. MDA-MB-231 세포들을, 10% 우태아 혈청 (FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0292] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0293] a. 첫번째 세트의 분석에서, MDA-MB-231 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0294] MDA-MB-231 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 9에 나타내었다.

표 9

[0295]

각 약제에 대한 IC50 값 몰 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	3.50E-09	시스플라틴	1.53E-04	옥살리플라틴	1.08E-04
5-FU	9.00E-05	시타라빈	9.57E-06	젬시타빈	8.50E-09
메토트렉세이트	5.94E-06	도세탁셀	2.50E-09	파클리탁셀	8.50E-09
빈크리스틴	5.00E-08	비노렐빈	1.20E-05	다우노루비신	3.70E-07
독소루비신	6.00E-07	악티노마이신 D	4.54E-10	마이토마이신 C	2.00E-06
토포테칸	1.66E-07	이리노테칸	8.50E-06	에토포사이드	4.80E-06
보리노스탤	1.70E-06	시클로포스파미드	1.00E-03	카무스틴	9.00E-04
다카르바진	1.92E-05	타목시펜	1.30E-05	템시롤리무스	1.20E-05
에를로티닙	1.00E-04	ET-743	2.00E-09	PM02734	2.80E-06
PM00104	1.00E-09				

- [0296] b. 두번째 세트의 분석에서, MDA-MB-231 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.
- [0297] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.
- [0298] 이 분석에 따라, MDA-MB-231 인간 유방 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:

- [0299] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합 (도 171) 및 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 (도 172) 상승작용을 나타내었다.
- [0300] b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합은 (도 173) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 시타라빈과 PM01183의 조합 (도 174) 및 켄시타빈과 PM01183의 조합은 (도 175) 강한 상승작용을 나타낸 한편, 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 (도 176) 75/25-70/30 및 50/50의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0301] c. 도세탁셀과 PM01183의 조합 (도 177) 및 파클리탁셀과 PM01183의 조합은 (도 178) 상승작용을 나타내었다. 빈크리스틴과 PM01183의 조합은 (도 179) 75/25 및 50/50의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 비노렐빈과 PM01183의 조합은 (도 180) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0302] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 181) 및 마이토마이신 C와 PM01183의 조합은 (도 184) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 182) 강한 상승작용을 나타내었으며, 악티노마이신 D와 PM01183의 조합은 (도 183) 상승작용을 나타내었다.
- [0303] e. 토포테칸과 PM01183의 조합은 (도 185) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 이리노테칸과 PM01183의 조합 (도 186) 및 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 187) 상승작용을 나타내었다.
- [0304] f. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 188) 75/25 및 50/50-40/60의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0305] g. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 189) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0306] h. 카무스틴과 PM01183의 조합은 (도 190) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0307] i. 다카르바진과 PM01183의 조합은 (도 191) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0308] j. 타목시펜과 PM01183의 조합은 (도 192) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0309] k. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 193).
- [0310] l. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 194).
- [0311] m. ET-743과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 195).
- [0312] n. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 196) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0313] o. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 197) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0314] **실시예 10.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 결장직장 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0315] 본 연구의 목적은 결장직장암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0316] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 켄시타빈, 도세탁셀, 비노렐빈, 다우노루비신, 다카르바진, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보리노스탤, 보테조밋, 템시롤리무스, 에를로티닙, PM02734 및 아플리딘 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0317] HT-29는 본 분석을 위해 선택된 인간 결장 선암종 세포주였다. HT-29 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0318] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0319] a. 첫번째 세트의 분석에서, HT-29 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0320] HT-29 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 10에 나타내었다.

표 10

[0321]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 물 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	3.70E-09	시스플라틴	2.20E-04	옥살리플라틴	1.03E-04
5-FU	9.00E-06	시타라빈	7.80E-06	젬시타빈	4.00E-07
도세탁셀	3.20E-10	비노렐빈	3.00E-08	다우노루비신	5.32E-07
독소루비신	9.00E-07	악티노마이신 D	3.27E-09	마이토마이신 C	2.00E-06
토포테칸	3.28E-07	이리노테칸	9.00E-06	에토포사이드	5.44E-06
보테조밋	6.15E-09	보리노스탤	2.76E-06	시클로포스파미드	1.00E-03
다카르바진	2.47E-05	템시롤리무스	3.50E-06	에를로티닙	2.56E-05
아플리딘	1.76E-09	PM02734	2.14E-07		

[0322]

b. 두번째 세트의 분석에서, HT-29 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.

[0323]

세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.

[0324]

이 분석에 따라, HT-29 인간 결장직장 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:

[0325]

a. 시스플라틴과 PM01183의 조합은 (도 198) 75/25-70/30의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 옥살리플라틴과 PM01183의 조합은 (도 199) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0326]

b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합(도 200) 및 젬시타빈과 PM01183의 조합은 (도 202) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었으며, 시타라빈과 PM01183의 조합은 (도 201) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0327]

c. 도세탁셀과 PM01183의 조합 (도 203) 50/50 및 75/25의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 비노렐빈과 PM01183의 조합은 (도 204) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0328]

d. 다우노루비신과 PM01183의 조합 (도 205) 및 마이토마이신 C와 PM01183의 조합은 (도 208) 강한 상승작용을 나타내었다. 독소루비신과 PM01183의 조합 (도 206) 및 악티노마이신 D와 PM01183의 조합은 (도 207) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0329]

e. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 209) 및 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 211) 강한 상승작용을 나타내었다. 이리노테칸과 PM01183의 조합 (도 210) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0330]

f. 보테조밋과 PM01183의 조합은 (도 212) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0331]

g. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 213) 상승작용을 나타내었다.

[0332]

h. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 214) 40/60-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0333]

i. 다카르바진과 PM01183의 조합은 (도 215) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0334]

j. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 216).

[0335]

k. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다 (도 217).

[0336]

l. 아플리딘과 PM01183의 조합은 (도 218) 40/60-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0337]

m. PM02734와 PM01183의 조합은 (도 219) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0338]

실시예 11. 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 신장 암종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.

[0339]

본 연구의 목적은 신장암의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.

[0340]

하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 시클로포스파미드, 마이토마이신 C (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 메토

트렉세이트, 도세탁셀, 빈크리스틴, 비노렐빈, 다우노루비신, 다카르바진, 시타라빈, 독소루비신, 악티노마이신 D, 토포테칸, 이리노테칸, 에토포사이드, 보리노스탤, 에를로티닙, PM02734, ET-743, PM00104 및 아플리딘 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.

[0341] RXF-393은 본 분석을 위해 선택된 인간 신장 암종 세포주였다. RXF-393 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 로즈웰 파크 기념 연구소 배지 (RPMI)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.

[0342] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:

[0343] a. 첫번째 세트의 분석에서, RXF-393 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.

[0344] RXF-393 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 11에 나타내었다.

표 11

[0345]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	5.00E-09	시스플라틴	6.67E-05	5-FU	3.00E-04
시타라빈	5.00E-05	젠타빈	5.00E-07	메토틱세이트	1.75E-04
도세탁셀	5.94E-10	빈크리스틴	1.73E-08	비노렐빈	8.50E-06
다우노루비신	6.20E-07	독소루비신	8.00E-07	악티노마이신 D	7.09E-10
마이토마이신 C	9.00E-06	토포테칸	3.93E-07	이리노테칸	1.40E-05
에토포사이드	2.00E-05	보리노스탤	4.10E-06	시클로포스파미드	1.00E-03
다카르바진	7.94E-04	에를로티닙	4.80E-06	아플리딘	1.50E-09
ET-743	9.60E-09	PM02734	5.00E-06	PM00104	5.40E-09

[0346] b. 두번째 세트의 분석에서, RXF-393 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.

[0347] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의하여 측정되었다.

[0348] 이 분석에 따라, RXF-393 인간 신장 암종 세포주에서 하기가 발견되었다:

[0349] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합 (도 220) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0350] b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합(도 221), 시타라빈과 PM01183의 조합 (도 222), 젠타빈과 PM01183의 조합 (도 223), 및 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 (도 224) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0351] c. 도세탁셀과 PM01183의 조합 (도 225), 빈크리스틴과 PM01183의 조합 (도 226) 및 비노렐빈과 PM01183의 조합은 (도 227) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0352] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합은 (도 228) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 229) 75/25-60/40의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편 악티노마이신 D와 PM01183의 조합은 (도 230) 75/25-70/30 및 30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다. 마이토마이신 C와 PM01183의 조합은 (도 231) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0353] e. 토포테칸과 PM01183의 조합은 (도 232) 강한 상승작용을 나타내었다. 이리노테칸과 PM01183의 조합은 (도 233) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 234) 75/25 및 40/60-30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0354] f. 보리노스탤과 PM01183의 조합은 (도 235) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

- [0355] g. 시클로포스파미드와 PM01183의 조합은 (도 236) 75/25-70/30 및 25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0356] h. 다카르바진과 PM01183의 조합은 (도 237) 60/40-50/50의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0357] i. 에를로티닙과 PM01183의 조합은 강한 상승작용을 나타내었다 (도 238).
- [0358] j. 아플리딘과 PM01183의 조합은 (도 239) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0359] k. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 240) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0360] l. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 241) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0361] m. PM00104과 PM01183의 조합은 (도 242) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0362] **실시예 12.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 교묘세포종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.
- [0363] 본 연구의 목적은 교묘세포종의 치료에 사용된 화학치료제의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 측정하고자 하는 것이었다.
- [0364] 하기 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 시스플라틴, 옥살리플라틴 (이들 화합물들의 저장 용액을 멸균 이중 증류수 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다), 5-플루오로우라실, 젬시타빈, 도세탁셀, 빈크리스틴, 다우노루비신, 다카르바진, 독소루비신, 토포테칸, 이리노테칸, 메토트렉세이트, 에토포사이드, 보리노스탤, 템시롤리무스, 보테조밋, 에를로티닙, PM02734, ET-743 및 아플리딘 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.
- [0365] U87-MG는 본 분석을 위해 선택된 인간 교묘세포종 세포주였다. U87-MG 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 최소 필수 이글 (MEME)에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.
- [0366] 실시예 1에 개시된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:
- [0367] a. 첫번째 세트의 분석에서, U87-MG 종양 세포주에서 72시간의 약물 노출 후 IC₅₀ 값을 측정하였다.
- [0368] U87-MG 종양 세포주에 대한 각각의 개별적인 약제의 IC₅₀ 값 (약물 노출 72시간)을 실시예 1에 개시된 동일한 방법을 이용하여 계산하고, 표 12에 나타내었다.

표 12

[0369]

각 약제에 대한 IC ₅₀ 값 및 농도 (M)					
화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)	화합물	IC ₅₀ (M)
PM01183	4.50E-09	시스플라틴	4.40E-05	옥살리플라틴	1.90E-04
5-FU	1.00E-03	젬시타빈	4.50E-07	메토트렉세이트	5.00E-05
도세탁셀	1.00E-07	빈크리스틴	1.00E-07	다우노루비신	2.84E-07
독소루비신	3.00E-07	토포테칸	7.50E-07	이리노테칸	7.54E-06
에토포사이드	1.85E-05	보테조밋	4.00E-07	보리노스탤	1.60E-05
다카르바진	7.00E-04	템시롤리무스	3.50E-06	에를로티닙	1.49E-04
아플리딘	3.80E-09	ET-743	5.00E-09	PM02734	4.08E-06

- [0370] b. 두번째 세트의 분석에서, U87-MG 인간 종양 세포를, 실시예 1에 설명된 것과 같은 독특한 IC₅₀ 농도의 동일한 조합으로 상기 언급된 약제 각각과 조합하여 PM01183과 함께 인큐베이션하였다.
- [0371] 세포 배양물 및 세포 도말은 앞에서 설명된 것과 같이 수행되었으며, 세포독성 효과는 실시예 1에 개시된 것과 같은 MTT 분석에 의해서도 측정되었다.
- [0372] 이 분석에 따라, U87-MG 인간 교묘세포종 세포주에서 하기가 발견되었다:
- [0373] a. 시스플라틴과 PM01183의 조합은 (도 243) 70/30 및 50/50의 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 옥살리

플라틴과 PM01183의 조합은 (도 244) 강한 상승작용을 나타내었다.

- [0374] b. 5-플루오로우라실과 PM01183의 조합(도 245) 및 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 (도 247) 상승작용을 나타내었다. 켄시타빈과 PM01183의 조합은 (도 246) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0375] c. 도세탁셀과 PM01183의 조합 (도 248) 및 빈크리스틴과 PM01183의 조합은 (도 249) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0376] d. 다우노루비신과 PM01183의 조합은 (도 250) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타낸 한편, 독소루비신과 PM01183의 조합은 (도 251) 75/25 및 60/40의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0377] e. 토포테칸과 PM01183의 조합 (도 252) 및 에토포사이드와 PM01183의 조합은 (도 254) 강한 상승작용을 나타내었다. 이리노테칸과 PM01183의 조합은 (도 253) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0378] f. 보테조밋과 PM01183의 조합은 (도 255) 거의 모든 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0379] g. 보리노스맷과 PM01183의 조합은 (도 256) 강한 상승작용을 나타내었다.
- [0380] h. 다카르바진과 PM01183의 조합은 (도 257) 상승작용을 나타내었다.
- [0381] i. 템시롤리무스와 PM01183의 조합은 (도 258) 50/50 및 30/70의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0382] j. 예를로티닙과 PM01183의 조합은 (도 259) 40/60-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.
- [0383] k. 아플리딘과 PM01183의 조합은 (도 260) 50/50-25/75의 투여 비율에서 상승작용을 나타내었다.

[0385] *m. ET-743과 PM01183의 조합은 (도 261) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0386] l. PM02734과 PM01183의 조합은 (도 262) 강한 상승작용을 나타내었다.

[0387] **실시예 13.** 파클리탁셀, 비노렐빈 및 독소루비신과 조합된 PM01183의 인간 난소 종양 이종이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체 내 연구.

[0388] 본 연구의 목적은 인간 난소 암종의 이종이식 모델을 이용하여 파클리탁셀, 비노렐빈 및 독소루비신의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 평가하고자 하는 것이었다.

[0389] 모든 실험들에 암컷 무흉선 누드 마우스들(athymic nude mice) (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23℃ 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.

[0390] 이들 연구에 사용된 종양 모델은 A2780 세포주였으며, 이는 유럽 균주보관소 (European Collection of Cell Cultures) (ECACC 번호. 93112519)로부터 수득하였다.

[0391] A2780 세포들을 RPMI-1640 배지 중에서 37℃, 5% CO₂에서 생장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 오른쪽 옆구리 상에 피하주사로, 항생제 없이 50% 매트릭젤(Matrigel) 및 50% 무혈청 배지의 0.05mL 현탁액 중의 1x10⁷의 A2780 세포들 (PM01183과 독소루비신 및 PM01183과 비노렐빈 연구에서 시험관 내 5계대로부터; 및 PM01183과 파클리탁셀 연구에서 9 계대)로 임플란트되었다.

[0392] 종양 측정은 전자식 캘리퍼(digital caliper) (Fowler Sylvac, S235PAT)를 이용하여 측정하였다. 폭이 퍼진 타원체에 대한 부피 계산 식을 사용하여 2-차원 종양 측정으로부터 종양 부피 (mm³)를 추정하는데 사용하였다: 종양 부피 (mm³) = [L × W²] ÷ 2, (식 중, L은 길이로, mm의 최장 직경, 및 W는 폭으로, 종양의 mm로 최단 직경이다). 유닛 밀도를 추정하여, 부피를 중량으로 전환하였다(즉, 1 mm³ = 1 mg). 종양 부피 및 동물 체중을, 치료 첫날(0일)부터 출발하여 주 당 2-3 회 측정하였다.

[0393] 체중 변화(evolution), 임상적 징후, 및 주사 부위에서의 국소적 손상의 흔적을 모니터링함으로써 치료 내성(tolerability)을 평가하였다.

- [0394] 종양이 PM01183과 파클리탁셀의 연구에서 약 195 mm^3 의 부피, PM01183과 비노렐빈의 연구에서 약 158 mm^3 및 PM01183과 독소루비신의 연구에서 약 163.5 mm^3 에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (NewLab Oncology Software: 버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정치에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).
- [0395] PM01183은 PM01183의 동결건조박의 바이알(vials) 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를 0.2 mg/mL 로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 독소루비신은 독소루비신 HCl을 포함한 고체 분말 형태로 제공되었으며, 이는 0.9% 식염수 중에 재구성하였다. 비노렐빈은 제품을 0.9% 식염수로 희석하여 제조된 용액으로서 제공되었다. 파클리탁셀은 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 표적 최종 농도로 희석하여 제조된 용액의 형태로 제공되었다.
- [0396] 이들 실험에서, PM01183과 파클리탁셀, PM01183과 비노렐빈 및 PM01183과 독소루비신 처리, 및 위약을 주 당 1 회 연속 2주까지 0일 및 7일에 정맥주사 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.
- [0397] 처리군 (T)에서 종양 부피 중앙값을 대조군에서의 종양 부피 중앙값에 대한 비교 ($T/C \times 100\%$)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용은 조합군의 반응이, 병용요법에서 사용된 것들과 동일한 스케줄 및 투여량으로 단일 약제(단일요법)로서 투여된 가장 활성이 좋은 약제의 최상의 반응보다 컸다.
- [0398] 최종적으로, 약물 상호작용을 정량적으로 측정하는 조합 지수(combination index: CI)는 중앙값-효과 원리를 이용하여, 최종 측정일(PM01183과 파클리탁셀 조합 연구의 경우, 및 PM01183과 독소루비신 연구의 경우 10일, 및 PM01183과 비노렐빈 연구의 경우 9일)에 각 시험군에 대한, 치료에 의해 영향받은 분획 F_a ($1-T/C$ 로서 정의됨)로부터 수득하였다(Chou T.C. Pharmacol. Rev. 2006, 58, 621~681).
- [0399] 표 13은 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 파클리탁셀 모두를 이용하여 수득된 % T/C 값을 보고하며, 도 263은 위약, PM01183, 파클리탁셀, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 A2780 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 13

[0400]

			일자에 따른 % T/C				
군	투여량	시험재료	0	3	5	7	10
G01 (대조군)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	101.6	68.9	83.1	69.1	52.8
G03	0.135 mg/kg	PM01183	101.2	89.9	99.8	84.5	61.2
G04	0.09 mg/kg	PM01183	94.2	88.5	114.1	103.3	88.0
G05	0.045 mg/kg	PM01183	94.0	91.1	99.6	88.0	73.1
G06	25 mg/kg	파클리탁셀	95.3	49.3	42.9	34.0	19.8
G07	18.75 mg/kg	파클리탁셀	95.0	60.4	43.2	41.5	31.1
G08	12.5 mg/kg	파클리탁셀	96.2	62.5	73.9	62.5	50.8
G09	6.25 mg/kg	파클리탁셀	94.3	60.2	79.7	81.3	59.2
G10	0.18 mg/kg	PM01183	93.3	45.9	28.8	20.9	9.2
	25 mg/kg	파클리탁셀					
G11	0.135 mg/kg	PM01183	93.4	40.5	37.1	36.0	22.6
	18.75 mg/kg	파클리탁셀					
G12	0.09 mg/kg	PM01183	96.5	64.3	67.7	73.2	49.0
	12.5 mg/kg	파클리탁셀					
G13	0.045 mg/kg	PM01183	96.2	78.6	89.1	91.1	77.2
	6.25 mg/kg	파클리탁셀					

[0401] 위약: 100 mg 수크로오스 + 인산2수소칼륨 6.8 mg + 인산 충분량을 포함하는 동결건조박, pH 3.8~4.5, 이는 주입을 위해 1 mL 물로 재구성됨.

[0402] 표 14는 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 비노렐빈 모두를 이용하여 수득된 %

T/C 값을 보고하며, 도 264는 위약, PM01183, 비노렐빈, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 A2780 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 14

		일자에 따른 % T/C					
군	투여량	시험 재료	0	2	5	7	9
G01 (대조구)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	98.9	101.6	72.2	61.3	62.8
G03	0.135 mg/kg	PM01183	98.3	105.3	77.2	79.1	78.7
G04	0.09 mg/kg	PM01183	98.0	88.6	61.2	87.6	94.5
G05	0.045 mg/kg	PM01183	97.8	107.5	93.6	92.5	97.1
G06	16.0 mg/kg	비노렐빈	99.0	62.5	20.8	24.5	20.0
G07	12.0 mg/kg	비노렐빈	97.4	67.2	39.1	43.0	36.1
G08	8.0 mg/kg	비노렐빈	97.6	79.5	45.0	54.2	47.9
G09	4.0 mg/kg	비노렐빈	97.2	88.6	69.3	81.7	77.3
G10	0.18 mg/kg 16.0 mg/kg	PM01183 비노렐빈	97.3	50.1	10.9	10.6	8.6
G11	0.135 mg/kg 12.0 mg/kg	PM01183 비노렐빈	97.2	74.0	29.6	31.2	26.8
G12	0.09 mg/kg 8.0 mg/kg	PM01183 비노렐빈	96.8	69.3	48.3	56.5	49.8
G13	0.045 mg/kg 4.0 mg/kg	PM01183 비노렐빈	97.1	85.6	61.7	74.2	81.6

위약: 표 13에 개시된 것과 같다.

표 15는 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 독소루비신 모두를 이용하여 획득된 % T/C 값을 보고하며, 도 265는 위약, PM01183, 독소루비신, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 A2780 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 15

		일자에 따른 % T/C					
군	투여량	시험재료	0	3	5	7	10
G01 (대조구)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100.9	70.2	68.5	69.3	62.1
G03	0.135 mg/kg	PM01183	102.2	82.4	86.6	89.2	82.4
G04	0.09 mg/kg	PM01183	100.2	93.3	95.2	93.5	87.7
G05	0.045 mg/kg	PM01183	100.1	98.2	98.6	97.7	90.0
G06	8.0 mg/kg	독소루비신	99.5	60.8	49.8	48.1	39.4
G07	6.0 mg/kg	독소루비신	99.4	71.0	60.3	56.8	54.3
G08	4.0 mg/kg	독소루비신	102.0	82.9	75.1	75.0	68.9
G09	2.0 mg/kg	독소루비신	99.8	91.5	93.1	94.2	86.2
G10	0.18 mg/kg 8.0 mg/kg	PM01183 독소루비신	99.7	47.6	32.6	30.3	21.1
G11	0.135 mg/kg 6.0 mg/kg	PM01183 독소루비신	100.6	67.0	54.9	53.9	44.9
G12	0.09 mg/kg 4.0 mg/kg	PM01183 독소루비신	98.3	74.7	69.0	63.1	64.4
G13	0.045 mg/kg 2.0 mg/kg	PM01183 독소루비신	98.1	83.1	86.6	78.1	79.2

- [0407] 위약: 표 13에 개시된 것과 같다
- [0408] 이들 분석에 따라, 하기가 발견되었다:
- [0409] a. PM01183과 파클리탁셀의 조합 치료는 A2780 난소 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 최고-투여량 군에서 9.2% 및 22.6% (10일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 파클리탁셀의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(25 mg/kg 및 18.75 mg/kg 투여량에서의 파클리탁셀). 구체적으로, 조합물 (25 mg/kg 파클리탁셀 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 파클리탁셀 단독 (25 mg/kg 파클리탁셀)의 TC (%) 값은 28.8 대 42.9 (5일), 20.9 대 34.0 (7일), 및 9.2 대 19.8 (10일)이고, 조합물 (18.75 mg/kg 파클리탁셀 + 0.135 mg/kg PM01183) 대 파클리탁셀 단독 (18.75 mg/kg 파클리탁셀)의 TC (%) 값은 37.1 대 43.2 (5일), 36.0 대 41.5 (7일), 및 22.6 대 31.1 (10일)이었다. 따라서, PM01183이 파클리탁셀과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.
- [0410] 추가적으로, 증양값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 파클리탁셀의 조합은 1 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.8 초과 Fa에서), 이는 난소 A2780 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.
- [0411] b. PM01183과 비노렐빈의 조합 치료는 A2780 난소 세포들의 성장의 저해에 효과적이며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 8.6% 및 26.8% (9 일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 비노렐빈의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다 (16 mg/kg 및 12 mg/kg 투여량에서의 비노렐빈). 구체적으로, 조합물 (16 mg/kg 비노렐빈 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 비노렐빈 단독 (16 mg/kg 비노렐빈)의 TC (%) 값은 10.9 대 20.8 (5 일), 10.6 대 24.5 (7 일), 및 8.6 대 20.0 (9 일)이었고, 조합물 (12 mg/kg 비노렐빈 + 0.135 mg/kg PM01183) 대 비노렐빈 단독 (12 mg/kg 비노렐빈)의 TC (%) 값은 29.6 대 39.1 (5 일), 31.2 대 43 (7 일), 및 26.8 대 36.1 (9일) 이었다. 따라서, PM01183이 비노렐빈과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.
- [0412] 추가적으로, 증양값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 비노렐빈의 조합은 0.75 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.97 초과 Fa에서), 이는 난소 A2780 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서 상승작용을 나타내는 것이다.
- [0413] c. PM01183과 독소루비신의 조합 치료는 A2780 난소 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 21.1% 및 44.9% (10일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 독소루비신의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다 (8 mg/kg 투여량에서의 독소루비신). 구체적으로, 조합물(8 mg/kg 독소루비신 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 독소루비신 단독 (8 mg/kg 독소루비신)의 TC (%) 값은 32.6 대 49.8 (5 일), 30.3 대 48.1 (7 일), 및 21.1 대 39.4 (10일)이었다. 따라서, PM01183이 독소루비신과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.
- [0414] 추가적으로, 증양값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 독소루비신의 조합은 1 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.8 초과 Fa에서), 이는 난소 A2780 이종이식된 종양을 포함한 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.
- [0415] **실시예 14.** 시스플라틴 및 5-플루오로우라실과 조합된 PM01183의 인간 위 종양 이종이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체 내 연구.
- [0416] 본 연구의 목적은 인간 위 암종의 이종이식 모델을 이용하여 시스플라틴 및 5-플루오로우라실의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 평가하고자 하는 것이었다.
- [0417] 암컷 무흉선 누드 마우스들 (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23°C 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.
- [0418] 이들 연구에 사용된 종양 모델은 HGC-27 세포주였으며, 이는 유럽 균주보관소 (ECACC 번호. 94042256)로부터 수득하였다.

- [0419] HGC-27 세포들을 37℃, 5% CO₂ 하, 이스코브 변형 돌베코 배지 (IDMD)에서 생장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 오른쪽 옆구리 상에 피하주사로, 항생제 없이 50% 마트리젤 및 50% 무혈청 배지의 0.05mL 현탁액 중의 5x10⁶ HGC-27 세포들 (시험관 내, PM01183과 시스플라틴 연구에서 4세대 및 PM01183과 5-플루오로우라실 연구에서 6세대; 및 PM01183과 파클리탁셀 연구에서 9 계대로부터)로 임플란트되었다.
- [0420] 실시예 13에 개시된 것과 같이, 종양 측정 및 치료 내성을 수행하고 결정하였다.
- [0421] 종양이 PM01183과 시스플라틴의 연구에서 약 165.5 mm³의 부피 및 PM01183과 5-플루오로우라실의 연구에서 약 170 mm³에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).
- [0422] PM01183은 PM01183 동결건조박의 바이알 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를 0.2 mg/mL로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 시스플라틴 및 5-플루오로우라실은 제품을 주사를 위해 0.9%의 식염수로 희석하여 표적 최종 농도로 희석하여 제조된 용액의 형태로 제공되었다.
- [0423] 이들 실험에서, PM01183과 시스플라틴 및 PM01183과 5-플루오로우라실 처리, 및 위약을 주 당 1회 연속 2주 까지 0일 및 7일에 정맥주사 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.
- [0424] 처리군 (T)에서 종양 부피 중앙값을 대조군에서의 종양 부피 중앙값에 대한 비교 (T/C x 100%)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용 및 조합 지수 (CI)는 실시예 13에 개시된 것과 같이 결정하였다.
- [0425] 표 16은 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 시스플라틴 모두를 이용하여 수득된 % T/C 값을 보고하며, 도 266은 위약, PM01183, 시스플라틴, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 HGC-27 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 16

[0426]

			일자에 따른 % T/C						
군	투여량	시험재료	0	3	5	7	10	12	14
G01 (대조군)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	99.6	65.9	55.6	38.7	33.5	24.3	24.3
G03	0.135 mg/kg	PM01183	97.9	71.6	59.9	47.8	39.3	37.1	38.3
G04	0.09 mg/kg	PM01183	98.6	67.5	67.9	66.1	70.2	60.3	65.0
G05	0.045 mg/kg	PM01183	98.9	85.9	83.1	92.1	76.4	81.6	88.5
G06	6.0 mg/kg	시스플라틴	97.7	76.1	79.0	75.1	64.4	61.3	72.7
G07	4.5 mg/kg	시스플라틴	98.5	90.5	94.5	90.2	75.7	73.7	81.1
G08	3.0 mg/kg	시스플라틴	99.0	78.6	80.0	78.7	81.3	82.8	85.1
G09	1.5 mg/kg	시스플라틴	99.3	78.1	78.8	82.6	83.5	86.6	89.9
G10	0.18 mg/kg	PM01183	95.7	55.0	42.4	22.3	12.9	7.6	4.6
	6.0 mg/kg	시스플라틴							
G11	0.135 mg/kg	PM01183	99.2	67.7	42.7	28.6	17.3	12.1	9.8
	4.5 mg/kg	시스플라틴							
G12	0.09 mg/kg	PM01183	99.9	80.0	64.3	45.7	47.2	42.4	56.7
	3.0 mg/kg	시스플라틴							
G13	0.045 mg/kg	PM01183	99.9	93.3	83.0	75.9	69.3	70.3	80.0
	1.5 mg/kg	시스플라틴							

[0427]

위약: 표 13에 개시된 것과 같다

[0428]

표 17은 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 5-플루오로우라실 모두를 투여하여 수득된 % T/C 값을 보고하며, 도 267은 위약, PM01183, 5-플루오로우라실, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 HGC-27 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 17

군	투여량	시험재료	일자에 따른 % T/C						
			0	2	5	7	9	12	14
G01 (대조구)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	99.6	78.6	50.9	43.3	41.0	33.0	29.2
G03	0.135 mg/kg	PM01183	100.2	81.5	58.7	61.4	60.2	54.6	55.1
G04	0.09 mg/kg	PM01183	100.6	90.5	87.6	83.4	82.6	76.7	67.7
G05	0.045 mg/kg	PM01183	99.9	84.3	103.2	104.6	103.5	101.6	85.0
G06	50.0 mg/kg	5-플루오로우라실	100.3	81.2	82.3	81.1	75.6	69.6	60.7
G07	37.5 mg/kg	5-플루오로우라실	99.4	86.9	86.9	78.6	73.2	76.7	83.1
G08	25.0 mg/kg	5-플루오로우라실	100.6	89.8	97.0	111.4	102.6	93.9	82.8
G09	12.5 mg/kg	5-플루오로우라실	100.7	81.7	101.3	102.8	98.6	90.5	83.8
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 5-플루오로우라실	99.6	73.0	44.2	35.9	31.5	25.3	22.0
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 5-플루오로우라실	100.8	73.4	63.5	53.1	50.6	42.8	51.1
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 5-플루오로우라실	99.6	95.8	97.7	98.9	90.0	74.7	69.9
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 5-플루오로우라실	99.5	80.6	87.3	88.5	99.3	87.1	84.2

위약: 표 13에 개시된 것과 같다.

이들 분석에 따라, 하기가 발견되었다:

a. PM01183과 시스플라틴의 조합 치료는 HGC-27 위 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 최고-투여량 군에서 4.6% 및 9.8% (14일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 시스플라틴의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(0.18 mg/kg 및 0.135 mg/kg 투여량에서의 PM01183). 구체적으로, 조합물 (6 mg/kg 시스플라틴 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 PM01183 단독 (0.18 mg/kg PM01183)의 TC (%) 값은 12.9 대 33.5 (10 일), 7.6 대 24.3 (12 일) 및 4.6 대 24.3 (14 일)이고, 조합물 (4.5 mg/kg 시스플라틴 + 0.135 mg/kg PM01183) 대 PM01183 단독 (0.135 mg/kg PM01183)의 TC (%) 값은 17.3 대 39.3 (10 일), 12.1 대 37.1 (12 일), 및 9.8 대 38.3 (14 일)이었다. 따라서, PM01183이 파클리탁셀과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.

추가적으로, 중앙값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 시스플라틴의 조합은 1 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.8 초과와 Fa에서), 이는 위 HGC-27 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.

b. PM01183과 5-플루오로우라실의 조합 치료는 HGC-27 위 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 22.0% 및 51.1% (14일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 5-플루오로우라실의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(0.18 mg/kg 투여량에서의 PM01183). 구체적으로, 조합물 (50 mg/kg 5-플루오로우라실 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 PM01183 단독 (0.18 mg/kg PM01183)의 TC (%) 값은 35.9 대 43.3 (7 일), 31.5 대 41.0 (9 일), 25.3 대 33.0 (12 일), 및 22.0 대 29.2 (14 일)이었다. 따라서, PM01183이 5-플루오로우라실과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.

추가적으로, 중앙값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 5-플루오로우라실의 조합은 0.78 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.97의 Fa에서), 이는 위 HGC-27 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 온건한 상승작용을 나타내는 것이다.

실시예 15. 켄시타빈과 조합된 PM01183의 인간 췌장 종양 이종이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체 내 연구.

본 연구의 목적은 인간 췌장암 이종이식 모델을 이용하여 켄시타빈의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력

을 평가하고자 하는 것이었다.

- [0438] 암컷 무흉선 누드 마우스들 (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23℃ 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.
- [0439] 이들 연구에 사용된 종양 모델은 SW1990 세포주였으며, 이는 미국 균주보관소 (ATCC: CRL-2172™)로부터 획득하였다.
- [0440] SW1990 세포들을 37℃, 5% CO₂ 하, RPMI-1640 배지에서 성장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 오른쪽 옆구리 상에 피하주사로, 항생제 없이 50% 마트리겔 및 50% 무혈청 배지의 0.05mL 현탁액 중에서, 시험관 내 계대 12로부터, 5x10⁶ SW1990 세포들로 임플란트되었다.
- [0441] 실시예 13에 개시된 것과 같이, 종양 측정 및 치료 내성을 수행하고 결정하였다.
- [0442] 종양이 약 210 mm³에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정치에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).
- [0443] PM01183은 PM01183 동결건조박의 바이알 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를 0.2 mg/mL로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 켄시타빈은 주사를 위해 0.9%의 식염수로 제품을 40 mg/ml 저장 용액 농도로 재구성하여 제조된 용액으로서 제공되었다. 켄시타빈 저장 용액은 주사를 위해 0.9%의 식염수를 이용하여 표적 최종 농도로 더 희석하였다.
- [0444] 이들 실험에서, PM01183과 켄시타빈 처리, 및 위약을 주 당 1회 연속 3주 까지 0일, 7일 및 14일에 정맥주사 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.
- [0445] 처리군 (T)에서 종양 부피 중앙값을 대조군에서의 종양 부피 중앙값에 대한 비교 (T/C x 100%)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용 및 조합 지수는 실시예 13에 개시된 것과 같이 결정하였다.
- [0446] 표 18은 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 켄시타빈 모두를 이용하여 획득된 % T/C 값을 보고하며, 도 268은 위약, PM01183, 켄시타빈, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 SW1990 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 18

			일자에 따른 % T/C					
군	투여량	시험재료	0	3	6	8	10	13
G01 (대조군)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100.0	74.3	61.3	59.4	56.7	56.1
G03	0.135 mg/kg	PM01183	99.6	81.3	71.0	73.1	65.6	63.1
G04	0.09 mg/kg	PM01183	101.1	81.5	72.8	68.7	68.4	74.4
G05	0.045 mg/kg	PM01183	100.2	83.6	82.8	93.3	82.9	88.1
G06	180.0 mg/kg	켄시타빈	102.2	84.1	73.9	66.1	60.9	59.4
G07	135.0mg/kg	켄시타빈	102.3	78.3	71.9	63.7	55.4	52.7
G08	90.0 mg/kg	켄시타빈	103.8	70.0	73.8	63.3	55.6	54.8
G09	45.0 mg/kg	켄시타빈	102.3	85.5	70.3	70.5	63.3	64.8
G10	0.18 mg/kg 180.0 mg/kg	PM01183 켄시타빈	102.1	69.7	51.2	46.2	36.0	34.1
G11	0.135 mg/kg 135.0 mg/kg	PM01183 켄시타빈	100.4	64.6	52.8	51.5	48.9	46.0
G12	0.09 mg/kg 90.0 mg/kg	PM01183 켄시타빈	98.2	83.2	64.4	59.7	50.6	49.6
G13	0.045 mg/kg 45.0 mg/kg	PM01183 켄시타빈	97.7	81.6	70.9	68.8	65.9	65.7

[0447]

[0448] 위약: 표 13에 개시된 바와 같다.

[0449] 표 18 (Cont.)

군	투여량	시험재료	일자에 따른 % T/C					
			15	17	20	22	24	28
G01 (대조구)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	53.2	47.8	44.2	45.3	44.8	38.9
G03	0.135 mg/kg	PM01183	56.3	56.7	56.9	56.5	53.0	51.7
G04	0.09 mg/kg	PM01183	74.7	80.7	71.9	75.4	77.3	63.9
G05	0.045 mg/kg	PM01183	92.6	86.5	85.1	84.5	85.8	85.4
G06	180.0 mg/kg	젬시타빈	58.5	52.1	49.1	48.6	46.9	39.3
G07	135.0mg/kg	젬시타빈	54.8	51.2	49.5	48.7	49.8	49.5
G08	90.0 mg/kg	젬시타빈	49.9	47.4	47.6	47.0	45.9	49.2
G09	45.0 mg/kg	젬시타빈	63.1	58.5	58.7	57.3	65.2	59.3
G10	0.18 mg/kg 180.0 mg/kg	PM01183 젬시타빈	34.7	31.6	31.7	28.0	26.0	22.7
G11	0.135 mg/kg 135.0 mg/kg	PM01183 젬시타빈	42.4	38.2	36.6	34.6	31.5	25.8
G12	0.09 mg/kg 90.0 mg/kg	PM01183 젬시타빈	47.4	46.0	43.8	49.1	46.0	42.9
G13	0.045 mg/kg 45.0 mg/kg	PM01183 젬시타빈	57.9	59.9	55.9	54.9	52.1	50.5

[0450]

[0451] 위약: 표 13에 개시된 것과 같다

[0452] 이 분석에 따라, 하기가 발견되었다:

[0453] a. PM01183과 젬시타빈의 조합 치료는 SW1990 췌장 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 22.7% 및 25.8% (10일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 젬시타빈의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(0.18 mg/kg 투여량에서의 PM01183). 구체적으로, 조합물 (180 mg/kg 젬시타빈 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 PM01183 단독 (0.18 mg/kg PM01183)의 TC (%) 값은 31.7 대 44.2 (20일), 28.0 대 45.3 (22 일), 26.0 대 44.8 (24 일) 및 22.7 대 38.9 (28 일)이었다. 따라서, PM01183이 젬시타빈과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.

[0454] 추가적으로, 증양값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 젬시타빈의 조합은 1 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.8 초과인 Fa에서), 이는 췌장 SW1990 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.

[0455] **실시예 16.** 테모졸로미드와 조합된 PM01183의 인간 뇌 종양 이종이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체 내 연구.

[0456] 본 연구의 목적은 인간 뇌종양 이종이식 모델을 이용하여 테모졸로미드의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 평가하고자 하는 것이었다.

[0457] 암컷 무흉선 누드 마우스들 (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23°C 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.

[0458] 이들 연구에 사용된 종양 모델은 U87-MG 세포주였으며, 이는 미국 균주보관소 (ATCC HTB-14™)로부터 획득하였다.

[0459] U87-MG 세포들을 37°C, 5% CO₂ 하, 최소 필수 이글 배지 (MEME)에서 생장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 오른쪽 옆구리 상에 피하주사로, 항생제 없이 50% 마트리겔 및 50% 무혈청 배지의 0.05mL 현탁액 중, 시험관 내 계대 배양 5로부터의 5x10⁶ U87-MG 세포들 로 임플란트되었다.

[0460] 실시예 13에 개시된 것과 같이, 종양 측정 및 치료 내성을 수행하고 결정하였다.

[0461] 종양이 약 139 mm³에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정치에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).

[0462] PM01183은 PM01183 동결건조박의 바이알 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를

0.2 mg/mL로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 테모졸로미드는 제품을 주사를 위해 10% DMSO로 희석하여 표적 최종 농도로 희석하여 제조된 용액의 형태로 제공되었다.

[0463] 이들 실험에서, PM01183 및 테모졸로미드 및 위약을 다음과 같이 투여하였다: PM01183은 주 당 1회 3주 까지 0, 7 및 14일에 정맥주사하고, 테모졸로미드는 8일 연속 (0일 내지 7일) 동안 매일 경구투여하고, 위약은 PM01183 및 테모졸로미드에 대하여 제공된 것과 동일한 스케줄에 따라 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.

[0464] 처리군 (T)에서 종양 부피 중앙값을 대조군에서의 종양 부피 중앙값에 대한 비교 ($T/C \times 100\%$)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용 및 조합 지수 (CI)는 실시예 13에 개시된 것과 같이 결정하였다.

[0465] 표 19는 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 테모졸로미드 모두를 이용하여 수득된 % T/C 값을 보고하며, 도 269는 위약, PM01183, 테모졸로미드, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 U87-MG 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 19

			일자에 따른 % T/C							
군	투여량	시험재료	0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (대조군)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	99.8	95.5	64.8	63.2	52.0	44.1	38.5	37.1
G03	0.135 mg/kg	PM01183	98.5	90.5	61.2	71.3	67.7	65.3	64.2	63.6
G04	0.09 mg/kg	PM01183	97.9	99.5	74.4	85.1	69.4	71.8	74.1	73.5
G05	0.045 mg/kg	PM01183	98.2	101.0	80.4	83.8	78.8	77.7	76.7	82.5
G06	3.0 mg/kg	테모졸로미드	97.1	95.5	67.3	39.4	25.3	22.9	28.4	31.5
G07	1.5 mg/kg	테모졸로미드	94.1	96.9	75.6	73.0	56.5	59.3	50.0	53.5
G08	1.0 mg/kg	테모졸로미드	98.2	100.2	65.1	81.2	55.0	63.5	73.1	75.0
G09	0.75 mg/kg	테모졸로미드	97.7	98.9	76.3	77.3	64.4	63.1	62.8	72.7
G10	0.18 mg/kg 3.0 mg/kg	PM01183 테모졸로미드	97.8	95.0	50.9	33.1	21.0	18.3	16.6	17.4
G11	0.135 mg/kg 1.5 mg/kg	PM01183 테모졸로미드	98.7	102.4	62.7	42.0	30.3	29.1	29.0	30.9
G12	0.09 mg/kg 1.0 mg/kg	PM01183 테모졸로미드	96.2	101.0	79.3	76.1	49.8	51.2	57.6	56.5
G13	0.045 mg/kg 0.75 mg/kg	PM01183 테모졸로미드	101	106.0	67.4	73.0	57.8	59.0	69.3	72.2

[0466]

[0467] 위약: 표 13에 개시된 것과 같다

[0467]

[0469] 이 분석에 따라, 하기가 발견되었다:

[0469]

[0470] a. PM01183과 테모졸로미드의 조합 치료는 U87-MG 뇌 종양 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 17.4% 및 30.9% (10일)의 T/C 값을 갖고, 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 테모졸로미드의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(3 mg/kg 및 1.5 mg/kg 투여량에서의 테모졸로미드). 구체적으로, 조합물 (3 mg/kg 테모졸로미드 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 테모졸로미드 단독 (3 mg/kg 테모졸로미드)의 TC (%) 값은 18.3

[0470]

대 22.9 (11 일), 16.6 대 28.4 (14 일), 및 17.4 대 31.5 (16 일)이고, 조합물 (1.5 mg/kg 테모졸로미드 + 0.135 mg/kg PM01183) 대 테모졸로미드 단독 (1.5 mg/kg 테모졸로미드)의 TC (%) 값은 29.1 대 59.3 (11 일), 29.0 대 50.0 (14 일), 및 30.9 대 53.5 (16 일)이었다. 따라서, PM01183이 테모졸로미드와 조합된 경우, 항 종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.

[0471] 추가적으로, 종양값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 테모졸로미드의 조합은 1 미만의 CI 값을 결과로서 초래 하였으며 (0.8 초과인 Fa에서), 이는 뇌 U87-MG 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.

[0472] **실시예 17.** 이리노테칸과 조합된 PM01183의 인간 폐 종양 이종이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체 내 연구.

[0473] 본 연구의 목적은 인간 폐암 이종이식 모델을 이용하여 이리노테칸의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 평가하고자 하는 것이었다.

[0474] 모든 실험들에 암컷 무흉선 누드 마우스들(athymic nude mice) (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23℃ 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.

[0475] 이들 연구에 사용된 종양 모델은 H460 세포주였으며, 이는 미국 균주보관소 (ATCC 참조 번호 HTB-177TM)로부터 취득하였다.

[0476] H460 세포들을 돌베코 변형 이글 배지(DMEM) 중에서 37℃, 5% CO₂에서 성장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 오른쪽 옆구리 상에 피하주사로, 항생제 없이 50% 매트릭겔 및 50% 무혈청 배지의 0.05mL 현탁액 중의 5x10⁶의 H460 세포들로 임플란트되었다.

[0477] 종양 측정 및 치료 내성을, 실시예 13에 개시된 것과 같이 수행 및 결정하였다.

[0478] 종양이 약 177 mm³의 부피에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정치에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).

[0479] PM01183은 PM01183의 동결건조박의 바이알 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를 0.2 mg/mL로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 이리노테칸은 제품을 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 표적 최종 농도로 희석하여 제조된 용액의 형태로 제공되었다.

[0480] 이들 실험에서, PM01183과 이리노테칸 및 위약을 다음과 같이 정맥주사 투여하였다: PM01183을 주 당 1회 연속 2주까지, 0일 및 7일에, 이리노테칸을 매 4일마다, 0, 4, 8일에 투약하고, 위약을 PM01183과 이리노테칸에 대하여 제공된 것과 동일한 스케줄에 따라 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.

[0481] 처리군 (T)에서 종양 부피 종양값을 대조군에서의 종양 부피 종양값에 대한 비교 (T/C x 100%)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용 및 조합 지수(CI)는 실시예 13에 개시된 것과 같이 결정되었다.

[0482] 표 20은 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 이리노테칸 모두를 이용하여 취득된 % T/C 값을 보고하며, 도 270은 위약, PM01183, 이리노테칸, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 H460 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 20

군	투여량	시험재료	일자에 따른 % T/C					
			0	2	5	7	9	12
G01 (대조군)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	114.4	79.6	74.7	75.0	69.1	64.9
G03	0.135 mg/kg	PM01183	117.6	77.4	67.5	71.7	66.7	52.9
G04	0.09 mg/kg	PM01183	116.9	83.1	83.9	76.9	80.6	84.9
G05	0.045 mg/kg	PM01183	108.3	78.7	61.2	67.2	78.8	87.9
G06	50.0 mg/kg	이리노테칸	112.1	54.9	34.7	27.5	24.8	22.9
G07	37.5 mg/kg	이리노테칸	114.9	51.9	44.0	36.7	35.6	37.0
G08	25.0 mg/kg	이리노테칸	112.0	55.6	54.9	49.6	53.1	51.8
G09	12.5 mg/kg	이리노테칸	97.5	50.3	44.4	48.6	50.0	51.5
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 이리노테칸	117.1	44.3	19.4	13.4	10.9	9.0
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 이리노테칸	111.2	51.7	23.8	18.4	15.7	15.3
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 이리노테칸	110.0	53.2	38.1	26.6	28.0	27.1
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 이리노테칸	109.0	60.4	60.1	56.5	60.0	58.5

[0483]

[0484]

위약: 표 13에 개시된 것과 같다.

[0486]

이 분석에 따라, 하기가 발견되었다:

[0487]

a. PM01183과 이리노테칸의 조합 치료는 H460 폐 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 9.0% 및 15.3% (12 일)의 T/C 값을 갖고, 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 이리노테칸의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(50 mg/kg 및 37.5 mg/kg 투여량에서의 이리노테칸). 구체적으로, 조합물 (180 mg/kg 이리노테칸 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 이리노테칸 단독 (50 mg/kg 이리노테칸)의 TC (%) 값은 19.4 대 34.7 (5 일), 13.4 대 27.5 (7 일), 10.9 대 24.8 (9 일) 및 9.0 대 22.9 (12 일)이었고, 조합물 (37.5 mg/kg의 이리노테칸, 0.135 mg/kg의 PM01183) 대 이리노테칸 단독 (50 mg/kg 이리노테칸)의 TC (%) 값은 23.8 대 44.0 (5 일), 18.4 대 36.7 (7 일), 15.7 대 35.6 (9 일), 및 15.3 대 37.0 (12 일)이었다. 따라서, PM01183이 이리노테칸과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.

[0488]

추가적으로, 종양값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 이리노테칸의 조합은 1 미만의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.8 초과와 Fa에서), 이는 폐 H460 이종이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.

[0489]

실시예 18. 다카르바진과 조합된 PM01183의 인간 섬유육종 이종이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체 내 연구.

[0490]

본 연구의 목적은 인간 섬유육종 이종이식 모델을 이용하여 테모졸로미드의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 평가하고자 하는 것이었다.

[0491]

모든 실험들에 암컷 무흉선 누드 마우스들 (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23°C 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.

[0492]

이들 연구에 사용된 종양 모델은 HT1080 세포주였으며, 이는 미국 균주보관소(ATCC CCL-121™)로부터 수득하였다.

[0493]

HT1080 세포들을 최소 필수 이글 배지(MEME) 중에서 37°C, 5% CO₂에서 성장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 장딴지근(gastrocnemius muscle)에 정위적(orthotopically) 근육내 주사로, 항생제 없

이 무혈청 배지중 현탁된 시험관 내 9계대로부터 5×10^6 의 HT1080 세포들 (PM01183과 독소루비신 및 PM01183과 비노렐빈 연구에서 시험관 내 5계대로부터; 및 PM01183와 파클리탁셀 연구에서 9 계대)로 임플란트되었다.

[0494] 총 직경 (종양 + 다리) 측정은 전자식 캘리퍼 (Fowler Sylvac, S235PAT)를 이용하여 측정하였다. 이러한 총 직경 및 동물 체중을 치료 1일부터 출발하여 주 당 2~3회 측정하였다.

[0495] 체중 변화, 임상적 징후, 및 주사 부위에서의 국소적 손상의 흔적을 모니터링함으로써 치료 내성을 평가하였다.

[0496] 총 직경이 약 11.3 mm의 길이에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정치에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).

[0497] PM01183은 PM01183의 동결건조박의 바이알 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를 0.2 mg/mL로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 다카르바진은 주사를 위해 제품을 5% 글루코오스 용액을 이용하여 표적 최종 농도로 희석하여 제조된 용액의 형태로 제공되었다.

[0498] 이들 실험에서, PM01183과 다카르바진 및 위약을 주 당 1회 연속 2주까지 0일 및 7일에 정맥주사 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.

[0499] 처리군 (T)에서 종양 부피 중앙값을 대조군에서의 종양 부피 중앙값에 대한 비교 ($T/C \times 100\%$)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용 및 조합 지수(CI)는 실시예 13에 개시된 것과 같이 결정되었다.

[0500] 표 21은 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 다카르바진 모두를 이용하여 수득된 % T/C 값을 보고하며, 도 271은 위약, PM01183, 다카르바진, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스들에서의 HT1080 종양의 총 직경 (종양 + 다리) 평가를 나타낸다.

표 21

			일자에 따른 % T/C							
군	투여량	시험재료	0	2	4	7	9	11	14	16
G01 (대조군)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100	59.3	40.0	26.9	26.7	11.5	21.2	30.6
G03	0.135 mg/kg	PM01183	100	63.0	62.9	48.1	36.0	30.2	33.0	41.9
G04	0.09 mg/kg	PM01183	100	66.7	57.1	65.4	48.0	42.7	45.8	56.4
G05	0.045 mg/kg	PM01183	100	77.8	74.3	94.2	80.0	74.0	80.5	91.1
G06	150.0 mg/kg	다카르바진	100	40.7	28.6	30.8	44.0	37.5	44.9	57.3
G07	112.5 mg/kg	다카르바진	100	48.1	34.3	53.8	48.0	37.5	43.2	53.2
G08	75.0 mg/kg	다카르바진	100	74.1	65.7	69.2	58.7	45.8	46.6	51.6
G09	37.5 mg/kg	다카르바진	100	51.8	54.3	65.4	61.3	47.9	55.1	62.1
G10	0.18 mg/kg 150.0 mg/kg	PM01183 다카르바진	100	37.0	22.9	17.3	4.0	10.4	-4.2	1.0
G11	0.135 mg/kg 112.5 mg/kg	PM01183 다카르바진	100	29.6	25.7	11.5	-8.0	-17.7	-6.8	7.3
G12	0.09 mg/kg 75.0 mg/kg	PM01183 다카르바진	100	37.0	31.4	28.8	52.0	43.7	50.8	64.5
G13	0.045 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 다카르바진	100	55.6	51.4	67.3	70.7	62.5	59.3	62.1

[0501]

[0502] 위약: 표 13에 개시된 것과 같음.

- [0504] 이 분석에 따라, 하기가 발견되었다:
- [0505] a. PM01183과 다카르바진의 조합 치료는 HT1080 섬유육종 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 1.0% 및 7.3% (16일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종 직경에서의 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 다카르바진의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(0.18 mg/kg 및 0.135 mg/kg 투여량에서의 PM01183). 구체적으로, 조합물 (150 mg/kg 다카르바진 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 PM01183 단독 (0.18 mg/kg PM01183)의 TC (%) 값은 4.0 대 26.7 (9 일), 10.4 대 11.5 (11 일), -4.2 대 21.2 (14 일) 및 1.0 대 30.6 (16 일)이었고, 조합물 (112.5 mg/kg 다카르바진 + 0.135 mg/kg PM01183) 대 PM01183 단독 (0.135 mg/kg PM01183)은 -8.0 대 36.0 (9 일), -17.7 대 30.2 (11 일), -6.8 대 33.0 (14 일) 및 7.3 대 41.9 (16 일)이었다. 따라서, PM01183이 다카르바진과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.
- [0506] 추가적으로, 중앙값-효과 원리에 기초하여, PM01183과 다카르바진의 조합은 0.28의 CI 값을 결과로서 초래하였으며 (0.97 초과 Fa에서), 이는 체장 HT1080 의 정위적으로 이중이식된 종양을 갖는 마우스들에서의 상승작용을 나타내는 것이다.
- [0507] **실시예 19.** 이리노테칸과 조합된 PM01183의 인간 결장직장 종양 이중이식편에서의 효과를 결정하기 위한 생체내 연구.
- [0508] 본 연구의 목적은 인간 결장직장 암종 이중이식 모델을 이용하여 이리노테칸의 항종양 활성을 강화시키는 PM01183의 능력을 평가하고자 하는 것이었다.
- [0509] 모든 실험들에 암컷 무흉선 누드 마우스들 (Harlan Laboratories Models, S.L. (스페인 바르셀로나 소재))을 이용하였다. 동물들을 개별적으로 통풍되는 우리에서, 21~23°C 및 40~60% 습도에서 12-시간 명-암 사이클로 우리 당 10마리까지 수용하였다. 마우스들이 방사선 조사된 표준 설치류 식이 및 멸균수에 자유로이 접근하도록 허용하였다. 동물들을 종양 세포 현탁액으로 종양 이식하기 전에 적어도 5일 동안 새 환경에 익숙해지도록 하였다.
- [0510] 이들 연구에 사용된 종양 모델은 HT-29 세포주였으며, 이는 미국 균주보관소 (ATCC 번호. HTB-38™)로부터 수득하였다.
- [0511] HT-29 세포들을 돌베코 변형 이글배지 (DMEM) 중에서 37°C, 5% CO₂에서 성장시켰다. 각 동물은 26G 바늘 및 1 cc 주사기를 이용하여, 오른쪽 옆구리 상에 피하주사로, 주사용 0.9% 염화나트륨 0.05mL 현탁액 중, 시험관 내 10 계대로부터 5x10⁶의 HT-29 세포들로 임플란트되었다.
- [0512] 종양 측정 및 치료 내성은 실시예 13 중에 개시된 것과 같이 수행 및 결정되었다. 치료 내성은 체중 변화, 임상적 징후, 및 주사 부위에서의 국소적 손상의 흔적을 모니터링함으로써 평가하였다.
- [0513] 종양이 약 180 mm³의 부피에 도달하면, 뉴랩 종양학 소프트웨어 (버전 2.25.06.00)를 이용하여 마우스들을, 체중 및 종양 부피 측정치에 기초하여 치료군과 대조구에 임의 할당시켰다 (수 = 5-7/군).
- [0514] PM01183은 PM01183의 동결건조박의 바이알 형태로 제공되었으며, 이는 주입을 위해 물을 타서 재구성하여 농도를 0.2 mg/mL로 하였다. PM01183 저장 용액을, 주사를 위해 5% 글루코오스 용액을 이용하여 투여 제형 농도로 더욱 희석시켰다. 이리노테칸은 주사를 위해 제품을 5% 글루코오스 용액을 이용하여 표적 최종 농도로 더 희석하여 제조된 용액 형태로 제공되었다.
- [0515] 이들 실험에서, PM01183과 이리노테칸, 및 위약을 하기와 같이 정맥주사 투여하였다: PM01183을 주 당 1회 연속 3주까지 0일, 7 및 14일에, 이리노테칸을 매 4일마다, 0일, 4일, 8일, 12일 및 16일에 투여하고, 위약은 PM01183과 이리노테칸에 대해 제공된 것과 동일한 스케줄에 따라 투여하였다. 투여량 수준 군을 단일 약제로서 또는 조합하여 투여하였다.
- [0516] 처리군 (T)에서 종양 부피 중앙값을 대조구에서의 종양 부피 중앙값에 대한 비교 (T/C x 100%)를 이용하여 항종양 효능을 평가하였다. 추가적으로, 강화작용은 실시예 13에 개시된 것과 같이 결정하였다.
- [0517] 표 22는 각 투여량 수준으로 단일약제로서 그리고 조합물로서 PM01183과 이리노테칸 모두를 이용하여 수득된 % T/C 값을 보고하며, 도 272는 위약, PM01183, 이리노테칸, 및 2 개의 최고 비율로 조제된 이들 군의 해당 조합으로 치료된 마우스에서의 HT-29 종양의 종양 부피 평가를 나타낸다.

표 22

			일자에 따른 % T/C				
군	투여량	시험재료	0	3	5	7	10
G01 (대조구)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	100.4	108.4	86.5	101.1	116.5
G03	0.135 mg/kg	PM01183	98.4	106.4	95.3	116.6	115.2
G04	0.09 mg/kg	PM01183	98.4	100.9	88.7	121.9	129.8
G05	0.045 mg/kg	PM01183	99.8	103.7	100.6	111.1	135.8
G06	50.0 mg/kg	이리노테칸	100.1	114.7	93.7	96.1	70.5
G07	37.5 mg/kg	이리노테칸	98.4	108.1	97.5	99.2	84.3
G08	25.0 mg/kg	이리노테칸	98.8	108.6	97.2	101.4	96.5
G09	12.5 mg/kg	이리노테칸	99.0	99.1	90.6	97.4	92.7
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 이리노테칸	99.5	101.8	78.3	77.5	51.6
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 이리노테칸	98.4	98.0	85.2	85.4	60.7
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 이리노테칸	99.7	96.4	71.7	77.0	62.7
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 이리노테칸	100.7	104.8	104.3	116.0	98.8

[0518]

[0519]

위약: 표 13에 개시된 것과 같다.

[0520]

표 22 (Cont.)

			일자에 따른 % T/C			
군	투여량	시험재료	12	14	17	20
G01 (대조구)	10 ml/kg	위약	-	-	-	-
G02	0.18 mg/kg	PM01183	115.4	123.4	86.7	77.5
G03	0.135 mg/kg	PM01183	119.1	121.5	133.1	105.2
G04	0.09 mg/kg	PM01183	114.1	109.4	116.1	93.4
G05	0.045 mg/kg	PM01183	125.1	109.3		
G06	50.0 mg/kg	이리노테칸	61.7	51.7	41.4	33.3
G07	37.5 mg/kg	이리노테칸	77.4	65.0	58.4	49.4
G08	25.0 mg/kg	이리노테칸	79.3	82.5	76.3	60.3
G09	12.5 mg/kg	이리노테칸	90.8	89.4	102.6	93.4
G10	0.18 mg/kg 50.0 mg/kg	PM01183 이리노테칸	43.8	30.4	21.7	15.6
G11	0.135 mg/kg 37.5 mg/kg	PM01183 이리노테칸	51.9	40.1	39.2	28.7
G12	0.09 mg/kg 25.0 mg/kg	PM01183 이리노테칸	57.7	50.1	47.2	40.7
G13	0.045 mg/kg 12.5 mg/kg	PM01183 이리노테칸	85.5	90.5	88.1	76.5

[0521]

[0522]

위약: 표 13에 개시된 것과 같다

[0524]

이 분석에 따라, 하기가 발견되었다:

[0525]

a. PM01183과 이리노테칸의 조합 치료는 U87-MG 뇌 종양 세포의 성장의 저해에 효과적이었으며, 그 결과 2개의 높은-투여량 군에서 15.6% 및 28.7% (20일)의 T/C 값을 갖고, 대조구에 비하여 통계적으로 유의한 ($P < 0.01$) 종양 감소가 일어났다. 또한, PM01183과 이리노테칸의 조합은 본 실험에서 활성이 더 높은 단일 약제에 비해 더 낮은 T/C 값을 생산하였다(50 mg/kg 및 37.5 mg/kg의 투여량에서의 이리노테칸). 구체적으로, 조합물 (50 mg/kg 이리노테칸 + 0.18 mg/kg PM01183) 대 이리노테칸 단독 (50 mg/kg 이리노테칸)의 TC (%) 값은 30.4 대 51.7 (14일), 21.7 대 41.4 (17 일), 15.6 대 33.3 (20 일)이었으며, 조합물 (37.5 mg/kg 이리노테칸 + 0.135 mg/kg PM01183) 대 이리노테칸 단독 (37.5 mg/kg 이리노테칸)의 TC (%) 값은 40.1 대 65.0 (14일), 39.2 대 58.4 (17 일) 및 28.7 대 49.4 (20 일)이었다. 따라서, PM01183이 이리노테칸과 조합된 경우, 항종양 활성의 강화가 명확히 관찰되었다.

[0526] **실시예 20.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 백혈병 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.

[0527] 다음 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 메토틱세이트, 다우노루비신, 아플리딘, ET-743, PM02734 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20℃에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50μl의 분취액을 첨가하였다.

[0528] JURKAT 및 MOLT-4는 본 분석을 위해 선택된 인간 백혈병 세포주로, 이들은 미국 종균협회(ATCC)로부터 획득하였다. JURKAT 및 MOLT-4 세포들을, 10% 우태아 혈청(FBS), 2mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 무-페놀레드(phenol red-free) RPMI 배지에, 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 유지시켰다.

[0529] 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다:

[0530] a. 첫번째 세트의 분석에서, 각 화합물의 상이한 세포주들에 대한 상대적 효능은 시험관 내 세포독성 분석에 72 시간 노출을 이용하여 결정하였다.

[0531] 간략하게는, 세포들을 150μl의 배양 배지 중 웰 당 50000 세포의 밀도로 96 웰 마이크로정적 플레이트에 접종하고, 비히클 단독 또는 시험 화합물로 72시간 처리 전에 무-약물 배지 중에서 4-6 시간 동안 인큐베이션하였다.

[0532] 접종 후, 세포독성 효과를 MTT 환원 분석을 이용하여 평가하였다. 50 mL의 MTT 용액 (1 mg/mL)을, 웰에 첨가하고, 포르마잔 결정이 형성될 때까지 37℃에서 15~17시간 동안 인큐베이션하였다. 배양 배지를 부드럽게 제거한 후, DMSO를 첨가하여 불용성 보라색 포르마잔 생성물을 착색 용액으로 용해시켰다. 웰의 흡광도를 540nm에서 광학밀도를 측정하여 정량하였다. 결과는 대조구 세포 성장의 백분율로서 나타내었다. 조합 연구에 대해 사용된 EC50 값 (절반-최대 효과 농도)을 Prism v5.02 소프트웨어 (GraphPad)를 이용하여 계산하였다. EC50은 몰 농도로서 나타내었으며, 적어도 3개의 독립된 분석의 평균으로 나타내었다.

[0533] 각 약물에 대하여 획득된 개별적인 EC50 값을 표 23 및 24에 나타내었다.

표 23

JURKAT 중앙 세포주에 대한 각 약물의 EC50 값 몰농도 (M)					
화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)
메토틱세이트	1.45E-07	다우노루비신	7.92E-07	아플리딘	1.38E-08
ET-743	6.96E-09	PM00104	4.83E-09	PM01183	1.55E-09
PM02734	5.50E-06				

표 24

MOLT-4 중앙 세포주에 대한 각 약물의 EC50 값 몰농도 (M)					
화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)
메토틱세이트	4.39E-08	아플리딘	1.27E-09	ET-743	3.84E-09
PM00104	1.55E-09	PM01183	8.57E-10	PM02734	1.44E-05

[0536] b. 두 번째 세트의 실험에서, 시험된 약제들에 대한 농도-반응 곡선을, 이전의 문단에서 설명된 동일한 방법론을 이용하여 단독으로 및 2-약물 조합으로 모두로 수행하였다.

[0537] 본 연구에서 PM01183 및 기타 표준 약물에 대한 개별적인 EC50 값 간의 유의차가 있는 경우, 두 개의 약물에 대한 상이한 비율의 고정된 농도를 사용하였다. 정상적으로, 고정된 비율의 농도의 선택은 각 약물에 대한 EC50 값에서 등전비(equipotent ratio) (1:1) 및 그보다 높거나 낮은 각 약물에 대한 대응 EC50 값의 상이한 백분율을 나타내는 다른 비율이었다. 이들 출발 농도를 이용하여, 고정 계열 희석 (constant serial dilutions)을 수행하여, 단독 및 조합된 약물들의 각 세트에 대한 농도-반응 곡선을 생성하였다.

[0538] 각 약물 단독의 효과에 비하여, 2-약물 조합의 중앙 세포들의 생육성에 대한 효과는, 중앙값-효과 원리에 기초한 초우 및 탈랄레이(Chou and Talalay) 방법을 이용하여 평가하였다 (초우 및 탈랄레이, Adv. Enzyme Regul. 1984, 22, 27~55). 중앙값-효과 등식: $f_a / f_u = (C / C_m)^m$ (식 중, C는 약물 농도, C_m은 중앙값-효과 농도

(즉, IC₅₀, ED₅₀, 또는 LD₅₀, 연구되는 계를 50%로 저해하는 농도), f_a 는 약물 농도 C에 의하여 영향받은 세포 분획, f_u 는 영향받지 않은 분획, 및 m은 농도-반응 곡선의 S형(sigmoidicity) 계수는 소정의 생물학적 계 상에서 약물의 농도 및 효과간의 관계를 설명한다.

[0539] 본 등식에 기초하여, "조합 지수" (CI)는 약물 상호작용의 정도의 정량적 척도로서 사용된다. 조합 지수(CI)는 하기 등식에 의해 결정된다:

$$[0540] \quad CI = (C)_1 / (C_x)_1 + (C)_2 / (C_x)_2$$

[0541] 식 중, $(C_x)_1$ 는 계를 x의 백분율로 저해하는 제 1 약물 단독의 농도, $(C_x)_2$ 는 계를 동일한 x의 백분율로 저해하는 제 2 약물 단독의 농도, 및 $(C)_1 + (C)_2$ 는 계를 X의 백분율로 저해하는 제 1 및 제 2 약물의 농도이다. CI 값은 상이한 값의 f_a (즉, 상이한 정도의 세포 성장 저해)에 대한 등식을 풀어서 계산하였다. 1 보다 작은 CI 값 (<1)은 상승 효과를 나타내고, 값이 1이면 부가적 효과를 나타내며, 1보다 크면 (>1) 길항 작용을 나타낸다.

[0542] 데이터는 CalcuSyn 소프트웨어 (Biosoft, Cambridge, UK)를 이용하여 분석하였다. 통계 분석 및 그래프의 경우 Prism 소프트웨어 (GraphPad, San Diego, USA)를 이용하였다. 모든 결과는 적어도 3회의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다.

[0543] 세포 증식에 대하여 시험된 약물 조합물의 효과를 도 273~283에 나타내었다:

[0544] - 메토틱세이트와 PM01183의 조합. JURKAT (도 273) 세포주에서 메토틱세이트와 PM01183의 조합은 정해진 농도의 두 약물에서 어느 정도의 상승효과를 결과로서 나타내었다 (CI<1). MOLT-4 (도 274) 세포주에서 메토틱세이트와 조합된 PM01183의 효과는 대부분 부가적이었다.

[0545] - 다우노루비신과 PM01183의 조합. JURKAT (도 275) 세포주에서 다우노루비신과 PM01183의 조합은 정해진 농도의 화합물들에서 부가적 또는 상승적이었다(CI<1).

[0546] - 아플리딘과 PM01183의 조합. JURKAT (도 276) 및 MOLT-4 (도 277) 세포주에서 PM01183과 아플리딘의 조합은 정해진 농도의 두 화합물 모두에서 어느 정도 상승적이었다 (CI<1).

[0547] - ET-743과 PM01183의 조합. JURKAT (도 278) 세포주에서 PM01183과 ET-743의 조합은 정해진 농도의 두 약물 모두에서 부가적 또는 상승적이었다 (CI<1). MOLT-4 (도 279) 세포주에서 PM01183과 ET-743은 대부분 부가적이었다.

[0548] - PM00104과 PM01183의 조합. JURKAT (도 280) 세포주에서 PM01183과 PM00104의 조합은 적어도 부가적이었으며, 어느 정도 상승 효과를 초래하였다 (CI<1). MOLT-4 (도 281) 세포주 PM01183과 PM00104의 조합은 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

[0549] - PM02734과 PM01183의 조합. JURKAT (도 282) 세포주에서 PM01183과 PM02734의 조합은 대부분 부가적이었으며, 대부분 부가적이었으며, 정해진 농도의 두 약물들 모두에서 어느 정도 상승 효과를 초래하였다 (CI<1). MOLT-4 (도 283) 세포주에서 PM01183과 ET-743의 조합은 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

[0550] **실시예 21.** 화학치료제와 조합된 PM01183의 인간 림프종 세포주에서의 효과를 결정하기 위한 시험관 내 연구.

[0551] 다음 약제들을 PM01183과 조합하여 평가하였다: 젬시타빈, 시타라빈, 메토틱세이트, 다우노루비신, ET-743, PM02734 및 PM00104 (이들 화합물들의 저장 용액을 순수한 DMSO 중에서 제조하고, -20°C에서 저장하였다). 추가적인 일련의 희석액을 무혈청 배지 중에서 제조하여 최종 4배의 농도를 달성하였다. 웰 당, 각 희석된 화합물의 50 μ l의 분취액을 첨가하였다.

[0552] RAMOS 및 U-937은 본 분석을 위하여 선택된 인간 림프종 세포주로, 미국 균주보관소 (ATCC)로부터 획득하였다. RAMOS 및 U-937 세포들을 10% 우태아 혈청 (FBS), 2 mM L-글루타민 및 100 단위/mL의 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 무-페놀 레드 RPMI 배지 중에, 37°C, 5% CO₂ 및 95% 습도에서 성장시켰다.

[0553] 실시예 20에서 앞서 설명된 것과 같이, 스크리닝을 2 부분으로 나누어 수행하였다.

[0554] 첫 번째 세트의 분석에서, 각 약물에 대한 개별적인 EC₅₀ 값을 결정하였으며, 이는 표 25 및 26에 나타낸 바와 같다.

표 25

[0555]

RAMOS 종양 세포주에 대한 각 약물의 EC50 값 몰농도 (M)					
화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)
젬시타빈	2.51E-08	시타라빈	3.64E-08	메토트렉세이트	5.02E-06
다우노루비신	3.15E-07	ET-743	9.55E-09	PM00104	4.35E-09
PM01183	1.39E-09	PM02734	1.36E-05		

표 26

[0556]

U-937 종양 세포주에 대한 각 약물의 EC50 값 몰농도 (M)					
화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)	화합물	EC50 (M)
젬시타빈	3.27E-08	메토트렉세이트	2.63E-08	다우노루비신	3.04E-07
ET-743	8.62E-09	PM00104	4.50E-09	PM01183	1.03E-09
PM02734	6.85E-06				

[0557]

두 번째 세트의 분석에서, 시험된 약제들에 대한 농도-반응 곡선을, 단독 및 2-약물 조합으로 모두 시험하였다. 약물 조합의 효과는 실시예 20에 설명된 것과 같은 초우 및 탈랄레이 방법을 이용하여 평가하였다.

[0558]

세포 증식에 대하여 시험된 약물 조합물들의 효과를 도 284~296에 나타내었다:

[0559]

- PM01183과 시타라빈의 조합. RAMOS (도 284) 세포주에서 PM01183과 시타라빈의 조합은 어느 정도 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

[0560]

- 메토트렉세이트와 PM01183의 조합. RAMOS (도 285) 세포주에서 메토트렉세이트와 PM01183의 조합은 정해진 농도의 두 약물 모두에서 어느 정도 상승 효과를 초래하였다 (CI<1). U-937 (도 286) 세포주에서 PM01183과 메토트렉세이트의 조합은 정해진 농도에서 어느 정도의 상승 효과를 나타내었다.

[0561]

- 젬시타빈과 PM01183의 조합. RAMOS (도 287) 세포주에서 PM01183과 젬시타빈의 조합은 정해진 농도의 두 약물 모두에서 부가적 또는 상승 효과를 나타내었다(CI<1). U-937 (도 288) 세포주에서 PM01183과 젬시타빈의 조합은 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

[0562]

- 다우노루비신과 PM01183의 조합. RAMOS (도 289) 및 U-937 (도 290) 세포주에서 PM01183과 다우노루비신의 조합은 적어도 부가적이었으며, 어느 정도의 상승 효과를 나타내었다 (CI<1).

[0563]

- ET-743과 PM01183의 조합. RAMOS (도 291) 및 U-937 (도 292) 세포주에서 PM01183과 ET-743의 조합은 정해진 농도의 화합물에서 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

[0564]

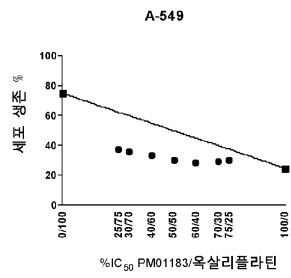
- PM00104과 PM01183의 조합. RAMOS (도 293)에서 PM01183과 PM00104의 조합은 상승 효과를 초래하였다 (CI<1). U-937 (도 294) 세포주에서 PM01183과 PM00104의 조합은 정해진 농도의 두 약물 모두에서 어느 정도의 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

[0565]

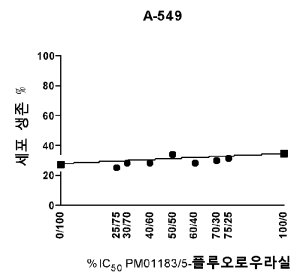
- PM02734과 PM01183의 조합. RAMOS (도 295) 세포주에서 PM01183과 PM02734의 조합은 상승 효과를 초래한 한편(CI<1), U-937 (도 296) 세포주에서 PM01183과 ET-743의 조합은 적어도 부가적이었으며, 두 약물 모두의 높은 농도에서 어느 정도의 상승 효과를 초래하였다 (CI<1).

도면

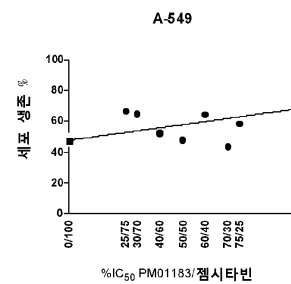
도면1



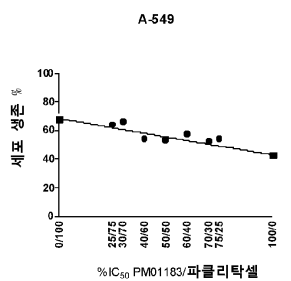
도면2



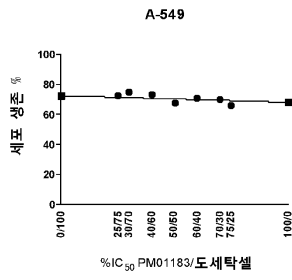
도면3



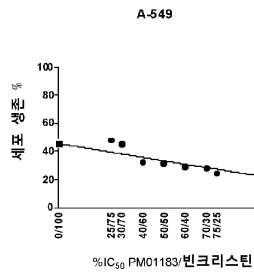
도면4



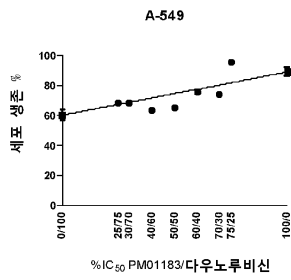
도면5



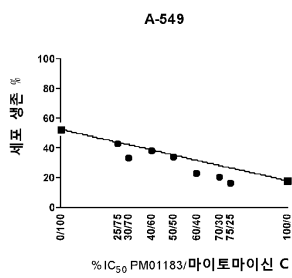
도면6



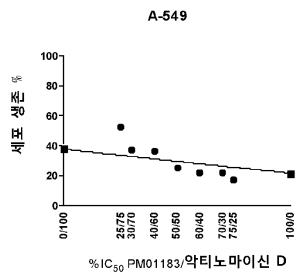
도면7



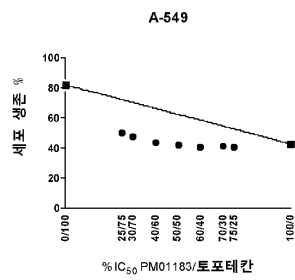
도면8



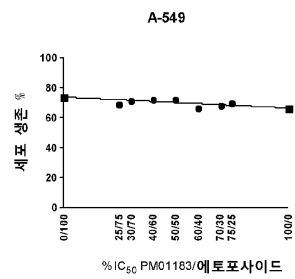
도면9



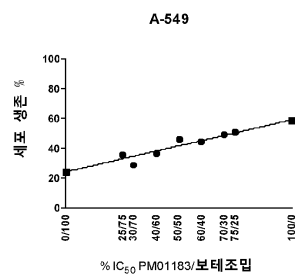
도면10



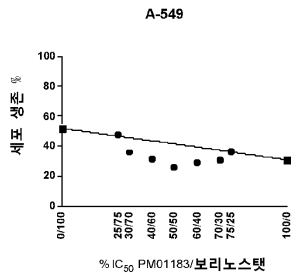
도면11



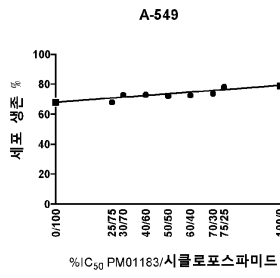
도면12



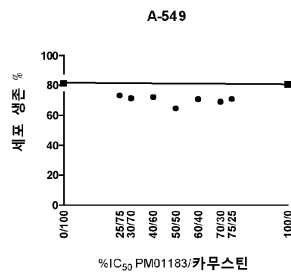
도면13



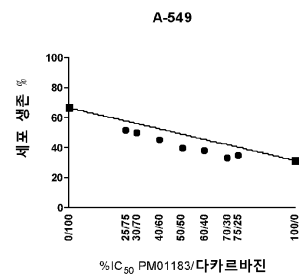
도면14



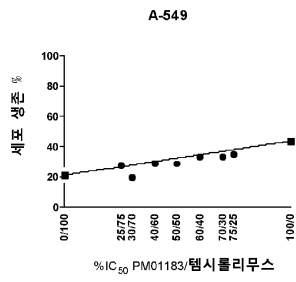
도면15



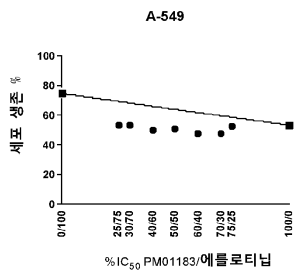
도면16



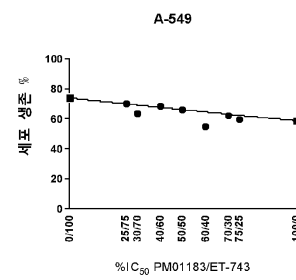
도면17



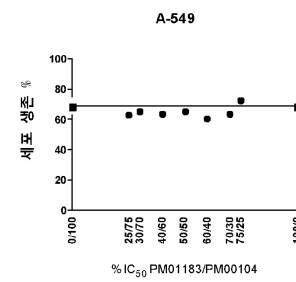
도면18



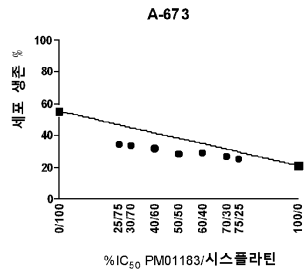
도면19



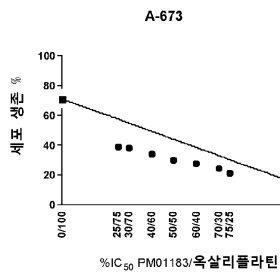
도면20



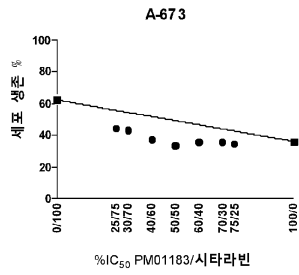
도면21



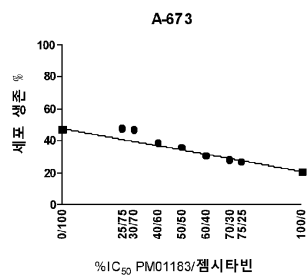
도면22



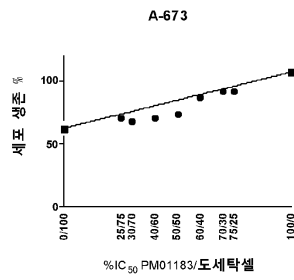
도면23



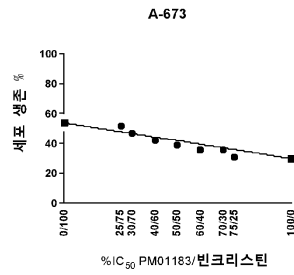
도면24



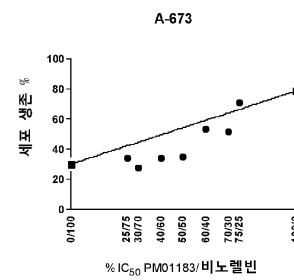
도면25



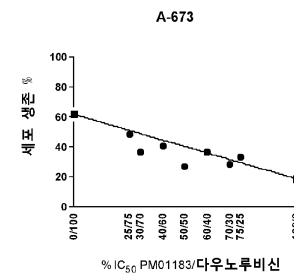
도면26



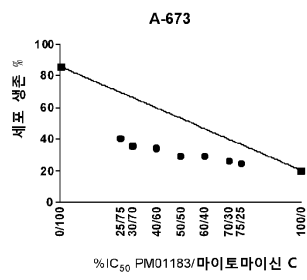
도면27



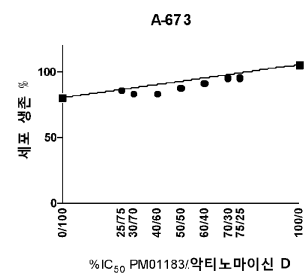
도면28



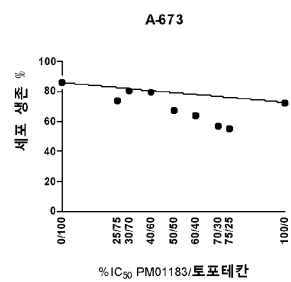
도면29



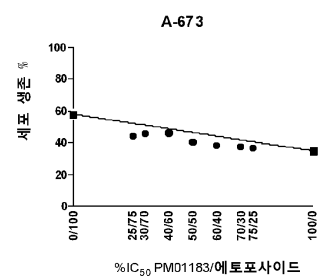
도면30



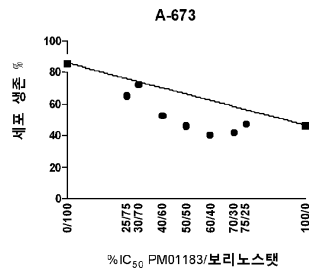
도면31



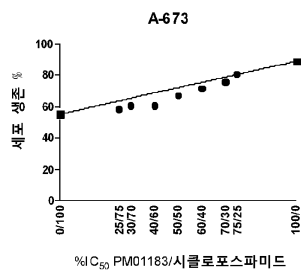
도면32



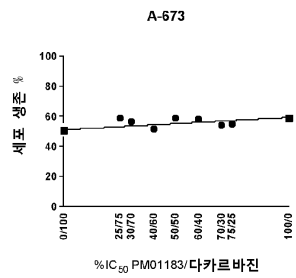
도면33



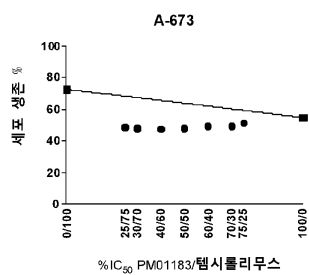
도면34



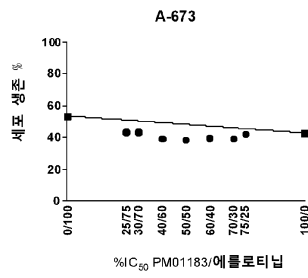
도면35



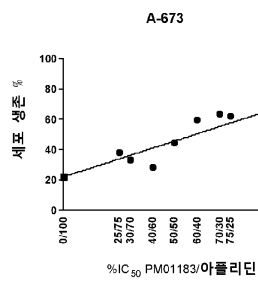
도면36



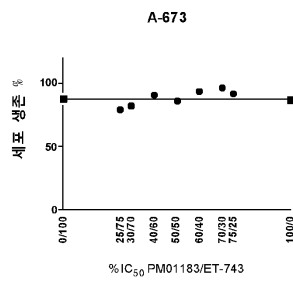
도면37



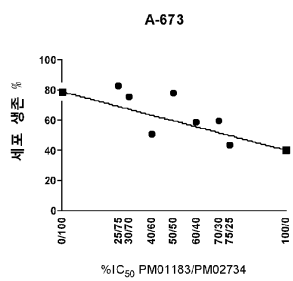
도면38



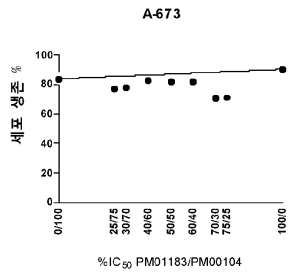
도면39



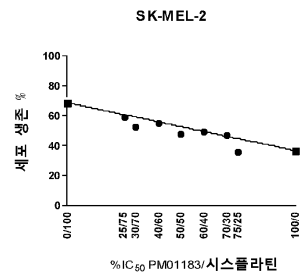
도면40



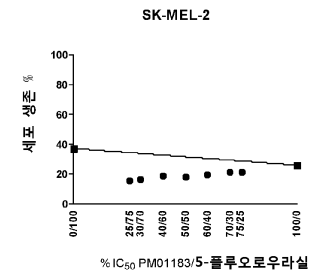
도면41



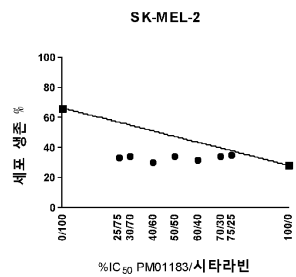
도면42



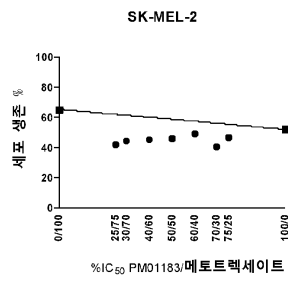
도면43



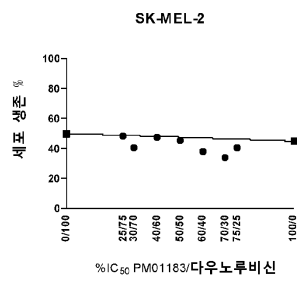
도면44



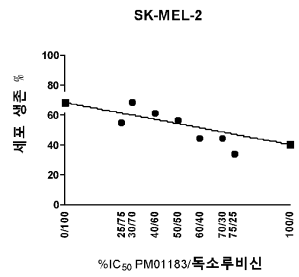
도면45



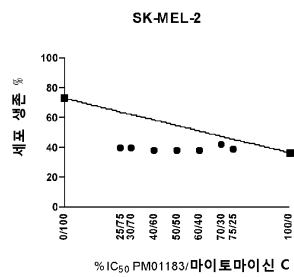
도면46



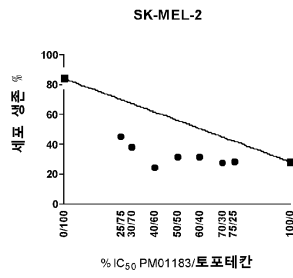
도면47



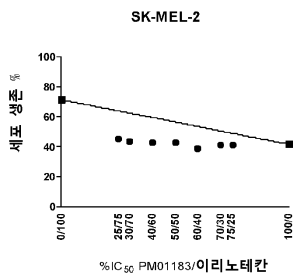
도면48



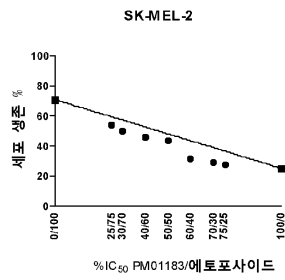
도면49



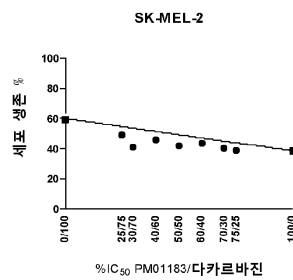
도면50



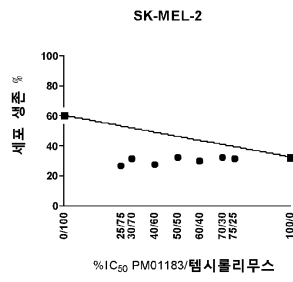
도면51



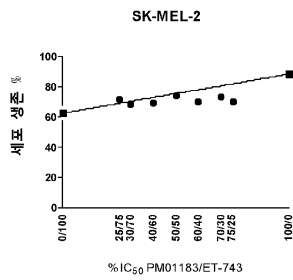
도면52



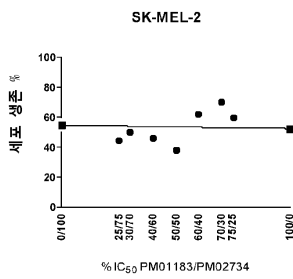
도면53



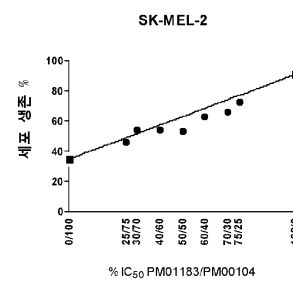
도면54



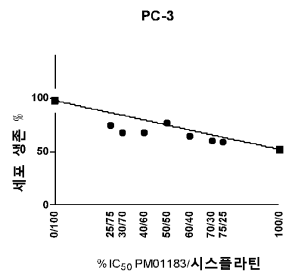
도면55



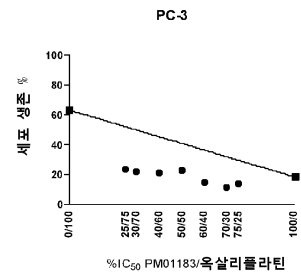
도면56



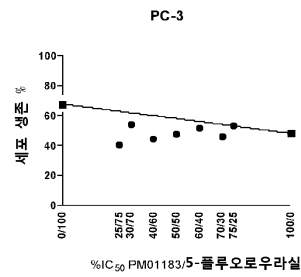
도면57



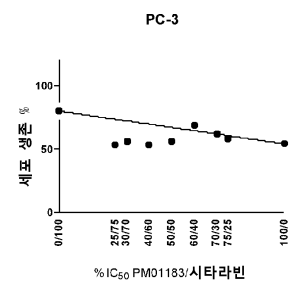
도면58



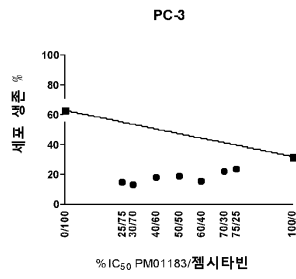
도면59



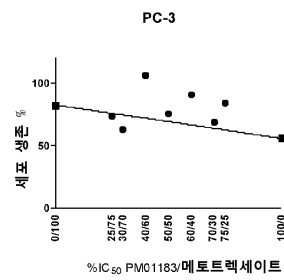
도면60



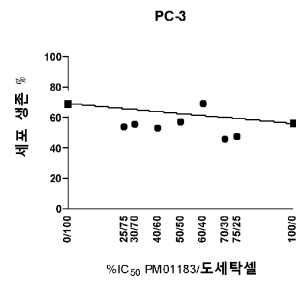
도면61



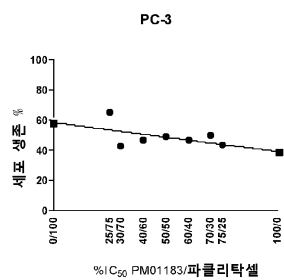
도면62



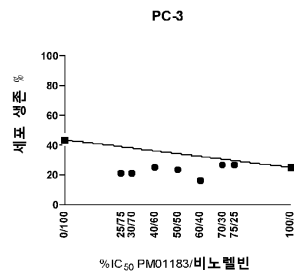
도면63



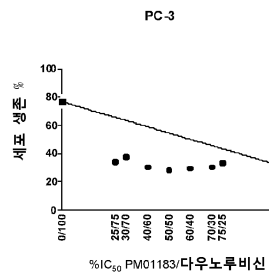
도면64



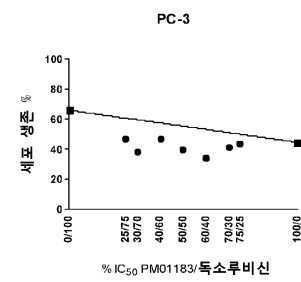
도면65



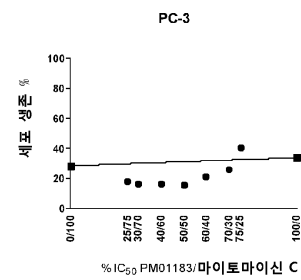
도면66



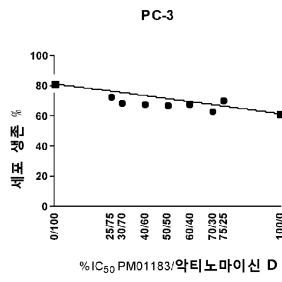
도면67



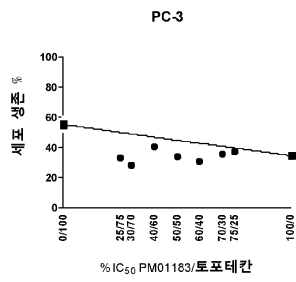
도면68



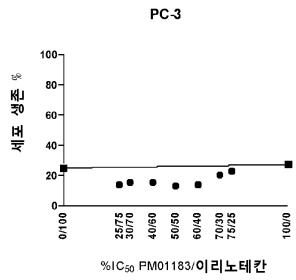
도면69



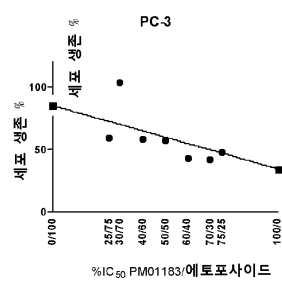
도면70



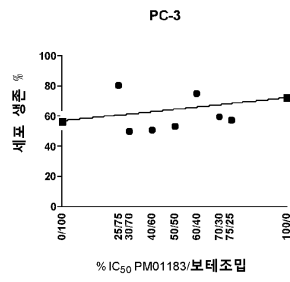
도면71



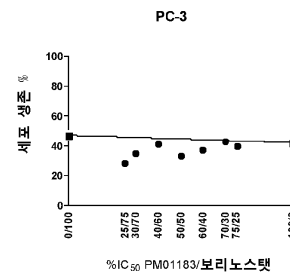
도면72



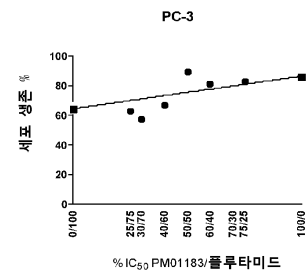
도면73



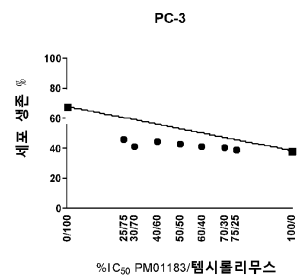
도면74



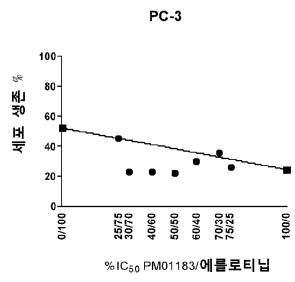
도면75



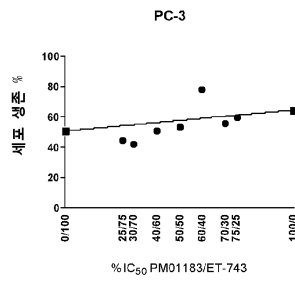
도면76



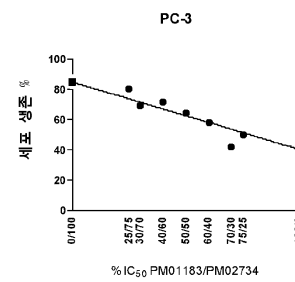
도면77



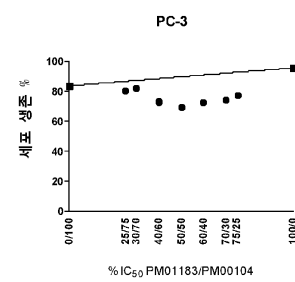
도면78



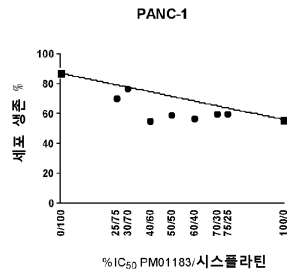
도면79



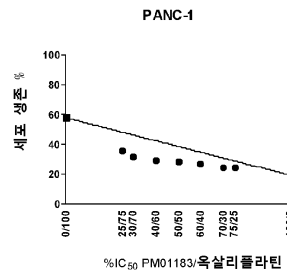
도면80



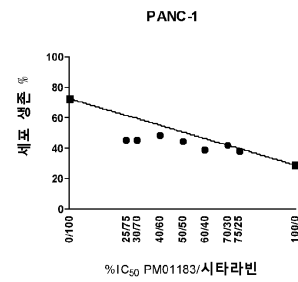
도면81



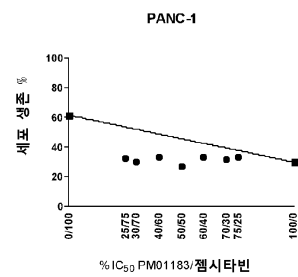
도면82



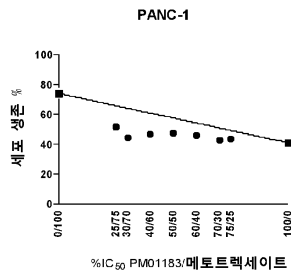
도면83



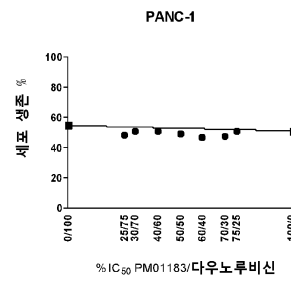
도면84



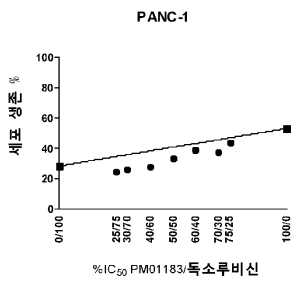
도면85



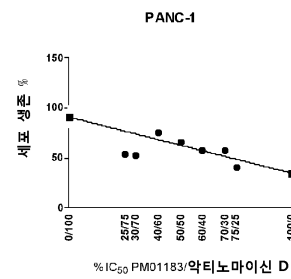
도면86



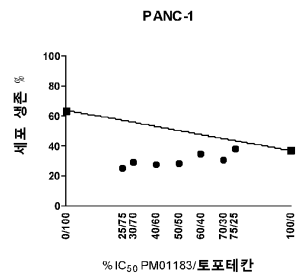
도면87



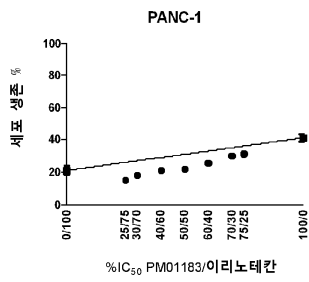
도면88



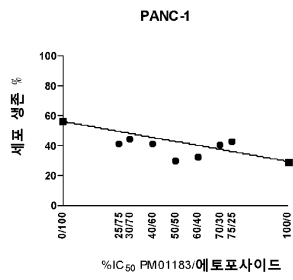
도면89



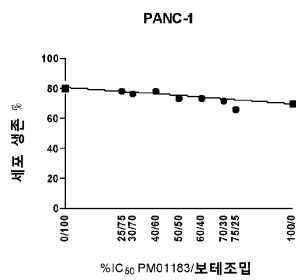
도면90



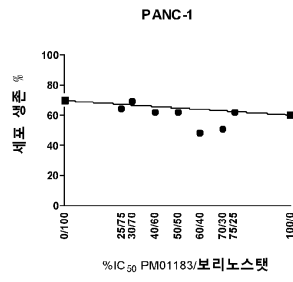
도면91



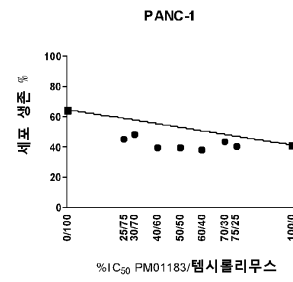
도면92



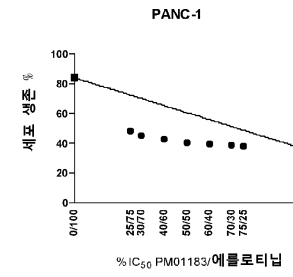
도면93



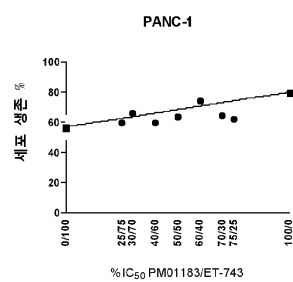
도면94



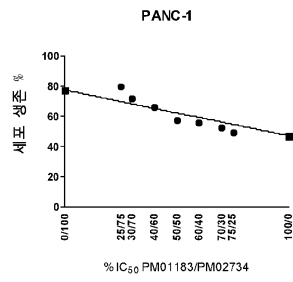
도면95



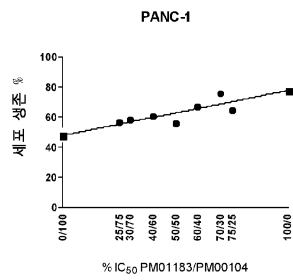
도면96



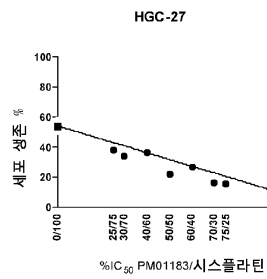
도면97



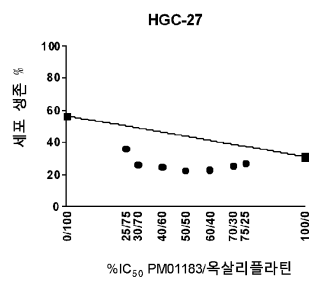
도면98



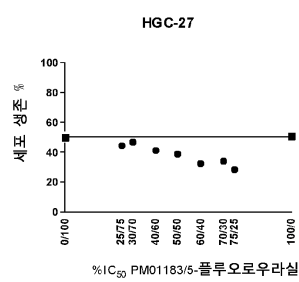
도면99



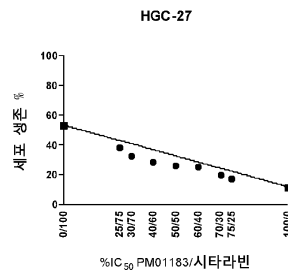
도면100



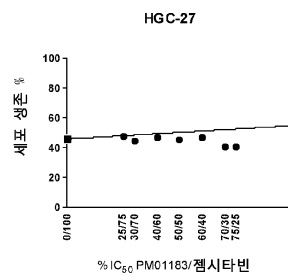
도면101



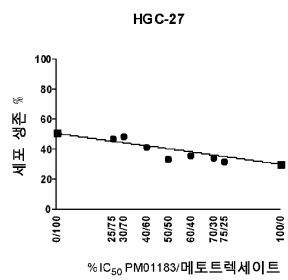
도면102



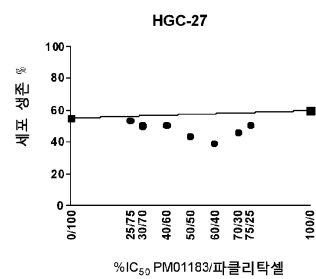
도면103



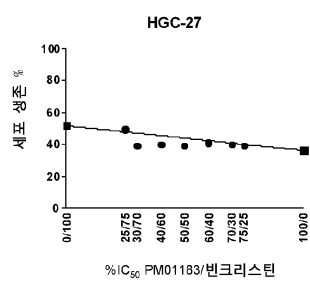
도면104



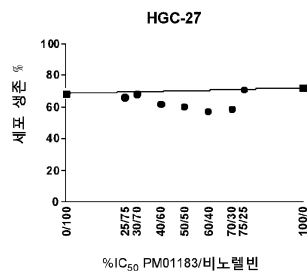
도면105



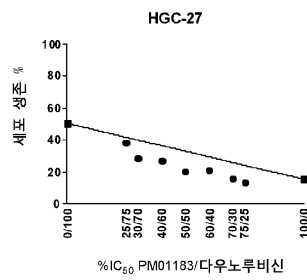
도면106



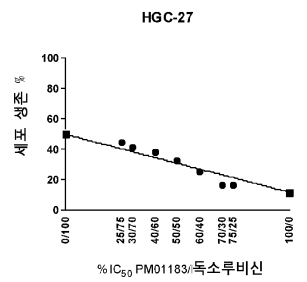
도면107



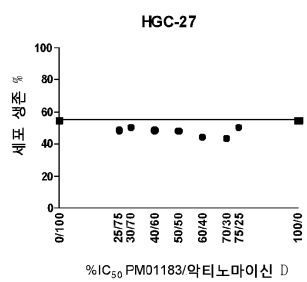
도면108



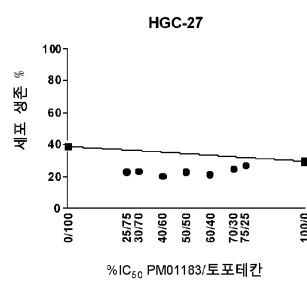
도면109



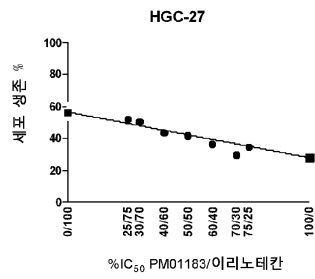
도면110



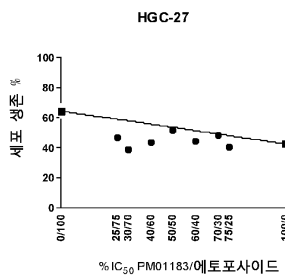
도면111



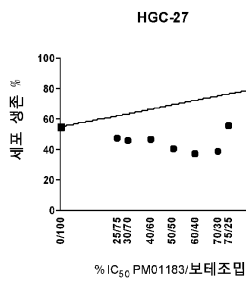
도면112



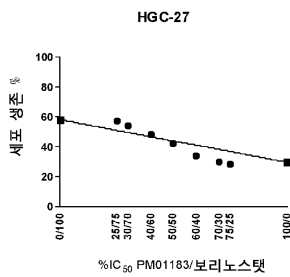
도면113



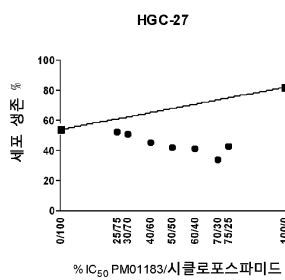
도면114



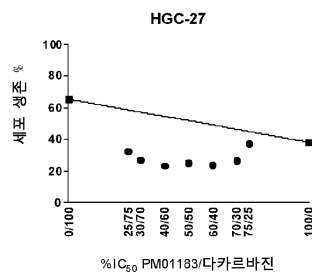
도면115



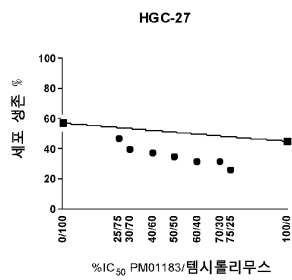
도면116



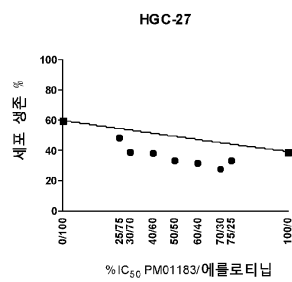
도면117



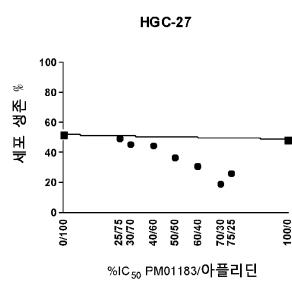
도면118



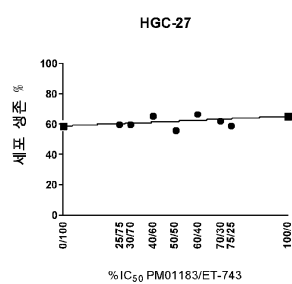
도면119



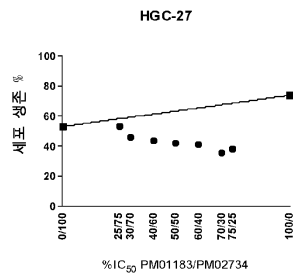
도면120



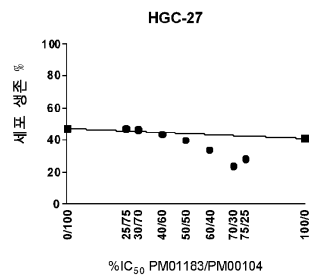
도면121



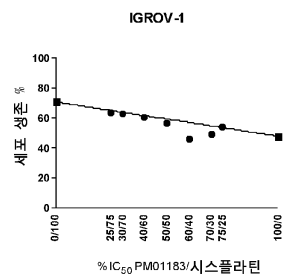
도면122



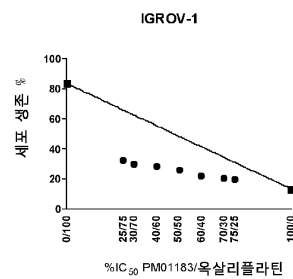
도면123



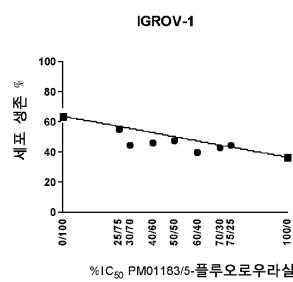
도면124



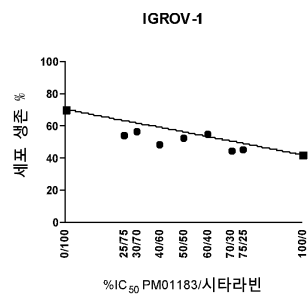
도면125



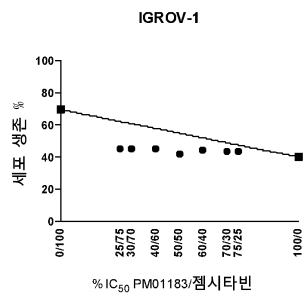
도면126



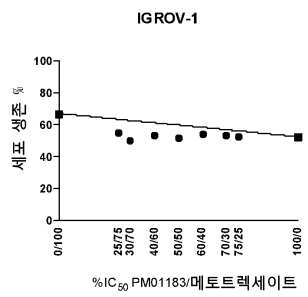
도면127



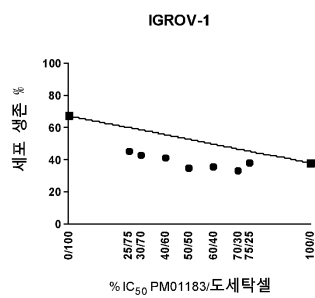
도면128



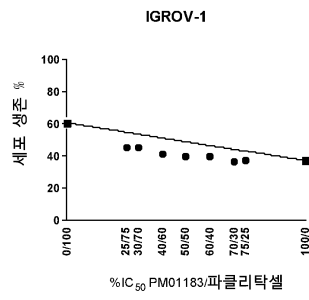
도면129



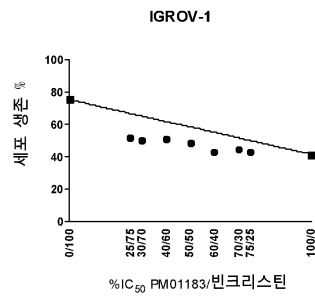
도면130



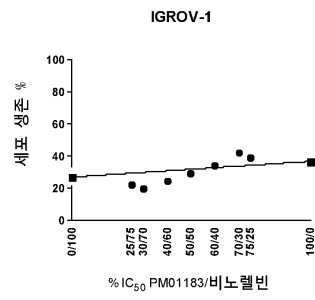
도면131



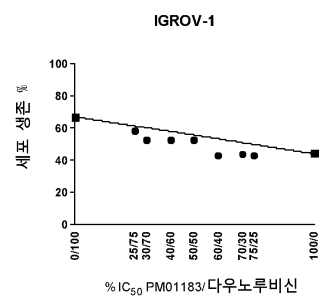
도면132



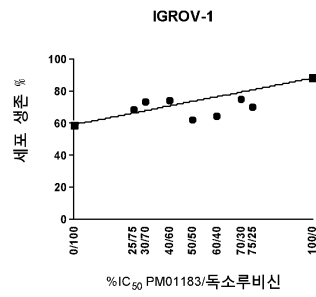
도면133



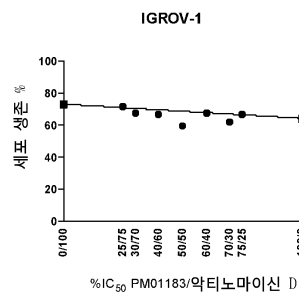
도면134



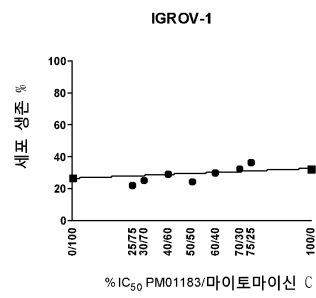
도면135



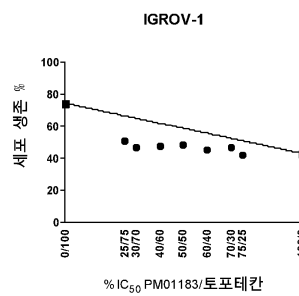
도면136



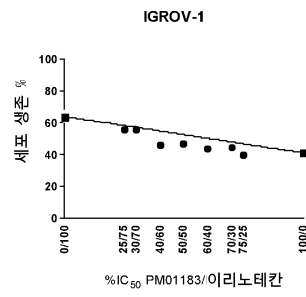
도면137



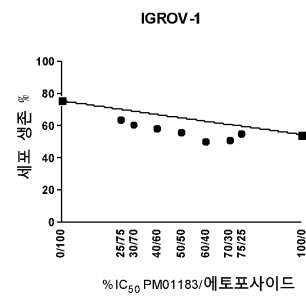
도면138



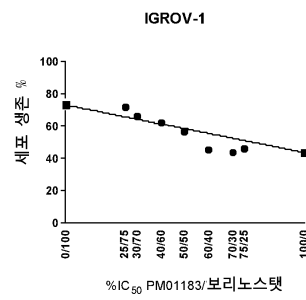
도면139



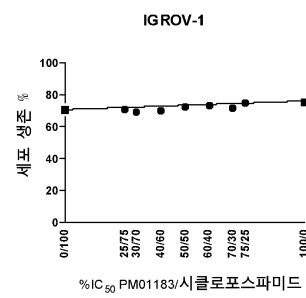
도면140



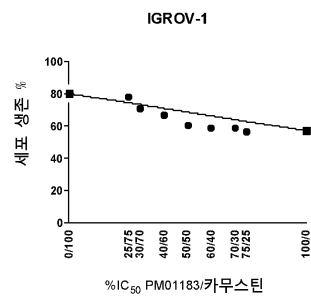
도면141



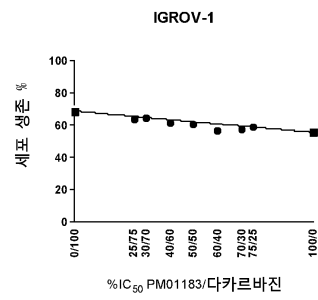
도면142



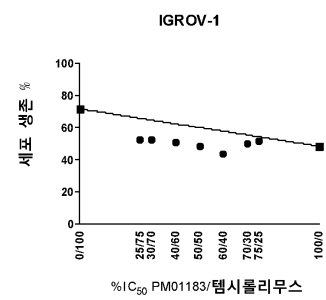
도면143



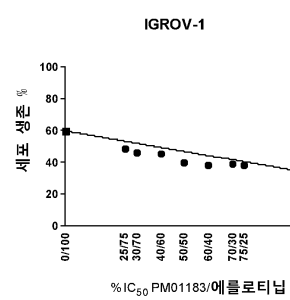
도면144



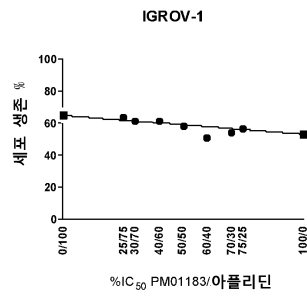
도면145



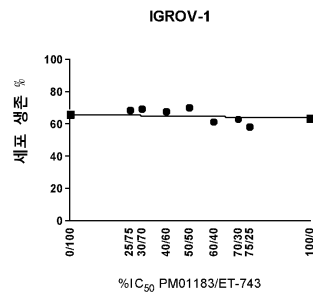
도면146



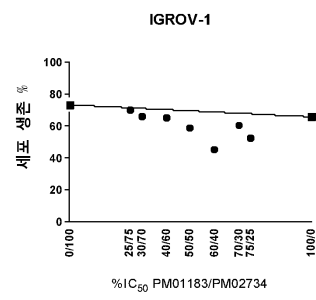
도면147



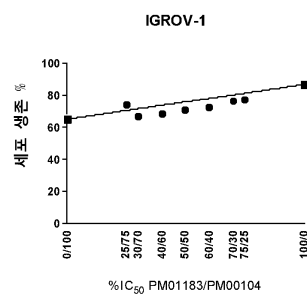
도면148



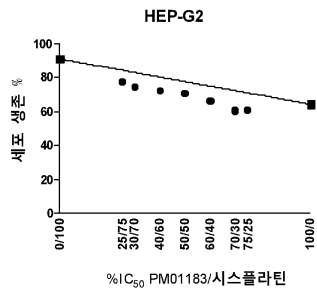
도면149



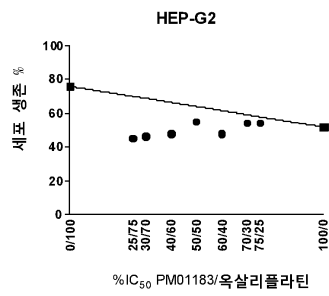
도면150



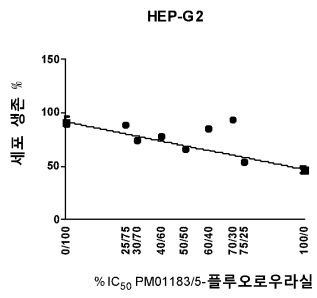
도면151



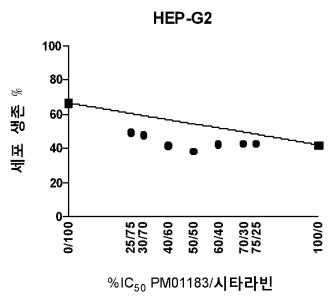
도면152



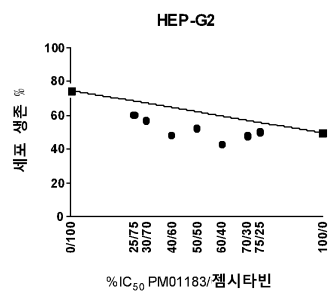
도면153



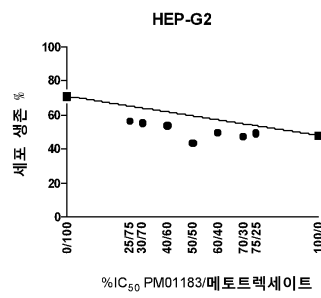
도면154



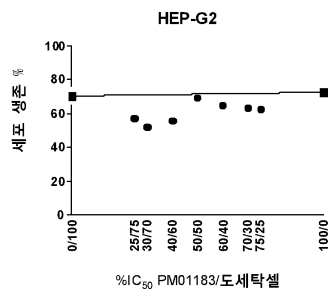
도면155



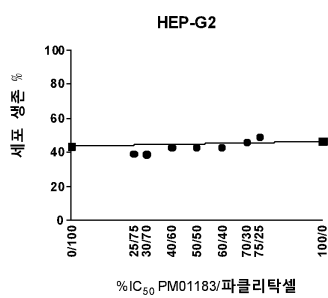
도면156



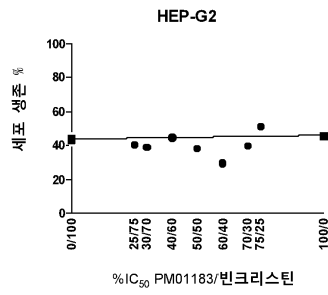
도면157



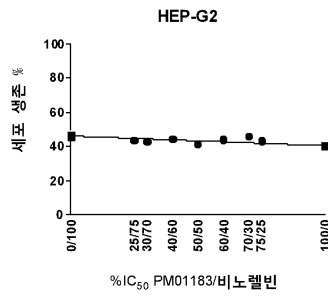
도면158



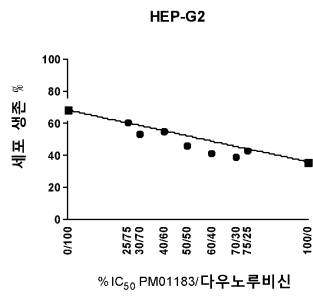
도면159



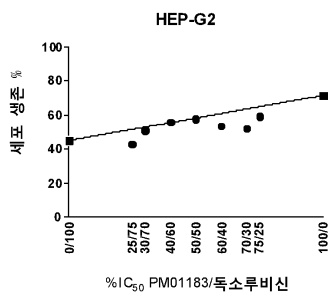
도면160



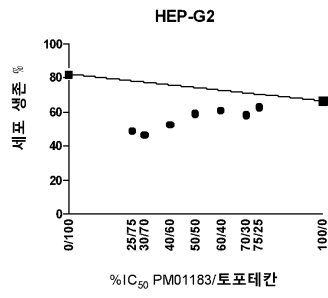
도면161



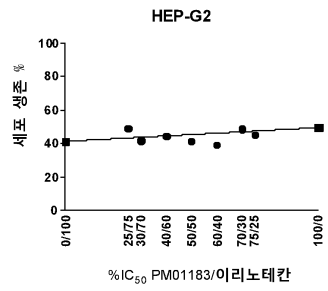
도면162



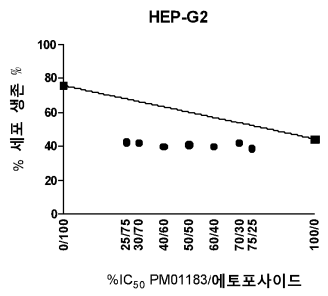
도면163



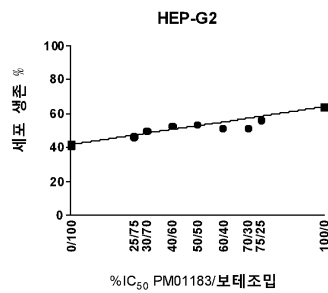
도면164



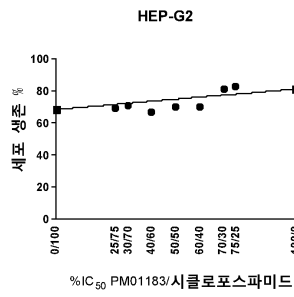
도면165



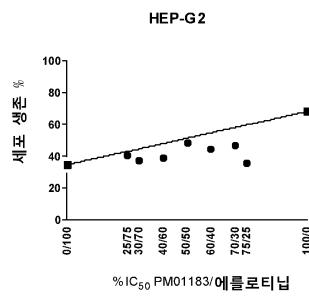
도면166



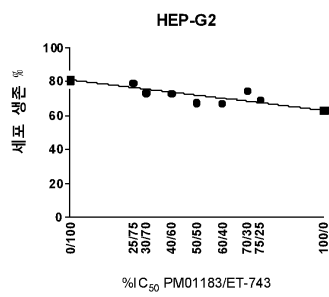
도면167



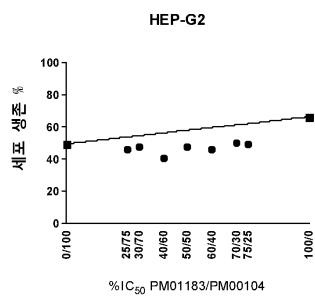
도면168



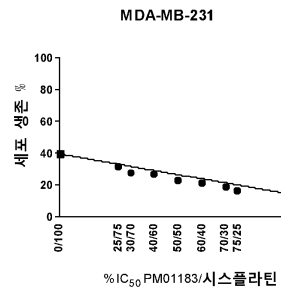
도면169



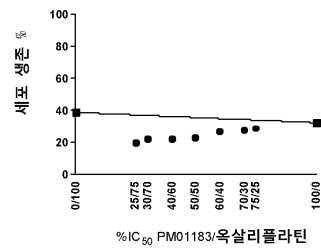
도면170



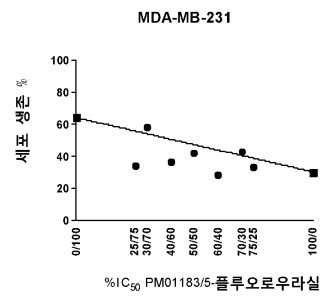
도면171



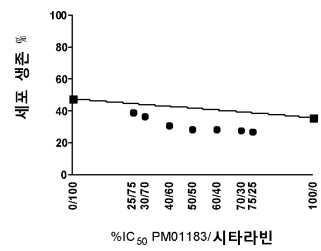
도면172



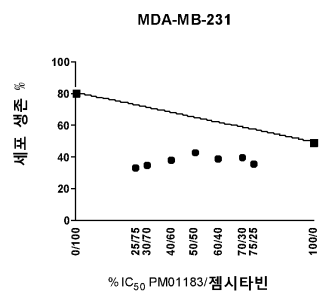
도면173



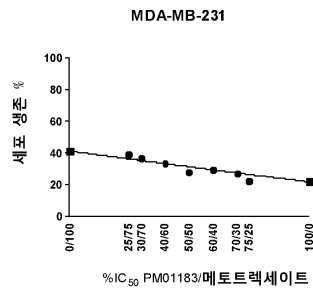
도면174



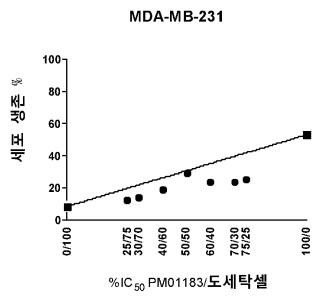
도면175



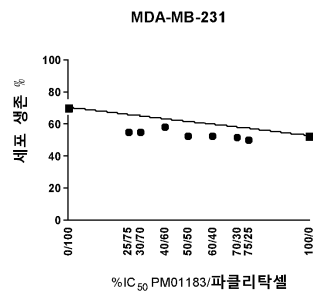
도면176



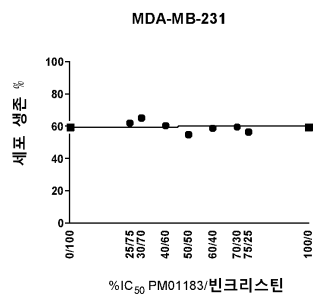
도면177



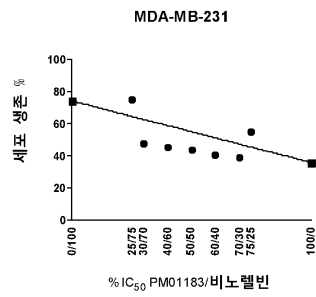
도면178



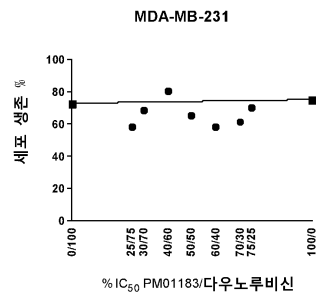
도면179



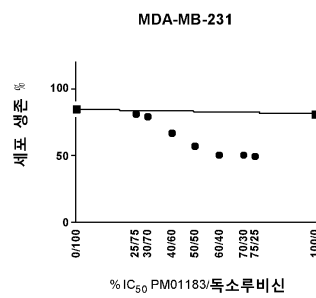
도면180



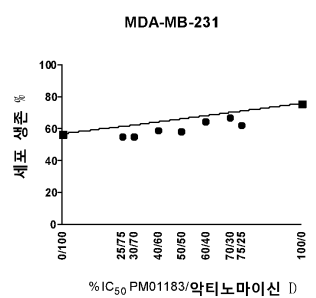
도면181



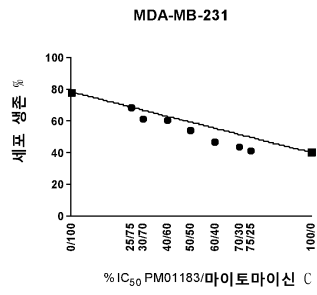
도면182



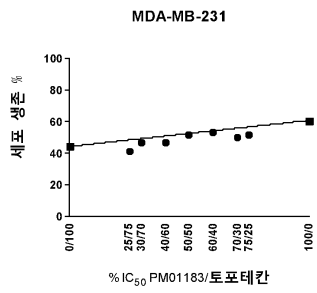
도면183



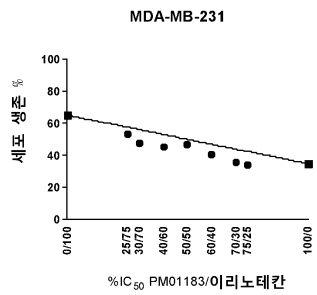
도면184



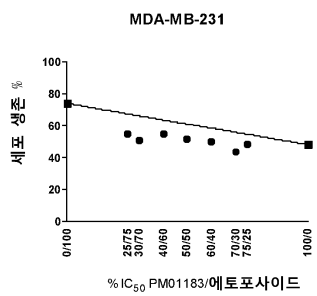
도면185



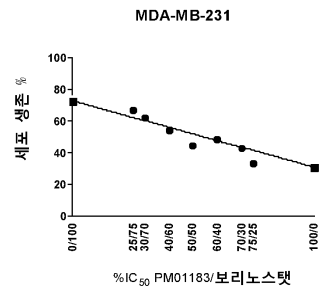
도면186



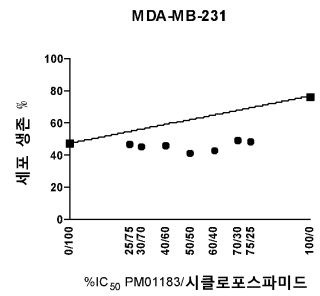
도면187



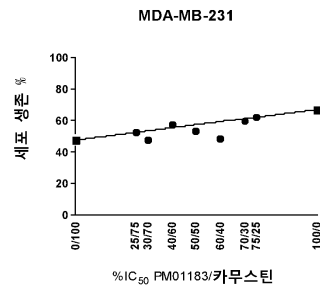
도면188



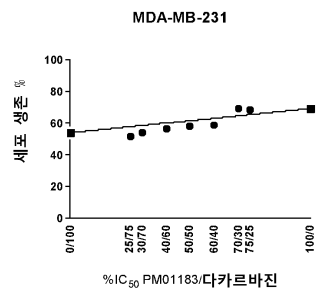
도면189



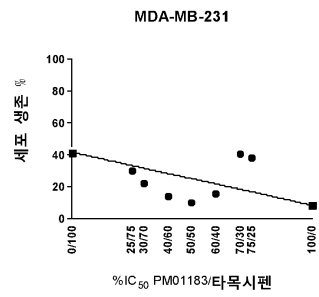
도면190



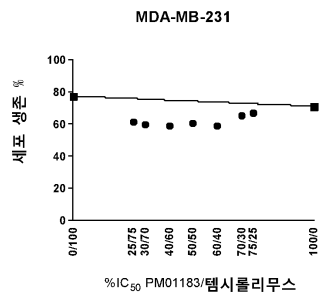
도면191



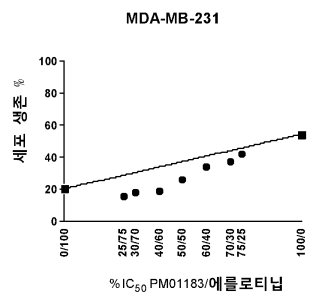
도면192



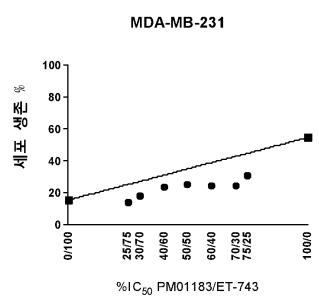
도면193



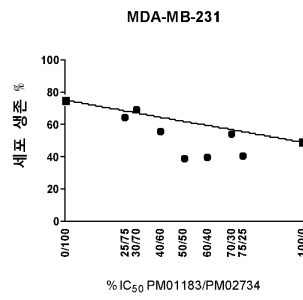
도면194



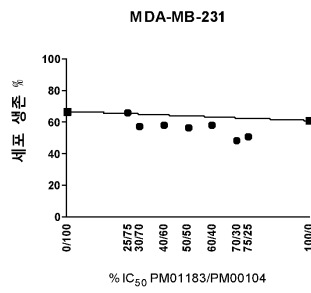
도면195



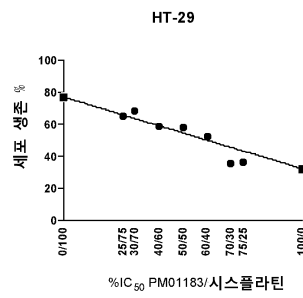
도면196



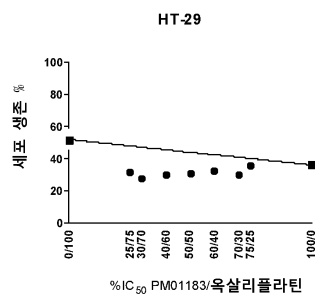
도면197



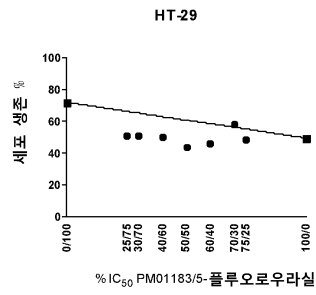
도면198



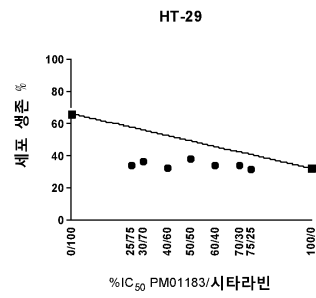
도면199



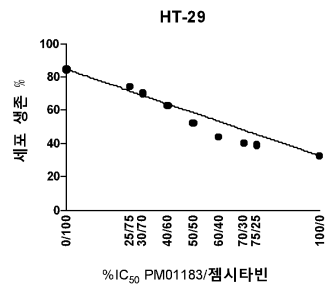
도면200



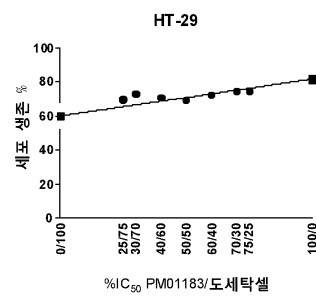
도면201



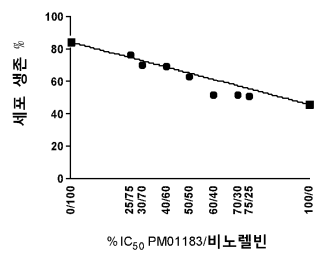
도면202



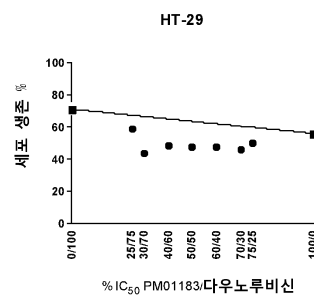
도면203



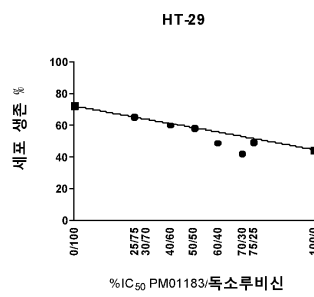
도면204



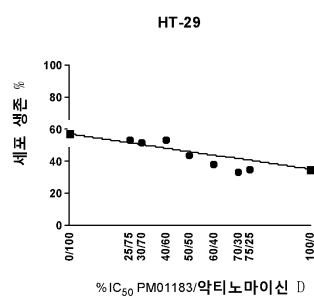
도면205



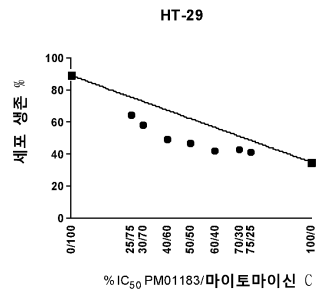
도면206



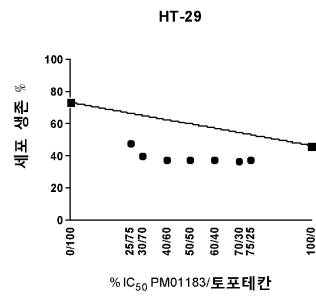
도면207



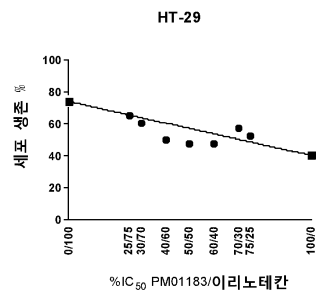
도면208



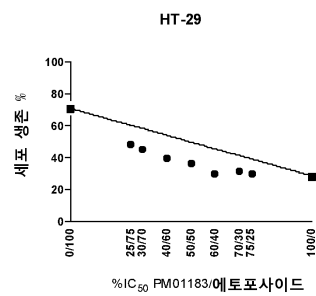
도면209



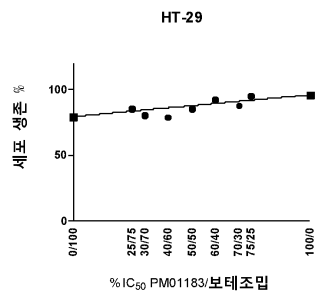
도면210



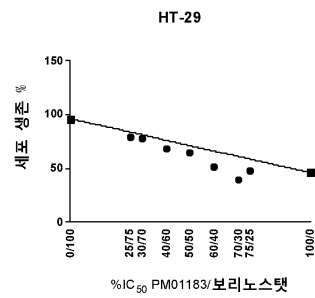
도면211



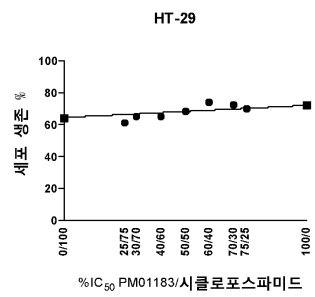
도면212



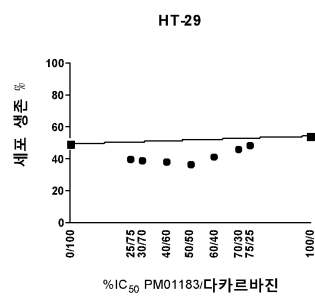
도면213



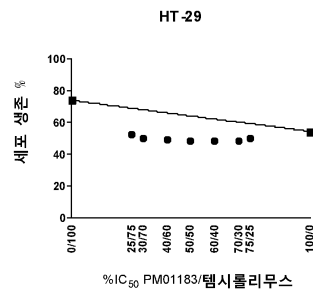
도면214



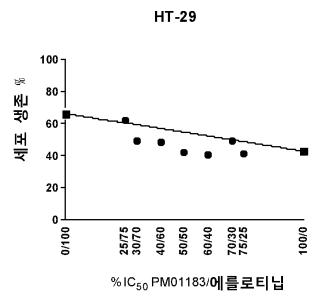
도면215



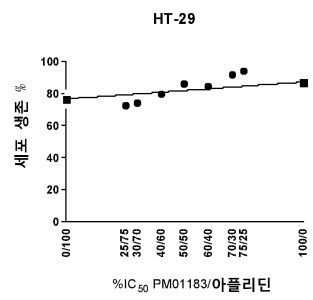
도면216



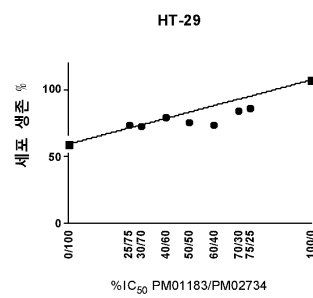
도면217



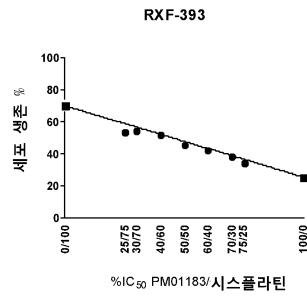
도면218



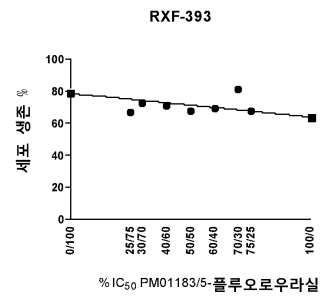
도면219



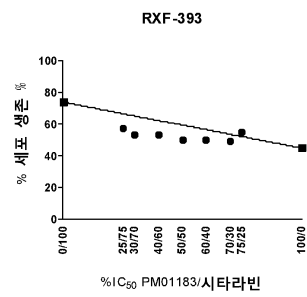
도면220



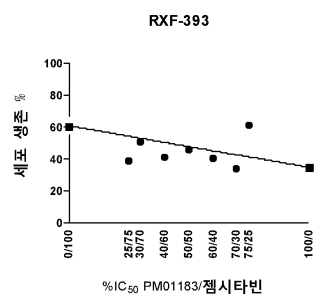
도면221



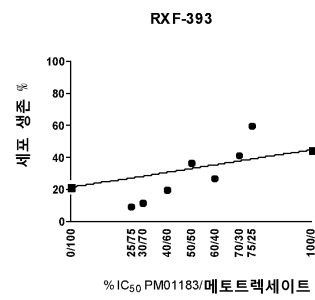
도면222



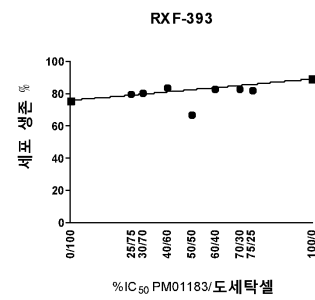
도면223



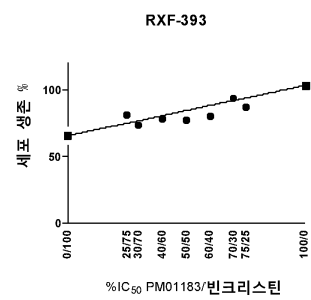
도면224



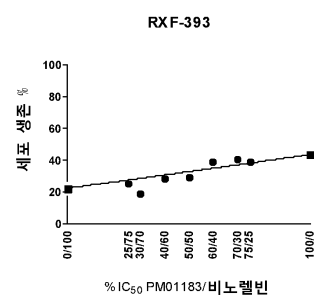
도면225



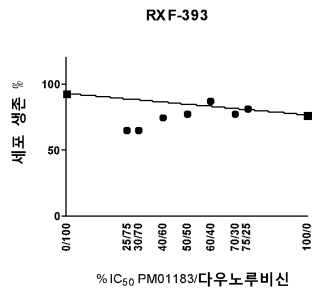
도면226



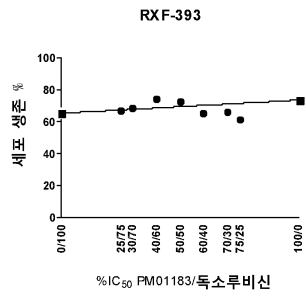
도면227



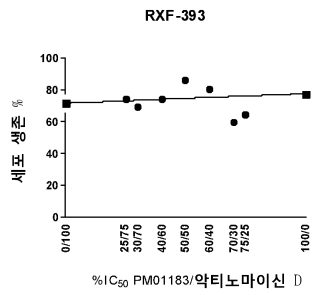
도면228



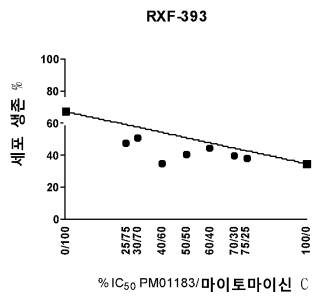
도면229



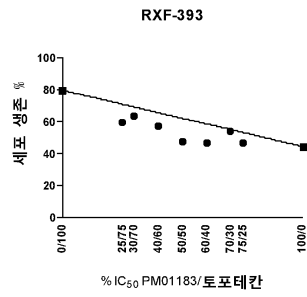
도면230



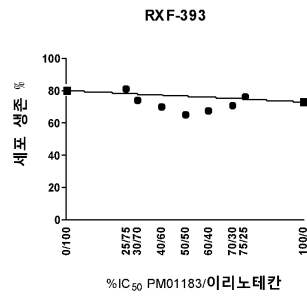
도면231



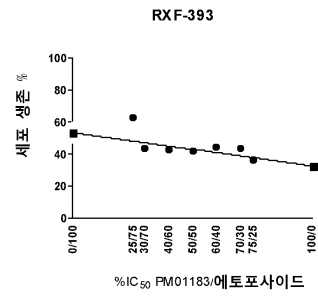
도면232



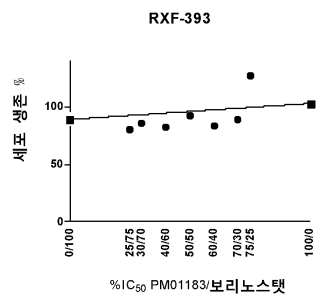
도면233



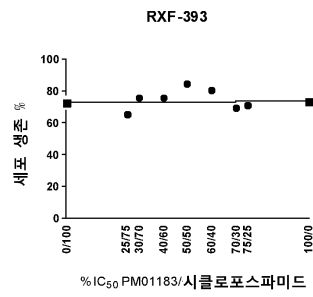
도면234



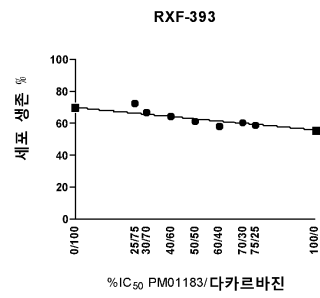
도면235



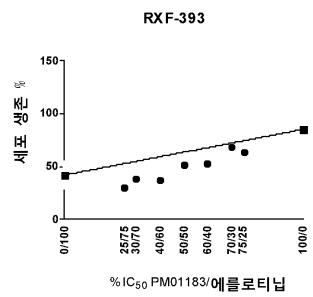
도면236



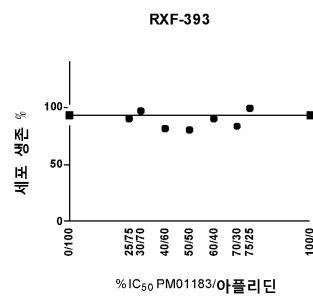
도면237



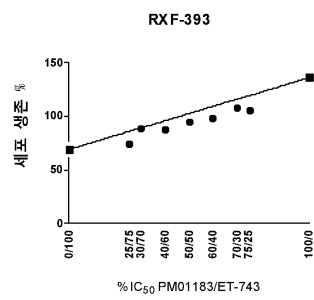
도면238



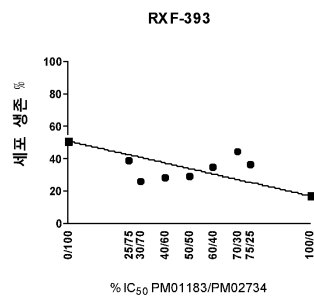
도면239



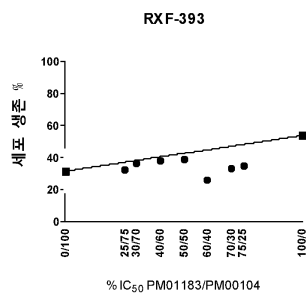
도면240



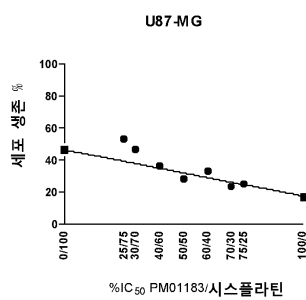
도면241



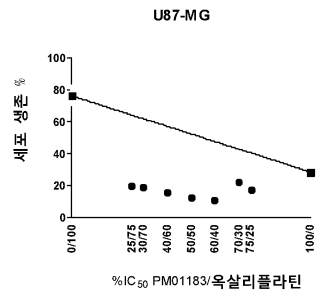
도면242



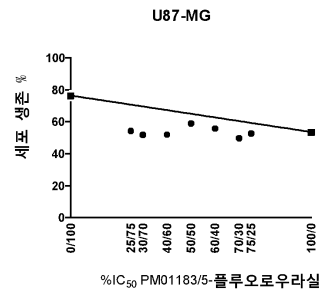
도면243



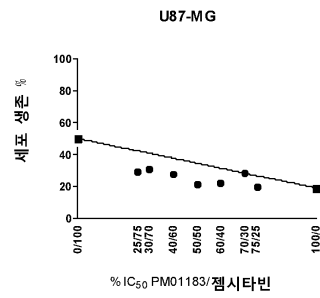
도면244



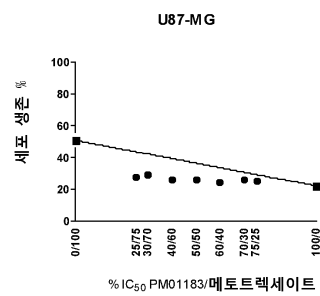
도면245



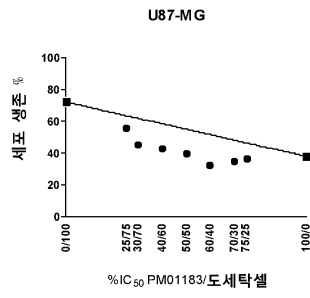
도면246



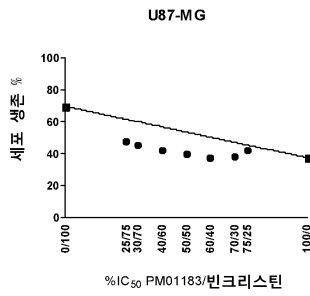
도면247



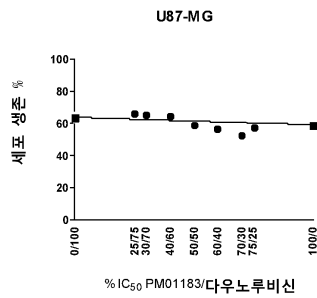
도면248



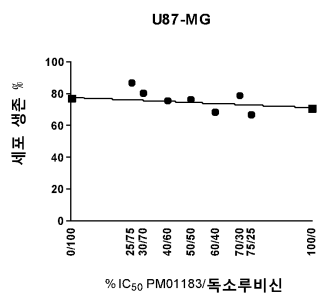
도면249



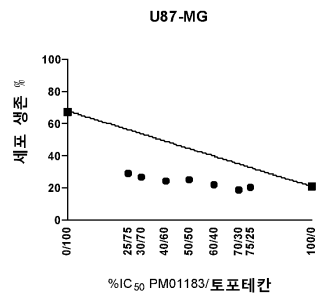
도면250



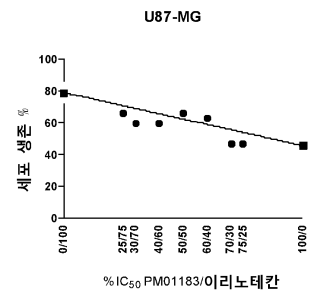
도면251



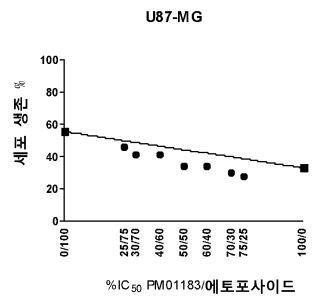
도면252



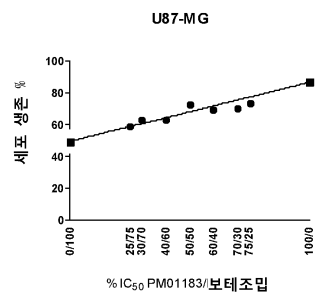
도면253



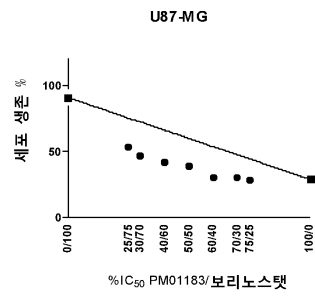
도면254



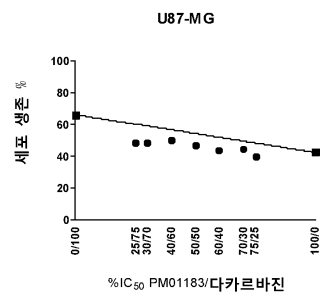
도면255



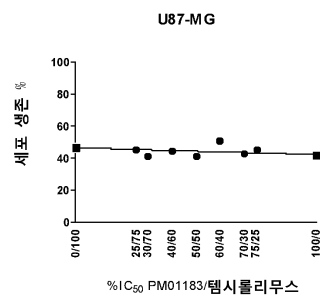
도면256



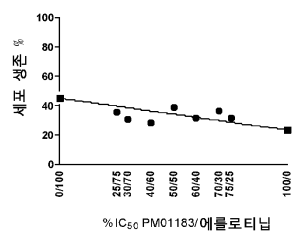
도면257



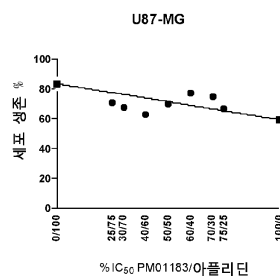
도면258



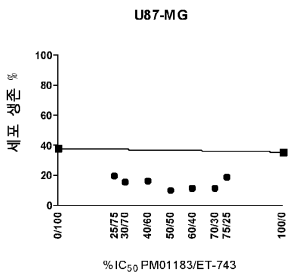
도면259



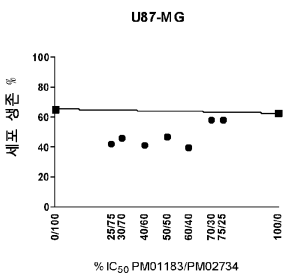
도면260



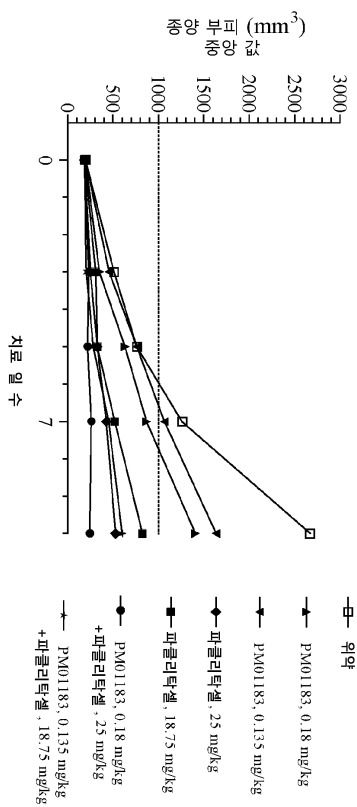
도면261



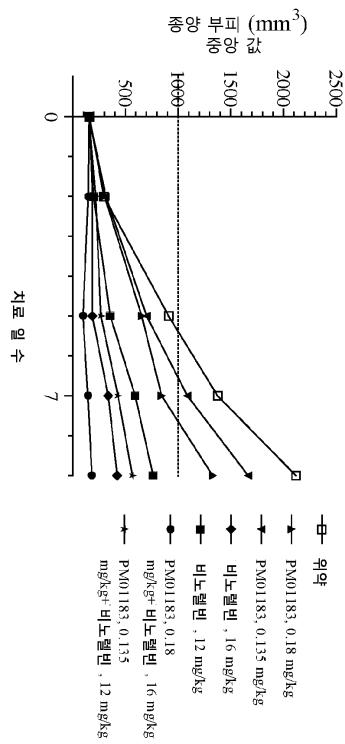
도면262



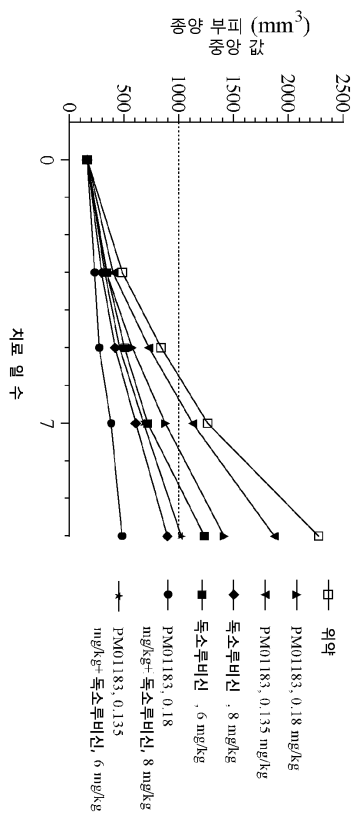
도면263



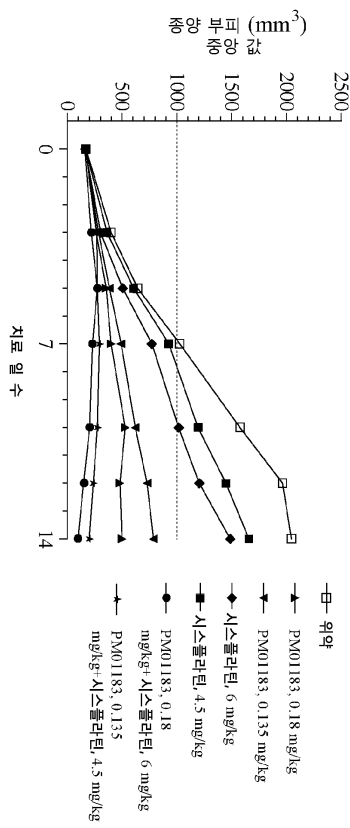
도면264



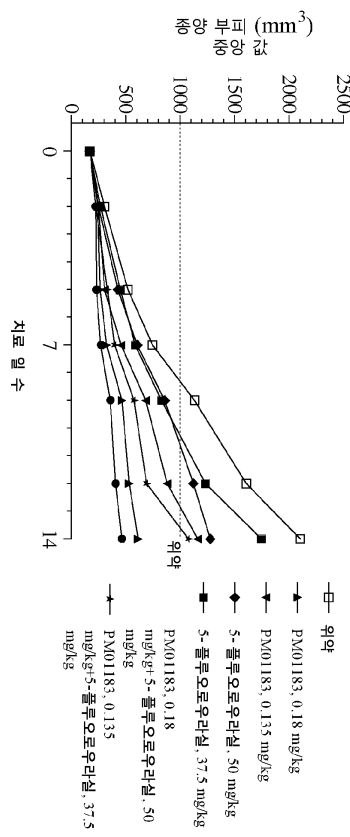
도면265



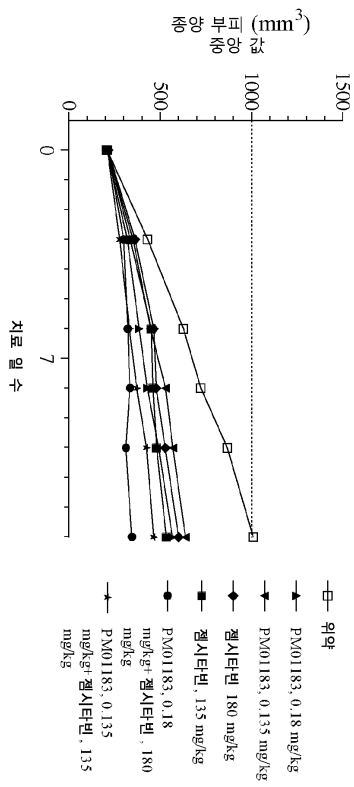
도면266



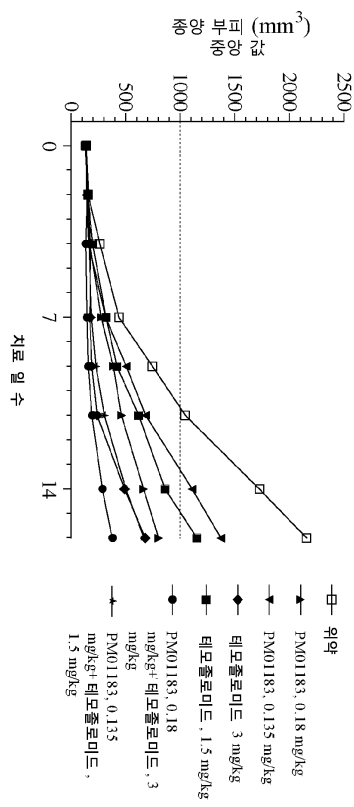
도면267



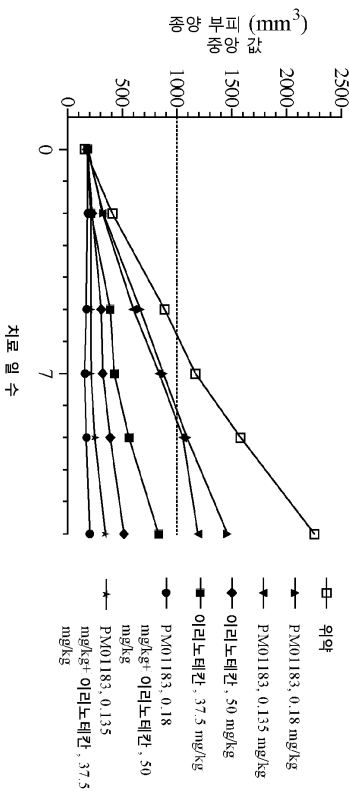
도면268



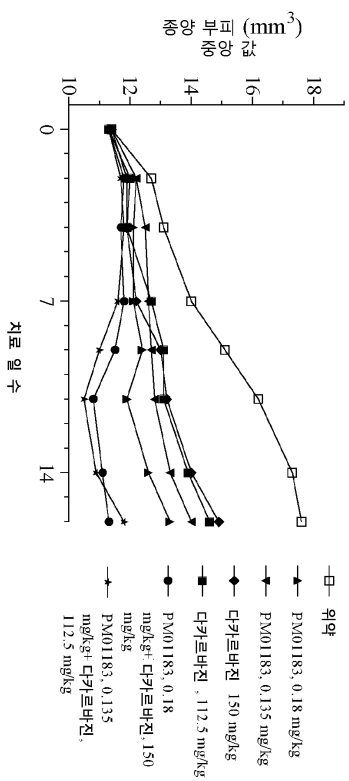
도면269



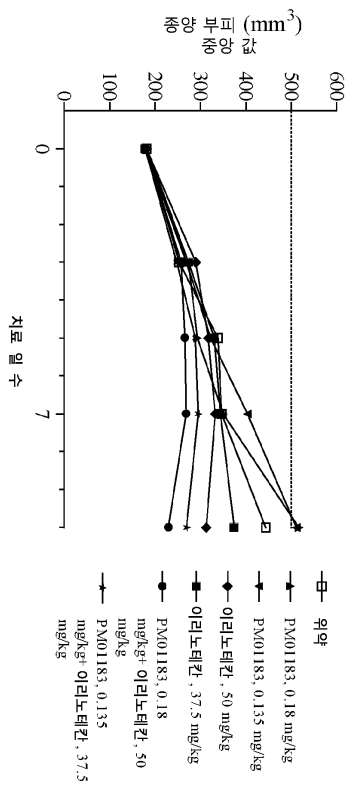
도면270



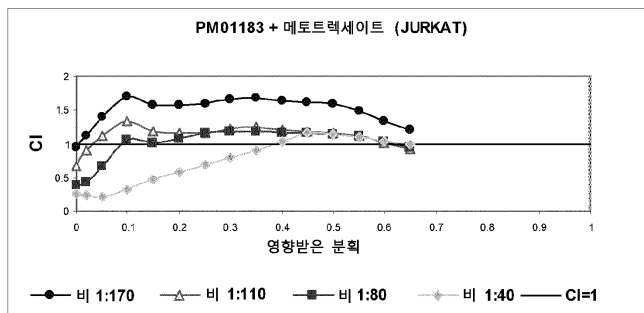
도면271



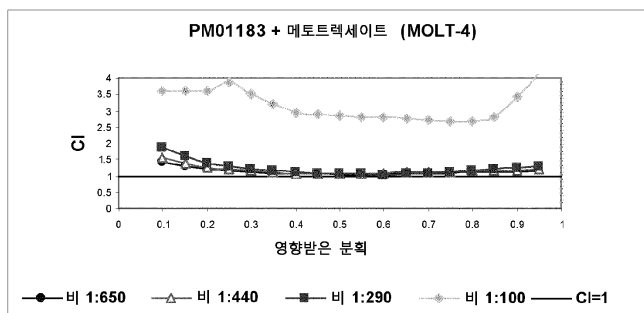
도면272



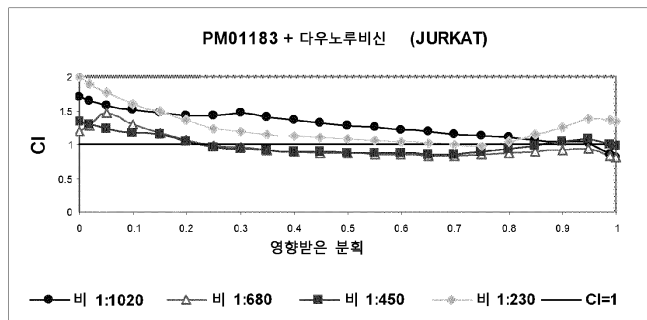
도면273



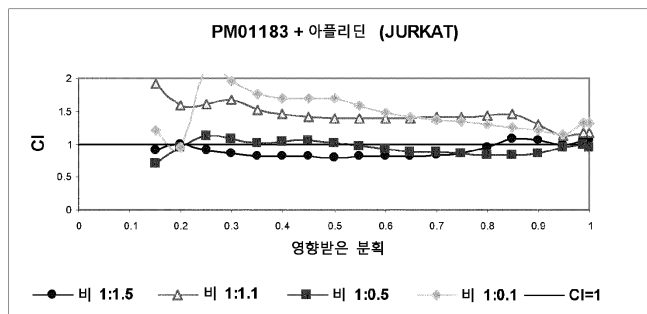
도면274



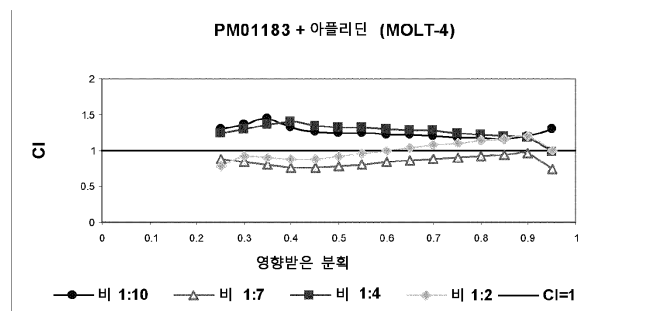
도면275



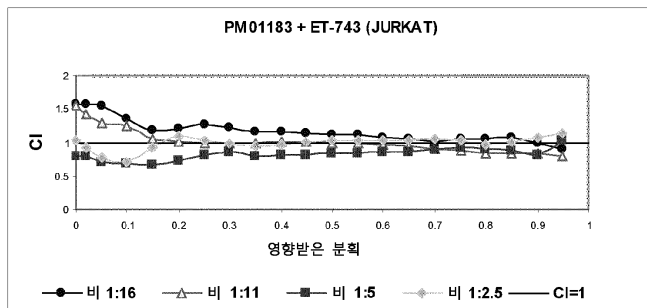
도면276



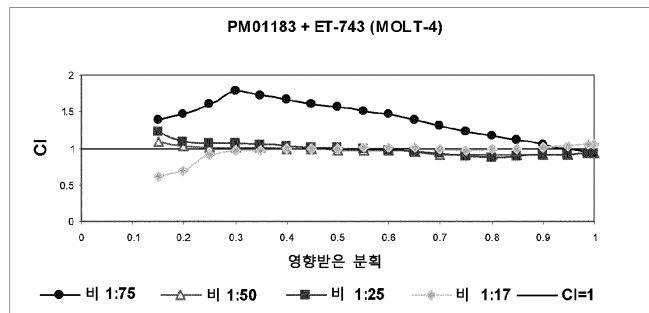
도면277



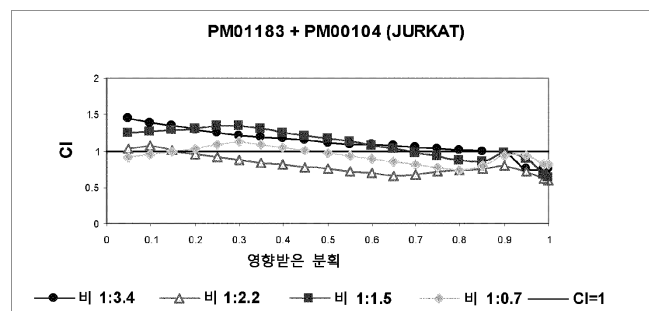
도면278



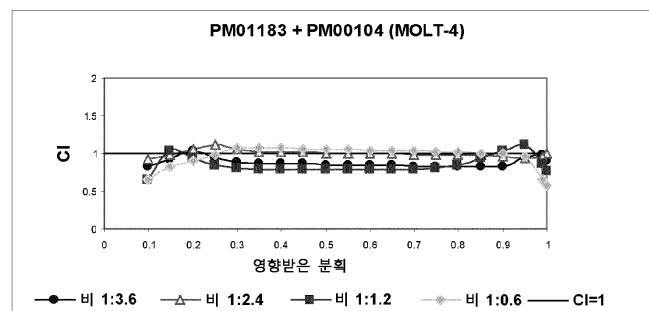
도면279



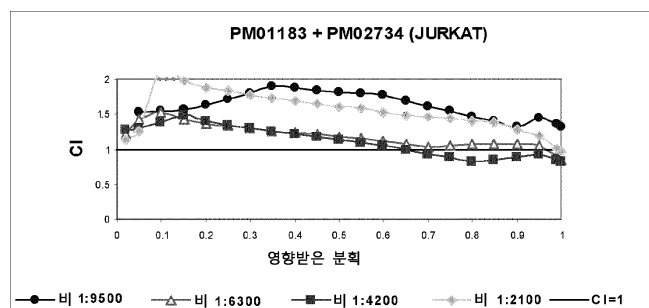
도면280



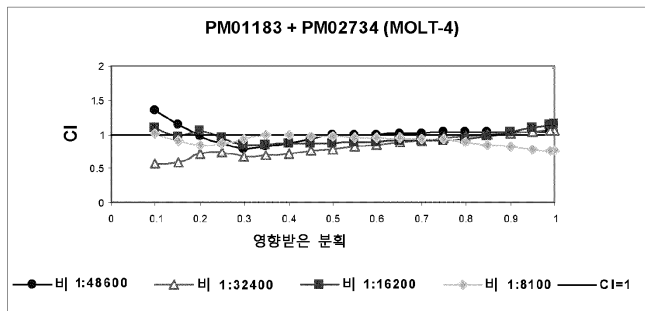
도면281



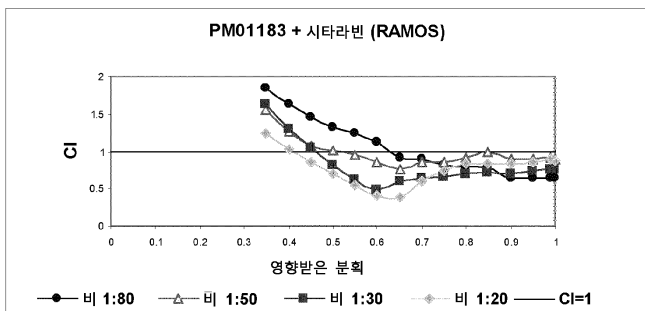
도면282



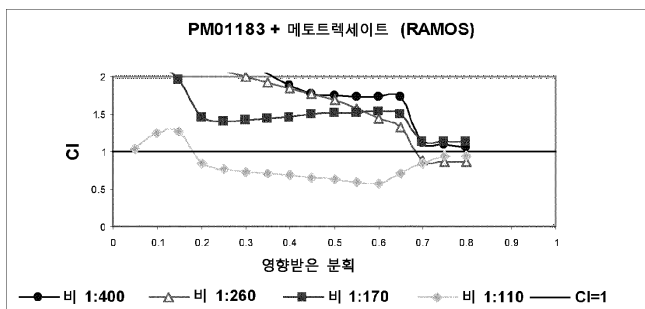
도면283



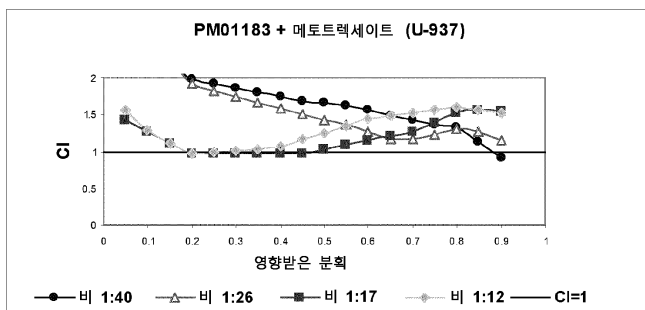
도면284



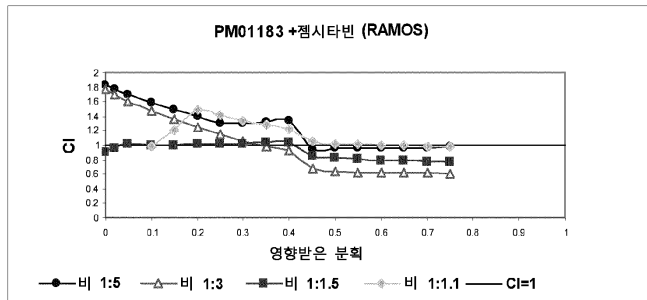
도면285



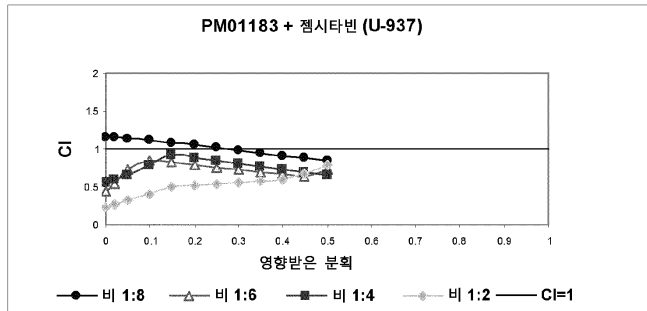
도면286



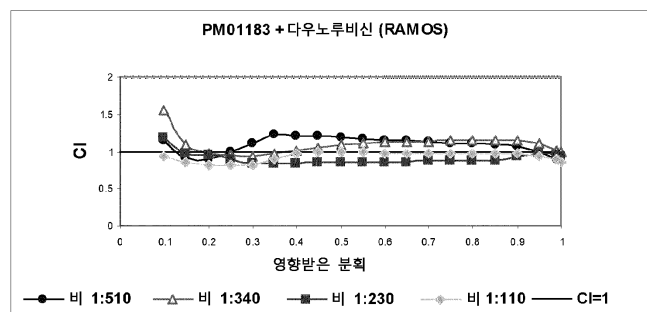
도면287



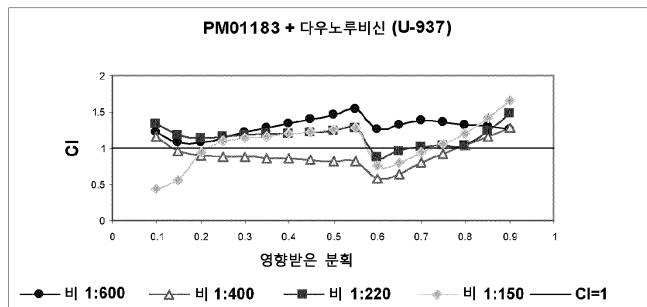
도면288



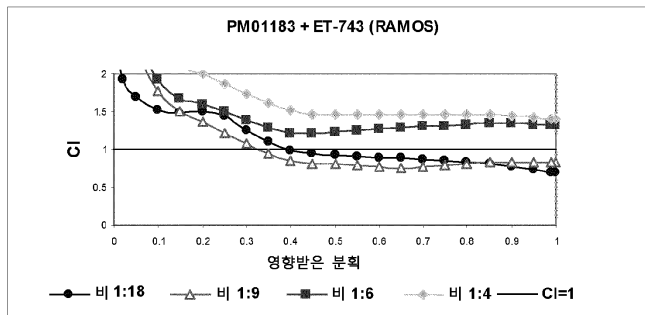
도면289



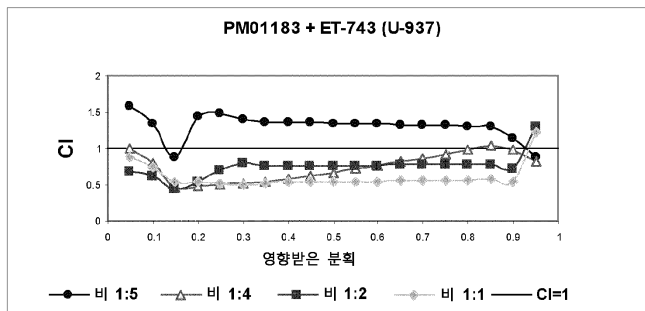
도면290



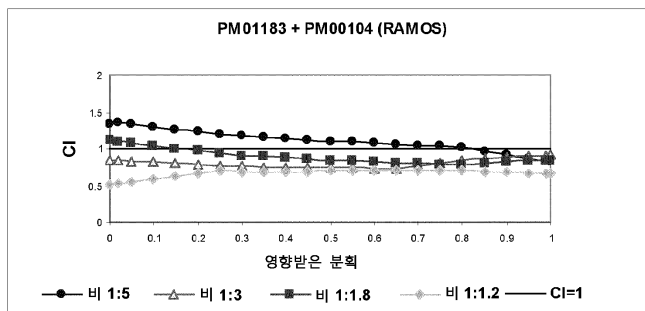
도면291



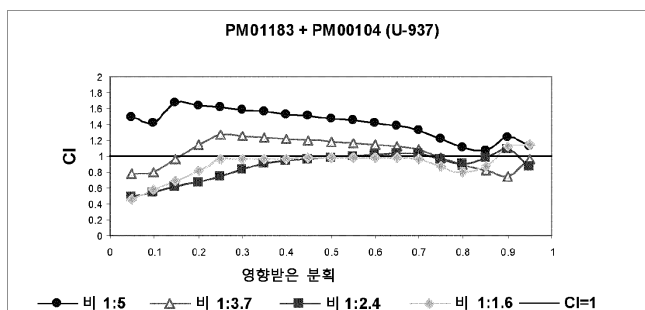
도면292



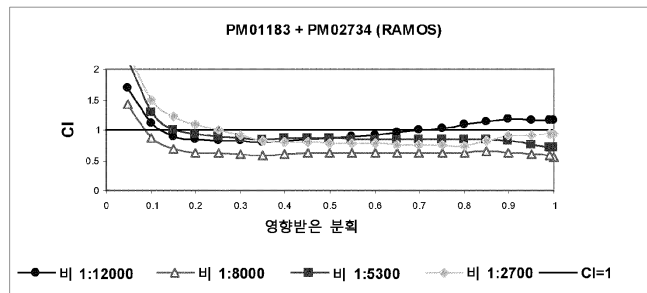
도면293



도면294



도면295



도면296

