

# (19)대한민국특허청(KR)

## (12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 31/17 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/337 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0061367

(43) 공개일자 2006년06월07일

(21) 출원번호 10-2006-7004451

(22) 출원일자 2006년03월03일

번역문 제출일자 2006년03월03일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/009723

국제출원일자 2004년08월27일

(87) 국제공개번호 WO 2005/023273

국제공개일자 2005년03월17일

(30) 우선권주장

60/539,344

MI2003A001714

2004년01월28일

2003년09월05일

미국(US)

이탈리아(IT)

(71) 출원인

젠티엄 에스피에이

이테리 코모 가르디아 빌라 22079 피아자 엑스엑스 세템브레 2

(72) 발명자

페로, 라우라, 이리스

이탈리아, 밀라노 아이-20021, 24/6, 피아체타 디 브레라

이아코벨리, 마씨모

이탈리아, 밀라노 아이-20152, 260/3, 비아 포르제아르메타

리차드선, 폴

미국, 매사추세츠 01170, 서본, 사이더 힐 레인 50

(74) 대리인

정홍식

심사청구 : 없음

(54) 디파이브로타이드를 단독으로 또는 다른 항암제들과조합하여 포함하는 항암제제

요약

디파이브로타이드의 단독 또는 다른 항암작용을 하는 활성성분들과 조합하여 사용되는 항암제로서의 용도가 개시된다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 주제는 포유동물에 유효량의 디파이브로타이드(defibrotide)를 투여함으로써, 암이 발병한(affected) 포유동물을 치료하는 방법이다.

### 배경기술

디파이브로타이드(이하 DF)라는 용어는 일반적으로 동물 및/또는 식물 조직으로부터 추출하여 얻는 폴리데옥시리보뉴클레오티드(polydeoxyribonucleotide)와 동일한 용어이다(1,2); 폴리데옥시리보-뉴클레오티드(polydesoxyribonucleotide)는 일반적으로 알칼리-금속 염, 통상적으로 나트륨 염의 형태로 사용되고, 통상적으로 약 45- 50 kDa의 분자량을 갖는다(CAS 등록번호: 83712-60-1).

DF는 예를 들면, 급성 신장 기능부전 치료(4) 및 급성 심근 허혈 치료(5)와 같은 다른 응용분야에서 사용될 수 있음에도 불구하고 그의 항혈전 활성(3)과 관련하여 주로 사용된다. DF는 또한, 응급한 임상상태의 치료에 사용되는데, 예를 들면, 높은 복용량의 화학요법 처방 특히, 간정맥폐쇄 증후군에 관련된 독성 억제에 사용된다(10, 11); DF는 플루다라빈의 항백혈병성 효과에 영향없이 플루다라빈(fludarabine)에 의하여 유도되는 세포사(apoptosis) 및 내피성 및 상피성 세포들의 전활성화(alloactivation)에 대한 보호작용을 가지고 있는 것으로 나타났다(12); 지질다당류에 의하여 매개된 내피성 손상 모델로부터 얻어진 DF의 보호효과에서 전임상 데이터 또한 나타났다(13).

일관적이고 명확한 물리적/화학적 특성들을 갖고, 그리고 가능한 바람직하지 않은 부작용들이 나타나지 않는 제품을 생산할 수 있도록 DF를 제조하는 방법이 미국 특허들에 개시되어 있다(6,7).

### 발명의 상세한 설명

이하의 실험에서, DF는 고복용량의 화학요법을 적용하고 있는 종양이 이식된 쥐를 이용한 세포배양 및 실험모델에서, 생쥐 EMT-6 유방암종 세포들 모델 및 우형 내피성 세포들에서 세균발육억제성 세포독성제와 조합되어 실험되었다,

4-히드로퍼옥시시클로-포스파미드(4HC)를 배양한 생쥐 EMT-6 유방암종 세포들에 노출하기 전 및 노출중, 또는 노출중 및 노출후에, 50 $\mu$ g/ml 농도의 DF에 노출한 결과, 50 및 250  $\mu$ mol 사이 농도의 4HC에서 암세포 살상에 있어서 약 2 대수 단위만큼의 증가를 야기할 수 있는 정도로 4HC의 세포독성이 상당히 증가하였다(도 1 참조). 50 $\mu$ g/ml 농도의 DF 노출 또한 노출 방법의 명백한 차이로 인한 티오테파의 세포독성 증가를 유도한다. 특히, 티오테파에 노출되기 전 및 노출중에 DF에 EMT-6 세포들을 노출하는 것은 100 및 250  $\mu$ mol 사이 농도의 티오테파에 대하여 2 대수단위만큼으로 암 세포들에 대한 세포독성을 증가시킨다. 이로 인해 알 수 있는 흥미로운 데이터는 티오테파의 세포독성에서 0.5 및 1 대수단위 사이의 증가를 보이는, 이는 비록 더 작은 범위에서지만, EMT-6 세포들을 티오테파에 노출하는 중 및 노출후에 DF에 노출되면 세포독성이 증가된다는 점이다. 유사한 결과가 카보플라틴에서도 관찰되었다; 그러나, 멜팔란에 노출하기 전 및 노출중 또는 노출중 및 노출후에 DF에 노출하는 것은 배양한 생쥐 EMT-6 유방암종 세포들에 대한 멜팔란의 세포독성에 대하여 의미있는 효과를 나타내지 않았다.

반면, 배양된 우형 내피성 세포들에 대한 이들 세균발육억제성 알킬화제 (antiblastic alkylating agent, AA) 단독의 세포독성이 EMT-6 유방암종 세포들에서 관찰된 것과 유사하다는 것이 증명되었음에도 불구하고, 이 타입의 세포 배양 모델이 50 $\mu$ g/ml 농도의 DF와 함께 AA들에 노출되었을 때는 세포독성면에서의 증가를 나타내지 않았다.

헤파토톡신 모노크로탈린 및 AA 카르무스틴 (BCNU)이 단독 또는 DF와 함께 유방암종 13762가 이식된 쥐를 사용한 실험 모델에서 생체실험되었다. 이 실험모델에서, 동물들에 이들 독성제들을 DF와 함께 노출시켰을 때 동물들에서 추가적인 독성이 나타나지 않았으나, 의미있는 수준의 종양 성장 지연(tumour growth delay, TGD)이 관찰되었다(표 1과 도 2a 및 2b 참조).

[표 1]

단독 또는 디파이브로타이드(DF)와 함께 모노크로탈린 또는 BCNU로 치료한 후에 유방암종 13762가 이식된 쥐에서의 종양 성장 지연. 종양은 0일째에 이식되어 화학요법이 8일째 및 18일째에 투여되었다.

치료그룹	500mm <sup>3</sup> 에 도달할 일수	TGD (일수)	p 값
제어군	14.6±0.8	-	-
모노크로탈린 (350 mg/kg) ip 8 & 18일	15.6±1.0	1.0	0.435
DF (200 mg/kg) iv 하루에 두번, 8-26일 +모노크로탈린	16.1±0.6	1.5	0.134
DF (200 mg/kg) iv 하루에 두번, 10-26일 +모노크로탈린	18.2±1.5	3.6	0.034
BCNU (150 mg/kg) ip 8 & 18일	18.0±2.5	3.4	0.195
DF (200 mg/kg) iv 하루에 두번, 8-26일 +BCNU	19.7±1.5	5.1	0.003
DF (200 mg/kg) iv 하루에 두번, 10-26일 + BCNU	21.3±1.6	6.7	0.0002

이들 실험들은 단독 또는 DF와 함께 모노크로탈린, BCNU, 및 시클로포스파미드(cyclophosphamide, CTX)를 사용하여 동일한 실험 모델에서 재시행되었다. 제어군과 비교하면, DF를 단독으로 사용하여 의미있는 수준의 종양 성장 지연(TGD)이 관찰되었다( $p < 0.05$ ); 이러한 지연은 DF가 CTX 및 BCNU와 함께 사용되었을 때 특히 의미있는 수준으로 나타났다( $p < 0.04$ ) 그리고, 각각 독성제의 개별적인 사용에 의하여 획득한 것에 비하여 현저하게 높았다. 예상치 못하게도, DF가 단독으로 사용되는 경우, 처음에는 종양의 성장을 지연시켰으나, 그후에는 종양 성장은 통상수준으로 다시 회복되었다. 더우기, DF가 AA와 조합하여 사용되는 경우, 종양은 DF의 공동투여가 중단되자마자 급속하게 재성장하게 되었다. 이 데이터는 DF의 추가적인 항암효과뿐만 아니라 또한 직접적인 DF 자체의 세포발육억제활성에 대하여 시사하고 있다.

카보플라틴과 함께이거나 또는 아니거나 DF가 파클리탁셀 치료와 함께 추가되었을 때, 세포독성 치료 단독과 비교하여 루이스 폐 암종(LEWIS pulmonary carcinoma)을 이식한 생쥐에서 종양 성장(TGD) 및 폐전이 횡수면의 감소 또한 관찰되었으나, 독성면에서는 분명한 증가를 나타내지 않았다(데이터는 제시되지 않음). 이들 효과의 기저에 깔려있는 메카니즘은 설명되지 않았으나, 약물 저항에 연관된 메카니즘에서의 세포 점착성 역할이 있음을 가정하면 DF의 점착 방지 성질이 연관되어 있을 가능성이 있다(8,9).

또한, DF가 인간 다발성 골수종(multiple myeloma, MM)의 무린(murine) 모델에서 생체 활성을 가지고 있는지 실험되었다. 60마리의 수컷 SCID/NOD 생쥐(6-8주 성장)에 방사선(450 라디안)이 조사되었고, 24시간 후에, 5x10<sup>6</sup> MM-1S 인간 MM 세포들과 함께 s.c.가 주입되었다. 촉진하여 알 수 있는 종양이 형성되고, 생쥐들은 임의로 6조(각각 10마리의 생쥐들)로 배치되어 a) 운반제(vehicle); b) DF (i.v. 450 mg/kg b.i.d); c) 멜팔란 (MEL) 2.5 mg/kg i.p. 일주일에 한번; d) 시클로포스파미드 (CTX) 50 mg/kg i.p., 8, 10, 12, 20, 22 및 24일째에; e) 및 f) MEL 또는 CTX와 함께 DF (300 mg/kg i.v.)를 조합하여 각각을 투여받았다. 생쥐들은 체중, 잠재 독성, 및 전자 캘리퍼를 이용한 종양부피에 대하여 3일마다 모니터링되었다.

DF는 단독으로 또는 MEL 또는 CTX와 조합하여, 모든 그룹에서 출혈성 합병증 또는 체중감소없이 잘 투여되었다( $P > 0.05$ ). 효능의 주요 끝점들은 a) 종양 부피 변화 및 b) 전체적인 생존(희생시간(time-to-sacrifice), 종양 직경  $> 2$  cm일 때 수행된)이었다. DF 치료는 제어군 생쥐들에서보다 상당히 낮은 종양 부피를 나타낸 결과를 가져왔다(분산분석 및 사후 검정법에 의한 모든 비교군에 대하여  $P < 0.05$ ); MEL 또는 CTX와 조합하여서는 각각의 단일 약물 세포독성 화학요법보다 상당히 더 낮은 종양 부피를 갖도록 유도하였다(모든 비교군에 대하여  $P < 0.05$ ).

카플란-메이어 생존 분석(Kaplan-Meier survival analysis)은 DF 투여가, 단일 약물로 또는 세포독성 화학요법 (MEL 또는 CTX)과 조합하여서, 운반제-처리 제어 그룹 또는 MEL- 또는 CTX-처리 그룹들, 각각과 비교하여 전체 생존이 만족할

만도록 상당히 연장된다는 것을 나타내었다(모든 비교군에 대하여  $P < 0.001$ , 로그순위검정). 흥미롭게도, 시험관내 실험에서는 MM 세포들에 대한 DF의 의미있는 수준의 직접적인 관내 세포독성 효과가 나타나지 않았는데, 이는 관찰된 생체 활성이 MM 세포들의 국부적 미세환경과의 상호작용의 효과에 기인할 수도 있다는 것을 암시하고 있다.

이들 장래성 있는 결과들은 이 MM 화학요법 모델에서 DF가 중앙 보호 작용을 부여하지 못하고, DF는 MM에 대한 생체 항암 활성을 갖을 뿐 아니라 세포독성 치료에 대한 반응을 개선한다는 첫번째 이론 증명을 구성한다. 이 실험은 DF의 항-MM 활성이 MM 세포가 그들의 미세환경과의 상호작용의 효과에 기인할 수 있다는 것을 제안하고, MM 및 다른 신생물들의, 치료를 위하여 다른 약물과 조합하여 DF를 장래에 임상적으로 사용시도하는 것에 대한 골격을 제공한다.

따라서, 유효량의 DF를 투여하여 암이 발병한 포유동물, 바람직하게는 인간을 치료하는 방법이 본 발명의 목적이다. DF는 적어도 또다른 항암작용을 하는 활성성분과 조합하여 투여될 수 있다. 다른 항암작용을 하는 활성성분은 파클리탁셀, 모노크로탈린, BCNU, 멜팔란 및/또는 시클로포스파미드로부터 선택될 수 있다.

본 발명의 다른 목적은 DF 및 적어도 하나의 다른 항암작용을 하는 활성성분을 함유하는 제제에 있다; 본 제제는 바람직하게는 수용액일 수 있고, 더욱 바람직하게는, 정맥내 투여에 적합한 형태일 것이고, 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 부형제(excipient) 및 공보조제(coadjuvant)를 포함할 수 있다.

본 발명을 위하여, 디파이브로타이드(DF)라는 용어가 동물 및/또는 식물 조직들, 특히, 포유동물 기관들로부터 추출되어 생성된 임의의 올리고뉴클레오티드 및/또는 폴리뉴클레오티드로서 이해되어 지는 것이다. 바람직하게는, DF는 본 명세서에 이렇게 언급되어 그 내용이 합체된 미국 특허들(6,7)에 기술된 방법에 의해 제조될 수 있다.

#### BIBLIOGRAPHY

1. US-3,770, 720
  2. US-3,899, 481
  3. US-3,829, 567
  4. US-4,694, 134
  5. US-4,693, 995
  6. US-4,985, 552
  7. US-5,223, 609
  8. Carlo-Stella, C. , Di Nicola, M. , Magni M. , et al., Defibrotide in Combination with Granulocyte Colony-stimulating Factor Significantly Enhances the Mobilization of Primitive and Committed Peripheral Blood Progenitor Cells in Mice. *Cancer Research*, 2002, 62: 6152-6157 (November 1,2002).
  9. Hazlehurst, L. , Damiano, J. , Buyuksal, I. , Pledger, W. J. , Dalton, W. S. , Adhesion to fibronectin via  $\beta 1$  integrins regulates p27 kipl levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR). *Oncogene*, 2000; 19 : 4319-4327.
  10. Richardson, P. G. , Elias, A. D. , Krishnan, A. , et al.
- Treatment of severe veno-occlusive disease with defibrotide: compassionate use results in response without significant toxicity in a high-risk population. *Blood*, 1998 ; 92: 737-44.
11. Richardson, P. , Murakami, C. , Jin, Z. , et al., Multi-institutional use of defibrotide in 88 patients after stem cell transplantation with severe veno-occlusive disease and multi-system organ failure: response without significant toxicity in a high risk population and factors predictive of outcome. *Blood*, 2002; 100 (13): 4337-4343.

12. Eissner, G. , Multhoff, G. , Gerbitz, A. , et al., Fludarabine induces apoptosis, activation, and allogenicity in human endothelial and epithelial cells: protective effect of defibrotide. Blood, 2002; 100: 334-340.

13. Falanga, A., Vignoli, A., Marchetti, M., Barbui, T. , Defibrotide reduces procoagulant activity and increases fibrinolytic properties of endothelial cells. Leukemia, 2003; in press.

#### (57) 청구의 범위

##### 청구항 1.

항암작용을 하는 제제 제조를 위한 디파이브로타이드(defibrotide)의 용도.

##### 청구항 2.

제1항에 있어서,

상기 디파이브로타이드는 적어도 하나의 다른 항암작용을 하는 활성성분과 조합하여 사용되는 것을 특징으로 하는 용도.

##### 청구항 3.

제2항에 있어서,

상기 다른 항암작용을 하는 활성성분은 파클리탁셀(paclitaxel), 모노크로탈린(monocrotaline), BCNU, 멜팔란(melphalan) 및/또는 시클로포스파미드(cyclophosphamide)로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 용도.

##### 청구항 4.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 포유동물은 인간인 것을 특징으로 하는 용도.

##### 청구항 5.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 포유동물은 다발성 골수종(multiple myeloma)이 발병(affect)한 포유동물인 것을 특징으로 하는 용도.

##### 청구항 6.

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 포유동물은 유방암종(mammary carcinoma)이 발병한 포유동물인 것을 특징으로 하는 용도.

##### 청구항 7.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 디파이프로타이드는 정맥내적으로 투여되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8.

활성물질들로서, 디파이프로타이드 및 적어도 하나의 다른 항암작용을 하는 활성성분을 함유하는 제제(formulation).

#### 청구항 9.

제8항에 있어서,

상기 제제는 수용액인 것을 특징으로 하는 제제.

#### 청구항 10.

제8항 또는 제9항에 있어서,

통상의(customary) 첨가제들 및/또는 보조제들을 함유하는 것을 특징으로 하는 제제.

#### 청구항 11.

제8항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다른 항암작용을 하는 활성성분은 파클리탁셀, 모노크로탈린, BCNU, 및/또는 시클로포스파미드로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제제.

#### 청구항 12.

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제제는 개별적으로 투여될 수 있는, 하나는 상기 디파이프로타이드를 함유하고, 다른 하나는 상기 다른 항암작용을 하는 활성성분을 함유하는 두 개의 별개의 제제들로 구성되는 제제.

#### 청구항 13.

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

동시의, 개별의, 또는 연속적 투여를 위하여 조합된 조제약(preparation)으로서의 제제.

#### 청구항 14.

암이 발병한 포유동물을 치료하는 방법에 있어서, 상기 방법은 상기 포유동물에 유효량의 디파이프로타이드를 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

**청구항 15.**

제14항에 있어서,

상기 디파이브로타이드는 적어도 하나의 다른 항암작용을 하는 활성성분과 조합하여 투여되는 것인 방법.

**청구항 16.**

제15항에 있어서,

상기 다른 항암작용을 하는 활성성분은 파클리탁셀, 모노크로탈린, BCNU, 멜팔란 및/또는 시클로포스파미드로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 17.**

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 포유동물은 인간인 방법.

**청구항 18.**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 포유동물은 다발성 골수종이 발병한 포유동물인 방법.

**청구항 19.**

제1항 내지 17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 포유동물은 유방암종이 발병한 포유동물인 방법.

**청구항 20.**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

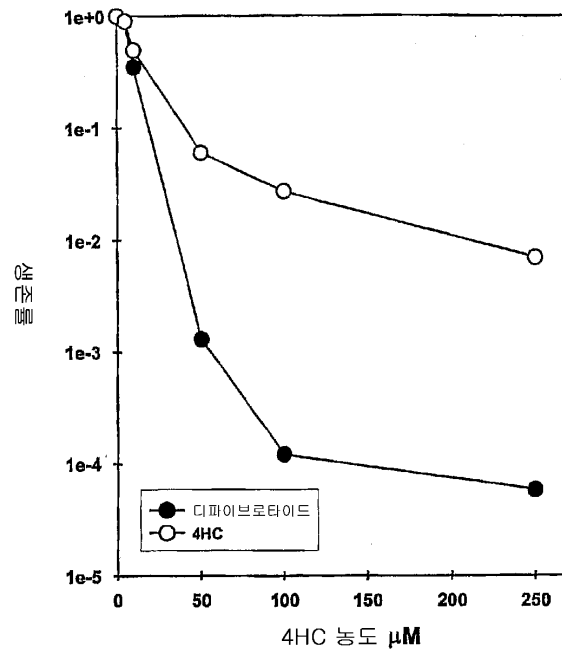
상기 디파이브로타이드는 정맥내적으로 투여되는 것인 방법.

도면

도면1

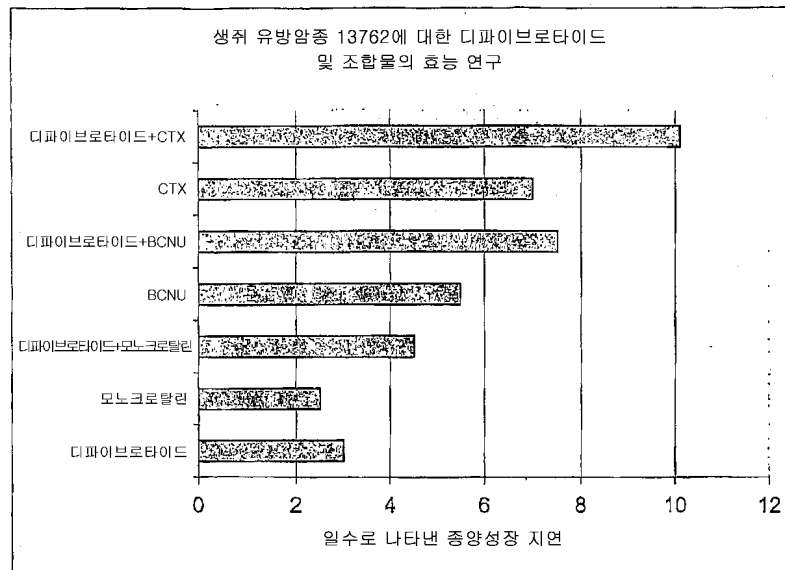
Figure 1

생쥐 EMT-6 유방암종 세포



도면2a

Figure 2a





도면2b

Figure 2b

