(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [7]
A61K 31/59

(45) 공고일자 2003년04월26일
(11) 등록번호 10-0382219
(24) 등록일자 2003년04월16일

(21) 출원번호 10-1999-7011663
(22) 출원일자 1999년12월10일
번역문 제출일자 1999년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/AU1998/00440
(86) 국제출원출원일자 1998년06월10일

(65) 공개번호 특2001-0013651
(43) 공개일자 2001년02월26일

(87) 국제공개번호 WO 1998/56387
(87) 국제공개일자 1998년12월17일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀랜드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기즈, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 가나, 인도네시아, 시에라리온, 유고슬라비아, 짐바브웨,
AP ARIPO특허: 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀랜드, 사이프러스,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 PO7270 1997년06월10일 오스트레일리아(AU)

(73) 특허권자 엠알씨 홀딩즈 피티와이 리미티드
오스트레일리아 2000 뉴 사우스 웨일즈 시드니 죠지 스트리트 88 스위트 1 레벨 1

(72) 발명자 모리스데이비드로손
오스트레일리아엔에스더블유2210루가모포레스트로드960

(74) 대리인 유미특허법인

심사관 : 이영완

(54) 간 종양 치료용 조성물

요약

본 발명은 간 종양 치료 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 비타민 D 화합물을 국부적으로 간에 전달하는 것을 포함한다. 또한, 본 발명은 이러한 치료에 적당한 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 1

색인어

비타민 D 화합물, 간암, 헤파토마, 화학요법, 과칼슘혈증

명세서

기술분야

본 발명은 종양 치료 방법에 관한 것으로서, 특히 간 종양의 치료 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 치료에 적당한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

헤파토마(Hepatoma, 1차 간암)는 전세계적으로 예상 발병률이 연간 1만 건에 달하는 세계에서 가장 보편적인 암 사망 원인중 하나이다(Lencioni R and Bartolozzi C. The Cancer Journal, Vol 10, pp1-6). 현재, 서양에서는 이에 대한 중요성이 증가하고 있지만, 아시아 지역에서는 이것이 가장 보편적인 것이나 그 발병률에 있어 상당한 편차가 있다. 현재는 사용 가능한 효과적인 치료법이 거의 없다. 치료하지 않은 상태에서의 평균 생존 기간은 대략 3개월 가량이다. 간을 절제(resection)하는 경우에는 대략 환자의 40%가 5년 정도 생존할 수 있으나, 거의 대부분의 환자는 이 치료에 적합하지 않다. 전신 화학요법(systemic chemotherapy)이 극히 제한적으로 1차 간암의 치료에 사용되고 있을 뿐이다. 결과적으로 경심방 화학적전색법(thechnique of transarterial chemoembolisation)(TAE)을 사용하여 약리학적으로 활성인 성분을 직접 간에 전달하고자하는 시도가 이루어지고 있다. TAE는 간동맥(hepatic artery)을 통하여 혈관화된(vascularize) 간 종양에 선택적으로 제제를 전달하여 종양 내에서 이들을 농축시켜 종양의 전색을 유발하는 개념으로 국소빈혈(ischemia)을 일으켜 괴사시키는 것이다. 넓은 범위의 화학요법제(chemotherapy agent)가 이 방법으로 전달되며, 이러한 화학요법제로는 독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 및 시스플라틴(cisplatin)이 있다(Choi, J. Cancer Control, Vol 3, pp407-413, 1996). 종종 화학요법제는 조영제(contrast agent)인 리피오돌(Lipiodol)에 용해되거나 유화된다. 리피오돌은 요오드화 양귀비 종자 오일(poppy seed oil)의 지방산 에틸에스테르이다. 종양에 요오드화 오일을 도입함으로써 화학요법제와 종양의 접촉을 연장시키고, 매질(medium)의 방사선 불투과(radioopaque) 특성은 주입을 진행시켜 방사선 촬영으로 관찰될 수 있게 할 것이다.

비타민 D는 활성화된 5개의 탄소 단위로 이루어진 이소프레노이드 화합물(isoprenoid compound)이다. 가장 풍부한 형태의 비타민는 비타민 D_3 또는 콜레칼시페롤(cholecalciferol)이다. 비타민 D_3는 콜레스테롤 생합성의 중간 물질인 7-디하이드로콜레스테롤(7-dehydrocholesterol)의 생합성으로 형성된다. 비타민 D_3는 간 내의 혈관 열공(blood compartment)을 순환하는 비타민 D의 주된 형태인 25-히드록시콜레칼시페롤[$25(OH)D_3$]로 대사되며, $25(OH)D_3$는 신장에서 두 개의 주요 디히드록시화 대사산물, 즉 1,25-디히드록시콜레칼시페롤[$1,25(OH)_2D_3$] 및 24,25-디히드록시콜레칼시페롤[$24R,25(OH)_2D_3$]로 전환된다.

$1,25(OH)_2D_3$는 생화학적으로 가장 큰 활성을 가지는 천연 비타민 D_3이며, 혈류를 따라 칼슘 흡수가 촉진되는 내장의 점막 세포에 있는 이들의 주요 활성자리로 옮겨진다. 비타민 D_3는 스테로이드 호르몬과 유사하게 작용하는 대사물질로 전환되기 때문에 프로호르몬(prohormone)이라 할 수 있다. 비타민 D_3는 칼슘 대사 및 인 대사 중 특히 무기질 골기질(inorganic matrix of bones) 합성에 관한 대사를 조절한다.

치료학상으로 1,25(OH)$_2$D$_3$ 및 몇몇 다른 비타민 D$_3$ 유사체(analogue)는 비타민 D의 식이성 영양결핍(구루병)의 유해한 효과에 대한 길항작용(couteract)에 사용되거나, 아인산염(hypophosphatemic) 비타민 D-내성 구루병 및 신장의 골이영양증(renal osteodysrophy)(신장 구루병)과 같이 비타민 D에 대한 반응 또는 합성에 이상이 있는 질병의 치료에 사용될 수 있다. 또한, 석회화(calcination) 관련 질환인 골다공증(osteoporosis)에 사용하는 것은 비타민 D의 영양학적 적합성과 거리가 멀기 때문에 확신할 수 없다. 이는 직접적으로 부갑상선(parathyroid) 기능을 억제하고 뼈의 전환율을 감소시키기 때문이다(Goodman & Gilman, The Pharmacological basis of Therapeutics. Pub. 1992, The McGraw Hill Companies Inc). 최근에는 비타민 D$_3$ 유사체가 피부 건선증(cuttaneous disease psoriasis) 치료에 사용되고 있다.

세포 종류에 따라 비타민 D$_3$ 수용체(receptor)가 존재한다는 것이 실험적으로 밝혀져 비타민 D 내분비계가 칼슘의 항상성과 직접적으로 관련되어 있지 않은 다양한 기초 세포 과정의 조절과 관련되어 있음을 이해하게 되었다(Pols, HAP et al, J Steroid Biochemistry, Vol 37, pp873-876, 1990). 비타민 D$_3$ 수용체를 포함하는 세포는 종양에서 유래된 다수의 악성 조직 또는 세포주(cell line)이다. 몇몇 암세포 상에 존재하는 수용체는 대다수의 환자에 대하여 기능적 유의성이 존재함을 의미하며, 비타민 D$_3$ 및 유사체가 흑색종(melanoma), 골육종(osteosarcoma), 유방암(breast carcinma) 세포(Deluca HF and Ostrem V, Advance in Experimental Medicine and Biology, Vol 206, pp413-429, 1986); 결장 선암(colon adenocarcinoma) 세포(Cross HS et al, Journal of Nutrition, Vol 127 Suppl, pp2004-2008, 1995); 및 간 종양 세포(Tanaka Y et al, Biochem Pharmacol Vol 38, pp449-453, 1989)의 증식을 억제할 수 있다는 내용의 논문이 발표되었다.

실험관 내에서의 이러한 효과는 비타민 D$_3$ 및 유사체가 암 치료에 사용될 수 있으리라는 희망을 갖게 하였다. 'unconventional cancer therapies'(British Columbia Cancer Agency publication; 600 West 10th Ave, Vancouver, BC, Canada)에는 비타민 D$_3$ 화합물의 예가 기재되어 있으며, 이 효과를 입증하기 위한 임상 실험이 시도되었으나, 불행히도 1,25(OH)$_2$D$_3$와 같은 천연 비타민 D$_3$ 유도체를 사용해서는 성공적으로 암을 치료할 수 없었으며, 실제로 이러한 실험은 거의 시도되지 않았다. 이는 비타민 D$_3$에 의하여 유발되는 암 세포의 성장을 감소시키는 데에는 물리학적량 이상의 농도가 요구된다는 보고(Pols et al-ibid) 때문이었다. 이에 대한 결론은 치료에 있어 종양 방지 특성이 발현되기 전에 칼슘의 항상성에 대한 비타민 D$_3$ 효과가 과하고 위험한 수준으로 발현되어 과칼슘혈증(hypercalcaemia)으로 인하여 생명을 위협하는 독성이 유도된다는 것이다.

이러한 문제를 극복하고 세포 분화(cell differentiation)에 대한 비타민 D$_3$의 작용과 이들에 의한 과칼슘혈 효과를 분리하기 위하여, 제약 산업에서는 칼슘 대사에 영향을 주지 않고 암이나 그 밖의 질병의 치료에 사용될 수 있는 합성 유사체에 대한 연구가 활발히 이루어져 왔다. 이러한 연구는 제한적이기는 하나 약간의 성공을 이루었다. 예를 들면, 22 내지 23개의 이중 결합, 24(S)-히드록시 작용기, 및 25 내지 27개의 탄소로 이루어진 시클로프로판 고리를 함유하는 칼시포트리올(Calcipotriol) 유사체가 합성되었다. 이 화합물은 1,25(OH)$_2$D$_3$와 유사한 수용체 친화성을 가지나, 칼슘의 대사 조절에 있어서 1,25(OH)$_2$D$_3$ 활성의 1% 이하이다. 칼시포트리올은 가능성 있는 건선 치료제로서 광범위하게 연구되고 있다(Goodman & Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics Pub McGraw Hill, 1992). 그러나 칼슘 대사에 대한 이들의 감소 효과에도 불구하고, 칼시트리올은 전신성 과칼슘혈증(sysyemic hypercalcaemia) 치료에 국부적으로 사용된다. 미국 특허 제4,891,364호(Jan 2 1990)에는 칼슘 대사에 대한 감소 효과를 가지는 종양의 치료에 유용한 합성 비타민 D 유사체가 기재되어 있다. 또한, 몇가지 국소 암을 치료하고자 하는 시도도 있었다. Bower M 등은 칼시포트리올을 사용하여 국소 유방암을 치료하였다(Lancet vol 337; No 8743 pp701-702). 치료받은 19명의 환자 중, 단지 3명만이 유의한 반응을 나타냈으며 1명은 극미한 반응을 나타내었다. 게다가, 이 합성 유사체가 칼슘 대사에 대하여 강력한 감소 효과를 가지며(상기의 문헌 참조) 치료가 유방암 병소 주변의 피부에 국소적으로 제한되었지만, 여전히 19명의 환자 중 2명이 치료 과정 중 과칼슘혈증을 나타내었다.

따라서, 많은 연자들의 흥미로운 발견 및 제약 산업의 고무적인 노력에도 불구하고, 비타민 D 화합물을 암 치료에 적용하는 것은 성공적이지 못하였다. 비타민 D$_3$의 사용을 어렵게 만드는 중요한 제한 요소는 비타민 D$_3$의 낮은 치료 지수(유효 투여량 대 독성 투여량의 비) 또는 선천적인 활성 부족이다.

발명의 상세한 설명

본 발명자는 놀랍게도 비타민 D 화합물의 용량(dose)이 높은 경우에도 비타민 D_3 또는 이들의 전구체, 대사산물, 또는 유사체와 같은 비타민 D 화합물이 국부적으로 간에 전달되면 과칼슘혈증이 발생되지 않음을 발견하였다. 예를 들면, 경구 투여 또는 정맥내 주사에 사용되는 $1,25(OH)_2D_3$의 투여량은 통상적으로 대략 0.5 내지 3 mcg/day 임에도 불구하고(과칼슘혈증 발생에 있어 뚜렷한 위험이 있는 레벨 이상), 본 발명자는 주목할 만한 전신 독성을 유발하지 않으면서도 10 mcg/day의 용량이 정맥내 주입으로 간에 전달될 수 있음을 발견하였다(실시예 2).

상기 발견에 대하여 가능한 결론은 비타민 이처럼 높은 용량의 D 화합물이 투여된 후에도 과칼슘혈증이 나타나지 않은 것은 간의 비타민 D 화합물 보유량 증가 또는 간의 분해능 증가(첫번째 도입 효과) 때문이라는 것이다. 그러나, 이런 결론으로는 다음의 사항을 설명할 수 없다: 공급되는 용량은 물리학적 레벨 이상이며, 정맥 주입으로 비타민 D 수용체를 함유하는 세포와 비타민 D 화합물의 접촉이 이루어진다 하더라도, 그들이 모든 비타민 D 화합물을 포획할 수 있을 것이라고 기대할 수는 없다. 분해에 있어서, 간의 주요 대사 활성은 간동맥이 아닌 간문맥(liver portal) 루트를 통한 화합물의 흡수에 영향을 준다. 또한, 상기에 기재된 바와 같이, 간은 비타민 D 활성화 자리 중하나이며, 물론 혈액에서 비타민 D 화합물을 제거하리라 기대되지도 않는다. 간동맥 전달 후, 비타민 D 화합물이 과칼슘혈증을 덜 유발되는 현상에 대한 정확한 원인은 알려져 있지 않다.

간으로 비타민 D 화합물을 국부적으로 전달하는 것은 안전할 뿐 아니라, 7명의 환자 중 4명이 치료에 대하여 종양 마커(tumour marker) 증가율 변화와 같은 적어도 제한된 반응을 나타내었다.

따라서, 국부적인 전달에 의하여 대량의 비타민 D 화합물이 간에 투여될 수 있음이 입증되었을 뿐 아니라, 병소의 진행에 대한 유효 효과의 지표도 얻을 수 없었다.

그러므로, 본 발명의 제1 관점은 비타민 D, 비타민 D의 전구체, 또는 이들의 대사산물 또는 유사체로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 비타민 D 화합물—여기서 비타민 D 화합물은 국부적으로 간에 전달됨—을 약리학적 유효량으로 치료 대상(subject)에 투여하는 것을 포함하는 간 종양의 치료 방법에 관한 것이다.

비타민 D 화합물의 국부적 전달은 동맥내 전달 또는 간문맥(portal vein) 전달에 의하여 이루어질 수 있다. 그중 바람직한 것은 비타민 D 화합물이 동맥내로 전달되는 것이며, 특히 바람직한 것은 비타민 D 화합물이 간동맥을 통하여 동맥내로 주입되어 전달되는 것이다.

본 발명의 치료 방법은 1차 또는 2차 간암의 치료에 사용될 수 있으며, 특히 헤파토마(1차 간암)의 치료에 적합하다. 또한, 본 발명의 치료 방법은 결장직장암(colorectal cancer), 폐암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 또는 신장암의 전이부와 같이 간에서 전이되는 형태의 2차 암의 치료에 사용될 수 있다. 2차 암은 육종(sarcoma)일 수 있다. 본 발명의 치료 방법은 1차 및 2차 간암의 치료에 사용될 수 있다.

비타민 D 화합물로서 비타민 D_3 유사체가 사용될 수 있으나, 바람직한 비타민 D 화합물은 비타민 D_3 또는 이의 전구체 또는 대사산물이다.

비타민 D 유사체 화합물은 $1,25(OH)_2D_3$ (1-25-디히드록시콜레칼시페롤), OCT(22-옥사칼시트리올), MC903(칼시포트리올), 또는 EB 1089(1α25(OH)$_2$22.24 디엔 24.26.27 트리호모 D_3)와 같은 적당한 유사체에서 선택되는 것이 바람직하다.

비타민 D의 대사산물은 비타민 D 또는 이들 유도체의 히드록시화 생성물 또는 그 밖의 생성물일 수 있다.

종양에 대한 비타민 D 화합물의 효과는 극히 용량 의존성이다. 따라서 고농도의 비타민 D 화합물이 종양에 전달되는 것이 바람직하다. 그러나, 수계 매질과 같은 종래의 담체에 대한 비타민 D 화합물의 제한된 용해도는 종양에 전달될 수 있는 화합물의 함량에 대하여 상한값을 제한한다.

본 발명자는 $1,25(OH)_2D_3$와 같은 비타민 D 화합물을 약리학적으로 수용 가능한 오일에 용해시킴으로써 매우 높은 농도의 비타민 D 화합물이 얻을 수 있음을 발견하였다. 예를 들면, 2 mg의 $1,25(OH)_2D_3$는 1 ㎖의 리피오돌에 쉽게 용해될 수 있다. 이러한 높은 용해도는 종양에 매우 높은 농도의 비타민 D 화합물의 도입을 가능하게 한다. 비타민 D 화합물용 담체로서 오일을 사용하면 얻어지는 추가 이점은 일부 오일은 몇 종류의 종양에서 농축되어 비타민 D 화합물이 종양 내에서 매우 높은 농도로 존재하게 한다는 것이다. 또한, 고농도 달성으로 얻어지는 또 다른 이점은 저농도에서 불활성인 몇몇 비타민 D 화합물이 오일에 용해되면 고농도에서 활성화 될 수 있다는 것이다.

또한, 본 발명 제2 관점은 상기 제1관점의 치료 방법에 관한 것으로서, 비타민 D가 약리학적으로 수용 가능한 오일에 용해된 상태로 전달되는 방법에 관한 것이다.

오일은 리피오돌과 같은 요오드화 오일일 수 있다. 물론, 요오드는 주입을 방사선 촬영으로 검출하는 데 유용하기는 하나, 요오드의 존재가 오일 시료의 필수 요건은 아니다. 더욱이, 오일 시료는 (1) 다량의 비타민 D 화합물과 섞일 수 있어야 하며; (2) 가능한 한, 치료되는 종양에 흡수될 수 있어야 한다. 따라서, 당업자는 담체에 Cremophor(폴리옥시에틸화 비버유)와 같이 제약 산업에 사용되는 화학적으로 변형된 오일 및 상이한 오일이 포함될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 미국 특허 제4,578,391호에는 동맥내 종양 치료용 오일의 예가 기재되어 있으며, 이 특허는 주입에 사용되는 낮은 지용성(oil-soluble) 또는 수용성의 종양 방지 약의 분해에 관한 것이다. 정맥내 용도의 공지된 제제(formulations)(Abbot Laboratories 제품인 Calcijex™ calcitriol injection, Physicians Desk Reference, ibid, 및 미국 특허 제4,308,264호에 기재되어 있음)는 수계 용액이며, 그들이 암 치료에 사용되었다는 보고는 없었다. 특히, 이들의 낮은 칼시트리톨 함량은 간으로의 동맥내 주입에 적합하지 못하였다.

보다 바람직한 담체는 리포좀(liposome) 및 마이크로에멀젼(microemulsion)과 같은 친지성 물질과 혼합될 수 있는 다양한 성분으로 이루어진 시스템을 포함한다.

에스트로겐(oestrogen) 수용체 길항제(antagonist)인 탐옥시펜(tamoxifen)은 헤파토마에 걸린 사람의 생존 기간을 상당히, 그러나 적당하게 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 또한 탐시옥펜은 유방암 세포주(cell lines) 상에서 비타민 D 수용체의 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자는 헤파토마에 대한 탐옥시펜의 효과가 내생 비타민 D에 대하여 종양을 보다 민감하게 만드는 비타민 D 수용체의 발현에 대한 이들의 효과에서 기인될 수 있다고 생각한다. 따라서, 탐옥시펜 및 에스트로겐 또는 에스트로겐과 유사한 화합물은 헤파토마와 같은 암에 대한 비타민 D의 치료 효과를 상당히 증가시켜 비타민 D 화합물의 투여량을 낮추는 반면 반응을 상당히 증가시켜 과칼슘혈증 및 그 밖의 합병증의 발생을 방지할 수 있으리라 기대된다.

따라서 본 발명의 제3 관점은 본 발명의 제1 관점 및 제2 관점에 따르는 치료 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 비타민 D 수용체의 발현을 증가시킬 수 있는 화합물을 주입하는 것을 추가로 포함한다.

비타민 D 수용체의 발현을 증가시킬 수 있는 화합물로는 탐옥시펜 또는 상이한 에스트로겐이나 에스트로겐과 유사한 화합물이 있을 수 있다.

비타민 D 수용체의 발현을 증가시킬 수 있는 화합물은 비타민 D 화합물 투여와 동시에 또는 그 전후에 투여될 수 있다.

본 발명의 제4 관점은 간 종양 치료에 적당한 조성물에 관한 것으로서, 이 조성물은 약리학적으로 수용 가능한 오일에 용해되는 비타민 D, 비타민 D의 전구체, 또는 이들의 대사산물 또는 유사체로 이루어지는 군에서 선택되는 비타민 화합물을 약리학적 유효량으로 포함한다.

약리학적으로 수용 가능한 오일은 요오드화 양귀비 종자의 오일과 같은 요오드화 오일이다. 양귀비 종자의 오일과 같은 비-요오드화 오일이 약리학적으로 수용 가능한 오일로 사용될 수도 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 시험관내 헤파토마 HepG2 세포의 성장에 대한 1,25 디히드록시비타민 D_3의 효과를 도시한 그래프.

도 2는 시험관내에서 10일 동안 처리된 사람의 결장암 세포 LoVo의 성장에 대한 1,25 디히드록시비타민 D_3의 효과를 도시한 그래프.

도 3-7은 본 발명의 방법에 따라 치료받는 동안의 환자의 혈청 칼슘 레벨을 도시한 차트.

도 8-9는 본 발명의 방법에 따라 치료받는 동안의 환자의 CEA 레벨을 도시한 그래프.

도 10-11은 각각 정맥내 주입 간동맥 주입에 돼지의 칼슘 레벨을 도시한 차트.

도 12는 물과 리피오돌에 대한 3H 비타민 D_3의 용해도를 도시한 그래프(100 ㎖ 라피오돌 + 100 ㎖ 물, 4 mM의 라피오돌 내의 비타민 D_3).

실시예

하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해시키기 위한 것이며, 이들로 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

실시예 1

사람 간암 세포주의 시험관내 성장에 대한 효과

사람의 간암 세포주, HepG2의 시험관내 성장에 대한 농도에 따른 1,25$(OH)_2$비타민 D_3의 효과를 연구하였다. 간암 세포의 티미딘 흡수 감소율은 성장 억제를 뒷받침해준다(도 1). 여기에 기록된 억제 크기는 놀라운 것이었으며, 성장 억제율이 투여량에 의존할지라도(10^{-11} M에서 효과가 현저히 낮음), 95%의 성장 억제율을 보였다. 비타민 D 유사체가 다른 타입의 암을 억제하는 것은 알려져 있었지만, 이것이 간암에도 효과가 있다는 것은 처음 밝혀진 것이다.

본 발명자는 이러한 크기의 억제 효과가 다른 암에서도 얻어짐을 발견하였다. 예를 들면, 결장직장암에서의 50 내지 60%의 성장 억제는 양호한 반응으로 간주된다(도 2). 결장직장암에 대한 1,25$(OH)_2D_3$의 효과는 하기 표에 설정된 비교 실험에 사용된 유사체(EB1089)보다 훨씬 낮았다.

하기 표는 사람의 직장암 세포인 LoVo와 사람의 간암 세포인 HepG2에 대한 1,25$(OH)_2D_3$의 효과 및 EB1089의 효과를 기재한 것이며, 결과는 억제율(%)±SEM이다.

농도	LoVo		HepG2	
	D_3	EB1089	D_3	EB1089
10^{-7} M	34.2±3.8	40.5±10.7	7.1±6.3	11.2±2.7
10^{-8} M	53.1±5.0	51.0±10.3	8.6±6.3	13.1±2.8
10^{-9} M	74.2±6.8	73.3±11.7	13.8±6.4	13.2±2.7
10^{-10} M	96.5±12.9	55.3±13.7	56.6±6.7	49.1±2.9
10^{-11} M	127.4±7.1	64.7±12.7	105.6±6.6	41.7±3.6

HepG2 세포에는 D_3 또는 EB1089를 5일 동안 처리한 반면, LoVo 세포에는 10일 동안 처리하였다.

하기 표는 다른 간암 세포주에 대한 비타민 D_3 유사체인 EB1089의 효과를 기재한 것이다.

세포군	농도				
	10^{7} M	10^{8} M	10^{9} M	10^{10} M	10^{11} M
SK-Hep	34.8 ± 5.2	63.1 ±16.2	52.1 ± 8.8	52.1 ± 8.6	82 ± 9.2
	46.6 ±13.0	71.3 ±11.8	61.6 ± 12.2	61.1 ± 16.6	78.8 ± 11.5
	79.2 ± 4.4	83.1 ± 4.2	88.4 ± 4.1	91.0 ± 4.5	118.3 ± 26.4
	60.1 ± 11.7	95.6 ± 12.2	103.1 ±12.4	103.8± 11.7	66.9 ± 36.9
Hep 1-6	56.1 ± 7.2	63.9 ± 7.0	78.1 ± 11.4	110.8 ± 13.8	103.4 ± 9.2
	118.9±11.1	113.4±5.6	106.7± 5.4	103.5±4.5	98.1 ± 4.3
HTC	57.9 ±7.2	63.9 ± 12.5	97.4 ± 13.8	107.8 ± 12.7	95.9 ± 13.0
	95.3 ± 17.7	86.9 ± 15.0	100.4 ±15.4	113.0 ± 22.1	98.8 ±15.5
NovoKoff	91.5 ± 14.5	106.0±18.1	103.7 ±13.8	116.3±22.1	131.0±15.9
	84.6 ±17.0	79.0 ± 18.4	95.4 ± 18.2	94.0 ± 21.4	92.6 ±17.6
Morris	136.0±12.5	134.0±13.3	117.8±11.7	118.0± 11.9	118.0 ±14.3
	80.1 ±5.2	83.3 ±4.7	79.1 ±4.9	88.3 ±3.9	90.8 ±5.9
PCL	98.5 ± 4.5	101.6±11.5	98.3 ±6.5	92.5 ± 6.6	102.5 ± 10.0
	106.0±9.1	105.2± 4.9	95.1 ± 3.3	100.1 ± 2.1	95.9 ± 2.9

(모든 실험은 5%의 숯가루(charcoal)가 처리된 배지에서 수행되었다. 특정한 세포주에 대한 연속적인 결과는 반복 실험에 대한 결과이다)

작용 속도 또한 매우 다양하며, 결장직장암에서는 5일째에 적당한 결과가 얻어지고 일반적으로 10일째에 겨우 깨끗해진 반면, 간암에서는 24시간 후에야 억제율을 측정할 수 있었다.

비타민 D_3 및 이것의 유도체가 다른 암보다 헤파토마에서 더 효과적으로 작용하는 메커니즘은 간암 세포에 의한 활성 대사산물의 생성에서 기인된 것이라 생각된다.

실시예 2

$1,25(OH)_2D_3$의 첫 번째 도입 효과 측정

주요 분비 루트는 칼시트리올산(calcitriolic acid) 및 다양한 다른 접합 화합물(conjugated compound)로서 담즙 내에 있는 것으로 알려져 있다. 본 발명자는 $1,25(OH)_2D_3$가 전신에 고농도로 존재하여 유발되는 과칼슘혈증 때문에 제한된다면, 간에서의 분해 작용(catabolism)은 첫 번째 도입 효과를 유도할 것이라 가정하였다.

첫 번째 도입 효과의 존재 여부 및 임상용으로의 유용성을 결정하기 위하여 두 종류의 실험을 수행하였다. 실험은 다음과 같다:

1. 1,25(OH)$_2$D$_3$의 간동맥 주입 효과를 관찰하는 1 단계 임상 실험.

2. 1,25(OH)$_2$D$_3$의 정맥내 투여 효과와 정맥내 주입 효과를 비교하는 돼지 모형.

이 실험의 방법 및 결과는 다음과 같다:

1 단계 실험

1,25(OH)D$_3$의 간동맥 주입 투여에 대한 1 단계 실험을 수행하였다.

목 적

1. 간암 치료에 대한 1,25(OH)D$_3$의 간동맥 주입의 안정성을 설명하고, 특히 혈청 칼슘 레벨에 대한 이들의 효과를 설명할 수 있다.

2. 종양 마커 레벨 및 그들의 증가율을 관측함으로써 간암에 대한 이러한 주입의 효과를 조사할 수 있다.

치료 대상

현재 화학적 식이요법에 대한 반응에 실패한 간암 또는 결장직장암 전이부를 가지는 7명의 환자.

치료 대상에 대한 상세한 사항은 다음과 같다:

[표 1]

번 호	연 령	성 별	종 양	간질환 이외의질환/합병증
1	62	F	결장직장암	폐암 전이부
2	73	M	헤파토마	무
3	42	M	결장직장암	무
4	72	F	결장직장암	폐쇄성 황달, 부분적으로 내생 스텐트(stent)에 의하여 완화됨
5	57	M	결장직장암	무
6	75	M	결장직장암	폐암 전이부 황달, 부분적으로 내생 스텐트에 의하여 완화됨
7	57	M	결장직장암	폐쇄성 황달, 부분적으로 내생 스텐트에 의하여 완화됨

개략적 치료 방법은 다음과 같다:

[표 2]

환자번호	1 기		2 기		3 기		4 기		5 기	
	투여량(mcg/day)	투여일(days)	투여량(mcg/day)	투여일	투여량(mcg/day)	투여일	투여량(mcg/day)	투여일	투여량(mcg/day)	투여일
1	0.02	4	0.05	3						
2	0.02	4	0.05	3						
3	2	4	5	24	0	35	10	8	15	3
4	0.5	8	2	8	5	10				
5	2	5	5	21	0	35	10	4	15	10
6	2	4	5	23	0	25	10	4	15	3
7	2	3	5	26						

방 법

1주 또는 이어지는 4주 동안 내내 간동맥 카테터(catheter)를 통하여 정해진 각각의 환자에게 1,25(OH)D_3를 주입하였다. LFTs, UECs, 칼슘 레벨, 및 인산염 레벨과 함께 AFP 또는 CEA 레벨을 규칙적으로 분석하였다.

환자 1 및 환자 2에게는 임시적인 간동맥 카테터를 통하여 먼저 1.25(OH)D_3 0.2 mcg/day를 4일 동안 주입한 후, 추가로 3일간 0.5 mcg/day를 주입하였다.

환자 3, 환자 5, 및 환자 6에게는 처음 2 mcg/day를 주입한 후, 4주 동안 5 mcg/week를 주입하였다. 유도된 간 효소를 감소시키기 위하여 4주 동안 중지한 후, 10 mcg/day를 주입하여 치료를 다시 시작한 다음, 즉시 15 mcg/day로 증가시켰다.

환자 4는 치료 전에 방종양성(paraneoplastic) 징후에서 기인된 과칼슘혈증을 앓고 있었으므로 투여량을 낮게 책정하였다. 0.5 mcg/day로 시작하고, 즉시 2 mcg/day로 이를 증가시킨 다음, 5 mcg/day로 다시 증가시켰다.

환자 7은 환자 3, 환자 5, 및 환자 6과 동일한 양을 복용하면서 시작하였으나, 병소의 진행 때문에 10 mcg/day로 시작하기 전에 실험을 중단하였다.

실험 결과 측정

칼슘 레벨 - 과칼슘혈증 발생이 관찰됨.

CEA 또는 AFP 레벨 - 치료에 대한 종양의 뚜렷한 반응이 관찰됨.

UECs 및 LFTs - 간 기능 및 신장 기능에 대하여 기대하지 못한 효과가 관찰됨.

결 과

7명의 환자 모두에 대하여 조사하였다. 환자중 어느 누구도 주입에 대하여 예기치 못한 역반응 또는 부작용을 나타내지 않았다. 어느 환자도 간 기능 또는 신장 기능의 장애를 경험하지 않았다.

환자 1과 환자 2 모두 치료 중에 낮은 투여량으로 과칼슘혈증을 나타내지 않았다(결과가 나타나지 않음).

도 3의 점선은 혈청 칼슘에 대한 정상 범위를 의미한다. 치료 대상 1 및 치료 대상 2는 0에서 7까지 치료되었으며, 치료 대상 3 내지 치료대상 7은 0에서 28까지 치료되었다.

도 3 및 도 4는 5 mcg/day 이하의 25(OH)$_2D_3$의 간동맥 주입이 과칼슘혈증을 유발하지 않음을 입증한다. 실제로 도 3에 나타난 바와 같이, 과거에 과칼슘혈증을 앓았던 환자의 칼슘 레벨이 이 치료에 의하여 높아지지 않았다.

도 5, 도 6, 및 도 7은 10 mcg/day 이하의 용양이 이 루트를 통하여 투여되어도 과칼슘혈증이 유발되지 않음을 입증해 준다. 또한, 이들 도면에는 15 mcg/day의 1,25(OH) $_2$D$_3$가 주입된 3명의 환장중 2명에서 과칼슘혈증이 발생하였음이 나타나 있다.

도 8 및 도 9는 7명의 환자 모두의 종양 마커 반응을 도시한 것이다. 도 8에 도시된 바와 같이, 환자 1의 마커 레벨이 치료가 시작된 시점에서 급격히 상승하였으나, 곧이어 레벨 상에서 같은 값만큼 급격히 감소였다. 환자 2는 마커 레벨의 감소는 없었으나, 시간에 따라 증가율이 감소하였다. 환자 3은 초기에는 마커 레벨이 극적으로 낮아졌으나, 후에 다시 상승하였다. 이러한 상승은 간질환 이외의 질환의 발생이 인지된 시기와 같은 시기에 이루어진 것으로 나타났다. 도 9는 환자 5 및 환자 6이 CEA 레벨 상승률의 관점에서 치료에 대한 어떠한 반응도 나타내지 않았으나, 환자 7의 CEA 레벨 상승률은 다소의 반응을 나타내었음을 개략적으로 도시한 것이다.

결과 분석 및 결론

본 발명자는 간동맥을 통한 1,25(OH) $_2$D$_3$주입 투여가 안전하며 예기치 못한 부작용을 일으키지 않음을 입증하였다. 10 mcg/day에 달하는 1,25(OH) $_2$D$_3$가 과칼슘혈증을 일으키지 않고 주입될 수 있었다. 이는 2 mcg/day의 칼시트리올이 경구 투여되었던 종래의 실험에서 환자의 50%가 과칼슘혈증이 유발된 것과 비교된다.

종양 마커 데이터로 이들 환자 모두가 매우 진전된 간질환 및 간질환 이외의 다양한 질환을 가지고 있었다는 사실을 설명하는 것은 매우 어렵다. 그러나 시간에 따라 종양 마커 레벨의 상승률 하락이 가리키는 바처럼 치료받은 7명의 환자 중 4명의 환자가 적어도 제한된 반응을 나타내었다.

실시예 3

1,25(OH)D$_3$의 정맥내 투여와 정맥내 주입 효과를 비교하는 돼지 모델

목 적

혈청의 칼슘 레벨에 대한 주입 효과와 동일한 용량의 정맥내 주입 효과를 비교함으로써 1,25(OH)D$_3$의 간동맥 주입에 대한 첫 번째 도입 효과의 존재를 설명할 수 있다.

치료 대상

15 내지 50 kg의 랜드레이스종(Landrace) 암퇘지(병증 이 극미한 것).

방 법

각각의 동물을 마취하고 간동맥 카테터 또는 정맥내 카테터를 삽입한 후, 연속 주입시키는 삽입된 '주입(infusaid)' 펌프에 연결하였다. 4주 동안은 동물에게 아무 것도 처리하지 않아 유발된 간의 효소를 감소시킨 후, 1주 또는 2주 동안 1,25(OH)D$_3$를 주입하였다. 그 동물은 간동맥을 통하여 첫 번째 주입되고 역으로 정맥내 카테터에 연결된 펌프를 가지는 동물로 '교체되었다(crossed ovwe)'.

혈액을 규칙적으로 공급하고 서로 상반되는(feo) 칼슘 레벨, LFTs, 및 UECs를 분석하였다.

결 과

지금까지 세 마리 돼지를 도입하여 실험을 수해하였다. 돼지 1 및 돼지 2는 정맥내 주입 및 간동맥 주입을 받았다. 불행히도, 돼지 3은 이 처리과정 중 할로테인(halothane) 마취에 대하여 악성 이상 고열증(hyperpyrexia) 반응을 나타내어 죽었다. 어느 돼지도 상기 루트를 통한 1,25(OH)D$_3$의 주입에 대하여 예기치 못한 반응을 나타내지 않았으며, 모두 정상적인 LFTs 및 UECs를 나타내었다.

도 10은 $1,25(OH)_2D_3$의 정맥내 주입 및 간동맥 주입 후의 칼슘 레벨을 개략적으로 도시한 것이다. 분명한 것은, 동량이 간동맥을 통하여 전달되는 경우에는 칼슘 레벨에 영향을 주지 않는 반면, 정맥내 루트를 통한 전달은 과칼슘혈증을 일으켰다.

도 11은 돼지 1에 대한 결과와 비슷한 돼지 2에 대한 결과를 개략적으로 도시한 것이다.

결과 분석 및 결론

이 실험은 같은 양이 정맥내로 전달되는 경우에 과칼슘혈증이 유발되나, 간동맥을 통한 $1,25(OH)D_3$ 주입은 과칼슘혈증을 유발하지 않았음을 입증해 준다. 이는 $1,25(OH)D_3$의 간동맥 주입과 관련된 첫 번째 도입 효과의 존재를 뒤받침한다.

실시예 4

리피오돌에 대한 비타민 D_3의 용해도 측정

리피오돌에 대한 비타민 D_3의 용해도를 측정하기 위하여, 방사능 표지된 비타민 D_3를 다양한 함량으로 리피오돌에 용해시켜 방사능 표지된 비타민 D_3의 용해도를 비교하였다. 도 12는 이에 대한 결과를 도시한 것으로서, 비타민 D_3가 실제로 수계 매질보다 리피오돌에 잘 용해됨을 입증해 준다.

당업자는 본 발명의 특정한 실시예에 나타난 바와 같이, 본 발명의 범위 내에서 본 발명이 다양하게 변화 또는 변형될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 예를 들면, 본 발명의 치료 방법은 방사선 치료 또는 화학요법과 같은 종래의 암 방지 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이며, 이들로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

약리학적으로 수용 가능한 오일에 $1,25(OH)_2D_3$ (1-25-디히드록시콜레칼시페롤), OCT(22-옥사칼시트리올), MC 903(칼시포트리올), 및 EB 1089($1\alpha 25(OH)_2$ 22.24 디엔 24.26.27 트리호모 D_3)로 이루어지는 군에서 선택되는 비타민 D 화합물을 약리학적 유효량으로 포함하는 간 종양 치료용 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서,

상기 조성물이 간 국부전달용 제제인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 3.

제2항에 있어서,

상기 조성물이 동맥내 또는 간문맥 주입용 제제인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서,

상기 조성물이 간동맥 주입용 제제인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 5.

제1항에 있어서,

상기 약리학적으로 수용 가능한 오일이 요오드화 오일인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서,

상기 요오드화 오일이 리피오돌(lipiodol)인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 7.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양이 1차 간암인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 8.

제7항에 있어서,

상기 1차 간암이 헤파토마(hepatoma)인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 9.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 종양이 2차 간암인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 10.

제9항에 있어서,

상기 2차 간암이 결장직장암, 폐암, 유방암, 전립선암, 췌장암, 또는 신장암으로 이루어지는 군에서 선택되는 암의 전이부인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 11.

제9항에 있어서,

상기 2차 간암이 육종(sarcoma)인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 12.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 비타민 D 화합물이 $1,25(OH)_2D_3$인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 13.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 탐옥시펜(tamoxifen), 에스트로겐, 또는 에스트로겐 유사체를 추가로 포함하는 간 종양 치료용 조성물.

청구항 14.

제13항에 있어서,

상기 조성물이 에스트로겐을 추가로 포함하는 간 종양 치료용 조성물.

청구항 15.

제13항에 있어서,

상기 조성물이 탐옥시펜을 추가로 포함하는 간 종양 치료용 조성물.

청구항 16.

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물이 하나 이상의 다른 항암 치료제를 추가로 포함하는 간 종양 치료용 조성물.

청구항 17.

제16항에 있어서,

상기 다른 항암 치료제가 화학요법제 또는 방사선 치료제인 간 종양 치료용 조성물.

청구항 18.

삭제

청구항 19.

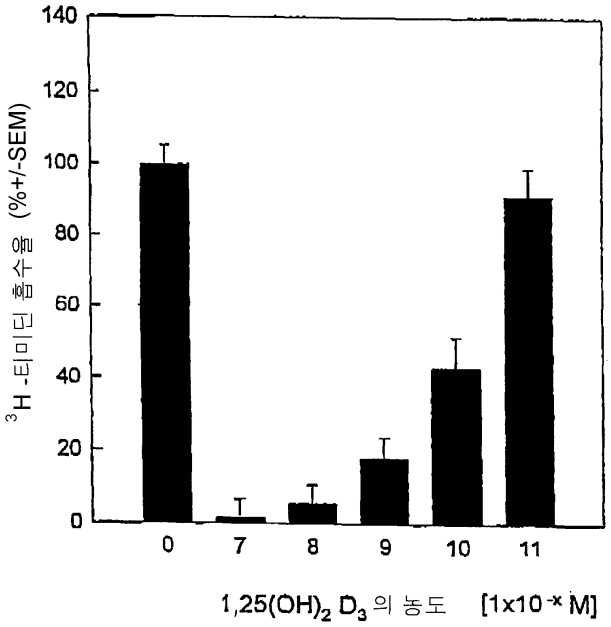
삭제

청구항 20.

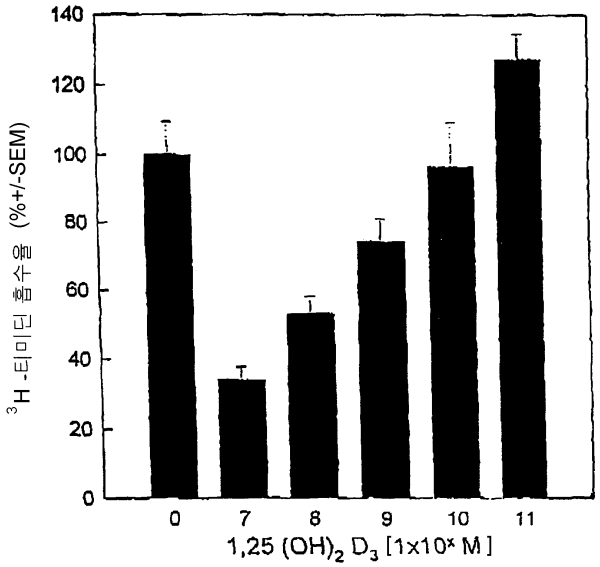
삭제

도면

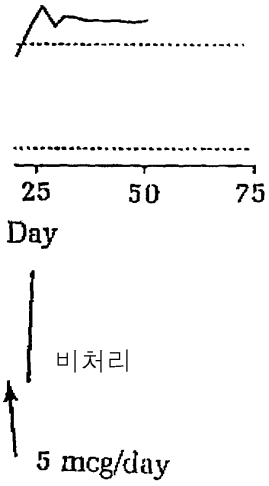
도면 1


140
120
100
80
60
40
20
0
^{3}H -티미딘 흡수율 (%+/-SEM)
0
7
8
9
10
11
1,25(OH)$_2$ D$_3$의 농도 [1x10^{-x} M]

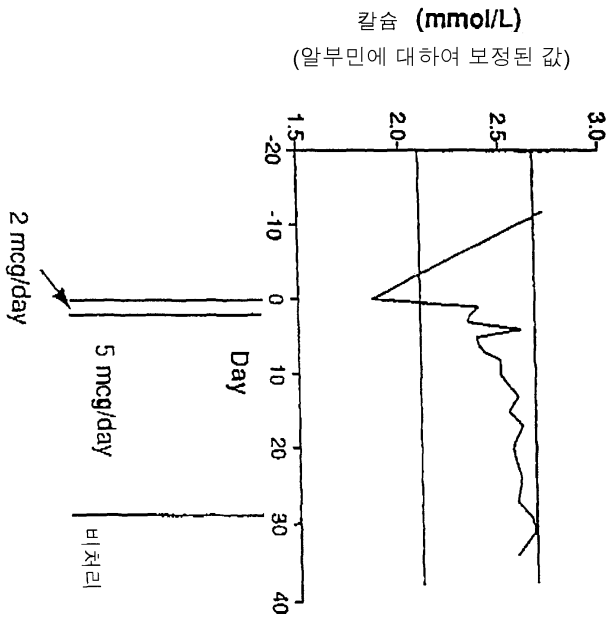
도면 2


140
120
100
80
60
40
20
0
^{3}H -티미딘 흡수율 (%+/-SEM)
0
7
8
9
10
11
1,25 (OH)$_2$ D$_3$ [1x10^{-x} M]

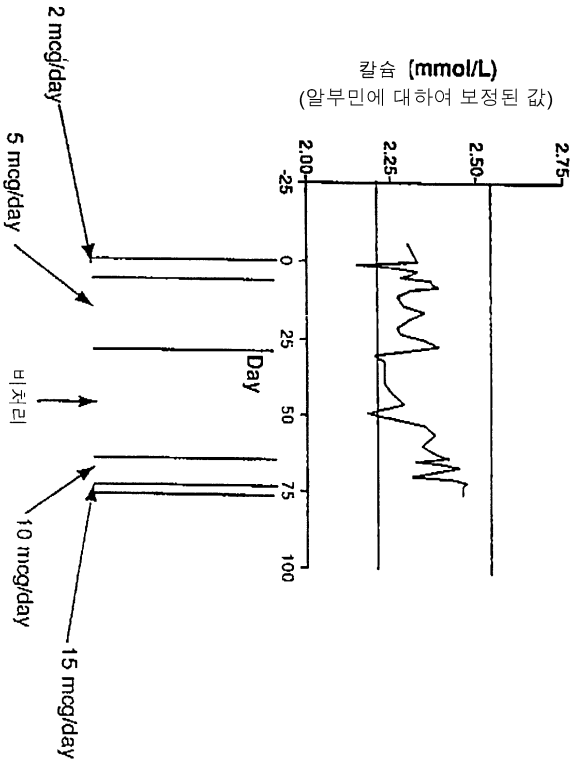
도면 3


25
50
75
Day
비처리
5 mcg/day

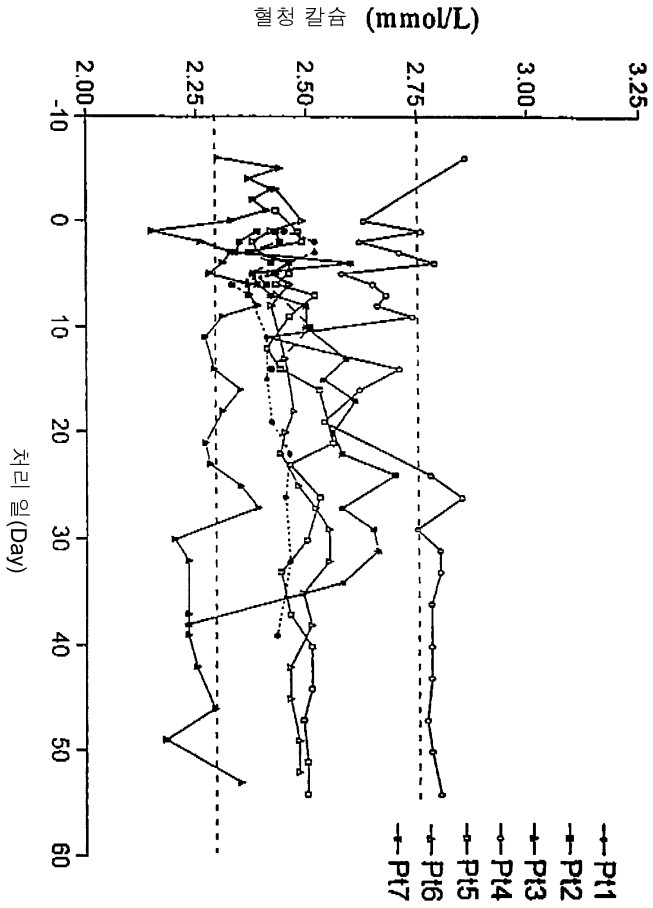
도면 4


칼슘 (mmol/L)
(알부민에 대하여 보정된 값)
1.5
2.0
2.5
3.0
-20
-10
0
10
20
30
40
Day
2 mcg/day
5 mcg/day
비처리

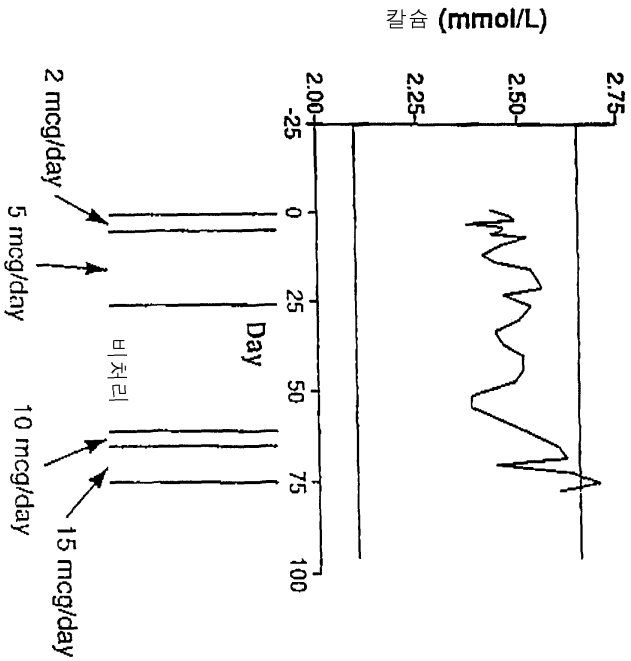
도면 5


칼슘 (mmol/L)
(알부민에 대하여 보정된 값)
2.00
2.25
2.50
2.75
-25
0
25
50
75
100
Day
2 mcg/day
5 mcg/day
비처리
10 mcg/day
15 mcg/day

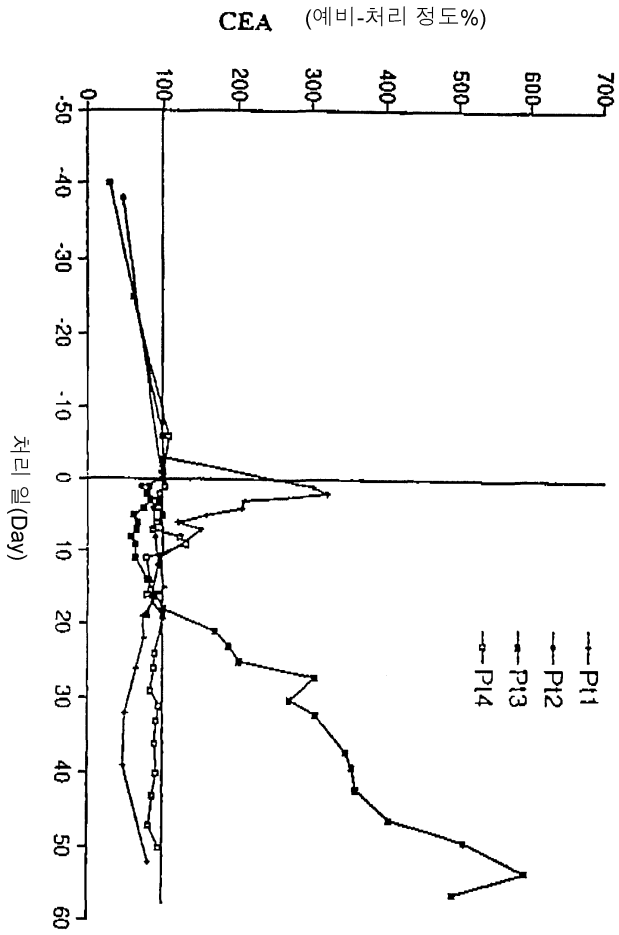
도면 6


혈청 칼슘 (mmol/L)
2.00
2.25
2.50
2.75
3.00
3.25
-10
0
10
20
30
40
50
60
처리 일(Day)
Pt1
Pt2
Pt3
Pt4
Pt5
Pt6
Pt7

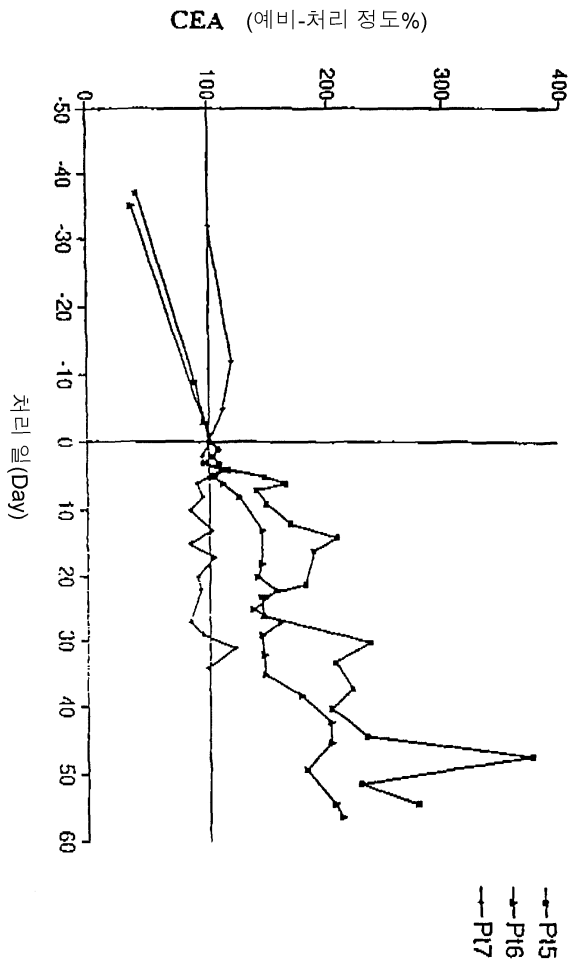
도면 7


칼슘 (mmol/L)
2.00
2.25
2.50
2.75
-25
0
25
50
75
100
Day
2 mcg/day
5 mcg/day
비처리
10 mcg/day
15 mcg/day

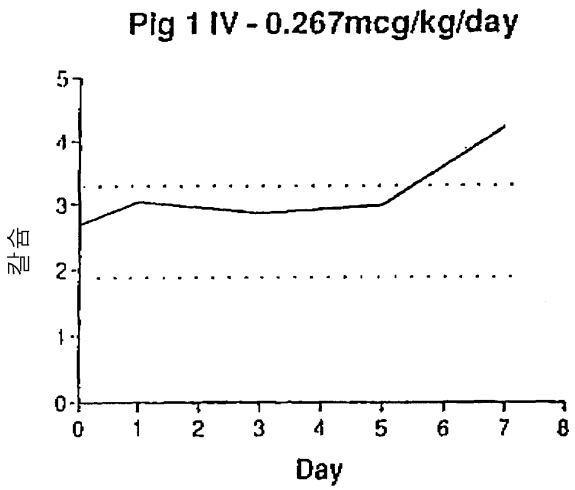
도면 8


CEA (예비-처리 정도%)
0
100
200
300
400
500
600
700
-50
-40
-30
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
처리 일(Day)
Pt1
Pt2
Pt3
Pt4

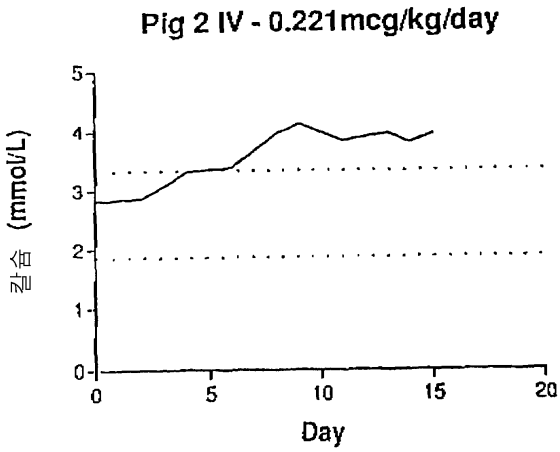
도면 9


CEA (예비-처리 정도%)
처리 일(Day)
-50
-40
-30
-20
-10
0
10
20
30
40
50
60
0
100
200
300
400
Pt5
Pt6
Pt7

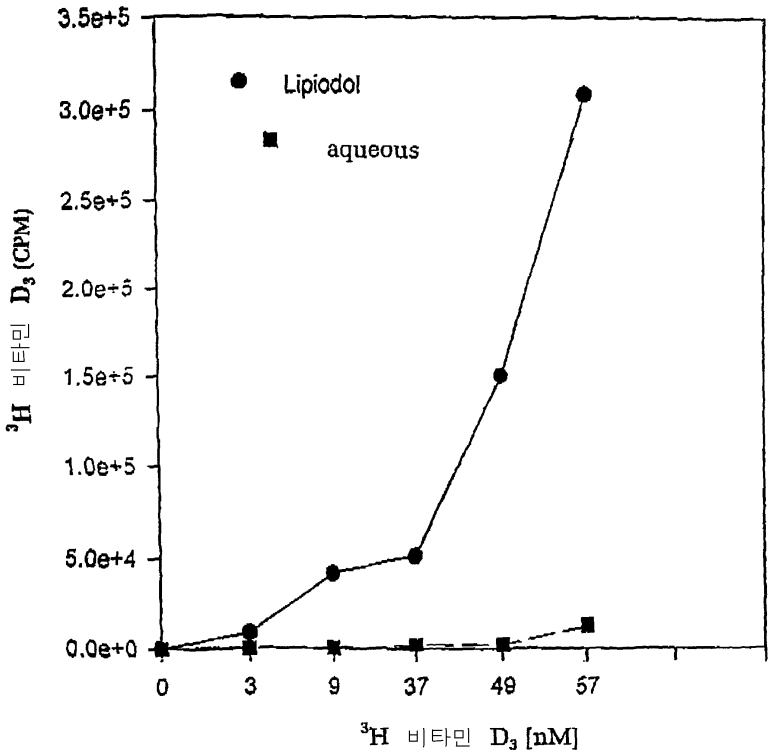
도면 10


Pig 1 IV - 0.267mcg/kg/day
칼슘
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Day

도면 11


Pig 2 IV - 0.221mcg/kg/day
칼슘 (mmol/L)
0
5
10
15
20
Day

도면 12


3.5e+5
3.0e+5
2.5e+5
2.0e+5
1.5e+5
1.0e+5
5.0e+4
0.0e+0
Lipiodol
aqueous
^{3}H 비타민 D_3 (CPM)
0
3
9
37
49
57
^{3}H 비타민 D_3 [nM]