



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월20일
(11) 등록번호 10-1880032
(24) 등록일자 2018년07월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/59 (2006.01) A61K 31/592 (2006.01)
A61K 31/593 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01) A61Q 7/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/59 (2013.01)
A61K 31/592 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7030571(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년08월06일
심사청구일자 2017년11월23일
(85) 번역문제출일자 2017년10월24일
(65) 공개번호 10-2017-0121323
(43) 공개일자 2017년11월01일
(62) 원출원 특허 10-2012-7006399
원출원일자(국제) 2010년08월06일
심사청구일자 2015년08월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/044765
(87) 국제공개번호 WO 2011/019617
국제공개일자 2011년02월17일
(30) 우선권주장
61/234,178 2009년08월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US6531459 B1
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 33 항

(73) 특허권자
베르그 엘엘씨
미국 테네시주 37210 네쉬빌 엘름 힐 피크 1845
(72) 발명자
히메네스 호아킨 제이.
미국 플로리다주 33144 마이애미 78쓰 코트 사우스웨스트 621
나라인 니넬 라진
미국 매사추세츠주 02142 캠브리지 스위트 2005
써드 스트리트 350
맥콕 존 패트릭
미국 텍사스주 75034 프리스코 서던 힐즈 드라이브 4913
(74) 대리인
장훈

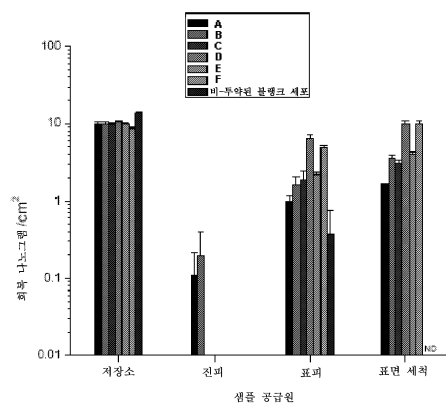
심사관 : 송호선

(54) 발명의 명칭 탈모증 치료용 비타민 D3 및 이의 유사체들

(57) 요약

본 발명은 탈모증, 예를 들어, 화학요법-유도된 탈모증(CIA; chemotherapy-induced alopecia)을 예방하거나 치료하기 위한 방법 및 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 비타민 D 화합물을 표피 층으로 국소 전달하지만 실질적으로 진피 층으로 전달되는 것을 방지하는 제형에서 유효량의 비타민 D 화합물로서 포함한다. 화학요법 환자에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 화학요법 약물 투약 전 또는 동시에 투여될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/593 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61K 8/67 (2013.01)

A61Q 7/00 (2013.01)

A61K 2121/00 (2013.01)

A61K 2800/74 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02002030430 A1*

KR1019990021864 A

Cancer Res., 1992.09., Vol.52, No.18., pp
5123-5125

US20020035097 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

치료학적 유효량의 칼시트리올 및 담체를 포함하는, 개체에서 화학요법-유도된 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한 국소 투여용 약제학적 조성물로서,

상기 담체는 55 내지 80%(w/w) 무수의 순수 에탄올 및 20 내지 45%(w/w) 프로필렌 글리콜을 포함하는 무수 액체이고, 상기 칼시트리올이 표피로 전달되지만 진피로 전달되는 것은 실질적으로 방지하도록 제형화된, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로필렌 글리콜 대 무수의 순수 에탄올의 %(w/w) 비가 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 36:64; 37:63; 38:62; 39:61; 40:60; 41:59; 42:58; 43:57; 44:56; 및 45:55로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 담체가 40%(w/w) 프로필렌 글리콜 및 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 30%(w/w) 프로필렌 글리콜, 10%(w/w) 에톡시디글리콜 또는 트랜스쿠톨, 및 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체가 영장류인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 개체가 사람인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 탈모증이 상기 개체에서 시작되지 않은, 약제학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 개체가 화학요법을 경험하고 있거나 막 경험할 예정인, 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 화학요법 이전에 또는 화학요법과 동시에 상기 개체에게 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 화학요법의 개시 후, 탈모증의 개시 전에 상기 개체에게 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 화학요법의 효능을 감소시키지 않는, 약제학적 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 화학요법이 전신 화학요법인, 약제학적 조성물.

청구항 13

제8항에 있어서, 상기 화학요법이 안트라사이클린(아드리아마이신/독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 발루비신), 5-FU, 타목시펜, 이리노테칸, 파클리탁셀(탁솔), 카보플라틴, 에토포사이드, 사이토산/사이클로포스파미드, 시스플라틴, 에를로티니브(타르세마), 겐시타빈, 스타우로스포린, 빈크리스틴, 이마티니브(글리벡), 게피티니브(이레사), 소라페니브, 다사티니브, 닥티노마이신, 헥사메타멜라민(HMM, 알트레타민), 이포스파미드, 블레오마이신, 메토트렉세이트, 도세탁셀(탁소테르), 빈데신, 비노렐빈, 토포데칸, 암사크린, 시타라빈, 부셀판, 멜팔란, 빈블라스틴, 로무스틴(CCNU), 티오테파, 겐시타빈, 카르무스틴(BCNU), 미트록산트론, 미토마이신 C, 프로카바진, 6-머캅토프린, 스텍토조토신, 플루다라빈, 알티트렉세이트(토무텍스), 카페시타빈 및 이의 등가물들 중의 하나 이상을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 약제학적 조성물이 하루에 2번 상기 개체에게 국소 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 칼시트리올이 $0.1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 의 용량으로 상기 개체에게 국소 투여되는, 약제학적 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 칼시트리올의 총 용량이 2 내지 $100\mu\text{g}$ 칼시트리올/75kg 체중인, 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 칼시트리올의 농도가 3 내지 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 칼시트리올의 농도가 5, 10, 20, 30, 50, 75, 또는 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 인, 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 칼시트리올의 농도가 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 인, 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 칼시트리올의 농도가 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ 인, 약제학적 조성물.

청구항 21

치료학적 유효량의 비타민 D 화합물 및 담체를 포함하는 국소 약제학적 조성물로서, 상기 비타민 D 화합물이 1,25-디하이드록시비타민 D₃, 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤, 1 α -하이드록시비타민 D₃, 1 α ,24-디하이드록시비타민 D₃, 또는 칼시포트리올이고; 상기 담체는 55 내지 80(w/w) 무수의 순수 에탄올 및 20 내지 45(w/w) 프로필렌 글리콜을 포함하는 무수 액체인, 약제학적 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 프로필렌 글리콜 대 무수의 순수 에탄올의 %(w/w) 비가 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 36:64; 37:63; 38:62; 39:61; 40:60; 41:59; 42:58; 43:57; 44:56; 및 45:55로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 약제학적 조성물.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 프로필렌 글리콜 대 무수의 순수 에탄올의 %(w/w) 비가 40:60인, 약제학적 조성물.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 국소 약제학적 조성물이 30%(w/w) 프로필렌 글리콜, 10%(w/w) 에톡시디글리콜 또는 트랜스쿠톨, 및 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 25

치료학적 유효량의 비타민 D 화합물 및 담체를 포함하는 국소 약제학적 조성물로서, 상기 비타민 D 화합물이 1,25-디하이드록시비타민 D₃, 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤, 1 α -하이드록시비타민 D₃, 1 α ,24-디하이드록시비타민 D₃, 또는 칼시포트리올이고; 상기 담체는 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올 및 40%(w/w) 프로필렌 글리콜을 포함하는 무수 액체인, 약제학적 조성물.

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물의 농도가 3 내지 100 μ g/mL인, 약제학적 조성물.

청구항 27

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물의 농도가 5, 10, 20, 30, 50, 75, 또는 100 μ g/mL인, 약제학적 조성물.

청구항 28

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물의 농도가 10 μ g/mL인, 약제학적 조성물.

청구항 29

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물의 농도가 20 μ g/mL인, 약제학적 조성물.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물이 칼시트리올인, 약제학적 조성물.

청구항 31

제27항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물이 칼시트리올인, 약제학적 조성물.

청구항 32

제28항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물이 칼시트리올인, 약제학적 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서, 상기 비타민 D 화합물이 칼시트리올인, 약제학적 조성물.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2009년 8월 14일자로 출원된 미국 가출원 제61/234,178호에 대한 우선권을 주장한다. 상기 출원의 내용은 이의 전문이 본원에 인용된다.

배경 기술

[0003] 탈모증은 다수의 화학요법제에서 공통적이고 괴로움을 주는 부작용이고, 현재 이에 대한 효과적인 예방책은 거의 없다. 최근의 연구에서, 화학요법을 받은 46명의 환자 중 35명이 더 불안감을 주는 부작용으로서 구토보다 탈모증을 꼽았다(참조: Tierney et al, B. J. Cancer, 62:527-528, 1990).

[0004] 현재, 탈모증을 앓고 있는 환자들은 국소 스테로이드를 반복 적용하여 손실된 모발을 재생장시키려는 시도만을 할 수 있거나 미녹시딜을 국소 적용하여 모발 성장을 유지시키는 시도를 할 수 있다. 또한, 몇몇의 전도유망한 연구가 있었지만, 화학요법 치료 동안 부작용으로 일어나는 탈모증을 예방하는 능력을 갖는 승인된 치료제는 현재 없다. 예를 들어, 새끼 래트 모델을 사용하여, 박테리아 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*)로부터 제조된 생물학적 반응 개질제인 ImuVert가 시토신 아라비노사이드 또는 아드리아마이신에 의해 유도된 탈모증으로부터 동물을 보호한다는 것이 입증되었다(참조: Hussein et al., Science 249: 1564-1566, 1990). 후속 연구에서, ARA-C-유도된 탈모증으로부터의 유사한 보호가 재조합 인터류킨-1(IL-1) 베타로부터 관찰되었다(참조: Jimenez et al., FASEB J. 1991). 이러한 전도유망한 결과에도 불구하고, 이러한 장애를 앓고 있는 환자의 탈모증을 치료하고, 추가로 암 치료를 받고 있는 환자에서 화학요법-유도된 탈모증을 예방하는, 안전하고 효과적인 치료제가 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0005] 발명의 요약

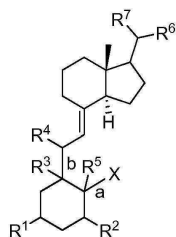
[0006] 본 발명은 탈모증(예를 들면, 화학요법-유도된 탈모증(CIA; chemotherapy-induced alopecia))을 예방하거나 치료하기 위한 비타민 D 화합물, 예를 들어, 비타민 D3 또는 칼시트리올 및 이의 유사체들 또는 이의 대사산물들의 용도, 이의 용량 및 제형에 관한 것이다.

[0007] 따라서, 한 국면에서, 본 발명은 표피로 전달되지만 진피로 전달되는 것은 실질적으로 방지하도록 제형화된 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에게 국소 투여함으로써, 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0008] 일부 양태에서, 약제학적 조성물은 약 40%(w/w) 프로필렌 글리콜 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(anhydrous absolute ethanol)(200 proof, U.S.); 또는 약 30%(w/w) 프로필렌 글리콜, 약 10%(w/w) 에톡시디글리콜 또는 트랜스쿠톨, 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, U.S.)을 포함한다.

[0009] 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학식 I의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들로 제시된다:

[0010] 화학식 I



[0011]

[0012] 상기 화학식 I에서,

[0013] a 및 b는 각각 독립적으로 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0014] X는, a가 이중 결합일 경우, -CH₂이거나, X는, a가 단일 결합일 경우, 수소 또는 하이드록실 치환된 알킬이고;

[0015] R¹은 수소, 하이드록실, 알콕실, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R'' 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

[0016] R²는 수소, 하이드록실, -O-트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R'' 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;

[0017] R³은, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, b가 단일 결합일 경우, R³은, 수소, 하이드록실 또는 알킬이거나, R³ 및 R¹은 이들이 부착된 탄소원자들과 함께 결합하여 5 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있고;

[0018] R⁴는, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R⁴는, b가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;

[0019] R⁵는, a가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R⁵는, a가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;

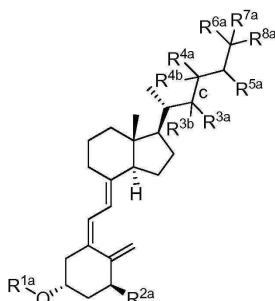
[0020] R⁶은 1 내지 5개의 하이드록실, 옥소, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 -NR'R'' 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클리실(heterocyclyl), 알킬-O-알킬, 알킬-CO₂-알킬이고;

[0021] R⁷은 1 내지 3개의 하이드록실, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 -NR'R'' 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

[0022] R' 및 R''는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 알킬 또는 알콕실이다.

[0023] 일부 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학식 II의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들로 제시된다:

[0024] 화학식 II



[0025]

[0026] 상기 화학식 II에서,

[0027] c는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0028] R^{1a}는 수소, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R'' 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

- [0029] R^{2a} 는 수소, 하이드록실, -O-트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;
- [0030] R^{3a} 및 R^{4a} 는, c가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R^{3a} 및 R^{4a} 는, c가 단일 결합일 경우, 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이고;
- [0031] R^{3b} , R^{4b} , R^{5a} , R^{6a} , R^{7a} 및 R^{8a} 는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이거나, R^{6a} , R^{7a} 및 R^{8a} 중의 임의의 두 개는 결합하여 3 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있다.
- [0032] 또다른 양태에서, 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D3; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D3; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D3, 또는 MC 903이다.
- [0033] 추가의 양태에서, 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D3; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D3; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D3, 또는 MC 903이 아니다.
- [0034] 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트(normal keratinocytes)에서 증가량의 칼시트리올과 유사하거나 동일한 유전자 조절 프로파일을 나타낸다.
- [0035] 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 발현 수준이 증가량의 칼시트리올로 조절되는 하나 이상의 유전자의 발현을 조절한다.
- [0036] 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트에서 HSPA2 또는 HSF4 mRNA, HSPB1 또는 DNAJC6 mRNA의 발현을 조절한다.
- [0037] 또다른 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트에서 SLC1A1, KCNB2, KCNN4 또는 SLC1A3 단백질의 발현을 조절한다.
- [0038] 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 표 3-1 및 표 3-2 중의 하나 이상의 단백질의 발현을 적어도 약 2배로 조절한다.
- [0039] 또다른 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트를 상기 비타민 D 화합물에 약 24시간 노출 후 표 3-3, 3-4, 3-5 또는 3-6 중의 하나 이상의 단백질의 과발현을 유도한다.
- [0040] 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트에서 GST, 케라틴 1, 케라틴 17, 갈렉틴 1, S100 A9(칼프로텍틴), 또는 S100 A13 중의 하나 이상의 과발현을 유도한다.
- [0041] 일부 양태에서, 탈모증은 원형 탈모증(AA; alopecia areata), 완전 탈모증(AT; alopecia totalis), 전신성 탈모증(AU; alopecia universalis) 또는 화학요법-유도된 탈모증(CIA; chemotherapy-induced alopecia)이다.
- [0042] 몇몇 기타 양태에서, 원형 탈모증은 확산 원형 탈모증, 단발성 원형 탈모증, 다발성 원형 탈모증 및 수발 원형 탈모증을 포함한다.
- [0043] 또다른 양태에서, 탈모증은 남성형 탈모증(남성형 대머리) 또는 화학요법 후 탈모증(PCA; post-chemotherapy alopecia)을 제외한다.
- [0044] 일부 양태에서, 개체는 영장류이다.
- [0045] 기타 양태에서, 개체는 사람이다.
- [0046] 기타 양태에서, 탈모증은 개체에서 시작되지 않았다.
- [0047] 또다른 양태에서, 개체는 화학요법을 경험하고 있거나 막 경험할 예정이다.
- [0048] 몇몇 기타 양태에서, 약제학적 조성물은 화학요법 이전에 또는 화학요법과 동시에 개체에게 투여된다.
- [0049] 기타 양태에서, 약제학적 조성물은 화학요법의 개시 후, 탈모증의 개시 전에 개체에게 투여된다.
- [0050] 일부 양태에서, 약제학적 조성물은 화학요법의 효능을 실질적으로 감소시키지 않는다.

[0051] 기타 양태에서, 화학요법은 전신 화학요법이다.

[0052] 일부 양태에서, 화학요법은 안트라사이클린(아드리아마이신/독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 발루비신), 5-FU, 배바시주마브, 타목시펜, 이리노테칸, 파클리탁셀(탁술), 카보플라틴, 에토포사이드, 사이토산/사이클로포스파미드, 시스플라틴, 에블로티니브(타르세바), 겐시타빈, 스타우로스포린, 빈크리스틴, 이마티니브(글리벡), 게피티니브(이레사), 소라페니브, 다사티니브, 닥티노마이신, 헥사메타멜라민(HMM, 알트레타민), 이포스파미드, 블레오마이신, 메토크렉세이트, 도세탁셀(탁소테르), 빈데신, 비노렐빈, 토포테칸, 암사크린, 시타라빈, 부셀판, 멜팔란, 빈블라스틴, 로무스틴(CCNU), 티오테파, 겐시타빈, 카르무스틴(BCNU), 미트록산트론, 미토마이신 C, 프로카바진, 6-머캅토프린, 스랩토조토신, 플루다라빈, 알티트렉세이트(토무텍스), 카페시타빈 및 이의 등가물들 중의 하나 이상을 포함한다.

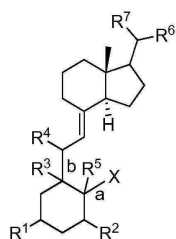
[0053] 추가의 양태에서, 비타민 D 화합물은 약 $0.1\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/ cm^2 에 등가인 용량 용적으로 개체에게 국소 투여된다.

[0054] 기타 양태에서, 총 용량은 약 2 내지 $100\mu\text{g}$ 칼시트리올/75kg 체중에 등가이다.

[0055] 또다른 국면에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 화학식 I의 비타민 D 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에게 국소 투여함을 포함하여, 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하고,

[0056] 상기 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D3; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D3; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D3, 또는 MC 903이 아니다;

[0057] 화학식 I



[0058]

[0059] 상기 화학식 I에서,

[0060] a 및 b는 각각 독립적으로 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0061] X는, a가 이중 결합일 경우, $-\text{CH}_2$ 이거나, X는, a가 단일 결합일 경우, 수소 또는 하이드록실 치환된 알킬이고;

[0062] R¹은 수소, 하이드록실, 알콕실, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 $-\text{NR}'\text{R}''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

[0063] R²는 수소, 하이드록실, $-\text{O}$ -트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 $-\text{NR}'\text{R}''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;

[0064] R³은, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, b가 단일 결합일 경우, R³은, 수소, 하이드록실 또는 알킬이거나, R³ 및 R¹은 이들이 부착된 탄소원자들과 함께 결합하여 5 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있고;

[0065] R⁴는, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R⁴는, b가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;

[0066] R⁵는, a가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R⁵는, a가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;

[0067] R⁶은 1 내지 5개의 하이드록실, 옥소, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 $-\text{NR}'\text{R}''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클리실, 알킬- O -알킬, 알킬- CO_2 -알킬이고;

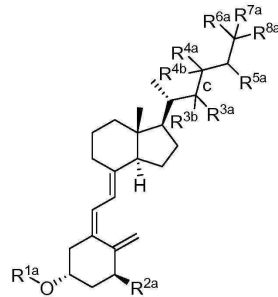
[0068] R⁷은 1 내지 3개의 하이드록실, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 $-\text{NR}'\text{R}''$ 잔기로 임의로

치환된 알킬이고;

[0069] R' 및 R"는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 알킬 또는 알콕실이다.

[0070] 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학식 II의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들로 제시된다:

[0071] 화학식 II



[0072]

[0073] 상기 화학식 II에서,

[0074] c는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0075] R^{1a}는 수소, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

[0076] R^{2a}는 수소, 하이드록실, -O-트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;

[0077] R^{3a} 및 R^{4a}는, c가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R^{3a} 및 R^{4a}는, c가 단일 결합일 경우, 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이고;

[0078] R^{3b}, R^{4b}, R^{5a}, R^{6a}, R^{7a} 및 R^{8a}는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이거나, R^{6a}, R^{7a} 및 R^{8a} 중의 임의의 두 개는 결합하여 3 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있다.

[0079] 또다른 국면에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에게 국소 투여함을 포함하여, 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하고, 상기 비타민 D 화합물은 개체에게

[0080] (1) 약 50 μ g/mL의 유효 농도로 국소 투여될 경우에는 적어도 약 25일 연속으로 약물 투여 후에 독성을 야기하지 않거나,

[0081] (2) 약 100 μ g/mL의 유효 농도로 국소 투여될 경우에는 적어도 약 7일 연속으로 약물 투여 후에 독성을 야기하지 않는다.

[0082] 또다른 국면에서, 본 발명은 공투여되는 화학요법제의 효능을 실질적으로 간섭하지 않고 상기한 개체에게 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한, 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에게 국소 투여함을 포함하여, 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0083] 한 국면에서, 본 발명은

[0084] (1) 정상 케라티노사이트에서 칼시트리올의 증가량과 유사하거나 동일한 유전자 조절 프로파일을 나타내거나;

[0085] (2) 하나 이상의 유전자(상기 유전자는 발현 수준이 칼시트리올의 증가량으로 조절된다)의 발현을 조절하거나;

[0086] (3) 정상 케라티노사이트에서 HSPA2 또는 HSF4 mRNA, HSPB1 또는 DNAJC6 mRNA의 발현을 조절하거나;

[0087] (4) 정상 케라티노사이트에서 SLC1A1, KCNB2, KCNN4, 또는 SLC1A3 단백질의 발현을 조절하거나;

[0088] (5) 표 3-1 및 표 3-2 중의 하나 이상의 단백질의 발현을 적어도 약 2배로 조절하거나;

[0089] (6) 정상 케라티노사이트를 상기 비타민 D 화합물에 약 24시간 노출 후, 표 3-3, 3-4, 3-5 또는 3-6 중의 하나

이상의 단백질의 과발현을 유도하거나;

[0090] (7) 정상 케라티노사이트에서 GST, 케라틴 1, 케라틴 17, 갈락틴 1, S100 A9(칼프로텍틴), 또는 S100 A13 중의 하나 이상의 과발현을 유도하는, 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에 게 국소 투여함을 포함하여, 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하고, 상기 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D₃; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D₃; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D₃, 또는 MC 903이 아니다.

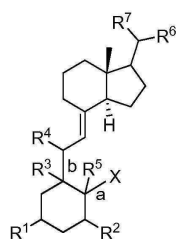
[0091] 또다른 국면에서, 본 발명은 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 국소 투여용 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 비타민 D 화합물은 표피로 전달되지만 진피로 전달되는 것은 실질적으로 방지하도록 제형화된다.

[0092] 일부 국면에서, 약제학적 조성물은 약 40%(w/w) 프로필렌 글리콜 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, US)(비변성); 또는 약 30%(w/w) 프로필렌 글리콜, 약 10%(w/w) 에톡시디글리콜 또는 트랜스쿠톨, 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, US)(비변성)을 포함한다.

[0093] 일부 국면에서, 본 발명은 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 국소 투여용 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 비타민 D 화합물은 화학식 I의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들로 제시되고,

[0094] 상기 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D₃; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D₃; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D₃, 또는 MC 903이 아니다:

[0095] 화학식 I



[0096] [0097] 상기 화학식 I에서,

[0098] a 및 b는 각각 독립적으로 단일 결합 또는 이중 결합이고;

[0099] X는, a가 이중 결합일 경우, -CH₂이거나, X는, a가 단일 결합일 경우, 수소 또는 하이드록실 치환된 알킬이고;

[0100] R¹은 수소, 하이드록실, 알콕실, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

[0101] R²는 수소, 하이드록실, -O-트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;

[0102] R³은, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, b가 단일 결합일 경우, R³은, 수소, 하이드록실 또는 알킬이거나, R³ 및 R¹은 이들이 부착된 탄소원자들과 함께 결합하여 5 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있고;

[0103] R⁴는, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R⁴는, b가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;

[0104] R⁵는, a가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R⁵는, a가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;

[0105] R⁶은 1 내지 5개의 하이드록실, 옥소, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알케닐, 알킬닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클리실, 알킬-O-알킬, 알킬-CO₂-알킬이고;

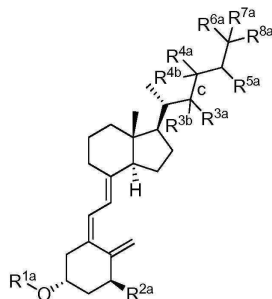
[0106] R⁷은 1 내지 3개의 하이드록실, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 -NR'R" 잔기로 임의로

치환된 알킬이고;

R' 및 R"는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 알킬 또는 알콕실이다.

일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학식 II의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들로 제시된다:

화학식 II



상기 화학식 II에서,

c는 단일 결합 또는 이중 결합이고;

R^{1a}는 수소, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;

R^{2a}는 수소, 하이드록실, -O-트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 -NR'R" 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;

R^{3a} 및 R^{4a}는, c가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R^{3a} 및 R^{4a}는, c가 단일 결합일 경우, 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이고;

R^{3b}, R^{4b}, R^{5a}, R^{6a}, R^{7a} 및 R^{8a}는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이거나, R^{6a}, R^{7a} 및 R^{8a} 중의 임의의 두 개는 결합하여 3 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있다.

일부 기타 국면에서, 본 발명은 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 국소 투여용 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 비타민 D 화합물은 개체에게

(1) 약 50 μ g/mL의 유효 농도로 국소 투여될 경우에는 적어도 약 25일 연속으로 약물 투여 후에 독성을 야기하지 않거나,

(2) 약 100 μ g/mL의 유효 농도로 국소 투여될 경우에는 적어도 약 7일 연속으로 약물 투여 후에 독성을 야기하지 않는다.

또다른 국면에서, 본 발명은 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 국소 투여용 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물은, 화학요법제와 함께 공투여될 경우, 화학요법제의 효능을 실질적으로 간섭하지 않는다.

다른 국면에서, 본 발명은 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 국소 투여용 약제학적 조성물을 제공하고, 상기 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물은,

(1) 정상 케라티노사이트에서 칼시트리올의 증가량과 유사하거나 동일한 유전자 조절 프로파일을 나타내거나;

(2) 하나 이상의 유전자(상기 유전자는 발현 수준이 칼시트리올의 증가량으로 촉진된다)의 발현을 조절하거나;

(3) 정상 케라티노사이트에서 HSPA2 또는 HSF4 mRNA, HSPB1 또는 DNAJC6 mRNA의 발현을 조절하거나;

(4) 정상 케라티노사이트에서 SLC1A1, KCNB2, KCNN4, 또는 SLC1A3 단백질의 발현을 조절하거나;

(5) 표 3-1 또는 표 3-2 중의 하나 이상의 단백질의 발현을 적어도 약 2배로 조절하거나;

(6) 정상 케라티노사이트를 상기 비타민 D 화합물에 약 24시간 노출 후, 표 3-3, 3-4, 3-5 또는 3-6 중의 하나

이상의 단백질의 과발현을 유도하거나;

[0128] (7) 정상 케라티노사이트에서 GST, 케라틴 1, 케라틴 17, 갈렉틴 1, S100 A9(칼프로텍틴), 또는 S100 A13 중의 하나 이상의 과발현을 유도하고, 상기 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D3; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D3; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D3, 또는 MC 903이 아니다.

[0129] 본원에서(상기 및 하기) 기술된 모든 양태는 본 발명의 국면 중의 하나에서만 기술된 양태 및 본 발명의 상이한 국면에서 기술된 양태를 포함하여, 적용가능한 경우, 임의의 기타 양태(들)와 함께 결합될 수 있을 것으로 고려됨을 주시해야 한다.

도면의 간단한 설명

[0131] 도 1은 3명의 피부 공여자에 걸친 총 흡수 및 질량 균형 결과, 및 단일 적용으로부터 48시간 동안 완전한 사람 사체 피부로부터의 칼시트리올의 분포를 나타낸다. 결과는 총 질량(ng/cm^2)으로 평균 \pm SE로서 로그 스케일(log scale)임을 주의한다.

도 2는 성장 배지 중에 존재하는 칼시트리올의 상이한 농도에 대한 HEKa 세포의 예시적 성장 곡선을 도시한다. 칼시트리올 농도의 로그 스케일임을 주의한다.

도 3은 체장 암종 세포주 PaCa2에 의한 예시적 성장 곡선을 도시하고, 이 성장 곡선은 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재에 반응하지 않는다.

도 4a 및 4b는 증가하는 농도의 칼시트리올의 존재하에 Hep-G2 세포 및 MCF-7 세포 각각의 성장을 나타낸다.

도 5는 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 EGFR Tyr 키나제 억제제 에를로티니브(타르세바)의 투약 곡선을 나타낸다.

도 6은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 또다른 EGFR Tyr 키나제 억제제 게푸투부브(이레사)의 투약 곡선을 나타낸다.

도 7은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 소라피니브의 투약 곡선을 나타낸다. 소라페니브는 몇몇 키나제(Raf, VEGF-R2, c-kit, PDGR-R)를 억제하는 것으로 공지되었다.

도 8은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 다사티니브의 투약 곡선을 나타낸다. 다사티니브는 BCR/ABL Tyr 키나제를 억제한다.

도 9는 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 스타우로스포린의 투여 곡선을 도시한다. 스타우로스포린은 비교적 비특이적 키나제 억제제이다.

도 10은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 시스플라틴의 투약 곡선을 나타낸다. 시스플라틴은 DNA 알킬화제이다.

도 11은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 카보플라틴의 투약 곡선을 나타낸다. 카보플라틴은 또한 DNA 알킬화제이다.

도 12는 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 이리노테칸의 투여 곡선이다.

도 13은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 파클리탁솔의 투약 곡선을 나타낸다.

도 14는 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 5-FU의 투약 곡선을 나타낸다.

도 15는 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 겐시타빈의 투약 곡선을 나타낸다.

도 16은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 독소루비신의 투약 곡선을 나타낸다.

도 17은 칼시트리올의 부재하(◆) 또는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 칼시트리올의 존재하(x)에 타목시펜의 투약 곡선을 나타낸다.

도 18은 0.1 μ g/mL 칼시트리올이 5-FU에 대해 정상 케라티노사이트 HEKa를 보호하는 반면, 암 세포에 대해 5-FU의 ED₅₀ 값에 뚜렷하게 영향을 미치지 않는다는 것을 도시한다.

도 19는 칼시트리올이 암 세포주 SkBr-3에 대해 독소루비신의 세포 독성 효과를 뚜렷하게 변경시키지 않는다는 것을 도시한다.

도 20a는 에토포사이드를 투여한 스프라그 다울리 래트에서, 칼시트리올의 국소 제형이 용량 의존 방식으로 화학요법-유도된 탈모증(CIA)으로부터 보호한다는 것을 나타낸다. 좌측 패널: 에토포사이드만 투여한 래트; 중간 패널: 에토포사이드를 투여하고 국소 제형 중의 0.1 μ g의 칼시트리올을 국소 적용한 래트; 우측 패널: 에토포사이드를 투여하고 국소 제형 중의 0.3mg의 칼시트리올을 국소 적용한 래트. 도 20b는 착색된 롱 에반스(Long Evans) 래트에서 유사한 결과를 나타낸다.

도 21은 칼시트리올 국소 제형(총 용량 0.2 μ g)이 롱 에반스 래트를 사이클로포스파미드(CTX)-유도된 탈모증으로부터 보호한다는 것을 나타낸다.

도 22a는 칼시트리올 국소 제형(총 용량 0.2 μ g)이 롱 에반스 래트를 CTX-독소루비신 병용 화학요법-유도된 탈모증으로부터 보호한다는 것을 나타낸다. 도 22b는 시타라빈-독소루비신 병용 화학요법-유도된 탈모증에 의해 처리된 래트에서 칼시트리올 국소 제형 칼시트리올에 의한 유사한 보호 결과를 나타낸다. 시타라빈 단독으로 처리된 래트에서 칼시트리올 국소 제형의 보호 효과는 도 22c에 도시된다.

도 23은 국소 칼시트리올 국소 제형(총 용량 0.2 μ g)이 MIAC51(녹색백혈병 세포)로 주사된 롱 에반스 래트를 CTX-유도된 탈모증으로부터 보호한다는 것을 나타낸다.

도 24는 MIAC51(녹색백혈병 세포)로 주사된 롱 에반스 래트에서 수행된 생체내 실험에서, 칼시트리올 국소 제형이 암 세포를 화학요법으로부터 보호하지 않는다는 것을 도시한다.

도 25a 및 25b는 미니피그 표피의 각질층 및 표피의 나머지에서 회수된 칼시트리올(ng/mg)의 추정된 수준을 나타낸다. 양은 회수된 칼시트리올의 평균 \pm SD로서 표현된다. nd= 전혀 검출되지 않음, na= 적용불가.

도 26은 표피 중의 회수된 칼시트리올 조직 수준에 3 내지 100 μ g/mL 적용의 칼시트리올 농도 범위로 적용된 칼시트리올 용량 사이의 근사 선형 상관관계를 도시한다.

도 27은 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제1 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 도 27A는 사이클로포스파미드 단독을 투여한 래트를 도시하고, 도 27B는 사이클로포스파미드와 비히클을 투여한 래트를 도시하고, 도 27C는 사이클로포스파미드 및 칼시트리올을 투여한 래트를 도시한다.

도 28은 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제2 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 좌측에서 우측으로, 사이클로포스파미드 단독으로 처리된 래트, 사이클로포스파미드 및 비히클로 처리된 래트 및 사이클로포스파미드 및 칼시트리올로 처리된 래트.

도 29는 독소루비신과 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제1 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 도 29A는 사이클로포스파미드와 독소루비신 단독을 투여한 래트를 도시하고, 도 29B는 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 비히클을 투여한 래트를 도시하고, 도 29C는 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 칼시트리올을 투여한 래트를 도시한다.

도 30은 독소루비신과 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제2 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 좌측에서 우측으로, 사이클로포스파미드와 독소루비신 단독으로 처리된 래트, 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 비히클로 처리된 래트 및 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 칼시트리올로 처리된 래트.

도 31은 독소루비신 및 시타라빈과 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제1 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 도 31A는 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈 단독을 투여한 래트를 도시하고, 도 31B는 사이클로포스파미드, 독소루비신, 시타라빈 및 비히클을 투여한 래트를 도시하고, 도 31C는 사이클로포스파미드, 독소루비신, 시타라빈 및 칼시트리올을 투여한 래트를 도시한다.

도 32는 독소루비신 및 시타라빈과 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제2 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 좌측에서 우측으로, 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈 단독으로 처리된 래트, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 시타라빈 및 비히클로 처리된 래트 및 사이클로포스파미드,

독소루비신, 시타라빈 및 칼시트리올로 처리된 래트.

도 33은 파클리탁셀 및 에토포사이드와 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제1 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 도 33A는 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드 단독을 투여한 래트를 도시하고, 도 33B는 사이클로포스파미드, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 비히클을 투여한 래트를 도시하고, 도 33C는 사이클로포스파미드, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 칼시트리올을 투여한 래트를 도시한다.

도 34는 파클리탁셀 및 에토포사이드와 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 녹색백혈병 래트의 제2 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 좌측에서 우측으로, 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드 단독으로 처리된 래트, 사이클로포스파미드, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 비히클로 처리된 래트 및 사이클로포스파미드, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 칼시트리올로 처리된 래트.

도 35는 파클리탁셀 및 에토포사이드와 병용된 독소루비신을 제공한 녹색백혈병 래트의 제1 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 도 35A는 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드 단독을 투여한 래트를 도시하고, 도 35B는 독소루비신, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 비히클을 투여한 래트를 도시하고, 도 35C는 독소루비신, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 칼시트리올을 투여한 래트를 도시한다.

도 36은 파클리탁셀 및 에토포사이드와 병용된 독소루비신을 제공한 녹색백혈병 래트의 제2 성장기 과정에 대한 칼시트리올의 효과를 도시한다. 좌측에서 우측으로, 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드 단독으로 처리된 래트, 독소루비신, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 비히클로 처리된 래트 및 독소루비신, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 칼시트리올로 처리된 래트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132]

발명의 상세한 설명

[0133]

본원에 기술된 발명은 부분적으로, 탈모증(예를 들면, 화학요법-유도된 탈모증)을 예방하거나 치료할 수 있는 비타민 D 화합물의 국소 제형이 보다 깊은 진피 층으로 전달되고/되거나 이에 축적되는 것을 실질적으로 방지하면서 선택적으로 피부의 표피 층으로 전달되거나 이에 축적될 수 있다는 발견을 기초로 한다. 이는 화학요법 치료를 경험한 특정 환자에서 유리할 수 있고, 상기 비타민 D 화합물의 보다 깊은 축적은 화학요법 용법의 효능을 감소시킨다. 이러한 국소 제형은 또한 과량의 비타민 D 화합물의 존재에 의해 부정적으로 영향을 받을 수 있는 의학적 상태를 갖는 환자, 예를 들어, 신장 결석을 앓고 있는 환자에서 유리할 수 있고, 이 상태는 특정 비타민 D 화합물에 의한 칼슘 동원시 악화될 수 있다. 따라서, 이러한 환자에서, 비타민 D 화합물의 이상적 전달은 혈관이 풍부한 진피 층으로 보다는 피부의 표피 층으로의 최소 유효 용량의 국소 전달이어야 한다.

[0134]

본 발명은 또한 부분적으로, 비타민 D 화합물이 비교적 낮은 농도/용량에서 정상 케라티노사이트에 대한 완전한 성장 촉진 효과를 나타내는 반면, 비교적 고농도/용량에서 동일 세포 상에서 성장 억제 효과를 나타낸다는 발견에 기초한다. 따라서, 본 발명은 바람직하지 않은 성장 억제 효과를 야기하지 않고 탈모증에 대한 최적의 보호 효과를 나타내는 방법 및 약제학적 조성물을 제공한다.

[0135]

본 발명은 추가로 비타민 D 화합물이 정상 케라티노사이트에서 다수의 표적 유전자의 발현을 활성화시키거나 억제하고, 따라서 특정 치료학적 적용에 가장 적합한 비타민 D 화합물을 선택하고 유사한 생물학적 활성을 갖는 추가의 비타민 D 유사체를 동정하기 위한 기준을 제공한다는 발견에 기초한다.

[0136]

임의의 특정 이론에 결부시키고자 하지 않고, 본 발명의 제형은 화학요법 시약의 약물 간섭을 최소화하는 것과 관련하여 유리할 수 있다. 피부의 진피 층은 혈관 중에서 풍부하고, 이 층으로의 국소용 약물 침투는 전신 전달된 화학요법 시약에 대해 약물 간섭을 일으켜 암 세포에 대한 바람직하지 않은 보호 효과를 유도한다.

[0137]

따라서, 한 국면에서, 본 발명은 실질적으로 진피 전달 및/또는 축적을 방지하면서 표피로 전달되고/되거나 이에 축적되도록 제형화된 비타민 D 화합물의 치료학적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에게 국소 투여함을 포함하는, 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.

[0138]

용어 "실질적으로 진피 전달 및/또는 축적을 방지하는"은 비타민 D 화합물의 표피로의 전달 및/또는 축적과 비교하여 약 25% 미만의 비타민 D 화합물의 진피로의 전달 및/또는 축적, 예를 들어, 표피로 전달되는 양과 비교할 경우, 진피로의 비타민 D 화합물의 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 1% 미만 또는 무전달 및/또는 무축적을 포함한다. 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 진피로의 전달 및/또는 축적과 비교하여, 약 1% 내지 25%, 예를 들어, 약 1 내지 약 20%, 약 1% 내지 약 15%, 약 1% 내지 약 10% 또는 약 1% 내지

약 5%가 진피로 전달되고/되거나 축적된다. 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 진피에서 전달되지 않고/않거나 축적되지 않는다. 일부 양태에서, 진피로 전달되거나 이에 축적되는 비타민 D 화합물의 양은 약 $0.3\text{ng}/\text{cm}^2$ 미만, 약 $0.2\text{ng}/\text{cm}^2$ 미만 또는 약 $0.1\text{ng}/\text{cm}^2$ 미만이다.

[0139] 용어 "탈모증"은 개체의 머리 또는 신체로부터 무의식적인 완전한 또는 부분 모발 손실을 포함하고, 원형 탈모증(AA), 완전 탈모증(AT), 전신성 탈모증(AU), 또는 화학요법-유도된 탈모증(CIA)을 포함한다. 원형 탈모증은 확산 원형 탈모증, 단발성 원형 탈모증, 다발성 원형 탈모증 및 수발 원형 탈모증을 포함한다. 일부 양태에서, 탈모증은 남성형 탈모증(androgenetic alopecia)(남성형 대머리(alopecia androgenetica) 또는 남성 대머리(male baldness)) 또는 화학요법후 탈모증(PCA)은 포함하지 않는다.

[0140] 탈모증은 때로 머리 또는 신체로부터 모발 손실에서부터 대머리 정도까지 의학적 기술이다. 체모의 공통적인 심미적 탈모와 달리, 탈모증, 예를 들어, 남성형 탈모증은 무의식적이고 달갑지 않은 경향이 있다. 그러나, 이는 또한 자기 자신의 머리를 뽑는 정신적인 충동(발모증) 또는 자발적인 일상적 헤어스타일링의 예상치 못한 결과(지나치게 단단하게 묶은 머리 또는 땀은 머리로부터의 기계적 "견인성 탈모증" 또는 부식성 모발 릴렉서 용액 또는 가열된 헤어 아이롱으로부터의 두피 화상)에 의해 유발될 수 있다. 일부 경우에, 탈모증은 철 결핍과 같은 기본적인 의학적 우려의 징후이다.

[0141] 모발 손실이 단지 한 구역에서 일어날 경우, 이는 "원형 탈모증"으로서 공지된다. 사람 원형 탈모증에서, 모발은 신체의 일부 또는 모든 영역으로부터 일반적으로 두피로부터 손실된다. 이는 특히 초기 단계에 두피에 대머리 스폿을 유도하기 때문에, 이는 때로 스폿 대머리로 칭명된다. 1% 내지 2%의 경우에, 상태는 전체 두피(완전 탈모증) 또는 전체 표피(전신성 탈모증)로 퍼질 수 있다.

[0142] AA와 유사하고 유사한 원인을 갖는 상태가 또한 기타 종에서 발생한다. 가장 통상적인 형태의 원형 탈모증은 두피 상에 하나 이상의 원형 스폿의 모발 손실을 포함한다. 모발은 또한 전체 두피에 걸쳐 더욱 확산적으로 손실될 수 있고, 이러한 경우, 상태는 확산 원형 탈모증이라 칭명된다. 단발성 원형 탈모증은 머리의 어느 곳에 발생할 수 있는 단지 하나의 스폿에 있는 대머리를 기술한다. 다발성 원형 탈모증은 다수의 모발 손실 영역을 의미한다. 당해 질환은 단지 턱수염에 제한될 수 있고, 이러한 경우, 이는 수발 원형 탈모증이라 칭명된다. 개체가 그/그녀의 두피에서 모발을 모두 손실할 경우, 당해 질환은 전체 원형 탈모증이라 칭명된다.

[0143] "전신성 탈모증"은 신체 상에서 완전한 모발 손실이 일어나는 경우이고, 이는 화학요법과 관련된 모발 손실이 때때로 전체 신체에 어떻게 영향을 미치는지와 유사하다.

[0144] "남성형 탈모증(Androgenic alopecia)"(또한 남성형 탈모증(androgenetic alopecia) 또는 남성형 대머리(alopecia androgenetica)라 공지됨)은 여성 및 남성 모두, 침팬지 및 오랑우탄에 존재하는 모발 손실의 일반적인 형태이다. 특히 남성에게서, 이 상태는 또한 남성 패턴 대머리로서 통상적으로 공지되었다. 모발은 두 관자놀이 위로부터 시작하여 명확한 패턴으로 손실된다. 경시적으로, 헤어라인이 감소하여 독특한 "M" 형상을 형성한다. 모발은 머리의 정수리에서 적어진다. 흔히, 머리의 측면 및 후부 주위의 모발의 가장자리가 남거나, 상태는 완전한 대머리로 진행할 수 있다. 여성의 모발 손실 패턴은 남성 패턴 대머리와 상이하다. 여성에서, 모발은 머리 전반에 걸쳐 모두 더 얇아지고, 헤어라인은 감소하지 않는다. 여성에서 남성형 탈모증은 좀처럼 전체 대머리를 유도하지 않는다.

[0145] 용어 "탈모증을 예방하는"은 이의 발생 전에 탈모증과 관련된 모발 손실을 정지시키거나 억제함을 포함한다.

[0146] 용어 "탈모증을 치료하는"은 탈모증과 관련된 모발 손실의 중증도를 감소시키거나 탈모증과 관련된 모발 손실 정도를 감소시킴을 포함한다. 일부 양태에서, 탈모증을 치료하는 것은 탈모증의 경감을 포함한다.

[0147] 용어 "투여하는"은 하나 이상의 용량의 비타민 D 화합물을 개체에게 탈모증을 예방하거나 치료하기에 유효한 양으로 제공함을 포함한다. 비타민 D 화합물의 제시된 투여 프로토콜에 최적인 투여 비율은 사용된 특정 화합물, 제형화된 특정 조성물, 적용 방식, 특정 투여 위치 등에 관련하여 수행된 통상의 용량 측정 시험을 사용하여 당해 분야의 숙련가에 의해 확정될 수 있다.

[0148] 용어 "국소 투여하는"은 개체의 피부에 하나 이상의 용량의 비타민 D 화합물을 탈모증을 치료하거나 예방하기에 효과적인 양으로 전달함을 포함한다.

[0149] 피부는 많은 전문화된 세포 및 구조를 함유하고, 적절한 체온을 유지하는 것을 돕고, 환경으로부터 지각 정보를 수집하고, 면역계에서 활동적인 역할을 하는 환경과 경계면을 이루는 보호 차단제로서 작용하는 것과 같은 각종

중요한 기능을 갖는다.

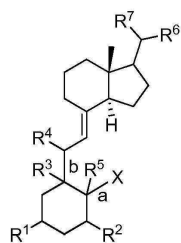
- [0150] 피부는 3개의 층- 표피, 진피 및 피하 조직을 갖는다. 표피는 피부의 최외각층이다. 이의 두께는 상이한 형태의 피부에서 다양하다. 이는 눈꺼풀 상에서 약 0.05mm로 가장 얇고, 손바닥 및 발바닥에서 약 1.5mm로 가장 두껍다. 하단에서 상단으로, 표피는 5개의 층: 기저층, 유극층, 과립층, 투명층(일부 피부에서 선택적임) 및 각질층을 함유한다.
- [0151] 기저층은 표피 중의 케라티노사이트의 하단층이고, 끊임없이 표피 세포를 재생시키는 책임이 있다. 이 층은 매우 자주 분할하는 미분화 원주 줄기 세포의 단지 1개의 줄을 함유한다. 세포의 반은 분화하고, 성숙 과정을 시작하기 위해 다음 층으로 이동한다. 나머지 반은 기저 층에 머무르고, 반복적으로 분화하여 기저층을 보충한다. 유극층(유극 세포층으로 칭명되기도 함)으로 이동하는 세포는 원형에서 다각형으로 변한다. 이 층에서, 세포는 케라틴을 합성하기 시작한다. 과립층, 또는 과립상 층 중의 세포는 이들의 핵을 손실하고, 세포질 물질의 짙은 클럼프(clump)를 특징으로 한다. 케라틴 단백질로서의 이 층에는 많은 활동이 있고, 방수 지질이 생산되고 조직화된다. 투명층은 단지 각질층과 과립층 사이의 마찰 및 전단력을 감소시키는 것을 돕는 두꺼운 피부에 존재한다. 각질층 중의 세포는 각질 세포로서 공지되었다. 이들 세포는 평평하게 되고, 층에 강도를 제공할 뿐만 아니라 물의 흡수를 허용하는 케라틴 단백질로 주로 구성된다. 각질층의 구조는 단순하게 보이지만, 이층은 매우 중요한 기능인 피부의 완전성 및 수화도를 유지시키는데 책임이 있다.
- [0152] 진피는 또한 피부의 위치에 따라 두께가 다양하다. 이는 눈꺼풀에서 약 0.3mm이고 등에서 약 3.0mm이다. 진피는 층에서가 아니라 전반에 걸쳐 존재하는 3가지 유형의 조직: 콜라겐, 탄성 조직 및 망상 섬유로 구성된다. 진피의 두 층은 유두 층 및 망상 층이다. 상부 유두층은 콜라겐 섬유의 얇은 배열을 함유한다. 하부 망상층은 보다 두껍고, 피부 표면에 평행하게 배열된 두꺼운 콜라겐 섬유로 이루어진다. 진피는 다수의 전문화된 세포 및 구조를 함유한다. 예를 들어, 혈관 및 신경은 이 층을 통과한다. 모낭도 또한 각 소낭에 부착된 기모근과 함께 이 층에 위치된다. 모낭의 일부도 또한 손상된 표피를 재생시킬 수 있는 줄기 세포를 함유한다. 줄기 세포는 진피-표피 접합부(DEJ; dermal-epidermal junction)에 존재할 수 있다. 피지(오일) 선 및 아포크린(냄새) 선은 소낭과 관련된다. 이 층은 또한 에크린(땀) 선을 함유하지만, 이들은 모낭과 관련되지 않는다. 피하 조직은 더 큰 혈관 및 신경을 수용하는 지방 및 결합 조직의 층이다. 이 층은 피부 자체 및 신체의 온도를 조절하는데 중요하다. 이 층의 크기는 신체 전반에 걸쳐, 그리고 사람마다 다양하다.
- [0153] 따라서, 본원에서 사용된 "표피"는 표피와 진피 사이의 접합층(예를 들면, 진피-표피 접합부 또는 DEJ) 및 표피층을 재생하는 줄기 세포(예를 들면, 소포 줄기 세포 및 표피 줄기 세포)를 포함하는 이의 층 5개 모두(존재하는 경우)를 포함한다.
- [0154] 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 실질적으로 진피로의 전달 및/또는 축적을 방지하면서 표피로 국소 전달되고/되거나 축적된다. 본원에서 사용된 용어 "실질적으로 진피 전달 및/또는 축적을 방지하는"은 진피에 비타민 D 화합물의 단지 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5% 또는 약 0% 전달/축적만을 포함한다. 바람직한 양태에서, 진피에서 비타민 D 화합물의 검출가능한 전달/축적은 없다.
- [0155] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 개체에게 약 1일, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 2주, 약 3주, 약 4주, 약 6주, 약 8주, 약 3개월, 약 4개월, 약 5개월, 약 6개월, 약 7개월, 약 8개월, 약 9개월, 약 10개월, 약 11개월 또는 약 1년 동안 투여된다. 일부 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 처리 기간 동안 매일 또는 격일로 또는 3일마다 한번 투여될 수 있다.
- [0156] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 각 처리 날에 하루에 1번, 하루에 2번, 하루에 3번 투여된다.
- [0157] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물의 각 투여를 개체 상의 동일 위치에 또는 수개의 상이한 위치에 적용한다. 상이한 위치에 적용될 경우, 각 위치에 대한 용량은 동일하거나, 피부 두께 및 약물 침투 차이(경우에 따라)와 같은 인자에 기초하여 조절될 수 있다.
- [0158] 특정 양태에서, 화학요법 개시시 발생할 수 있는 임의의 CIA를 예방하거나 이의 중증도를 감소시키기 위해 화학요법 개시전에 2주 연속 매일 하루에 2번 두피에 국소 투여한다.
- [0159] 용어 "개체"는 탈모증으로 고통받는 기능을 갖는 동물들을 포함한다. 하나의 양태에서, 개체는 포유동물, 예를 들어, 고양이, 개, 영장류, 마우스, 래트, 래빗, 소, 말, 염소, 양, 돼지 등이다. 일부 양태에서, 포유동물은 영장류, 예를 들어, 침팬지, 사람, 고릴라, 보노보, 오랑우탄, 원숭이 등이다. 또다른 양태에서, 포유동물은

사람이다.

- [0160] 일부 양태에서, 개체는 화학요법 치료를 경험하고 있거나 막 경험할 예정이다. 한 양태에서, 개체는 아직 탈모증 증상이 발병되지 않았거나, 탈모증이 투여 전에 시작되지 않았다. 일부 기타 양태에서, 개체는 암을 앓고 있다.
- [0161] 또다른 국면에서, 본 발명은, 공투여된 화학요법제의 효능을 실질적으로 간섭하거나 감소시키지 않고, 상기 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하기 위한, 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 개체에게 국소 투여하여 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공한다.
- [0162] 일부 양태에서, 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 실질적으로 화학요법, 특히 전신 화학요법의 효능을 감소시키지 않는다. 기타 양태에서, 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 화학요법의 효능을 향상시킨다. 용어 "공투여된 화학요법제의 효능을 간섭하지 않고"는 비타민 D 화합물이, 하나 이상의 화학요법제와 함께 투여될 경우, 하나 이상의 화학요법제의 생물학적 또는 치료학적 활성을 방해하거나 하나 이상의 화학요법제가 이의 목적하는 생물학적 또는 치료학적 활성을 수행하는 것을 방해하지 않는 상황을 포함한다. 용어 "공투여되는 화학요법제의 효능을 감소시키지 않고"는 비타민 D 화합물이, 하나 이상의 화학요법제와 함께 투여될 경우, 하나 이상의 화학요법제의 생물학적 또는 치료학적 활성을 감소시키지 않는 상황을 포함한다.
- [0163] 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 모낭 또는 진피 유두에 대한 세포독성 효과를 갖거나, 그렇지 않으면, 탈모증을 유도할 수 있는 임의의 화학요법제 또는 화학요법제의 병용물과 함께 사용될 수 있다. 용어 "화학요법제", "화학요법" 및 "화학요법 용법"은 안트라사이클린(아드리아마이신/독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 발루비신), 5-FU, 타목시펜, 이리노테칸, 파클리탁셀(탁솔), 카보플라틴, 에토포사이드, 사이토산/사이클로포스파미드, 시스플라틴, 에를로티니브(타르세바), 베바시주마브, 겐시타빈, 스타우로스포린, 빈크리스틴, 이마티니브(글리벡), 게피티니브(이레사), 소라페니브, 다사티니브, 닥티노마이신, 헥사메타멜라민(HMM, 알트레타민), 이포스파미드, 블레오마이신, 메토트렉세이트, 도세탁셀(탁소테르), 빈데신, 비노렐빈, 토포테칸, 암사크린, 시타라빈, 부셀판, 멜팔란, 빈블라스틴, 로부스틴(CCNU), 티오테파, 겐시타빈, 카무스틴(BCNU), 미트록산트론, 미토마이신 C, 프로카바진, 6-머캅토프린, 스렙토조토신, 플루다라빈, 알티트렉세이트(토무텍스), 카페시타빈 및 이의 등가물들을 포함한다.
- [0164] 일부 양태에서, 화학요법은 전신 화학요법이다.
- [0165] 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 바람직하게는 실질적으로 화학요법, 특히 전신 화학요법의 효능을 감소시키지 않는다. 바람직하게는, 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 화학요법의 효능을 향상시킨다.
- [0166] 본 발명의 방법 및 약제학적 조성물은 또한 가는 모발(hair thinning)을 유발할 수 있는 임의의 호르몬 치료 또는 생물학적 치료와 함께 사용될 수 있다.
- [0167] 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학요법제와 함께 공투여된다. 용어 "화학요법제와 공투여되는"은 화학요법제와 실질적으로 동시에 비타민 D의 화합물을 투여함을 포함한다. 예를 들어, 비타민 D 화합물은 화학요법제와 함께 공투여될 수 있고; 비타민 D 화합물을 먼저 투여한 직후에 화학요법제를 투여할 수 있거나, 화학요법제를 먼저 투여한 직후에 비타민 D 화합물을 투여할 수 있다.
- [0168] 몇몇 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 탈모증 발생 전(예를 들면, 모발 손실 전)에 개체에게 투여된다. 특정 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학요법 시작 후, 탈모증 시작 전에 개체에게 투여된다. 기타 양태에서, 개체는 아직 탈모증 증상을 나타내지 않았다(예를 들면, 탈모증은 시작되지 않았다). 비타민 D 화합물은 화학요법 전에 또는 화학요법과 동시에 개체에게 투여될 수 있다.
- [0169] 용어 "치료학적 유효량"은 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는데 필요하거나 충분한 비타민 D 화합물의 양을 포함한다. 유효량은 대상의 크기 및 체중, 질병의 유형 등과 같은 인자에 따라 가변적일 수 있다. 당해 기술 분야의 숙련가는 상기한 인자를 연구할 수 있고, 과도한 실험 없이 비타민 D 화합물의 유효량에 대한 측정을 수행할 수 있다.
- [0170] 본 발명의 비타민 D 화합물은 이를 필요로 하는 개체에게 약 $0.001\mu\text{g}$ 내지 $5\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/ cm^2 에 등가인 용량 용적으로 국소 투여될 수 있다. 특정 양태에서, 범위는 약 $0.01\mu\text{g}$ 내지 $0.5\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/ cm^2 , 또는 약 $0.1\mu\text{g}$ 내지 $0.5\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/ cm^2 이다.

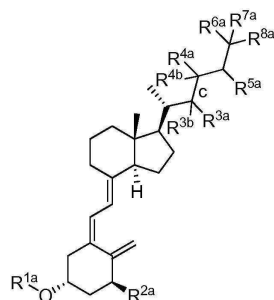
- [0171] 용어 "칼시트리올에 등가인 용량 용적"은 $0.001\mu\text{g}$ 내지 $5\mu\text{g}$ 칼시트리올/ cm^2 로서의 생물학적 및/또는 치료학적 활성과 실질적으로 유사한 생물학적 및/또는 치료학적 활성을 갖는 비타민 D 화합물의 양을 포함한다.
- [0172] 용어 "유효한 농도"는 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는데 필요하거나 충분한 국소 제형 중의 비타민 D 화합물의 농도를 포함한다. 특정 양태에서, 국소 제형 중의 비타민 D 화합물의 농도는 약 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200 또는 $400\mu\text{g/mL}$ 이다.
- [0173] 특정 양태에서, 비타민 D 화합물의 총 용량은 약 0.025 내지 $400\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/75kg 체중에 등가이다. 특정 양태에서, 범위는 약 0.1 내지 $100\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/75kg 체중; 약 0.4 내지 $25\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/75kg 체중; 또는 약 1, 2, 3, 5 또는 $10\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/75kg 체중이다. 특정 양태에서, 총 용량의 하한 범위는 약 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 또는 $2\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/75kg 체중에 등가이다. 특정 양태에서, 총 용량의 상한 범위는 약 400, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2 또는 $1\mu\text{g}$ 의 칼시트리올/75kg 체중에 등가이다.
- [0174] 또다른 국면에서, 본 발명은 개체에게 치료학적 유효량의 비타민 D 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 국소 투여하여 개체에서 탈모증을 예방하거나 치료하는 방법을 제공하고, 상기 비타민 D 화합물은, 개체에게
- [0175] (1) 약 $50\mu\text{g/mL}$ 의 유효한 농도로 국소 투여될 경우, 적어도 약 25일 연속으로 약물 투여 후 독성을 야기하지 않거나,
- [0176] (2) 약 $100\mu\text{g/mL}$ 의 유효한 농도로 국소 투여될 경우, 적어도 약 7일 연속으로 약물 투여 후 독성을 야기하지 않는다.
- [0177] 비타민 D 화합물을 투여함으로써 유도된 가능한 독성 부작용은, 예를 들어, 고칼슘혈증을 포함할 수 있고, 이는 식욕 부진, 골통증, 피로, 구토, 설사, 변비, 폴리우레아, 소양증, 신장 기능 부전, 입안의 금속성 맛, 단백뇨증, 뇨 원주(urinary cast), 질소혈증(azoteri) 또는 전이성 석회화를 포함하는 증상을 갖는다.
- [0178] 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 실질적으로 진피로의 전달/진피에서의 축적을 방지하면서 사람 표피로, 특히 두피 또는 목 영역의 표피로 전달되고/이에 축적되도록 제형화된다. 당해 분야의 숙련가는 실시예 1을 사용하여 진피 및/또는 표피로 전달되고/이에 축적되는 비타민 D 화합물의 양 또는 이의 결여(lack)를 용이하게 결정할 수 있다.
- [0179] 용어 "비타민 D 화합물"은 화학식 I의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들을 포함한다:

[0180] 화학식 I



- [0181]
- [0182] 상기 화학식 I에서,
- [0183] a 및 b는 각각 독립적으로 단일 결합 또는 이중 결합이고;
- [0184] X는, a가 이중 결합일 경우, $-\text{CH}_2$ 이거나, X는, a가 단일 결합일 경우, 수소 또는 하이드록실 치환된 알킬이고;
- [0185] R^1 은 수소, 하이드록실, 알콕실, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 $-\text{NR}'\text{R}''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;
- [0186] R^2 은 수소, 하이드록실, $-\text{O}$ -트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 $-\text{NR}'\text{R}''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;
- [0187] R^3 은, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, b가 단일 결합일 경우, R^3 은, 수소, 하이드록실 또는 알킬이거나, R^3 및 R^1 은 이들이 부착된 탄소원자들과 함께 결합하여 5 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있고;

- [0188] R^4 는, b가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R^4 는, b가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;
- [0189] R^5 는, a가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R^5 는, a가 단일 결합일 경우, 수소, 할로젠 또는 하이드록실이고;
- [0190] R^6 은 1 내지 5개의 하이드록실, 옥소, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 $-NR'R''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클리실, 알킬-O-알킬, 알킬-CO₂-알킬이고;
- [0191] R^7 은 1 내지 3개의 하이드록실, 할로젠, 알콕실, 아릴, 헤테로아릴, 시아노, 니트로 또는 $-NR'R''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;
- [0192] R' 및 R'' 는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 알킬 또는 알콕실이다.
- [0193] 일부 양태에서, R^1 은 하이드록실이고, R^2 는 수소 또는 하이드록실이고, a는 이중 결합이고, R^5 는 부재하고, X는 $-CH_2$ 이고, b는 이중 결합이고, R^3 및 R^4 는 부재하고, R^6 은 알킬(예를 들면, 메틸)이고, R^7 은 알킬(예를 들면, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 예를 들어, 하이드록실 치환된 알킬 또는 사이클로알킬 치환된 알킬, 예를 들어, $-(CH_2)_3CH(CH_3)_2$ 또는 $-(CH_2)_3COH(CH_3)_2$) 또는 알케닐(예를 들면, $-CH=CHCH(CH_3)CH(CH_3)_2$)이다.
- [0194] 특정 양태에서, 비타민 D 화합물은 화학식 II의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염들로 제시된다:
- [0195] 화학식 II



- [0196]
- [0197] 상기 화학식 II에서,
- [0198] c는 단일 결합 또는 이중 결합이고;
- [0199] R^{1a} 는 수소, 트리-알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 $-NR'R''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬이고;
- [0200] R^{2a} 는 수소, 하이드록실, -O-트리알킬 실릴, 또는 1 내지 3개의 할로젠, 하이드록실, 시아노 또는 $-NR'R''$ 잔기로 임의로 치환된 알킬, 알콕실 또는 알케닐이고;
- [0201] R^{3a} 및 R^{4a} 는, c가 이중 결합일 경우, 부재하거나, R^{3a} 및 R^{4a} 는, c가 단일 결합일 경우, 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이고;
- [0202] R^{3b} , R^{4b} , R^{5a} , R^{6a} , R^{7a} 및 R^{8a} 는 각각 독립적으로 수소, 하이드록실, 할로젠, 1 내지 3개의 하이드록실 또는 할로젠 잔기로 임의로 치환된 알콕실 또는 알킬이거나, R^{6a} , R^{7a} 및 R^{8a} 중의 임의의 두 개는 결합하여 3 내지 7원 카보사이클릭 환을 형성할 수 있다.
- [0203] 한 양태에서, 상기 화합물은 R^{1a} , R^{3a} 및 R^{4a} 가 각각 수소인 화학식 II로 제시된다.
- [0204] 또다른 양태에서, 상기 화합물은 c가 단일 결합인 화학식 II로 제시된다.
- [0205] 또다른 양태에서, 상기 화합물은 R^{6a} 및 R^{8a} 가 둘 다 메틸인 화학식 II로 제시된다.
- [0206] 하나의 양태에서, 상기 화합물은 R^{1a} 가 수소인 화학식 II로 제시된다.

[0207] 또다른 양태에서, 상기 화합물은 R^{2a} 가 하이드록실인 화학식 II로 제시된다.

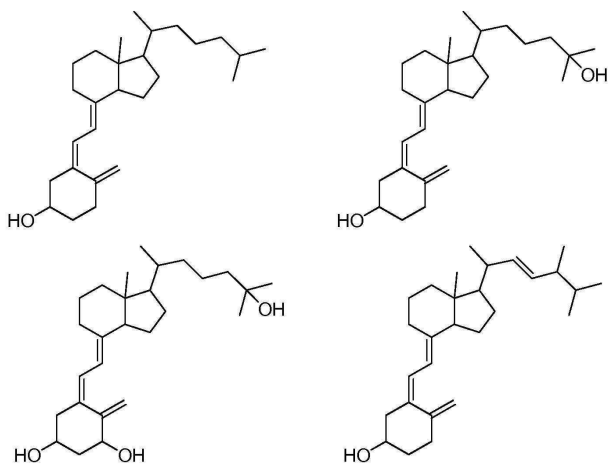
[0208] 또다른 양태에서, 상기 화합물은 R^{7a} 가 하이드록실인 화학식 II로 제시된다.

[0209] 또다른 양태에서, 상기 화합물은 R^{5a} 가 하이드록실인 화학식 II로 제시된다.

[0210] 하나의 양태에서, R^{1a} 는 수소이고, R^{2a} 는 수소 또는 하이드록실이고, c는 단일 결합이고, R^{3a} , R^{3b} , R^{4a} , R^{4b} 및 R^{5a} 는 각각 수소이고, R^{6a} 및 R^{7a} 는 각각 알킬(예를 들면, 메틸)이고, R^{8a} 는 수소 또는 하이드록실이다.

[0211] 또다른 양태에서, R^{1a} 는 수소이고, R^{2a} 는 수소 또는 하이드록실이고, c는 이중 결합이고, R^{3a} 및 R^{4a} 는 부재하고, R^{3b} 및 R^{4b} 는 수소이고, R^{5a} 는 알킬(예를 들면, 메틸)이고, R^{6a} 및 R^{7a} 는 각각 알킬(예를 들면, 메틸)이고, R^{8a} 는 수소 또는 하이드록실이다.

[0212] 하나의 양태에서, 비타민 D 화합물은 다음 구조, 또는 이의 입체이성체들 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염들로부터 선택된다:



[0213]

[0214] 특정 양태에서, 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D3; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D3; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D3, 또는 MC 903이다.

[0215] 기타 양태에서, 비타민 D 화합물은 1,25-디하이드록시비타민 D3; 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤; 1,25-디하이드록시-16-엔-인-콜레칼시페롤; 1 α -하이드록시비타민 D3; 1 α ,24-디하이드록시비타민 D3, 또는 MC 903이 아니다.

[0216] 비타민 D 화합물의 기타 적합한 유사체, 대사산물, 유도체 및/또는 모방체는 예를 들어, 1,25-디하이드록시비타민 D3(칼시트리올로서도 공지됨), 1,25-디하이드록시-16-엔-23-인-콜레칼시페롤, 및 이의 전문 각각이 참고로 인용된 하기 특허들에 기술된 것과 같은 비타민 D 화합물의 기타 비타민 D 유사체, 동족체, 모방체 및 유도체를 포함한다: 미국 특허 제4,391,802호(1 α -하이드록시비타민 D 유도체); 제4,717,721호(콜레스테롤 또는 에르고스테롤 측쇄보다 길이가 더 긴 17개의 측쇄를 갖는 1 α -하이드록시 유도체); 제4,851,401호(사이클로펜타노-비타민 D 유사체); 제4,866,048호 및 제5,145,846호(알키닐, 알케닐, 및 알카닐 측쇄를 갖는 비타민 D3 유사체); 제5,120,722호(트리하이드록시칼시페롤); 제5,547,947호(플루오로-콜레칼시페롤 화합물); 제5,446,035호(메틸 치환된 비타민 D); 제5,411,949호(23-옥사-유도체); 제5,237,110호(19-노르-비타민 D 화합물); 제4,857,518호(하이드록시화된 24-호모-비타민 D 유도체). 기타 적합한 예는 하기를 포함한다: 로칼트롤(ROCALTROL)(로슈 라보라토리즈(Roche Laboratories)); 칼시렉스(CALCIJEX) 주사가능한 칼시트리올; EB 1089 (24a,26a,27a,트리호모-22,24-디엔-1 α ,25-(OH)2-D3, KH 1060 (20-에피-22-옥사-24a,26a,27a-트리호몰라, 25-(OH)2-D3), MC 1288 (1,25-(OH)2-20-에피-D3) 및 MC 903 (칼시포트리올, 1 α ,24s(OH)2-22-엔-26,27-테하이드로-D3)을 포함하는 연구 중인 약물(제조원: 레오 파마슈티칼스(Leo Pharmaceuticals)); 1,25-(OH)2-16-엔-D3, 1,25-(OH)2-16-엔-23-인-D3, 및 25-(OH)2-16-엔-23-인-D3을 포함하는 로슈 파마슈티칼(Roche Pharmaceutical)의 약물; 추가이 파마슈티칼스(Chugai Pharmaceuticals)의 22-옥사칼시트리올(22-옥사-1 α ,25-(OH)2-D3; 1 α -(OH)-D5(제조원: 유니버시티 오브 일리노이스(University of Illinois)); 및 ZK 161422 (20-메틸-1,25-(OH)2-D3) 및 ZK 157202 (20-메틸

-23-엔-1,25-(OH)2-D3)을 포함하는 약물(제조원: 인스티튜트 오브 메디칼 케미스트리-쉐링 아게(Institute of Medical Chemistry-Schering AG)); 1 α -(OH)-D2; 1 α -(OH)-D3, 1 α -(OH)-D4, 25-(OH)-D2; 25-(OH)-D3; 및 25-(OH)-D4. 추가의 예는 1 α ,25-(OH)2-26,27-d6-D3; 1 α ,25-(OH)2-22-엔-D3; 1 α ,25-(OH)2-D3; 1 α ,25-(OH)2-D2; 1 α ,25-(OH)2-D4; 1 α ,24,25-(OH)3-D3; 1 α ,24,25-(OH)3-D2; 1 α ,24,25-(OH)3-D4; 1 α -(OH)-25-FD3; 1 α -(OH)-25-FD4; 1 α -(OH)-25-FD2; 1 α ,24-(OH)2-D4; 1 α ,24-(OH)2-D3; 1 α ,24-(OH)2-D2; 1 α ,24-(OH)2-25-FD4; 1 α ,24-(OH)2-25-FD3; 1 α ,24-(OH)2-25-FD2; 1 α ,25-(OH)2-26,27-F6-22-엔-D3; 1 α ,25(OH)2-26,27-F6-D3; 1 α ,25S-(OH)2-26-F3-D3; 1 α ,25-(OH)2-24-F2-D3; 1 α ,25S,26-(OH)2-22-엔-D3; 1 α ,25R,26-(OH)2-22-엔-D3; 1 α ,25-(OH)2-D2; 1 α ,25-(OH)2-24-에피-D3; 1 α ,25-(OH)2-23-인-D3; 1 α ,25-(OH)2-24R-F-D3; 1 α ,25S,26-(OH)2-D3; 1 α ,24R-(OH)2-25F-D3; 1 α ,25-(OH)2-26,27-F6-23-인-D3; 1 α ,25R-(OH)2-26-F3-D3; 1 α ,25,28-(OH)3-D2; 1 α ,25-(OH)2-16-엔-23-인-D3; 1 α ,24R,25-(OH)3-D3; 1 α ,25-(OH)2-26,27-F6-23-엔-D3; 1 α ,25R-(OH)2-22-엔-26-F3-D3; 1 α ,25S-(OH)2-22-엔-26-F3-D3; 1 α ,25R-(OH)2-D3-26,26,26-d3; 1 α ,25S-(OH)2-D3-26,26,26-d3; 및 1 α ,25R-(OH)2-22-엔-D3-26,26,26-d3을 포함한다. 추가 예는 이의 전문이 본원에 참고로 인용된 미국 특허 제6,521,608호에서 찾을 수 있다. 예를 들어, 이의 전문 각각이 본원에 참조로 인용된 S.S. 특허 제6,503,893호, 제6,482,812호, 제6,441,207호, 제6,410,523호, 제6,399,797호, 제6,392,071호, 제6,376,480호, 제6,372,926호, 제6,372,731호, 제6,359,152호, 제6,329,357호, 제6,326,503호, 제6,310,226호, 제6,288,249호, 제6,281,249호, 제6277,837호, 제6,218,430호, 제6,207,656호, 제6,197,982호, 제6,127,559호, 제6,103,709호, 제6,080,878호, 제6,075,015호, 제6,072,062호, 제6,043,385호, 제6,017,908호, 제6,017,907호, 제6,013,814호, 제5,994,332호, 제5,976,784호, 제5,972,917호, 제5,945,410호, 제5,939,406호, 제5,936,105호, 제5,932,565호, 제5,929,056호, 제5,919,986호, 제5,905,074호, 제5,883,271호, 제5,880,113호, 제5,877,168호, 제5,872,140호, 제5,847,173호, 제5,843,927호, 제5,840,938호, 제5,830,885호, 제5,824,811호, 제5,811,562호, 제5,786,347호, 제5,767,111호, 제5,756,733호, 제5,716,945호, 제5,710,142호, 제5,700,791호, 제5,665,716호, 제5,663,157호, 제5,637,742호, 제5,612,325호, 제5,589,471호, 제5,585,368호, 제5,583,125호, 제5,565,589호, 제5,565,442호, 제5,554,599호, 제5,545,633호, 제5,532,228호, 제5,508,392호, 제5,508,274호, 제5,478,955호, 제5,457,217호, 제5,447,924호, 제5,446,034호, 제5,414,098호, 제5,403,940호, 제5,384,313호, 제5,374,629호, 제5,373,004호, 제5,371,249호, 제5,430,196호, 제5,260,290호, 제5,393,749호, 제5,395,830호, 제5,250,523호, 제5,247,104호, 제5,397,775호, 제5,194,431호, 제5,281,731호, 제5,254,538호, 제5,232,836호, 제5,185,150호, 제5,321,018호, 제5,086,191호, 제5,036,061호, 제5,030,772호, 제5,246,925호, 제4,973,584호, 제5,354,744호, 제4,927,815호, 제4,804,502호, 제4,857,518호, 제4,851,401호, 제4,851,400호, 제4,847,012호, 제4,755,329호, 제4,940,700호, 제4,619,920호, 제4,594,192호, 제4,588,716호, 제4,564,474호, 제4,552,698호, 제4,588,528호, 제4,719,204호, 제4,719,205호, 제4,689,180호, 제4,505,906호, 제4,769,181호, 제4,502,991호, 제4,481,198호, 제4,448,726호, 제4,448,721호, 제4,428,946호, 제4,411,833호, 제4,367,177호, 제4,336,193호, 제4,360,472호, 제4,360,471호, 제4,307,231호, 제4,307,025호, 제4,358,406호, 제4,305,880호, 제4,279,826호 및 제4,248,791호를 참조한다.

- [0217] 이용될 수 있는 또다른 화합물은 비타민 D 모방체, 예를 들어, 각각의 전문이 본원에 참고로 인용된 미국 특허 제6,218,430호 및 WO 공보 제2005/037755호에 의해 개시된 비스-아릴 유도체를 포함한다. 본 발명에 적합한 비-세코스테로이드성(non-secosteroidal) 비타민 D 모방체 화합물의 추가 예는 이들 전문 각각이 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제6,831,106호; 제6,706,725호; 제6,689,922호; 제6,548,715호; 제6,288,249호; 제6,184,422호, 제6,017,907호, 제6,858,595호 및 제6,358,939호에서 찾을 수 있다.
- [0218] 이용될 수 있는 또다른 적합한 비타민 D3 유사체, 대사산물 및/또는 유도체는 이의 전문이 본원에 참고로 인용된 미국 특허 출원 공보 제2006/0177374호에서 확인된 것들을 포함한다.
- [0219] 용어 "비타민 D 유사체"는 구조 및 기능에서 비타민 D와 유사한 화합물을 포함한다. 하나의 양태에서, 비타민 D 유사체는 비타민 D3 유사체(예를 들면, 구조 및 기능에서 비타민 D3와 유사한 화합물)이다.
- [0220] 용어 "비타민 D 대사산물"은 비타민 D의 대사와 연관된 중간체 및 생성물인 화합물을 포함한다. 하나의 양태에서, 비타민 D 대사산물은 비타민 D3 대사산물(예를 들면, 비타민 D3의 대사와 연관된 중간체 또는 생성물인 화합물)이다.
- [0221] 용어 "비타민 D 유도체"는 하나의 원자를 또다른 원자 또는 원자의 그룹으로 대체하여 모 화합물(예를 들면, 비타민 D)로부터 발생될 수 있는 화합물을 포함한다. 하나의 양태에서, 비타민 D 유도체는 비타민 D3 유도체(예

를 들면, 하나의 원자를 또다른 원자 또는 원자의 그룹으로 대체하여 비타민 D3으로부터 발생할 수 있는 화합물)이다.

[0222] 용어 "비타민 D 모방체"는 생물학적 과정에서 비타민 D를 화학적으로 모방할 수 있는 화합물을 포함한다. 하나의 양태에서, 비타민 D 모방체는 비타민 D3 모방체(예를 들면, 생물학적 과정에서 비타민 D3을 화학적으로 모방할 수 있는 화합물)이다.

[0223] 비타민 D3은 어간유 또는 조사 효모(irradiated yeast)의 섭취 후에 흡수된다. 식물 및 동물 공급원은 단지 불활성 비타민 D 전구체, 7-데하이드로콜레스테롤 또는 에르고스테롤을 함유한다. 7-데하이드로콜레스테롤은 피부에 저장되고, 일광에 의해 비타민 D3으로 전환될 수 있다. 그러나, 비타민 D는, 자외선 조사에 의해 피부에 섭취되든지 형성되든지, 활성 대사산물로 변형되어야 한다. 비타민 D3은 간 효소에 의해 25-하이드록시콜레칼시페롤로 전환된다. 이어서, 신장에서, 두 화합물 1,25-디하이드록시콜레칼시페롤 및 24,25-디하이드록시콜레칼시페롤이 형성된다. 비타민 D 활성 대사산물은 장관으로부터의 칼슘의 흡수, 골 침착 및 골 재흡수에 중요한 역할을 한다.

[0224] 본 발명의 비타민 D 화합물은 특정의 공통의 생물학적 활성, 예를 들어, 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEK a)에서 특정의 표적 유전자 발현을 상향 또는 하향 조절하는 능력을 통해 부분적으로 케라티노사이트에서 아포토시스를 예방하는 능력을 공유한다. 따라서, 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은, 예를 들어, 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEK a)에서 등가량의 칼시트리올과 유사하거나 동일한 유전자 조절 프로파일을 나타낼 수 있다.

[0225] 본원에 사용된 "등가량"은 비타민 D 화합물이, 실질적으로 동일한 몰량으로 동일하거나 동등한 생물학적 또는 치료학적 활성을 실질적으로 갖는 경우, 동일 몰량을 포함한다. 그러나, 상이한 비타민 D 화합물이 실질적으로 동일하거나 동등한 생물학적 또는 치료학적 활성이 없는 경우, 용어 "등가량"은 기준 비타민 D 화합물(예를 들면, 칼시트리올)과 비교시 동일한 양의 생물학적 또는 치료학적 활성을 실질적으로 일으키는 비타민 D 화합물을 양을 포함한다.

[0226] 용어 "유전자 조절 프로파일"은 적합한 대조군과 비교시 통계학적으로 유의하게(예를 들면, $p < 0.05$) 조절되는(예를 들면, 상향 또는 하향 조절되는) 유전자의 목록 또는 스펙트럼을 포함한다. 예를 들어, 세포와 비타민 D 화합물을 소정의 시간 동안(예를 들면, 24시간) 접촉시, 표적 세포는, mRNA 또는 단백질 발현 수준이 모조품/비히클-처리 대조군과 비교시 조절되는(예를 들면, 상향 또는 하향 조절되는), 유전자의 스펙트럼을 나타낼 수 있다. 검출시 조절되는(예를 들면, 상향 또는 하향 조절되는) 유전자 목록은 그 특정 순간에 세포의 유전자 발현 프로파일의 스냅샷(snapshot)을 구성한다.

[0227] 용어 "유사한 유전자 조절 프로파일"은 시험된 표적 유전자의 총 수의 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상, 또는 그 이상이 동일한 유전 발현 방향을 실질적으로 나타내는 상황을 포함한다(예를 들어, 각 유전자 중의 상향 또는 하향 조절의 정도 또는 크기가 상이할 수 있지만, 모두 상향 조절되거나 모두 하향 조절됨).

[0228] 용어 "동일한 유전자 조절 프로파일"은 시험된 거의 모든 표적 유전자가 동일한 유전자 발현 방향을 나타내는 상황을 포함한다(예를 들어, 각 유전자 중의 상향 또는 하향 조절의 정도 또는 크기가 상이할 수 있지만, 모두 상향 조절되거나 모두 하향 조절됨).

[0229] 하나의 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은, 발현 수준이 등가량의 기준 비타민 D 화합물(예를 들면, 칼시트리올)에 의해 촉진되는, 하나 이상의 표적 유전자의 발현을 촉진시킨다. 기타 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은, 발현 수준이 등가량의 기준 비타민 D 화합물(예를 들면, 칼시트리올)에 의해 억제되는, 하나 이상의 표적 유전자의 발현을 억제한다.

[0230] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트에서 단백질의 발현을 조절할 수 있다. 용어 "단백질의 발현을 조절한다"는 정상 케라티노사이트에서 단백질의 상향 조절 및 하향 조절을 포함한다. 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 HSPA2, HSF4 mRNA, HSPB1 또는 DNAJC6 mRNA의 발현을 조절한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEK a)에서 HSPA2 또는 HSF4 mRNA의 발현을 상향 조절하고/하거나, HSPB1 또는 DNAJC6 mRNA의 발현을 하향 조절한다.

[0231] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트에서 SLC1A1, KCNB2, KCNN4 단백질 또는 SLC1A3 단백질의 발현을 조절한다. 일부 양태에서, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEK a)에서 SLC1A1, KCNB2, 또는 KCNN4 단백질의 발현을 상향 조절하고/하거나 SLC1A3 단백질의 발현을 하향

조절한다.

- [0232] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 표 3-1 및 표 3-2 중의 하나 이상의 단백질을 조절할 수 있다. 예를 들어, 하나의 양태에서, 비타민 D 화합물은, 예를 들어, 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEKa)에서 표 3-1 중의 하나 이상의 단백질의 발현을 적어도 약 2배 상향 조절하고/하거나 표 3-2 중의 하나 이상의 단백질의 발현을 적어도 약 2배 하향 조절할 수 있다.
- [0233] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEKa)를 비타민 D 화합물에 약 24시간 노출 후, 표 3-3, 3-4, 3-5 또는 3-6 중의 어느 것의 하나 이상의 단백질의 과발현을 유도할 수 있다.
- [0234] 특정 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEKa)에서 GST, 케라틴 1, 케라틴 17, 갈렉틴 1, S100 A9(칼프로텍틴), 또는 S100 A13 중의 하나 이상의 과발현을 야기할 수 있다.
- [0235] 본원에서 사용된 용어 "알킬"은 1 내지 20개의 탄소원자, 예를 들어, 1 내지 7개의 탄소원자 또는 1 내지 4개의 탄소원자를 포함하는 완전히 포화된 분지되거나 비분지된(예를 들면, 직쇄 또는 선형) 탄화수소 잔기를 포함한다. 알킬 잔기의 대표적인 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, 2급-부틸, 이소-부틸, 3급-부틸, n-펜틸, 이소펜틸, 네오펀틸, n-헥실, 3-메틸헥실, 2,2-디메틸펜틸, 2,3-디메틸펜틸, n-헵틸을 포함한다.
- [0236] 또한, 용어 "알킬"은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 모두를 포함한다. 알킬 잔기에 대한 치환기의 대표적인 예는 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 할로젠 또는 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노를 포함함)이다.
- [0237] 본원에서 사용된 용어 "알콕시"는 알킬-O-을 포함하고, 여기서, 알킬은 상기 정의된 바와 같다. 알콕시 잔기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 2-프로폭시, 부톡시, 3급-부톡시, 펜틸옥시, 헥실옥시, 사이클로프로필옥시-, 사이클로헥실옥시- 등을 포함한다. 일부 양태에서, 알콕시 그룹은 약 1 내지 7개의 탄소, 예를 들어, 1 내지 4개의 탄소를 갖는다. 용어 알콕시는 치환된 알콕시를 포함한다. 치환된 알콕시 그룹의 예는 할로겐화된 알콕시 그룹을 포함한다. 할로젠 치환된 알콕시 그룹의 예는 플루오로메톡시, 디플루오로메톡시, 트리플루오로메톡시, 클로로메톡시, 디클로로메톡시, 및 트리클로로메톡시이다.
- [0238] 용어 "알콕시알킬"은 상기 정의된 바와 같은 알킬 그룹을 포함하고, 여기서, 알킬 그룹은 알콕시로 치환된다. 더욱이, 용어 "알콕시알킬"은 "비치환된 알콕시알킬" 및 "치환된 알콕시알킬" 모두를 포함한다. 알콕시알킬 잔기에 대한 치환기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 할로젠 또는 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노를 포함함)를 포함한다.
- [0239] 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 분지되거나 비분지된 탄화수소를 포함한다. 알케닐 잔기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 비닐, 프로프-1-에닐, 알릴, 부테닐, 이소프로페닐 또는 이소부테닐을 포함한다. 더욱이, 용어 "알케닐"은 "비치환된 알케닐" 및 "치환된 알케닐" 모두를 포함한다. 알케닐 잔기에 대한 치환기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 할로젠 또는 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노를 포함함)를 포함한다.
- [0240] 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 갖는 분지되거나 비분지된 탄화수소를 포함한다. 알키닐 잔기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 에티닐, 프로프-1-이닐(프로파길), 부티닐, 이소프로피닐 또는 이소부티닐을 포함한다. 더욱이, 용어 "알키닐"은 "비치환된 알키닐" 및 "치환된 알키닐" 모두를 포함한다. 알키닐 잔기에 대한 치환기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 할로젠 또는 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노를 포함함)를 포함한다.
- [0241] 본원에서 사용된 용어 "사이클로알킬"은 3 내지 12개의 탄소 원자, 예를 들어, 3 내지 8개, 또는 3 내지 7개의 탄소원자의 포화 또는 불포화 모노사이클릭, 바이사이클릭 또는 트리사이클릭 탄화수소 그룹을 포함한다. 예시적인 모노사이클릭 탄화수소 그룹은, 예를 들어, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥테닐, 사이클로헥실 및 사이클로헥세닐을 포함한다. 예시적인 바이사이클릭 탄화수소 그룹은, 예를 들어, 보르닐, 인딜, 헥사하이드로인딜, 테트라하이드로나프틸, 데카하이드로나프틸, 바이사이클로[2.1.1]헥실, 바이사이클로[2.2.1]헵틸, 바이사이클로[2.2.1]헵테닐, 6,6-디메틸바이사이클로[3.1.1]헵틸, 및 2,6,6-트리메틸바이사이클로[3.1.1]헵틸, 바이사이클로[2.2.2]옥틸을 포함한다. 트리사이클릭 탄화수소 그룹의 예는, 예를 들

어, 아다만틸을 포함한다.

[0242] 용어 "사이클로알킬"은 "비치환된 사이클로알킬" 및 "치환된 사이클로알킬" 모두를 포함한다. 사이클로알킬 잔기에 대한 치환기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 할로젠 또는 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노를 포함함)를 포함한다.

[0243] 용어 "아릴"은 환 부분에 6 내지 20개의 탄소원자를 갖는 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 방향족 탄화수소 그룹을 포함한다. 아릴 잔기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 페닐, 나프틸, 안트라실, 펜안트릴 또는 테트라하이드로나프틸을 포함한다. 더욱이, 용어 아릴은 "비치환된 아릴" 및 "치환된 아릴" 모두를 포함한다. 아릴 잔기에 대한 치환기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 하이드록시, 할로젠, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 할로젠 또는 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노를 포함함)를 포함한다.

[0244] 용어 "헤테로아릴"은 탄소 원자 및 O, N 또는 S로부터 선택된 1 내지 5개의 헤테로원자로부터 선택된 5 내지 10개의 환 원을 함유하는 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 헤테로아릴 잔기를 포함한다. 헤테로아릴 그룹의 예는, 이에 제한되지 않지만, 티에닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 옥사-2,3-디아졸릴, 옥사-2,4-디아졸릴, 옥사-2,5-디아졸릴, 옥사-3,4-디아졸릴, 티아-2,3-디아졸릴, 티아-2,4-디아졸릴, 티아-2,5-디아졸릴, 티아-3,4-디아졸릴, 3-, 4- 또는 5-이소티아졸릴, 2-, 4- 또는 5-옥사졸릴, 3-, 4- 또는 5-이속사졸릴, 3- 또는 5-1,2,4-트리아졸릴, 4- 또는 5-1,2,3-트리아졸릴, 테트라졸릴, 2-, 3- 또는 4-피리디닐, 3- 또는 4-피리다지닐, 3-, 4- 또는 5-피라지닐, 2-피라지닐, 2-, 4- 또는 5-피리미디닐을 포함한다. 헤테로아릴 그룹은 모노-, 바이-, 트리- 또는 폴리사이클릭일 수 있다.

[0245] 용어 "헤테로아릴"은 헤테로방향족 환이 하나 이상의 아릴, 지환족 또는 헤테로사이클릴 환에 융합된 그룹을 추가로 포함하고, 여기서, 부착 라디칼 또는 부착점은 헤테로방향족 환 상 또는 융합된 아릴 환 상이다. 이러한 헤테로아릴 잔기의 대표적인 예는, 이에 제한되지 않지만, 인돌릴, 이소인돌릴, 인다졸릴, 인돌리지닐, 푸리닐, 퀴놀리지닐, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 신놀리닐, 프탈라지닐, 나프티리디닐, 퀴나졸리닐, 퀴낙살리닐, 페난트리디닐, 페나트롤리닐, 페나지닐, 페노티아지닐, 페녹사지닐, 벤즈이소퀴놀리닐, 티에노[2,3-b]푸라닐, 푸로[3,2-b]-피라닐, 5H-피리도[2,3-d]-o-옥사지닐, 1H-피라졸로[4,3-d]-옥사졸릴, 4H-이미다조[4,5-d] 티아졸릴, 피라지노[2,3-d]피리다지닐, 이미다조[2,1-b] 티아졸릴, 이미다조[1,2-b][1,2,4]트리아지닐, 7-벤조[b]티에닐, 벤족사졸릴, 벤즈이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤족사피닐, 벤족사지닐, 1H-피롤로[1,2-b][2]벤즈아자피닐, 벤조푸릴, 벤조티오펜, 벤조트리아졸릴, 피롤로[2,3-b]피리디닐, 피롤로[3,2-c]피리디닐, 피롤로[3,2-b]피리디닐, 이미다조[4,5-b]피리디닐, 이미다조[4,5-c]피리디닐, 피라졸로[4,3-d]피리디닐, 피라졸로[4,3-c]피리디닐, 피라졸로[3,4-c]피리디닐, 피라졸로[3,4-d]피리디닐, 피라졸로[3,4-b]피리디닐, 이미다조[1,2-a]피리디닐, 피라졸로[1,5-a]피리디닐, 피롤로[1,2-b]피리다지닐, 이미다조[1,2-c]피리미디닐, 피리도[3,2-d]피리미디닐, 피리도[4,3-d]피리미디닐, 피리도[3,4-d]피리미디닐, 피리도[2,3-d]피리미디닐, 피리도[2,3-b]피라지닐, 피리도[3,4-b]피라지닐, 피리미도[5,4-d]피리미디닐, 피라지노[2,3-b]피라지닐, 또는 피리미도[4,5-d]피리미디닐을 포함한다. 더욱이, 용어 "헤테로아릴"은 "비치환된 헤테로아릴" 및 "치환된 헤테로아릴" 모두를 포함한다.

[0246] "아릴" 또는 "헤테로아릴" 그룹의 방향족 환은 비치환되거나, 예를 들어, 할로젠, 하이드록시, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 알콕시, 사이클로알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 아릴옥시, 헤테로아릴옥시, 헤테로사이클릴옥시, 아릴알킬옥시, 헤테로아릴알킬옥시, 헤테로사이클릴알킬옥시, 케톤(알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐, 알케닐카보닐, 알키닐카보닐, 아로일, 아릴알킬카보닐, 헤테로아릴카보닐, 헤테로사이클릴카보닐을 포함함), 에스테르(알콕시카보닐, 사이클로알킬옥시카보닐, 아릴옥시카보닐, 헤테로아릴옥시카보닐, 헤테로사이클릴옥시카보닐, 알킬카보닐옥시, 사이클로알킬카보닐옥시, 아릴카보닐옥시, 헤테로아릴카보닐옥시, 헤테로사이클릴카보닐옥시를 포함함), 카보네이트(알콕시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 헤테로아릴옥시카보닐옥시를 포함함), 카바메이트(알콕시카복실아미노, 아릴옥시카보닐아미노, 알케닐옥시카보닐아미노, 알키닐옥시카보닐아미노, 아릴옥시카보닐아미노, 아미노카보닐옥시, 알킬아미노카보닐옥시, 디-알킬아미노카보닐옥시, 아릴아미노카보닐옥시를 포함함), 카바모일(알킬아미노카보닐, 디-알킬아미노카보닐, 아릴아미노카보닐, 아릴알킬아미노카보닐, 알케닐아미노카보닐을 포함함), 아미도(알킬카보닐아미노, 알킬카보닐알킬아미노, 아릴카보닐아미노, 헤테로아릴카보닐아미노를 포함함), 아릴알킬, 헤테로아릴알킬, 헤테로사이클로알킬, 아미노(알킬아미노, 디-알킬아미노, 아릴아미노, 디-아릴아미노, 및 알킬아릴아미노를 포함함), 설포닐(알킬설포닐, 아릴설포닐, 아릴알킬설포닐, 헤테로아릴설포닐, 알콕시설포닐, 아릴옥시설포닐, 헤테

로아릴옥시설펀, 사이클로알킬설펀, 헤테로사이클릴설펀을 포함함), 설파모일, 설펀아미도, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 티오에테르(알킬티오, 아릴티오, 헤테로아릴티오를 포함함), 우레이도, 이미노, 아미디노, 티오카복실(알킬티오카보닐, 아릴티오카보닐을 포함함), 설피닐(알킬설피닐, 아릴설피닐을 포함함), 카복실을 포함하는 치환기로 하나 이상의 환 위치에서 치환될 수 있고, 여기서, 각각의 상기 탄화수소 그룹은 하나 이상의 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 할로젠, 하이드록시 또는 알콕시 그룹으로 임의로 치환될 수 있다.

[0247] 본원에서 사용된 용어 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클로"는 비치환 또는 치환된, 포화 또는 불포화 비-방향족 환 또는 환 시스템을 포함하고, 예를 들어, 이는 4-, 5-, 6- 또는 7원 모노사이클릭, 7-, 8-, 9-, 10-, 11- 또는 12원 바이사이클릭 또는 10-, 11-, 12-, 13-, 14- 또는 15원 트리사이클릭 환 시스템이고, O, S 및 N 으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하고, 여기서, N 및 S는 또한 다양한 산화 상태로 임의로 산화될 수 있다. 하나의 양태에서, 헤테로사이클릴 잔기는 5 내지 7개의 환 원자를 함유하고 O, S 또는 N 으로부터 선택된 추가의 헤테로원자를 임의로 함유하는 포화된 모노사이클릭 환을 나타낸다. 헤테로사이클릭 그룹은 헤테로원자 또는 탄소 원자에 부착될 수 있다. 헤테로사이클릴은 융합되거나 브릿지된 환 뿐만 아니라 스피로 사이클릭 환을 포함할 수 있다. 헤테로사이클릴 잔기의 예는, 예를 들어, 디하이드로푸라닐, 디옥솔라닐, 디옥사닐, 디티아닐, 피페라지닐, 피롤리딘, 디하이드로피라닐, 옥사티올라닐, 디티올란, 옥사티아닐, 티오모르폴리노, 옥시라닐, 아지리디닐, 옥세타닐, 옥세파닐, 아제티디닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로티오펀, 피롤리디닐, 테트라하이드로피라닐, 피페리디닐, 모르폴리노, 피페라지닐, 아제피닐, 옥사피닐, 옥사아제파닐, 옥사티아닐, 티에파닐, 아제파닐, 디옥세파닐 및 디아제파닐을 포함한다.

[0248] 용어 "헤테로사이클릴"은 1, 2 또는 3개의 치환기, 예를 들어, =O, =S, 할로젠, 하이드록시, 시아노, 니트로, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릴, 알콕시, 사이클로알킬옥시, 알케닐옥시, 알키닐옥시, 아릴옥시, 헤테로아릴옥시, 헤테로사이클릴옥시, 아릴알킬옥시, 헤테로아릴알킬옥시, 헤테로사이클릴알킬옥시, 케톤(알킬카보닐, 사이클로알킬카보닐, 알케닐카보닐, 알키닐카보닐, 아로일, 아릴알킬카보닐, 헤테로아릴카보닐, 헤테로사이클릴카보닐을 포함함), 에스테르(알콕시카보닐, 사이클로알킬옥시카보닐, 아릴옥시카보닐, 헤테로아릴옥시카보닐, 헤테로사이클릴옥시카보닐, 알킬카보닐옥시, 사이클로알킬카보닐옥시, 아릴카보닐옥시, 헤테로아릴카보닐옥시, 헤테로사이클릴카보닐옥시를 포함함), 카보네이트(알콕시카보닐옥시, 아릴옥시카보닐옥시, 헤테로아릴옥시카보닐옥시를 포함함), 카바메이트(알콕시카복실아미노, 아릴옥시카보닐아미노, 알케닐옥시카보닐아미노, 알키닐옥시카보닐아미노, 아릴옥시카보닐아미노, 아미노카보닐옥시, 알킬아미노카보닐옥시, 디알킬아미노카보닐옥시, 아릴아미노카보닐옥시를 포함함), 카바모일(알킬아미노카보닐, 디알킬아미노카보닐, 아릴아미노카보닐, 아릴알킬아미노카보닐, 알케닐아미노카보닐을 포함함), 아미도(알킬카보닐아미노, 알킬카보닐알킬아미노, 아릴카보닐아미노, 헤테로아릴카보닐아미노를 포함함), 아릴알킬, 헤테로아릴알킬, 헤테로사이클릴알킬, 아미노(알킬아미노, 디알킬아미노, 아릴아미노, 디아릴아미노, 및 알킬아릴아미노를 포함함), 설펀(알킬설펀, 아릴설펀, 아릴알킬설펀, 헤테로아릴설펀, 알콕시설펀, 아릴옥시설펀, 헤테로아릴옥시설펀, 사이클로알킬설펀, 헤테로사이클릴설펀을 포함함), 설파모일, 설펀아미도, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 티오에테르(알킬티오, 아릴티오, 헤테로아릴티오를 포함함), 우레이도, 이미노, 아미디노, 티오카복실(알킬티오카보닐, 아릴티오카보닐), 설피닐(알킬설피닐, 아릴설피닐을 포함함), 카복실로 치환될 수 있는 본원에서 정의된 바와 같은 헤테로사이클릭 그룹을 포함하고, 여기서, 각각의 상기 탄화수소 그룹은 하나 이상의 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 할로젠, 하이드록시 또는 알콕시 그룹으로 임의로 치환될 수 있다.

[0249] 용어 "헤테로사이클릴알킬"은 헤테로사이클릴로 치환된 알킬이다. 용어는 비치환된 및, 하나 이상의 알킬, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 할로젠, 하이드록시 또는 알콕시 그룹으로 치환될 수 있는 치환된 헤테로사이클릴 알킬 잔기를 포함한다.

[0250] 용어 "카보닐" 또는 "카복시"는 산소 원자에 이중결합으로 연결된 탄소(C=O)를 함유하는 화합물 및 잔기를 포함한다. 카보닐은, 본 발명의 화합물이 이의 의도된 기능을 수행하도록 하는 임의의 잔기로 추가로 치환될 수 있다. 예를 들어, 카보닐 잔기는 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 알콕시, 아미노 등으로 치환될 수 있다. 카보닐을 함유하는 잔기의 예는 알데히드, 케톤, 카복실산, 아미드, 에스테르, 우레아, 무수물 등을 포함한다.

[0251] 용어 "하이드록시" 또는 "하이드록실"은 -OH 또는 -O⁻를 갖는 그룹을 포함한다.

[0252] 용어 "할로젠"은 불소, 브롬, 염소, 요오드 등을 포함한다.

- [0253] 용어 "과할로겐화된"은 모든 수소가 할로젠 원자로 대체된 잔기를 포함한다.
- [0254] 본 발명의 비타민 D 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염들, 용매화물들 또는 프로드럭들은 하나 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있고, 따라서 에난티오머, 부분입체이성체, 및 절대 입체화학의 관점에서, (R)- 또는 (S)- 또는, 아미노산에 대해 (D)- 또는 (L)-로서 정의될 수 있는 다른 입체이성체 형태를 생성할 수 있다. 본 발명은 모든 이러한 가능한 이성체, 뿐만 아니라 이의 라세미 및 광학적으로 순수한 형태를 포함하는 것을 의미한다. 광학적 활성 (+) 및 (-), (R)- 및 (S)-, 또는 (D)- 및 (L)-이성체는 키랄 합성 단위체(synthon) 또는 키랄 시약을 사용하여 제조될 수 있고, 또는 종래 기술, 예를 들어, 키랄 칼럼을 사용하는 HPLC를 사용하여 분할될 수 있다. 본원에 기재된 화합물이 올레핀성 이중 결합 또는 기하학적 비대칭의 다른 중심을 함유할 경우, 달리 특정되지 않는 한, 화합물은 E 및 Z 기하 이성체 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, 모든 호변이성체 형태도 또한 포함되는 것으로 의도된다.
- [0255] 용어 "입체이성체"는 동일한 결합에 의해 결합된 동일 원자로 구성되지만 상호교환가능하지 않는 상이한 3차원 구조를 갖는 화합물을 포함한다. 본 발명은 다양한 입체이성체 및 이들의 혼합물을 고려하고, 분자가 서로 포개질 수 없는 거울상인 서로 다른 2개의 입체이성체를 의미하는 에난티오머를 포함한다.
- [0256] 본 발명은 모든 약제학적으로 허용가능한 동위원소-표지된 비타민 D 화합물을 포함하고, 여기서, 하나 이상의 원자는 동일한 원자 수를 갖지만 자연에서 통상 발견된 원자량 또는 질량 수와 상이한 원자량 또는 질량 수를 갖는 원자로 대체된다.
- [0257] 본 발명의 화합물 내에 포함하기에 적당한 동위원소의 예는 수소의 동위원소, 예를 들어, ^2H 및 ^3H , 탄소의 동위원소, 예를 들어, ^{11}C , ^{13}C 및 ^{14}C , 염소의 동위원소, 예를 들어, ^{36}Cl , 불소의 동위원소, 예를 들어, ^{18}F , 요오드의 동위원소, 예를 들어, ^{123}I 및 ^{125}I , 질소의 동위원소, 예를 들어, ^{13}N 및 ^{15}N , 산소의 동위원소, 예를 들어, ^{15}O , ^{17}O 및 ^{18}O , 인의 동위원소, 예를 들어, ^{32}P , 및 황의 동위원소, 예를 들어, ^{35}S 를 포함한다. 더 무거운 동위원소, 예를 들어, 중수소, 즉 ^2H 에 의한 치환은 더 큰 대사 안정성, 예를 들어, 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 용량 요건으로부터 기인하는 특성의 치료 이점을 부여할 수 있다. 동위원소-표지된 비타민 D 화합물은 일반적으로 당업자에게 공지된 종래 기술에 의해 이전에 사용된 비-표지된 시약 대신에 적절한 동위원소-표지된 시약을 사용하여 제조할 수 있다.
- [0258] 용어 "프로드럭"은 생리학적 조건하에서 또는 가용매분해에 의해 본 발명의 생물학적 활성 화합물로 전환될 수 있는 화합물을 포함한다. 따라서, 용어 "프로드럭"은 약제학적으로 허용되는 본 발명의 화합물의 대사 전구체를 의미한다. 프로드럭은, 이를 필요로 하는 대상에게 투여될 때 불활성일 수 있지만, 생체내에서 본 발명의 활성 화합물로 전환된다. 프로드럭은 전형적으로 생체내에서 신속히 전환되어, 예를 들어, 혈액에서의 가수분해 또는 소화관 또는 간에서의 전환에 의해 본 발명의 모 화합물을 수득한다. 프로드럭 화합물은 종종 포유동물 유기체에 용해도, 조직 적합성 또는 지연 방출의 이점을 제공한다(참조: Bundgard, H., Design of Prodrugs (1985), pp. 7-9, 21-24 (Elsevier, Amsterdam)).
- [0259] 프로드럭의 논의는 문헌(참조: Higuchi, T., et al., "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, Vol. 14, and in Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, Anglican Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987)에 제공된다.
- [0260] "약제학적으로 허용가능한 염"은 산 및 염기 부가 염 모두를 포함한다. "약제학적으로 허용가능한 산 부가 염"은 유리 염기의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하고, 생물학적으로 또는 그외에도 바람직하고, 무기 산, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등, 및 유기 산, 예를 들어, 이에 제한되지 않지만, 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 캄포르산, 캄포르-10-설폰산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 카본산, 신남산, 시트르산, 사이클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 젠티스산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루쿠론산, 글루탐산, 글루타르산, 2-옥소-글루타르산, 글리세로인산, 글리콜산, 히프르산, 이소부티르산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설폰산, 무크산, 나프탈렌-1,5-디설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 1-하이드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 프로피온산, 피로글루탐산, 피루브산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 세박산, 스테아르산, 석신산, 타르타르산, 티오시안산, p-톨루엔설폰산, 트리플루오로아세트산, 운데실렌산 등과 형성되는 염들을 의미한다.

- [0261] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염기 부가 염"은 유리 산의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하고, 생물학적으로 또는 그외에도 바람직한 염들을 포함한다. 이들 염은 무기 염기 또는 유기 염기를 유리 산에 첨가하여 제조된다. 무기 염기로부터 유도된 염은, 이에 제한되지 않지만, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 구리, 망간, 알루미늄 염 등을 포함한다. 바람직한 무기 염은 암모늄, 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 마그네슘 염이다. 유기 염기로부터 유도된 염은, 이에 제한되지 않지만, 1급, 2급 및 3급 아민, 천연 치환된 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지를 포함하는 치환된 아민, 예를 들어, 암모니아, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 디에탄올아민, 에탄올아민, 데아놀, 2-디메틸아미노에탄올, 2-디에틸아미노에탄올, 디사이클로헥실아민, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인, 하이드라바민, 콜린, 베타인, 벤에타민, 벤자틴, 에틸렌디아민, 글루코사민, 메틸글루카민, 테오브로민, 트리에탄올아민, 트로메타민, 퓨린, 피페라진, 피페리딘, N-에틸피페리딘, 폴리아민 수지 등의 염을 포함한다.
- [0262] 결정화는 종종 본 발명의 화합물의 용매화물을 생성한다. 본원에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명의 화합물의 하나 이상의 분자를 용매의 하나 이상의 분자와 함께 포함하는 응집물을 의미한다. 용매는 물일 수 있고, 이 경우에, 용매화물은 수화물일 수 있다. 또는, 용매는 유기 용매일 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 일수화물, 이수화물, 반수화물, 세스퀴수화물, 삼수화물, 사수화물 등을 포함하는 수화물 뿐만 아니라, 상응하는 용매화된 형태로서 존재할 수 있다. 본 발명의 화합물은 진정한 용매화물일 수 있고, 한편, 다른 경우에, 본 발명의 화합물은 단지 우발적인 물을 보유하거나, 물 + 특정 우발적인 용매의 혼합물일 수 있다.
- [0263] 용어 "약제학적 조성물"은 비타민 D 화합물을 개체에게 전달하기 위한, 본 발명의 화합물(예를 들면, 비타민 D 화합물) 및 본 기술분야에서 일반적으로 허용되는 매질의 제형을 포함한다. 이러한 매질은 이의 모든 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.
- [0264] 일부 양태에서, 본 발명의 조성물은 임의의 상피 표면에 국소적으로 투여될 수 있다. "상피 표면"은, 신체의 외부 표면을 덮고, 또는 비제한적으로, 피부 및 점막 표면을 포함하는 중공 구조를 정렬시킨 조직의 면적을 포함한다. 이와 같은 상피 표면은 경구, 인두, 식도, 폐, 눈, 귀, 코, 구강, 혀, 질, 경부, 비뇨생식기, 소화기 및 항문직장 표면을 포함한다.
- [0265] 조성물은 국소 투여에 사용되는 다양한 종래 형태로 제형화될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 반-고체 및 액체 용량형, 예를 들어, 액체 용액 또는 현탁액, 겔, 크림, 에멀전, 로션, 슬러리, 파우더, 스프레이, 폼(foam), 페이스트, 연고, 고약, 밤(balm) 또는 점적제를 포함한다.
- [0266] 국소 적용용으로 통상적으로 사용되는 담체는 펙틴, 젤라틴 및 이의 유도체, 폴리락트산 또는 폴리글리콜산 중합체 또는 이의 공중합체, 셀룰로스 유도체, 예를 들어, 메틸 셀룰로스, 카복시메틸 셀룰로스, 또는 산화된 셀룰로스, 구아 검, 아카시아 검, 카라야 검, 트라가칸트 검, 벤토나이트, 한천, 카보머, 블래더랙(bladderwrack), 세라토니아(ceratonia), 텍스트란 및 이의 유도체, 가티 검, 헥토라이트, 차전자피(ispaghula husk), 폴리비닐피롤리돈, 실리카 및 이의 유도체, 크산탄 검, 카올린, 탈크, 전분 및 이의 유도체, 파라핀, 물, 식물성 및 동물성 오일, 폴리에틸렌, 폴리에틸렌 옥사이드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 글리세롤, 에탄올, 프로판올, 프로필렌 글리콜(글리콜, 알콜), 고정유, 나트륨, 칼륨, 알루미늄, 마그네슘 또는 칼슘 염(예를 들면, 클로라이드, 카보네이트, 비카보네이트, 시트레이트, 글루코네이트, 락테이트, 아세테이트, 글루세이트 또는 타르트레이트)을 포함한다.
- [0267] 국소용 제제에 대한 표준 조성물 전략은 약물의 지속성 및 체류 시간을 향상시키고 달성된 예방적 효능을 향상시키기 위해 비타민 D 화합물에 적용될 수 있다.
- [0268] 국소 경피 패치가 또한 사용될 수 있다. 경피 패치는 본 발명의 조성물의 신체에의 조절 전달을 제공하는 추가 이점을 갖는다. 이러한 용량형은 적당한 매질에 제제를 용해시키거나 분산시켜 제조할 수 있다.
- [0269] 파우더 및 스프레이는 비타민 D 화합물 이외에, 담체, 예를 들어, 락토스, 탈크, 수산화알루미늄, 규산칼슘 및 폴리아미드 파우더, 또는 이들 물질의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 종래의 추진제, 예를 들어, 클로로플루오로하이드로카본 및 휘발성 비치환된 탄화수소, 예를 들어, 부탄 및 프로판올 추가로 함유할 수 있다.
- [0270] 통상, 수성 에어로졸은 종래의 약제학적으로 허용되는 담체 및 안정화제와 함께 비타민 D 화합물의 수용액 또는 현탁액을 제형화하여 제조된다. 담체 및 안정화제는 특정 화합물의 요건에 따라 다양하지만, 전형적으로 비이온성 계면활성제(예를 들면, Tweens, Pluronic, 폴리에틸렌 글리콜 등), 혈청 알부민과 같은 단백질, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예를 들어, 글리신, 완충제, 염, 당 또는 당 알콜을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액으로부터 제조된다. 본 발명의 에어로졸 또는 임의의 다른 전달 수단의 생성은 본

기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 에어로졸 전달의 경우에, 당해 화합물은 추진제를 갖는 임의의 적당한 담체와 함께 미분된 형태로 공급된다.

- [0271] 액화된 추진제는 전형적으로 주위 조건하에서 가스이고, 압력하에서 압축된다. 추진제는 프로판 및 부탄, 또는 다른 저급 알칸, 예를 들어, 탄소 5개 이하의 것들을 포함하여 임의로 허용가능하고 본 기술분야에 공지될 수 있다. 조성물은 적당한 추진제 및 밸브를 갖는 용기 내에 보유되고, 밸브의 작용으로 방출될 때까지 고압에서 유지시킨다.
- [0272] 하나의 양태에서, 비타민 D 화합물은 예방적으로 투여될 수 있다. 예방적 적용을 위해, 비타민 D 화합물은 잠재적인 탈모증 전에 적용될 수 있다. 적용 시점은 비타민 D 화합물의 예방적 유효성을 최대화하기 위해 최적화할 수 있다. 적용 시점은 조성물의 투여 방식, 용량, 안정성 및 유효성, 투약 빈도, 예를 들어, 단일 적용 또는 다중 복용에 따라 다양할 것이다. 당업자는 비타민 D 화합물의 예방적 유효성을 최대화하기 위해 필요한 가장 적절한 시간 간격을 결정할 수 있다.
- [0273] 비타민 D 화합물은 조성물 내에 존재할 때, 일반적으로, 총 중량의 약 0.000001% 내지 약 100%, 더 바람직하게는 약 0.001% 내지 약 50%, 가장 바람직하게는 약 0.01% 내지 약 25%의 양으로 존재할 것이다.
- [0274] 담체를 포함하는 본 발명의 조성물에 대해, 상기 조성물은 하나 이상의 담체를, 예를 들어, 약 1 내지 약 99중량%, 바람직하게는 약 50 내지 약 99중량%, 가장 바람직하게는 약 75 내지 약 99중량% 포함한다.
- [0275] 또한, 본 발명의 조성물의 별개의 성분은 미리 블렌딩될 수 있거나, 각각의 성분은 치료 성분의 목적하는 농도 수준을 달성하기 위해 그리고 성분이 궁극적으로 서로 긴밀하게 혼합되는 한, 소정 용량에 따라 동일한 환경에 별개로 첨가될 수 있다. 또한, 본 발명은 연속 또는 간헐적 기준으로 투여되거나 전달될 수 있다.
- [0276] 하나의 양태에서, 제형은 비타민 D 활성 성분을 포함하고, 임의로 기타 소량의 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제, 예를 들어, 약 0.4%(w/v)의 포스폴리폰 90G와 함께 약 40%(w/w) 프로필렌 글리콜 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, US)로 제형화된다. 또다른 양태에서, 제형은 비타민 D 활성 성분을 포함하고, 임의로 기타 소량의 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체 또는 희석제, 예를 들어, 약 0.4%(w/v)의 포스폴리폰 90G와 함께 약 30%(w/w) 프로필렌 글리콜, 약 10%(w/v) 에톡시디글리콜 또는 트랜스쿠톨 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, US)로 제형화된다. 일부 양태에서, 에탄올은 무수의 순수 200 proof (U.S.) 비변성 에탄올(USP)이다. 본원에 기술된 제형은 어느 정도 수준의 활성 비타민 D 화합물의 진피 침투 및 전달 수준을 제공하고, 탈모증을 예방하거나 탈모증, 특히 화학요법-유도된 탈모증(CIA)의 중증도를 감소시키기 위한 유효 수단을 제공한다.
- [0277] 특정 양태에서, 약제학적 조성물은 약 40%(w/w) 프로필렌 글리콜(USP 등급) 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, US), 비변성된 USP를 포함한다.
- [0278] 일부 양태에서, 약제학적 조성물은 약 40%(w/w) 프로필렌 글리콜(예를 들면, USP 등급 또는 보다 우수한 등급), 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, US)(비변성)(예를 들면, USP 등급 또는 보다 우수한 등급)을 포함한다.
- [0279] 기타 양태에서, 약제학적 조성물은 약 30%(w/w) 프로필렌 글리콜, 약 10%(w/w) 에톡시디글리콜 또는 트랜스쿠톨, 및 약 60%(w/w) 무수의 순수 에탄올(200 proof, U.S.)을 포함한다.
- [0280] 기타 양태에서, 약제학적 조성물은 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1%의 포스폴리폰, 예를 들어, 포스폴리폰 90G를 포함한다.
- [0281] 기타 양태에서, 프로필렌 글리콜 및/또는 무수의 순수 에탄올의 정확한 백분율(w/w)은 40%:60% 비에 기초하여 변할 수 있다. 예를 들어, 프로필렌 글리콜 대 무수의 순수 에탄올의 % 비는 20:80; 25:75; 30:70; 35:65; 36:64; 37:63; 38:62; 39:61; 41:59; 42:58; 43:57; 44:56; 45:55 동일 수 있다. 이러한 기타 제형의 유효성은 당해 분야 인지된 기술, 예를 들어, 실시예 I에 기술된 과정을 사용하여 입증될 수 있다.
- [0282] 특정 양태에서, 제형 중의 무수의 순수 에탄올은 95% 에탄올, 96% 에탄올, 97% 에탄올, 98% 에탄올, 또는 99% 에탄올로 대체될 수 있다.
- [0283] 특정 양태에서, 약제학적 조성물은 또한 미량의 기타 불활성 성분, 부형제 또는 성분을 포함할 수 있다. 이러한 성분의 존재는 실질적으로 비타민 D 화합물의 유효성 또는 이의 진피 침투/축적 거동에 영향을 미치지 않는다.

[0284] 본 발명의 비타민 D 화합물은 실질적으로 진피 층을 침투하지 않고 표피로 전달되도록 제형화된다. 로슈 더마톨로지(Roche Dermatology)에 의해 개발된 이전 상이한 제형은 적용당 약 500 내지 1000 μ g의 용량으로 사용될 경우 CIA를 보호하는데 비효과적이었고, I기 연구 중인 사람 대상 대부분에서 피부염을 유발시켰다. 동일한 로슈 제형은 또한 래트 녹색백혈병 모델(하기)에서 작용시키는데 실패하였다.

[0285] 본 발명의 예시적 제형 중의 하나는 다음 (비-제한적) 과정에 따라 제조할 수 있다:

화학식 I: 1.2 μ g/g(1.2ppm)에서의 칼시트리올

성분	% w/w
100ppm 칼시트리올 농축물	1.2
200 proof 에탄올	58.8
프로필렌 글리콜	40
총	100

[0286]

[0288] 화학식 I은 다음과 같이 제조한다: 칼시트리올을 에탄올에 용해시킨 다음, 프로필렌 글리콜을 첨가하고, 생성되는 용액이 외관상 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다. 상기 제형의 비중은 약 0.875g/mL이다. w/v로 표현된 상기 화학식의 표적 농도는 1.05 μ g/mL이다.

화학식 II: 3.6mg/g(3.6ppm)에서의 칼시트리올

성분	% w/w
100ppm 칼시트리올 농축물	3.6
200 proof 에탄올	56.4
프로필렌 글리콜	40
총	100

[0289]

[0291] 화학식 II는 다음과 같이 제조한다: 칼시트리올을 에탄올에 용해시킨 다음, 프로필렌 글리콜을 첨가하고, 생성되는 용액이 외관상 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다. 상기 제형의 비중은 약 0.875g/mL이다. w/v로 표현된 상기 화학식의 표적 농도는 3.15 μ g/mL이다.

[0292] 사용된 시약은 모두 USP 등급 시약(U.S. 약전의 요건 충족)이다.

[0293] 본 발명의 제형을 사용하여, 약 0.2 μ g의 용량(2 μ g/mL 국소용 용액의 100 μ l로서 투여됨)은 신생아 래트에서 CIA에 대해 보호성이다. 이 정보에 기초하여, 당해 분야의 숙련가는 치료될 포유동물의 평균 체중에 기초하여 적절한 용량 수준을 용이하게 조절할 수 있다. 예를 들어, 사람 대상에서, 약 2.5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 25 μ g, 50 μ g, 75 μ g 또는 100 μ g의 칼시트리올의 총 용량(또는 비타민 D 화합물의 기타 등가량)이 사용될 수 있다. 예비 동물 독물학 연구는 약 100 μ g의 용량이 진피 자극을 유발하지 않고 실질적인 진피 침투 없이(예를 들면, 매우 낮은 진피 침투) 우수한 표피 침투를 나타낸다는 것을 보여준다. 추가의 용량 정보에 대해 상기 기술을 참조한다.

[0295] 실시예

[0296] 하기 실시예는 본 발명의 특정 국면을 설명하고, 어떠한 측면으로도 한정하려는 것은 아니다. 실시예는 명확한 예시를 위해 좀 더 상세하게 설명하였지만, 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명의 진정한 범위를 벗어나지 않고도 방식 및 세부사항에서 다양한 변화가 이루어질 수 있음을 인지할 것이다.

[0298] 실시예 1: 프란츠(Franz) 사람 피부 유한 용량 모델을 사용한 시험관내 칼시트리올의 경피 흡수 평가

[0299] 본 실시예는 다양한 칼시트리올 제형의 경피 흡수 약력학을 평가하기 위해 고안되었다. 흡수는 유한 용량 기술 및 프란츠 확산 세포를 사용하여 시험관내에서 사람 사체 피부에서 측정하였다. 시험관내 사람 사체 피부 모델은 국소 적용된 약물의 경피 흡수의 연구 및 약력학을 측정하는 유용한 도구인 것으로 증명되었다. 당해 모델은 통상적인 생체내 조건에 부합하는 온도 및 습도에서 피부를 유지시키는 특별하게 설계된 확산 세포에 고정된 사람 사체 피부를 사용하였다. 유한 용량(예를 들면, 4 내지 7mg/cm²)의 제형을 피부의 외부 표면에 적용하고, 피부의 내부 표면을 침지하는 수용체 용액에서 이의 겉보기 비율을 모니터링하여 약물 흡수를 측정하였다. 이어서, 총 흡수, 흡수를 뿐만 아니라 피부 함량을 규정하는 데이터를 당해 모델에서 정확하게 측정하였다. 당해 방법은 생체내 경피 흡수 동력학을 정확하게 예상하기 위한 역사적 관행이다. 따라서, 사람 피부에 대한 시험관내 유한 용량 모델은 칼시트리올과 같은 비타민 D 화합물의 경피 흡수 약력학의 특성화를 가능하게 하였다.

[0300] 본 실험에서, 칼시트리올을 함유하는 6개 제형을 48시간 투약 기간에 걸쳐 칼시트리올의 경피 흡수에 대해 각각의 상이한 3개의 사체 피부 공여자 상에서 제형당 3개의 복제 피부 절편으로 시험하였다. 용량 적용후 미리 선택된 시점에서, 피부 수용체 용액을 이의 전체에서 제거하고, 새로운 수용체 용액으로 대체하고, 분취량을 후속

분석을 위해 저장하였다. 또한, 각질층, 표피 및 진피를 회수하고, 약물 함량을 평가하였다. 당해 샘플은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 칼시트리올 함량에 대해 분석하였다. 본원에 사용된 프로토콜의 간단한 설명은 다음에 제공된다.

[0301] 사후 24 내지 48시간내에 수득한 피부 질환의 명백한 징후가 없는 사람 사체 몸통 피부를 본 연구에 사용하였다. 피부를 수집하고, 동결보존하고, 수-불침투성 플라스틱 백에 밀봉하고, 실험일까지 -70°C 미만에서 저장하였다. 사용 전에, 피부를 약 37°C 물에서 해동시킨 다음, 수돗물로 세정하여 임의의 부착 혈액 또는 기타 물질을 표면으로부터 제거하였다. 단일 공여자의 피부를 정적 2.0cm^2 프란츠 확산 세포 상에 고정하기에 충분히 큰, 다수의 보다 작은 절편으로 절단하였다. 공여자당 3개의 복제물을 각 제형에 대해 시험하였다. 피부 챔버를 인산염-완충된 등장성 염수(PBS)(pH 7.4 ± 0.1)의 저장 용액으로 수용량까지 채우고, 표피 챔버를 주위 실험실 환경에 개방 상태로 유지시켰다. 수난용성 화합물의 수용해도를 증가시키는 것으로 공지된 비이온성 계면활성제, 볼포(Volpo)(Oleth-20)를 PBS에 첨가할 수 있다. 저장 용액 중의 볼포는 경피 흡수 동안 확산 싱크(sink) 조건을 보장하며, 시험 피부의 차단 특성에 영향을 미치지 않는 것으로 공지되어 있다. 이어서, 세포를 확산 장치에 위치시키고, 피부 저장 용액을 약 600 RPM에서 자기 교반하고, 이의 온도를 $32.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 의 피부 표면 온도를 성취하도록 유지시켰다.

[0302] 각 피부 절편의 완전성을 보장하기 위해, 적정수에 대한 이의 투과도를 시험 생성물의 적용 전에 측정하였다. 단시간(0.5 내지 1시간) 평형 기간 후, $^3\text{H}_2\text{O}$ (NEN, Boston, MA, sp. Act. 약 $0.5\mu\text{Ci/mL}$)를 점적기에 의해 피부 상부를 통해 적층시켜 전체 노출된 표면을 피복시켰다(약 250 내지 $500\mu\text{L}$). 5분 후, $^3\text{H}_2\text{O}$ 수성 층을 제거하였다. 30분 후, 저장 용액을 수집하고, 액체 신틸레이션 계수에 의해 방사성 함량에 대해 분석하였다. $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 흡수가 $1.56\mu\text{L-equ/cm}^2$ 미만인 피부 샘플을 허용가능한 것으로 간주한다. 사용된 모든 피부 샘플은 약 $0.50\mu\text{L-equ/cm}^2$ 미만의 $^3\text{H}_2\text{O}$ 흡수를 가졌다(결과는 도시하지 않음).

[0303] 용량 투여 및 샘플 수집: 투여 직전, 예비 용량 샘플을 수집하고, 저장 용액을 0.2% 볼포(또한 Oleth-20으로 공지됨, 수용액에서 약물의 혼화성을 보장하기 위해 사용된 비이온성 계면활성제)를 함유하는 $0.1 \times \text{PBS}$ 의 신선한 용액으로 대체하였다. 침니(chimney)를 프란츠 세포로부터 제거하여 피부의 표피 표면에 충분히 접근하게 하였다. 이어서, 모든 제형은 $10\mu\text{L}$ 제형/ cm^2 를 전달하도록 전방 이동 피펫 세트(positive displacement pipette set)를 사용하여 피부 절편에 적용하였다. 당해 용량은 피펫의 테플론 팁(Teflon tip)으로 표면을 통해 확산시켰다. 적용 5 내지 10분 후, 프란츠 세포의 침니 부분을 대체하였다. 투여후 미리 선택된 시간(6, 12, 24 및 48시간)에서, 저장 용액을 전부 제거하고, 새로운 저장 용액으로 대체하고, 소정 용적 분취량을 후속 분석을 위해 저장하였다.

[0304] 각 공여자의 단일 피부 절편을, 투약하지 않고서 피부 외부로 확산하는 물질의 외관을 평가하는데 사용된 세포에 고정하는데, 이는 내인성 칼시트리올을 나타낼 수 있다. 최종 샘플을 수집한 후, 피부 표면을 80:20 에탄올:물로 2회(각각 1.0mL 용적) 세척하여 피부 표면으로부터 흡수되지 않은 제형을 수집하였다. 세척 후, 피부를 챔버로부터 제거하고, 표피와 진피로 분리하였다. 각 층을 밤새 80:20 에탄올:물로 추출하였다.

[0305] 칼시트리올의 정량화는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 수행하였다. 요약하면, HPLC는 아길런트 1100 시리즈 LC/MSD와 함께 휴렛-팩커드(Hewlett-Packard) 1100 시리즈 HPLC 시스템으로 수행하였다. A) 수 중 0.1% 암모늄 아세테이트 및 B) 메탄올 중 0.1% 암모늄 아세테이트로 이루어진 용매 시스템을 0.550mL/분 의 유속으로 페노메넥스 루나(Phenomenex Luna) C18(2) 컬럼(100A, 3μ $100 \times 4.6\text{ mm}$)을 통해 작동시켰다. 피크 면적은 순수한 표준물로부터 매일 제조한 외부 표준 곡선을 사용하여 농도에 대해 정량화하였다. 수집일에 분석하지 않은 샘플은 -20°C 이하에서 저장하였다.

[0306] 보조 연구(pilot study)에서, 당해 그룹으로부터의 단일 제형을 단일 공여자에 대해 약 $5\mu\text{L/cm}^2$ 용량으로 6개 챔버에 투약하였다. 수용체 용액을 0, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 및 48시간에 수집하였다. 최종 수용체 용액 샘플을 투여한 후, 표면을 세척하고, 피부를 상기한 바와 같이 분석을 위해 수집하였다. 모든 샘플을 처리하고, 칼시트리올 함량에 대해 분석하였다.

[0307] 중추 연구(pivotal study)의 최종 설계는 보조 연구, 특히 적용된 용량, 수용체 용액 샘플링 일정 및 샘플 처리 방법에서 관찰된 결과를 토대로 하였다. 이들 변형은 중심 연구 샘플에서 칼시트리올의 검출 및 정량화를 최적

화하기 위해 이루어졌다. 예를 들면, 준비 프로토콜이 저장 샘플을 2, 4, 8, 12, 24, 32 및 48시간에서 수집한 것으로 나타내는 경우에도, 이는 저장 샘플 중의 칼시트리올의 보다 양호한 검출 수준을 촉진시키기 위해 저장 샘플이 6, 12, 24 및 48시간에서 수집될 수 있음이 보조 연구 후에 측정되었다. 또한, 보조 연구 후, 20 μL 를 사용한 2cm²에 대한 투약(이 경우, 용량은 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 이다)은 저장 용액 샘플에서 칼시트리올의 검출을 향상시킬 수 있다. 그러나, 비-투약 챔버는 1cm²에서 유지되었다. 하기 파라미터가 계산되었다: a) 총 흡수(모든 저장 용액의 합계); b) 연구 기간에 걸친 투과율 및 투과 정도; 및 c) 적용된 용량의 질량 밸런스. 데이터 평가를 위해, a) 임의의 샘플이 LLQ(정량화 하한치) 미만인 경우, 당해 샘플은 비-데이터 값으로서 처리될 수 있다. 방사성 샘플(예를 들면, 수 완전성 시험)의 경우, LLQ는 블랭크 샘플의 소정 평균 배경으로서 정의된다. 조사자의 재량으로, LLQ 미만의 모든 값은 제로 값, 또는 주요 파라미터를 계산하기 위해 측정된 실제 값으로 나타내고; b) 추정된 이상치(outlier)는 잔류하는 복제물 챔버 세트로부터의 동일한 값의 또는 딘 및 덕손(Dean and Dixon) 이상치 시험에 의해 측정된 것과 동일한 값의 평균 \pm 3SD 범위보다 큰 경우로 확인되었다. 조사자의 재량으로, 이상치로서 언급된 값을 데이터의 총 합계로부터 제거하고(그러나, 텍스트 또는 데이터 표에서는 자체로 주목된다); c) 챔버 내에서, 소정 시점 값이 비-데이터 값으로 언급하거나, 다른 이유로 부재하는 경우, 시점 값을 내삽 값으로 대체하여 관련 파라미터를 계산하였다. 내삽 값은 다음과 같이 인접 값을 연결하는 라인 상에서 계산한다:

- [0308] ■ 소정 3 시점: (B) 부재와 함께 (T1, A), (T2, B) 및 (T3, C)
- [0309] ■ 여기서, T는 시간이고, A-C는 측정된 데이터 값이다.
- [0310] ■ 평가된 $B = A - [((A-C) / |T1-T3|) \times (|T1-T2|)]$
- [0311] 통계학적 평가를 위해, 공여자 내의 복제물을 평균하고, 표준 편차를 각각의 중요 파라미터에 대해 계산하였다. 이어서, 공여자 내에서 평균을 수집하고, 표준 오차를 갖는 공여자 모집단에 걸쳐 평균을 계산하였다. 시험 물품 사이의 차이는 스튜던트 t-시험을 사용하여 평가하였다.
- [0312] 이 프로토콜을 사용하여, 하기 시험 제형을 평가하였다:
- [0313] ■ A: (1ppm): 0.2mL(1%(w/v))의 100ppm 칼시트리올 농축물(롯트 번호 H, 하기 참조)을 19.8mL(99%(w/v))의 200 proof 에탄올($1\mu\text{g}/\text{mL}$)에 용해시킨다.
- [0314] ■ B(1ppm): 먼저, 0.2mL(1%(w/v))의 100ppm 칼시트리올 농축물(롯트 번호 H, 하기 참조)을 11.8mL(59%(w/v))의 200 proof 에탄올에 용해시킨 다음, 8mL(40%(w/v))의 프로필렌 글리콜을 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다($1\mu\text{g}/\text{mL}$).
- [0315] ■ C(1ppm): 먼저, 0.2mL(1%(w/v))의 100ppm 칼시트리올 농축물(롯트 번호 H, 하기 참조)을 11.8mL(59%(w/v))의 200 proof 에탄올에 용해시킨 다음, 6mL(30%(w/v))의 프로필렌 글리콜 및 2mL(10%(w/v))의 에톡시디글리콜을 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다($1\mu\text{g}/\text{mL}$).
- [0316] ■ D(3ppm): 먼저, 0.6mL(3%(w/v))의 100ppm 칼시트리올 농축물(롯트 번호 H, 하기 참조)을 11.4mL(57%(w/v))의 200 proof 에탄올에 용해시킨 다음, 6mL(30%(w/v))의 프로필렌 글리콜을 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합하고, 마지막으로 2mL(10%(w/v))의 에톡시디글리콜을 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다($3\mu\text{g}/\text{mL}$).
- [0317] ■ E(1ppm): 먼저, 0.2mL(1%(w/v))의 100ppm 칼시트리올 농축물(롯트 번호 H, 하기 참조)을 11.72mL(58.6%(w/v))의 200 proof 에탄올(DP-04-099)에 용해시키고, 6mL(30%(w/v))의 프로필렌 글리콜을 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한 다음, 2mL(10%(w/v))의 트랜스쿠톨 P를 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합하고, 마지막으로, 0.08mL(0.4%(w/v))의 포스포리폰 90G 농축물(롯트 번호 G, 하기 참조)을 첨가하고, 용액으로 분산시키고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다($1\mu\text{g}/\text{mL}$).
- [0318] ■ F(3ppm): 먼저, 0.6mL(3%(w/v))의 100ppm 칼시트리올 농축물(롯트 번호 H, 하기 참조)을 11.32mL(56.6%(w/v))의 200 proof 에탄올에 용해시킨 다음, 6mL(30%(w/v))의 프로필렌 글리콜을 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한 다음, 2mL(10%(w/v))의 트랜스쿠톨 P를 첨가하고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합하고, 마지막으로, 0.08mL(0.4%(w/v))의 포스포리폰 90G 농축물(롯트 번호 G, 하기 참조)을 첨가하고, 용액으로 분산시키고, 투명하고 균질해질 때까지 혼합한다($31\mu\text{g}/\text{mL}$).
- [0319] ■ G: 50g(50%(w/v))의 200 proof 에탄올을 50g(50%(w/v))의 포스포리폰 90G와 혼합하고, 투명하고 균질해질

때까지 혼합한다.

[0320] ■ H: 0.01mg(0.01%(w/v))의 칼시트리올을 100mL(99.99%(w/v))의 200 proof 에탄올에 완전히 용해시킨다.

[0321] 당해 연구에 사용된 모든 시약은 분석학적 시약 등급 이상이였다. 유일한 시약의 공급원은 최종 보고서의 텍스트 내에서 각 화학 물질의 최초 언급 후에 기재될 것이다.

[0322] 당해 연구의 결과는 하기 요약 표에 요약되어 있다:

[0323] 요약 표: 표피, 진피 및 전체 흡수에서 칼시트리올 함량에 대한 공여자의 평균 결과; 단일 적용으로부터 48시간에 걸쳐 사람 사체 피부를 사용한 칼시트리올의 경피 흡수. 전체 질량(ng)으로서 평균 \pm SE

시험물품	표피 (ng/cm ²)	진피 (ng/cm ²)	전체 흡수 (ng/cm ²)
로트 A	0.98 \pm 0.19	0.11 \pm 0.11	9.85 \pm 0.62
로트 B	1.63 \pm 0.44	0.19 \pm 0.19	9.84 \pm 0.67
로트 C	1.89 \pm 0.54	0.00 \pm 0.00*	9.74 \pm 0.43
로트 D	6.44 \pm 0.74	0.00 \pm 0.00	10.51 \pm 0.10
로트 E	2.19 \pm 0.14	0.00 \pm 0.00	9.96 \pm 0.32
로트 F	4.83 \pm 0.42	0.00 \pm 0.00	8.80 \pm 0.25
비-투약 블랭크 세포	0.37 \pm 0.37	0.00 \pm 0.00	13.75 \pm 0.59***

[0324]

[0325] * 제로 값은 검출 하한치 이하의 결과를 나타낸다.

[0326] ** 피부로부터 방출되는 내인성 칼시트리올인 것으로 간주된다.

[0327] 상기 데이터는, 칼시트리올이 평가된 시험 제형으로부터 시험관 내에서 사람 사체 피부 내로 침투하였음(피부를 통과하는 것이 필수적이지는 않지만)을 나타낸다. 각 공여자로부터 비-투약된 블랭크 피부 절편은 내인성 칼시트리올과 일치하는 HPLC/MS 공유출 피크를 증명하였다. 저장소 용액(이는 실질적으로 모든 시험 제형에 대해 동일하다)에 존재하고 비-투약된 피부 절편과 유사한 양은, 피부 절편으로부터 방출되는 내인성 칼시트리올을 확산시키는 것 같았다. 시험 제형 및 비-투약 챔버에서 차이가 거의 관찰되지 않기 때문에, 저장소 용액에서 관찰된 양은 국소 적용된 시험 제형으로부터 유래하는 칼시트리올을 나타내는 것 같지 않다.

[0328] 칼시트리올 흡수의 증거는, 2개의 제형(A 및 B)을 투약한 이들 피부 절편에서 피부 함량으로서 관찰되었고, 도 1에 도시되어 있다. 진피 피부 층에서 어떠한 측정가능한 수준도 비-투약 피부 절편으로부터 나타나지 않기 때문에, 이들 2개의 시험 제형으로부터 측정가능한 진피 수준은 적용된 용량으로부터의 흡수를 나타내는 것으로 해석된다. 또한, 시험 제형을 투여한 모든 표피 샘플은 비-투약 피부 절편보다 큰(약 3배 내지 약 17배) 칼시트리올 수준을 증명하였다. 표피 칼시트리올 함량에 기초한 등급 서열은 다음과 같이 시험 제형을 정렬한다:

[0329] D > F > E > C > B > A >>> 비-투약 피부

[0330] 이 등급 서열과 일치하도록, 시험 제형은 표피 함량이 클수록 고농도(3 μ g/mL 대 1 μ g/mL)의 칼시트리올(D 및 F)을 함유하는 것을 나타낸다. 매우 유사한 등급 서열은 표면 세척 결과에서 관찰된다(피부 표면으로부터 잔류 시험 물품의 회수). 어떠한 칼시트리올도 비-투약 블랭크 피부 절편의 표면 세척물에서 관찰되지 않았다.

[0332] 실시예 2: 칼시트리올에 대한 표피 세포 배양물 반응과 관련된 중요 단백질의 동정 - 실시간 PCR(RTPCR)

[0333] 본 실시예 및 하기 몇몇 실시예는 칼시트리올에 대한 활성화 경로에서 단백질 또는 유전자의 동일성에 관한 추가의 정보를 제공한다. 이들 실험은 비타민 D 화합물에 대한 표피 세포의 세포상 반응에 관련된 작용 메카니즘 및 중요 단백질/유전자를 동정한다.

[0334] 구체적으로, 케라티노사이트 세포주 HEK를 칼시트리올에 노출시키는 것은 세포 과정에 대한 현저한 영향을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 본원에 기재된 실험은 칼슘 채널 수송에서 칼시트리올 유도된 변화 및 열 충격 단백질의 조절에서의 변화와 관련된 중요 단백질/유전자의 동정에 초점을 맞춘다. 실시간 폴리머라제 연쇄 반응(RTPCR; Real-time polymerase chain reaction) 방법은 이온 채널, 수송 단백질 및 열 충격 단백질과 관련된 유전자에 대한 mRNA 수준의 변화를 동정하기 위해 본 실시예에서 사용되었다.

[0335] 스크리닝 도구로서 PCR 어레이를 사용하여, 세포 내에서 칼시트리올의 생물학적 작용 방식에 대한 통찰을 잠재적으로 제공할 수 있는 분자 표적 범위를 평가하였다. mRNA 수준의 변화는 실시간 PCR 정량화를 사용하여 평가하여, 80 경로 특이적 표적(첨부 참조)을 함유하는 사전 선별된 서브세트에서 mRNA 수준을 평가한다. PCR 어레이 분석은 2개의 유전자 그룹, 즉 열 충격 단백질과 관련된 것들(SABiosciences) 및 뉴로사이언스 이온 채널 및

트랜스포터와 관련된 것들(SABioscience)을 사용하였다.

[0336] 세포 배양: 1차 사람 표피 케라티노사이트(HEKa)를 사람 케라티노사이트 성장 보충제(Cascade Biologics, Inc., Portland OR)와 함께 에피라이프 배지(Epilife Medium)(Cascade Biologics, Inc., Portland OR)에서 유지시켰다. 세포는 5% CO₂와 함께 37°C에서 성장시켰다.

[0337] HEKa 세포의 D3 처리: HEKa 세포를 0.1μg/mL의 칼시트리올 또는 대조군 비히클로 처리하였다. 최종 농도 0.1μg/mL의 칼시트리올을 수득하기 위해, 1mg의 칼시트리올을 2mL의 에탄올에 용해시키고, 1μL의 생성 스톱을 5mL의 배지에 첨가하였다. 세포의 비히클 대조군 그룹은 1μL의 에탄올을 함유하는 5mL 배지로 처리하였다. 세포는 처리 개시 후 3, 6, 16, 24, 48 또는 72시간에서 수거하였다.

[0338] RNA 분리: 세포는 제조업자의 지시에 따라 RNeasy Mini 키트(Qiagen, Inc., Valencia CA)를 사용하여 상이한 처리 시간에서 RNA 분리를 위해 용해시켰다. RNA는 260nm에서 광학 밀도를 측정하여 정량화하였다. 제1 스트랜드 합성: 제1 스트랜드 cDNA는 제조업자의 권고에 따라 RT 제1 스트랜드 합성 키트(SABiosciences, Frederick MD)를 사용하여 1μg의 전체 RNA로부터 합성하였다.

[0339] 실시간 PCR: 제1 스트랜드 합성으로부터의 생성물을 물로 희석하고, SYBR 그린 마스터 혼합물(SABiosciences, Frederick MD)과 혼합하고, PCR 어레이에 적재하였다. 실시간 PCR은 Biorad CFX96 상에서 PCR 어레이(Heat Shock Protein Arrays, and Neuroscience and Ion Channel Arrays)(SABiosciences, Frederick MD)로 작동시켰다. 데이터 분석은 SABiosciences 웹사이트에서 이용가능한 PCR 어레이 데이터 분석 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0340] 하기 표 2-1은 칼시트리올 처리 후에 HEKa 세포에서 조절되는 열 충격 단백질 유전자 어레이 상의 유전자를 나타낸다. 결과는 2개의 독립적인 실험에서 조절되는 유전자만을 나타낸다.

[0341] [표 2-1]

비타민 D3 처리에 의해 조절된 열 충격 단백질 어레이 중의 유전자

유전자 기호	단백질	조절 패턴
HSPB1	열 충격 27 kDa 단백질 1	48시간에서 하향 조절됨
DNAJC6	DnaJ(Hsp40) 동족체, 아부류 C, 구성원 6	하향 조절됨
HSPA2	열 충격 70 kDa 단백질 2	48시간에서 상향 조절됨
HSF4	열 충격 전사 인자 4	48시간에서 상향 조절됨

[0342]

[0344] HEKa 세포에서 칼시트리올 처리에 의해 mRNA 수준에서 조절된 2개의 유전자는 HSPB1 및 HSPA2이었다. HSPB1은 세포막 뿐만 아니라 시토솔, 미토콘드리아 및 골지체에서 발현되는 27 kDa 단백질이다. HSPA2는 세포막 및 핵에 존재하는 70 kDa 단백질이고, HSF1에 의해 조절된다. HSPB1 및 HSPA2 둘 다는 아포토시스에 연루되었다. HSF4는 레틴산에 의해 조절되고, 세포 분화에 관여한다. DNAJC6은 HSP40 그룹 단백질에 속한다. 이는 클라트린 피복 소낭 및 세포질에 존재한다.

[0345] 유사하게는, 3개의 독립적인 실험으로부터 일치하는 뉴로사이언스 및 이온 채널 어레이(Neuroscience and Ion Channels Array)로부터 수득한 결과는 하기 표 2-2에 요약되어 있다.

[0346] [표 2-2]

비타민 D3 처리에 의해 조절된 뉴로사이언스 및 이온 채널 어레이 중의 유전자

유전자 기호	유전자	조절 패턴
SLC1A1	용질 담체 부류 1(신경/표피 고친화성 글루타메이트 수송체, 시스템 X _{ag}), 구성원 1	16시간에서 상향 조절됨
KCNB2	칼륨 전압-게이트 채널, Shab-관련된 아부류, 구성원 2	24시간까지 상향 조절됨
KCNN4	칼륨 중간체/작은 전도성 칼슘-활성화 채널, 아부류 N, 구성원 4	48시간에서 상향 조절됨
SLC1A3	용질 담체 부류 1(신경아교 고친화성 글루타메이트 수송체), 구성원 3	48시간에서 하향 조절됨

[0347]

[0349] 글루타메이트 수송체 및 칼륨 채널의 변화가 일관되게 관찰되었다. SLC1A1(또한 EAAC1 또는 EAAT3으로서 공지됨)은 막을 교차하는 흥분성 신경전달물질 글루타메이트의 수송에 주로 관여하는 것으로 공지되어 있다. 이러한 용질 담체 단백질은 심장 및 피부 등의 조직 중의 신경계 외부에서 발견되었다. 래트 케라티노사이트에서는, 상처 치유시에 글루타메이트 시그널링 및 SLC1A1의 관여를 나타내는 증거가 있다(참조:

Genever *et al.*, 1999). 현재 흑색종(Clinical Trials. gov, Mosby's Drug Consult, 13th Edition)에 대한 임상 시험의 약물인 리루졸에 의한 SLC1A1의 억제에 피부 세포에서 SC1A1의 생물학적 역할을 나타낸다. SLC1A1이 손상된 운동 뉴런에서 황-아포토시스 메커니즘에 관여하는 경우[참조: Kiryu-Seo *et al.*, 2006], SLC1A1이 HEK293 세포에서 D3 처리에 의해 상향 조절되는 본 실험에서의 관찰은 잠재적 보호 메커니즘 경로 연관성을 시사한다.

- [0350] SLC1A3(또한 EAAT1 또는 EA6으로서 공지됨)은 나트륨 의존성 글루타메이트 및 아스파르테이트 수송을 가능하게 하는 또다른 용질 담체이다. 이러한 수송체는 통상 뇌의 신경아교 세포에서 발견되는데, 이는 글루타메이트의 시냅스 공간의 완전한 청소에 관여하고, 이에 의해 시냅스후 뉴런의 연장된 분극을 방지한다. SLC1A3은 신경아교 유도된 항신경성 인자(GDNF) 및 포스포디에스테라제 6B(PDE6B)와 상호작용하는 것으로 공지되어 있다. SLC1A3은 세포독성의 감소에 관여할 수 있다.
- [0351] KCNN4는 칼륨 중간체/작은 전도성 칼슘 활성화 채널, 아부류 N, 구성원 4이다. 이의 활성화 후, 세포막은 과분극화되고, 세포 내로의 칼슘 유입이 증가된다. 이러한 칼륨 채널은 신경계 외부의 다수의 조직에 편재된다.
- [0352] 칼슘 전압-게이트 채널, Shab-관련 아부류, 구성원 2인 KCNB2는 칼시트리올 처리후 약 24시간에서 상향 조절된다. 이러한 칼륨 채널은 신경전달인자 방출, 인슐린 분비 및 평활근 수축의 조절에 중요하다.
- [0353] 칼시트리올이 이들 실험에서 사용되었지만, 당해 기술분야의 숙련가는 본 발명의 다른 비타민 D 화합물(본원에서 상기 기재한 것들)도 표적 유전자 발현의 조절시에 유사한 활성을 나타낼 수 있음을 용이하게 이해할 것이다. 특정한 양태에서, 본 발명의 비타민 D 화합물은 이들 실험에서 칼시트리올의 프로파일과 유사하거나 동일한 유전자 조절 프로파일을 나타내는 것으로 고려된다. 예를 들면, 하나 이상의 표적 유전자의 발현(mRNA 및/또는 단백질)의 상향 조절은 유사하게 칼시트리올에 의해 상향 조절되거나, 하나 이상의 표적 유전자의 발현(mRNA 및/또는 단백질)의 하향 조절은 유사하게 칼시트리올에 의해 하향 조절된다.
- [0355] 실시예 3: 칼시트리올-항체 어레이에 대한 표적 세포 배양 반응과 관련된 중요 단백질의 동정
- [0356] 칼시트리올 자극시에 단백질 변화의 평가는 또한 항체 마이크로어레이를 활용하여 평가되었고, 이는 700개 이상의 잠재적 표적 단백질의 변화를 스크리닝할 수 있다.
- [0357] 본 실험에서, 700개 이상의 표적 단백질에 대한 항체를 포함하는 항체 마이크로어레이(Panorama XP725 Antibody Array, Sigma)를 사용하여, 각각 약 3, 6 또는 24시간 동안 칼시트리올로 처리된 HEK293 세포에서 단백질 농도/수준의 변화를 평가하였다. 요약하면, 처리된 HEK293 세포를 먼저 수거한 다음, 추출하여 가용성 단백질 상청액을 수득하였다. 각 샘플(1mg/mL에서)로부터 추출된 단백질 샘플(총 약 1mg)의 2개 부분을 각각 형광 염료(각각 Cy3 및 Cy5)로 표지하였다. 과다한 염료를 단백질 샘플로부터 제거하고, 수득된 표지된 단백질 샘플을 마이크로어레이 배양에 사용하였다.
- [0358] 초기 시점(예를 들면, 3시)에서의 특정 표적 단백질과 비교하여 후기 시점(예를 들면, 6시 또는 24시)에서 특정 표적 단백질의 발현 수준을 측정하기 위해, 샘플을 상이한 표지로 표지화하였다(예를 들면, Cy3으로 표지된 3시 추출물, Cy5로 표지된 6시 또는 24시 추출물). 이어서, 동일한 양의 전체 단백질을 함유하는 2개의 표지된 샘플을 혼합하였다(예를 들면, Cy3 표지된 3시 샘플을 각각 Cy5 표지된 6시 또는 24시 샘플과 혼합하였다). 마이크로어레이 칩(제조사에 권장한 프로토콜에 따라)과 함께 배양한 후, 칩을 세척하여 건조시켰다. 이어서, 마이크로어레이를 형광 레이저 스캐너로 스캐닝하여 Cy3 및 Cy5 염료의 상대 형광 강도를 측정하였다.
- [0359] 특정 형태의 표적 단백질의 양이 시간에 따라 증가(또는 감소)하는 경우, 후기 시점(예를 들면, Cy5)와 관련된 보다 많은(또는 보다 적은) 염료가 마이크로어레이에 체류될 것이다. 예를 들어, 당해 실험에서, 최초의 시점(예를 들면, 3시)은 기준으로 사용되어 2개의 후기 시점(예를 들면, 6시 대 24시)에서 상대 단백질 발현 수준을 측정한다. 보다 많은 Cy5가 6 내지 24시간에서 어레이에 의해 체류되는 경우, 표적 단백질의 발현 수준은 시간 기간에 따라 증가하였다. 반대로, 6시 내지 24시 사이에 체류된 Cy5가 감소되는 경우, 표적 단백질 발현 수준은 감소된다.
- [0360] 이 방법을 사용하는 초기 분석은 2배 초과와 상대 발현 수준 변화(증가 또는 감소)를 나타내는 이들 표적 단백질에 초점을 맞췄다. 전체적으로, 칼시트리올 처리된(24시간) HEK293 세포를 사용한 항체 어레이 실험은 비타민 칼시트리올에 대한 반응에 있어서 발현 수준이 현저히 변화된 하기 표적 단백질(표 3-1 및 3-2에서)을 동정하였다.

[0361] [표 3-1]

칼시트리올 처리 후의 단백질 수준이 증가(2배 초과)된 표적 단백질

아밀로이드 전구체 단백질	HDAC2
ARTS	HDAC6
ASAP1 센타우린 b4	ILK
BACH1	MAP 키나제 활성화된 단백질 키나제2 MAPKAPK2
Bclx	MAP 키나제 ERK1
BclxL	멜라노코르틴3 수용체
BID	미오신 IX Myr5
Bmf	뉴로필라렌트 200
CENPE	산화질소 신타제 bNOS
cMyc	p120ctn
코필린	PAD14
콘택신 32	Par4 전립선 아폽토시스 반응 4
Csk	프레세닐린1
CtBP1	증식 세포 단백질 Ki67
Dcr2	단백질 키나제 Ba
디메틸 히스톤 H3 diMeLys4	PUMA bbc3
디메틸 히스톤 H3 diMeLys9	ROCK1
디스트로빈	S100
ERK5 BIG MAPKBMK1	SHPTP2
에스트로젠 수용체	Sin3A
FKHRL1 FOXO3a	물질 P 수용체
병소 부착 키나제 pp125FAK	시넵토포닌
FOXP2	종양 괴사 인자 a
글루탐산 데카복실라제 65	우비퀴틴 C 말단 하이드롤라제 L1
글루탐산 데카복실라제 GAD65 67	우보모블린 E카드헤린
g투불린	비트로백틴

[0362]

[0364] [표 3-2]

칼시트리올 처리 후의 단백질 수준이 감소(2배 초과)된 표적 단백질

Crk II
성장 인자 독립 1
세린 트레오닌 단백질 포스파타제 1b
카텝신 D
형질전환 성장 인자 b pan
WAVE
단백질 티로신 포스파타제 PEST
CD40

[0365]

[0367]

동일한 단백질 항체 어레이 방법을 사용하여 24시간에서 칼시트리올 처리된 HEKa 세포의 평가는 현저히 상향 조절된 약 50개 단백질을 동정하였다. 이들 단백질은 일반적으로 4개 범주에 포함된다: (i) 전사 및 세포 주기 대조군(표 3-3); (ii) 구조, 세포골격 및 부착 단백질(표 3-4); (iii) 아폽토시스 조절 단백질(표 3-5); 및 (iv) 신경 세포 분화 및 알츠하이머 질환(표 3-6).

[0368]

[표 3-3]

세포 주기 및 전사 대조군(칼시트리올 처리 24시간 후)에 관한 과발현된 단백질

단백질	기능
BACH1	전사 인자(알츠하이머 질환)
CENPE	세포 주기의 G2 상에서 축적하는 동원체 단백질
cMyc	전사 인자(암 종양유전자)
C-src 트리오신 키나제(Csk)	세포 성장(암)
CtBP1	전사 억제인자
디메틸 히스톤 H3 diMeLys4	전사 조절
디메틸 히스톤 H3 diMeLys9	전사 조절
에스트로젠 수용체	리간드 의존성 핵 수용체
FKHRL1 FOXO3a	ROCK 키나제 및 NO 시그널링과 관련된 전사 인자
FOXP2	뇌, 폐, 장 발병의 전사 조절인자
HDAC2	유전자 발현 조절
MAP 키나제 활성화된 단백질 키나제 2 MAPKAPK2	다수의 세포 과정에 관련된 키나제(스트레스 및 염증 반응, 핵 전달, 유전자 발현 조절 및 세포 증식). 열 충격 단백질 HSP27은 기질의 하나인 것으로 밝혀졌다.
MAP 키나제 ERK1	다양한 세포의 시그널에 대한 반응으로 증식, 분화 및 세포 주기 진행 등의 다양한 세포 과정을 조절하고 핵 단백질을 포스포릴화하는 시그널링 캐스케이드에서 작용함
멜라노코르틴 3 수용체	호르몬 수용체
증식성 세포 단백질 Ki67	증식 마커
S100	다중 세포 과정의 조절과 관련된 칼모듈린 유사 칼슘 결합 단백질
SHPTP2	다양한 세포 시그널링 사건에서 조절 역할을 담당하는 키나제
Sin3A	전사 조절 단백질

[0369]

[0371] [표 3-4]

구조, 세포골격 및 부착(칼시트리올 처리 24시간 후)에 관한 과발현된 단백질

단백질	기능
ARTS	세포골격 구성의 조절
ASAP1 선택유된 b4	액틴 세포골격의 조절
코펠린	액틴 필라멘트의 가장
콘택신 32	말초 미엘린의 주성분
디스트로빈	세포골격 결합의 기대 단백질
병소 부착 키나제 pp125FAK	병소 부착 키나제의 포스포릴화는 이동을 위해 유도된 케라티노사이트에서 증가된다.
g투불린	마이크로투비알(microtubial), 방추극
미오신 IX Myr5	운동 단백질
뉴로필라멘트 200	신경 세포 관련된 구조 단백질
p120ctn	부착 및 신호 형질유도
PAD14	아르기닌 잔기를 시트룰린 잔기로 전환시키고, 퇴행성 과정을 겪는 세포에서 중간체 필라멘트 단백질 및 중간체 필라멘트 결합된 단백질을 조절할 수 있음
ROCK1	액틴 안정성에 관여하는 키나제
우보모블린 ECadherin	Ca 의존성 세포 부착 분자, 표피 세포 인지 및 부착을 조절하는 기능을 가진 막관통 당단백질
비트로넥틴	세포 부착 및 확산의 촉진

[0372]

[0374] [표 3-5]

아포토시스 조절(칼시트리올 처리 24시간 후)에 관한 과발현된 단백질

단백질	기능
Bclx	아포토시스 조절
BclxL	아포토시스 조절
BID	아포토시스 조절
Bmf	아포토시스 조절
Dcr2	수용체는 세포외 TRAIL 결합 도메인, 막관통 도메인 및 결합된 세포질 사멸 도메인을 함유한다. 당해 수용체는 아포토시스를 유도하지 않고, TRAIL 유도된 세포 아포토시스에서 억제 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다.
ERK5 BIG MAPKBMK1	배드(Bad)의 포스포릴화에 의한 아포토시스로부터 내피 세포의 보호
인테그린 연결된 키나제(ILK)	인테그린 매개된 신호 형질도입의 조절은 PKB/Akt 경로에 관련된 아포토시스를 예방할 수 있다.
단백질 키나제 Ba	아포토시스의 세포 생존 및 억제에 관련된 (Akt)
PUMA bbc3	아포토시스 조절인자

[0375]

[0377] [표 3-6]

신경 세포 분화 및 알츠하이머 질환(칼시트리올 처리 24시간 후)과 관련된 과발현된 단백질

단백질	기능
아밀로이드 전구체 단백질(APP)	아밀로이드 전구체 단백질(APP)은 다수의 조직에서 발현된 완전한 막 단백질이고, 뉴론의 시냅스에서 농축된다. 이의 주요 기능은 공지되어 있지 않지만, 시냅스 형성[2] 및 신경 가소성[3]의 조절인자로서 관련된다.
BACH1	전사 인자(알츠하이머 질환)
프레세닐린1	APP(알츠하이머 질환에서 관찰된 돌연변이)의 절단에 책임이 있는 gamma 세크레타제의 부성분
글루탐산 테카복실라제 65	신경전달인자 생성(정신분열병)
글루탐산 테카복실라제 GAD65 67	신경전달인자 생성(정신분열병)
뉴로필라멘트 200	신경 세포 관련된 구조 단백질
산화질소 신타제 bNOS	유도성, 세포 신호전달, 면역계
골질 P 수용체	뉴로레티드 수용체
시냅토포딘	뉴론에서 척추 장치(spine apparatus) 형성에 관련된 액틴 결합 단백질
콘택신 32	말초 미엘린의 주성분
중양 과사 인자 a	면역 세포의 조절
우비퀴틴 C 말단 하이드롤라제 L1	뉴론 특이성(알츠하이머 질환 및 파킨슨병)

[0378]

[0380] 실시예 4: 칼시트리올-프로테오믹 분석(Calcitriol - Proteomic Analysis)에 대한 표피 세포 배양 반응과 관련된 주요 단백질의 동정

[0381] 일련의 HEKa 배양물을 칼시트리올로 처리하고, 세포 펠렛을 칼시트리올3 노출후 3, 6 및 24시간에서 수거하였다. 이어서, 세포 펠렛은 2-D 겔 및 웨스턴 블롯 분석과 같은 프로테오믹 방법을 사용하여 분석하였다. 하기에 기재된 실험에서, HEKa 세포는 0.1μg/mL 칼시트리올로 처리하고, 3, 6 및 24시간에서 수득

한 샘플을 2-D 겔 전기영동 및 관련된 비교 분석(결과는 도시하지 않음)에 의해 처리하였다.

[0382] 비교 조사에서 약 458개 단백질 스폿의 모든 분석을, 3, 6 및 24시간 처리 샘플에 대해 대조군 샘플과 비교하여 수행하였다. 통계학적으로 유의적인 차이 변화를 나타내는 6개 스폿이 동정되었다. 이들 스폿을 분해하고, 이들의 단백질 함량은 트립신 소화 및 질량 분석 특성화에 의해 서열 동정하였다.

[0383] 결과(표 4-1)는 HEKa 케라티노사이트 샘플로부터의 6개 스폿 세트가, 통상의 오염물로 종종 관찰된 케라틴과 대조적으로, 순수한 내인성 케라틴을 함유함을 나타내었다. 2개의 S100 단백질은 글루타티온 S-트랜스퍼라제 및 갈렉틴 1과 함께 강력하게 조절되는 것으로 동정되었다. 갈렉틴 1은 글루코실화된 것으로 증명되었다.

[0384] [표 4-1]

2-D 겔 전기영동 연구에 기초한 칼시트리올에 의해 강력하게 조절되는 것으로 동정된 단백질

스폿	확인된 단백질	명칭	반응	기능	세포 위치
4	글루타티온 S-트랜스퍼라제	GST	3, 6, 및 24시간에서 상향	GST 수송	세포질
2	케라틴 1	KRT1	6시간에서 상향 및 24시간에서 하향	중간체 필라멘트	세포질
8	케라틴 17	KR17	24시간에서 하향	중간체 필라멘트	세포질
10	S100 A9 (칼프로텍틴)	S100A9	6 및 24시간에서 하향	칼슘 결합 단백질	세포질
14	S100 A13	S100A13	6 및 24시간에서 상향	칼슘 결합 단백질	세포질
27	갈렉틴 1	LGALS1	6 및 24시간에서 상향	베타-갈락토사이드-결합 단백질	세포외

[0385] 2개의 S100 단백질(A9 및 A13)은 칼프로텍틴 부류의 단백질에 속한다. 당해 부류에서 이들 저분자량 단백질에는 21개의 상이한 종류가 있다. 이들 S100 단백질은 칼슘(EF-핸드 모티프)를 결합하고, 각 유형은 세포 특이적 방식으로, 및 환경 인자에 의존적인 수준으로 발현된다. 다양한 질환이 변화된 S100 단백질 수준과 관련된 다(심근증, 신경변성 및 염증 질환 및 암). S100 단백질은 또한 칼시트리올과 접촉시에 상향 조절되는 것으로 항체 어레이 결과에서 동정됨에 주목해야 한다.

[0389] 실시예 5: 케라티노사이트 성장에 대한 칼시트리올의 효과

[0390] 일련의 HEKa 배양물을 상이한 농도의 칼시트리올로 처리하고, HEKa 세포의 성장 거동을 소정의 성장 기간 후에 분석하였다. 모든 실험은 96웰 플레이트 포맷으로 수행하였다. 각 웰은 동일한 양의 HEKa 세포를 약 100 μ L의 배지(통상 2000 내지 5000개 세포/웰)에 함유하였다. 칼시트리올을 에탄올에 용해시켜 스톱 용액을 제조하였다. 스톱 용액을, 4.0 μ g/mL 내지 약 15.5ng/mL(9개 시험 농도)의 범위를 포함하는 성장 배지에서 1:2로 순차 희석하였다. 약 100 μ L의 각 시험 농도의 칼시트리올을 상응하는 시험 웰에 첨가하여, 최종 용적 약 200 μ L/웰을 수득하였다. 시험된 칼시트리올 농도는 2.0 내지 0.008 μ g/mL 범위에 존재한다(예를 들면, 96웰 플레이트에서 컬럼 2 내지 10에 상응함). 컬럼 11은 네가티브 대조군(칼시트리올 비함유)으로서 사용하였다. 모든 실험은 이중으로 수행하였다.

[0391] 도 2에 도시된 바와 같이, 칼시트리올은 약 0.008 내지 2.0 μ g/mL의 농도 범위에 걸쳐 HEKa 세포 내에서 적정하였다. 최저 수준의 칼시트리올은 HEKa 세포에서 내성이 우수하였고, 칼시트리올은 HEKa 세포 성장을 온화하게 자극하는 것으로 나타났다(약 10 내지 20%). 그러나, 약 1.0 μ g/mL 이상의 칼시트리올 농도에서, 세포 성장은 억제된다. HEKa 세포 대 칼시트리올에 의한 전체 투약 반응은 약 6주 동안에 걸쳐 일련의 19개 독립적 실험 동안 일정하였다(데이터는 도시하지 않음).

[0393] 실시예 6: 암 세포 성장에 대한 칼시트리올의 효과

[0394] 정상 케라티노사이트 HEKa에서 관찰된 것과는 달리, 현저한 성장 촉진 또는 성장 억제 효과가, SkBr-3(유방 선암 암, 과발현된 Her2), SKMEL-28(흑색종), PaCa2(췌장 암종), NCI-ES-0808 및 NIH-3T3(비사멸 섬유아세포)을 포함하는, 시험된 대부분의 암 또는 비사멸 세포주에 대해 관찰되지 않았다. 이러한 암/비사멸 세포주에 의해 나타난 한 가지 예시적 성장 곡선은 췌장 암종 세포주 PaCa2에 대해 도 3에 도시되어 있다. PaCa2의 성장은 광범위한 칼시트리올 농도에 대해 영향을 미치지 않음에 주목한다.

[0395] 2개의 시험된 암 세포주, MCF-7(p53 돌연변이를 갖는 유방암) 및 HepG2(간암)는 낮은 비타민 D3 농도(0.05 내지

0.25 μ g/mL)에서 칼시트리올 자극 및 높은 칼시트리올 농도(0.5 μ g/mL 초과)에서 칼시트리올 억제에 유사하게 반응하였다. 도 4 참조.

[0396] 이들 테이타는, 특정한 농도 한계 이하로 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEKa)에 적용하는 경우, 대상 비타민 D 화합물이 암 세포 성장을 동시에 촉진시키지 않고서 이들 정상 케라티노사이트의 성장을 촉진시킬 수 있음을 시사한다. 농도 한계를 초과하면, 비타민 D 화합물은 정상 케라티노사이트의 성장을 실제로 억제할 수 있다.

[0398] 실시예 7: 다양한 화학요법 약물에 대한 HEKa 세포에 대한 칼시트리올의 보호 효과

[0399] 본 실시예는, 수개의 예외를 갖는, 본 발명의 비타민 D 화합물이 대부분 형태의 최전선 화학요법 약물의 세포독성 효과에 대해 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEKa)를 보호할 수 있음을 증명한다. 구체적으로, 17개 항암 약물을 시험하여 이들 약물의 세포독성 효과에 대한 칼시트리올의 영향을 평가하였다. 약물 명칭 및 이들 각각의 작용 메커니즘은 하기 표에 수록되어 있다.

[0400] [표 7-1]

HEKa 세포에서 칼시트리올의 화학보호 활성에 대해 시험된 약물

시험 약물	메카니즘
독소루비신	세포독성
5-FU	피리미딘 항대사물질
타목시펜	에스트로겐 수용체에 결합함
이리노테칸	토포이소머라제 1 억제제
파클리탁셀	유사분열 억제제
카보플라틴	DNA 알킬화제
에토포사이드	토포이소머라제 2 억제제
사이클로포스파미드	알킬화제
시스플라틴	DNA 알킬화제
에를로티니브(타르세바)	EGFR 티로신 키나제 억제제
젬시타빈	피리미딘 항대사물질
스타우로스포린	비특이적 키나제 억제제
빈크리스틴	마이크로튜비알(microtubial) 억제제
이마티니브(글리벡)	티로신 키나제 억제제(ab1, c-키트, PDGF-R)
게피티니브(이레사)	EGFR 티로신 키나제 억제제
소라페니브	티로신 키나제 억제제(Raf, VEGF-R2, c-키트, PDGF-R)
다사티니브	티로신 키나제 억제제(BCR/ABL)

[0401] 처음 일련의 실험에서, 다수의 키나제 억제제 기반 약물을, HEKa 세포에 대한 보호 효과를 제공하는 0.1 μ g/mL 칼시트리올의 능력을 평가하도록 설계된 분석에서 사용하였다. 이들은 에를로티니브(타르세바), EGFR Tyr 키나제 억제제; 게푸투비브(이레사), EGFR Tyr 키나제 억제제; 소라페니브, 몇몇 Tyr 키나제의 억제제(Raf, VEGF-R2, c-키트, PDGF-R); 다사티니브, BCR/ABL Tyr 키나제 억제제; 및 스타우로스포린, 비교적 비특이적 키나제 억제제를 포함한다.

[0404] 이들 실험에서 수득된 용량 곡선은, 낮은 약물 용량 수준(전신 전달된 화학요법을 경험한 환자 피부에 영향을 미치는 것과 다르지 않음)에서 칼시트리올은 특정한 성장 자극을 제공하고 HEKa 세포를 보호하는 일반적 동향을 나타낸다(도 5 내지 9 참조). 또한, 칼시트리올은 보다 비특이적 키나제 억제제와 비교하여 보다 특이적 키나제 억제제에 대한 보다 현저한 보호 효과를 갖는 것으로 나타났다.

[0405] 유사하게는, 칼시트리올은 또한 시스플라틴 및 카보플라틴 등의 알킬화제의 저용량 수준에 대해 중간 수준의 보호를 나타내었다(도 10 및 11 참조).

[0406] 이리노테칸은 아마도 토포이소머라제 I과의 상호작용을 통해 세포 성장을 억제한다. 이리노테칸에 대한 포지티브 보호 효과가 또한 칼시트리올의 존재하에 관찰되었다(도 12 참조).

[0407] 파클리탁셀은 유사분열 억제제이다. 0.1 μ g/mL의 칼시트리올의 존재는 파클리탁셀에 대한 약간의 보호 효과를 제공한다(도 13).

[0408] 5-플루오로우라실(5-FU) 등의 피리미딘 항대사물질 기반 약물은 다양한 방식으로 작용하지만, 원칙적으로 티미딜레이트 신타제 억제제로서 작용한다. 5-FU는 티미딘의 합성을 차단하고, 이는 DNA 복제에 필요하다. 따라서, 5-플루오로우라실은 광선(일광) 각화증 및 피부의 몇몇 형태의 기저 세포 암종을 치료하는데 국소적으로 사용되었다. 5-FU에 대한 적어도 완만한 보호 효과는 0.1 μ g/mL의 칼시트리올이 존재할 때에 관찰된다(도 14).

[0409] 젬시타빈은 데옥시시티딘의 2' 탄소 상의 수소원자가 불소원자로 치환된 뉴클레오사이드 유사체이다. 플루오로우라실 및 기타 피리미딘 유사체와 유사하게, 젬시타빈은 DNA 복제 동안 핵산(이 경우, 시티딘임)의 빌딩 블록

중의 하나를 대체한다. 겐시타빈은 다양한 암종: 비소형 세포 폐암, 췌장암, 방광암 및 유방암의 치료에 사용된다. 도 15는, 0.1 μ g/mL의 칼시트리올이 존재할 때, 겐시타빈에 대한 적어도 온화한 보호 효과가 관찰됨을 나타낸다.

- [0410] 한편, 칼시트리올은 독소루비신의 세포독성 효과에 대한 현저한 보호 효과를 제공하는 것으로 나타나지 않았다 (도 16). 또한, 타목시펜에 대한 임의의 보호 효과는 약하다(도 17). 타목시펜은 중앙 및 기타 조직 표적물상의 에스트로겐 수용체에 경쟁적으로 결합하여, DNA 합성을 감소시키고 에스트로겐 효과를 억제시키는 핵 복합체를 생성한다.
- [0411] 상기 데이타와 일치하게, 도 18 중의 데이타는 HEKa 케라티노사이트가 칼시트리올에 의해 성장 자극되었고, 5-FU에 대한 일부 보호 수준이 HEKa 세포에서 관찰되었음을 나타낸다. 흥미롭게도, 3개의 시험된 암 세포주, 즉 Hep-G2, PaCa-2 및 SKMEL-28에서, 5-FU 처리에 대한 ED₅₀ 곡선은 0.1 μ g/mL 칼시트리올 보충물을 갖는 것들과 현저히 상이하지 않았다. Hep-G2 세포는 칼시트리올 처리에 의해 완만하게 자극되었지만, 이의 5-FU ED₅₀ 곡선은 칼시트리올의 존재하에도 실질적으로 변화하지 않았음에 주목한다.
- [0412] 유사하게는, 2 계대 동안 2 내지 0.1 μ g/mL의 칼시트리올에 대한 하기 4개 시험된 암 세포주: Hep-G2, MCF-7, PC-2 및 PaCa의 노출은 다른 약물(예를 들면, 독소루비신, 시스플라틴 및 에를로티니브)에 대한 이들 세포의 반응을 변화시키지 않았다.
- [0413] 상기 이들 결과는 칼시트리올이, 암세포에 대한 화학요법의 효과를 길항시키지 않고서, 화학요법(예를 들면, 5-FU를 사용) 동안 정상 케라티노사이트(예를 들면, HEKa)를 보호할 수 있음을 시사한다.
- [0414] HEKa 세포에서 관찰된 것과 같이, 칼시트리올은 SkBr-3, SKMEL-28, PaCa-2, MCF-7, NCI-ES-0808, Hep-G2 및 NIH-3T3과 같은 암/비사멸 세포에 대한 독소루비신의 세포독성 효과를 인지가능하게 변화시키지 않는 것으로 나타났다(도 19 참조).
- [0415] 또한, 칼시트리올과 시판 약물과의 가능한 상승작용 효과가 연구되었다. 이들 실험에서, 선택된 시판 약물은 세포 배양을 위한 최종 목적 농도보다 4배 높은 농도에서 개시하여 연속으로 희석시킨다. 한편, 0.4 μ g/mL 칼시트리올의 스톱을 제조한 다음, 연속 희석된 약물(1:1의 비율)과 혼합하였다. 이어서, 약물/칼시트리올 혼합물을 적어도 15분 동안 배양하고, 세포 배지에 (100 μ L 대 100 μ L의 비율로) 첨가하였다. 따라서, 최종 칼시트리올 농도는 0.1 μ g/mL이었다.
- [0416] 약물 처리 기간은 통상 3일이었다. 3일 말기에, 96웰 플레이트의 배경 OD는 280nm에서 판독하고, 사전에 20 μ L의 "기질 세포 역가 96 수성 1성분 용액 시약(Substrate Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent)"(Promega)을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 37 $^{\circ}$ C 배양기에 반납하고, 490nm에서 이의 OD를 대략 1.5의 OD에 도달할 때까지 매시간 판독하였다. 순 OD 증가는 예비 기질 OD 판독치를 제외하여 계산하였다.
- [0417] 세포에 대한 약물의 영향은 대조군 웰(약물 비함유)의 OD와 관련하여 상이한 농도에서 OD를 비교하여 계산하였다. 약물 농도의 함수로서 순 OD의 결과를 플롯팅하고, 이를 사용하여 ED₅₀ 값을 측정하였다.
- [0418] HEKa 세포 결과의 분석은 칼시트리올과 5-FU, 독소루비신, 타목시펜, 이리노테칸, 파클리탁셀, 카보플라틴, 스타우로스포린, 빈크리스틴, 시스플라틴, 에를로티니브, 겐시타빈, 이미티니브, 게피티니브, 소라피니브 및 다사티니브를 포함하는 대부분 시험 약물 사이에 어떠한 상호작용도 없음을 나타낸다. 동일한 결과는, 약물 병용물을 다른 세포에 대해 시험하는 경우에도 수득되었다. 따라서, 어떠한 특정 이론에 국한시키고자 하는 것은 아니지만, 칼시트리올 및 상기 약물의 작용 메카니즘은 상이한 것으로 나타났다.
- [0420] 실시예 8: 칼시트리올을 사용한 세포의 전처리: 화학요법 약물의 존재 및 부재하에 칼시트리올의 세포-기반 분석 시험
- [0421] 세포 생존력을 평가하는 상기 세포-기반 분석을 당해 실시예에 사용하여, 선택된 화학요법 약물의 작용에 대한 칼시트리올의 잠재적 보호 효과를 평가하였다. 각 세포주는 0.1 μ g/mL 칼시트리올의 존재하에 2개 세포 계대 동안 성장시켰다. 이어서, 이들 전처리된 세포를 사용하여 세포-기반 분석을 설정하였다. 또한, 비처리 세포를 사용하여 이중 약물/칼시트리올 농도하에 병행 실험을 확립하였다. 이는 화학요법 약물의 투여 전에 장기간 칼시트리올 노출의 잠재적 효과에 대한 병행 비교를 가능하게 하였다.
- [0422] 5개 세포주 각각을 0.1 μ g/mL 칼시트리올의 존재하에 2개 세포 계대 동안 성장시킨 후, HEKa 세포만이 이들의 전체 성장 및 모폴로지에 있어서 현저히 영향받았다. 4개의 암 세포주는 계속 성장시키고, 이들의 일반적인 모폴

로지 외관은 변화되지 않았다. 그러나, HEKa 세포는 장기간 칼시트리올 노출 후에 성장을 멈췄고, 이들의 모폴로지는, 칼시트리올 처리 전의 보다 분지된 외관과는 반대로, 한 방향으로 신장된 것으로 변화하였다. 이 세포주
의 경우, 새로운 세포 배치를 개시하고, 화학요법 약물의 존재하에 시험하기 전에, 칼시트리올의 존재하에 단일
계대에만 노출시켰다.

[0423] 3개의 통상 사용된 화학요법 약물(독소루비신, 시스플라틴 및 에를로티니브)을 선별하여 칼시트리올 처리된 세
포를 평가하였다. 시판 약물과 칼시트리올과의 가능한 상승작용 또는 보호 효과가 조사되었다. 이들
실험에서, 시판 약물은 세포 배양을 위한 최종 목적 농도보다 4배 높은 농도에서 개시하여 연속으로
희석하였다. 0.4 μ g/mL의 칼시트리올의 스톱을 제조하고, 연속 희석된 약물에 (1:1 비율로) 첨가하였다. 약물
과 칼시트리올의 혼합물을 적어도 15분 동안 항온처리하고, 세포에 (100 μ L 대 100 μ L의 비율로) 첨가하였다.
따라서, 최종 칼시트리올 농도는 0.1 μ g/mL이었다.

[0424] 분석을 상기 기재된 방법에 따라 수행하여, 일관성을 제공하고 직접 비교를 가능하게 하였다. 당해 결과는 생
존 세포의 전체 수의 측정에 기반하였다. 결과(도시하지 않음)는 칼시트리올 전처리가 세포 배양물에 대한 화
학보호 효과에 필수적이지 않음을 나타낸다. 당해 결과는 전처리 그룹과 동시 처리 그룹 사이에서 거의 동일하
였다. 따라서, 칼시트리올의 국소 적용은 화학요법의 전신 전달과 동시에 적용될 수 있다. 단계적 적용은 필
요하지 않다.

[0426] 실시예 9: 신규 칼시트리올 제형에 의한 화학요법-유도된 탈모증(CIA)의 보호

[0427] 탈모증은 현재 치료적 개입이 없는 화학요법의 가장 곤란한 부작용 중의 하나이다. 신생아 래트는, 성장기 모
공 패턴이 사람과 유사하기 때문에, 화학요법-유도된 탈모증(CIA)를 연구하기 위한 우수한 모델인 것으로 입증
되었다.

[0428] 본 연구에서, 세코스테로이드 칼시트리올(USP 등급)을 국소 제형(40%(w/w) 프로필렌 글리콜, USP; 및 60%(w/w)
탈수 알콜, 200 proof, 비변성 USP)에 용량 및 시간 의존적 방식으로 전달하여 CIA를 치료/예방하였다.

[0429] 구체적으로, 새끼를 가진 롱 에반스(Long Evans) 및 스프라그 다울리(Sprague Dawley) 래트를 할란 라보라토리
즈, 인코포레이티드(Harlan Laboratories, Inc.)로부터 구입하였다. 이들을 하우징하고, 적용가능한 동물 취급
규칙 및 규정에 따라 먹이를 주었다. 새끼는 실험 개시 전에 48시간 동안 순응시켰다. 세코스테로이드 칼시트
리올 제형(상기 참조) 또는 비히클 대조군(칼시트리올 비함유)을 두경부 상에 5일째에 개시하여 연속 6일 동안
매일 국소 적용하였다. 래트를 6시간 동안 이들의 한배 새끼 및 어미로부터 격리시켰다. 후속적으로, 처리된
부분은 비누 및 물로 세정하고, 새끼를 이들의 한배 새끼에게 돌려놓았다. 13일째에, 래트에게 에토포사이드(3
일 동안 매일 1.5mg/kg) 또는 사이클로포스파미드(CTX)(37.5mg/kg 1회) 또는 병용물 사이클로포스파미드
(35mg/mg 1회) 및 독소루비신(3일 동안 매일 2.5mg/kg)을 제공하였다. 모든 화학요법제는 시그마(Sigma)로부터
구입하였고, 0.1mL의 전체 용적으로 복강내(i.p.) 제공하였다. 탈모증은 화학요법의 최종 투여후 10일에 기록
되었다.

[0430] 생후 5일째에 녹색백혈병을 래트에게 이식한 실험의 경우, 래트는 각각 45마리의 3개 그룹으로 무작위로 나누었
다. 모든 래트에게 0.1mL의 혈청 비함유(SF) RPMI 중의 1×10^5 녹색백혈병 세포주 MIAC51(i.p.)을 투여하였
다. MIAC51을 L-글루타민 및 10% 소 태아 혈청이 보충된 RPMI 1640에서 37°C 5% CO₂, 100% 습도 배양기에서 배
양하였다. 세포는 50% 컨플루언시(1.5 \times 10⁶mL)로 성장시키고, 50mL 원추형 튜브에 수집하고, 600g \times 10분으
로 실온에서 원심분리하고, 1×10^6 /mL의 농도로 SF-RPMI에 재현탁시켰다. 그룹 1 래트는 추가의 처리를 제공
하지 않았다. 그룹 2 래트는 13일째에 국소 비히클 및 CTX를 제공하였다. 그룹 3 래트는 13일째에 국소 칼시
트리올 제형(0.1 μ g) 및 CTX를 제공하였다. 국소 적용은 상기한 바와 같이 수행하였다.

[0431] 생후 23일째에, 혈액 샘플을 모든 래트로부터 수집하고, 분별을 수행하였다. 백혈병을 갖는 래트를
희생시키고, 백혈병이 없는 래트를 유지시키고, 제2 분별을 31일째에 백혈병이 검출되는 임의 시점에서 수행하
고, 동물을 CO₂ 질식으로 희생시켰다.

[0432] 결과는 전체 신체 탈모증이 에토포사이드를 투여한 그룹에서 관찰되었음을 입증하였다. 대조적으로, 6시간 동
안 0.1 μ g의 칼시트리올로 처리한 래트에서, 부분 국지화 보호가 모든 동물에서 관찰되었다. 0.3 μ g 칼시트리올
을 투여한 그룹에서, 전체 신체 보호가 달성되었다. 도 20a 및 20b 참조.

[0433] 사이클로포스파미드를 투여한 그룹에서, 대조군 래트는 전체적으로 탈모증으로 된 반면, 0.1 μ g 칼시트리올을 투
여한 래트는 에토포사이드에서 관찰된 것과 유사한 보호를 달성하였다. 마찬가지로, 0.3 μ g 칼시트리올의 투여

는 사이클로포스파미드-처리된 래트에서 완전한 신체 보호를 유도하였다. 도 21 참조. 기타 화학요법 또는 병용 화학요법 용법을 사용한 유사한 결과가 도 22a, 22b, 22c 및 23에 도시되어 있다.

[0434] 래트에게 녹색백혈병을 이식한 별도의 실험에서, 예비 결과는 칼시트리올의 국소 적용에 의해 사이클로포스파미드로부터 암 세포의 보호를 나타내지 않았다. 도 24 참조.

[0435] 결론적으로, 대상 제형 중의 칼시트리올에 의한 전처리는 암 세포의 보호 없이 CIA에 대한 보호를 제공하였다. 국소 칼시트리올은 병용 화학요법 뿐만 아니라 단일 화학요법으로 유도된 CIA로부터 용량 의존 방식으로 CIA를 예방하였다. 또한, 국소 칼시트리올은 CIA를 예방하면서, 화학요법의 세포독성 효과로부터 암 세포를 보호하지 않았다.

[0437] 실시예 10: 다중 화학요법 용법을 제공한 녹색백혈병 래트에서 국소 칼시트리올에 의한 CIA의 보호

[0438] 본 연구는 다중-코스 화학요법-유도된 탈모증의 동물 모델에서 국소 칼시트리올 용액의 보호 효과를 증명한다. 본 연구에 사용된 래트는 MIAC51을 보유하고, 래트 녹색백혈병 세포주를 래트 신생아내로 20-메틸콜라트렌의 위장 주입(instillation) 및 녹색백혈병 세포의 후속적 주입에 의해 발병시켰다. MIAC51 세포주는 사람 녹색백혈병(백혈병, 백혈성 복수 및 골수성녹색종 형성)의 특성을 갖는 악성 골수성 백혈병을 유발한다[참조: Jimenez et al., Science 238: 1278-1280(1987)].

[0439] 현재까지, 화학요법-유도된 탈모증(CIA)을 시험하기 위한 효과적인 시험관내 또는 무척추 모델은 없다. 대부분 사용된 모델 중에서, 지메네즈 등(Jimenez et al.)에 의해 개발된 신생아 래트는 사람과의 직접 상관관계를 입증하였다[참조: Int J Cancer 1996; 65: 97-103, 참조로서 도입됨]. 이어서, 제2 성장기가 모발을 클리핑(clipping)하여 유도될 수 있고, 이에 의해 화학요법의 다중 과정을 시험할 수 있는 래트 모델을 개발하였다. 이 모델을 사용하여, 사이클로포스파미드, 독소루비신, 파클리탁셀, 에토포사이드 및 시타라빈 및 이들의 병용물을 포함하는 빈번히 사용된 탈모증 화학요법을 시험할 수 있다.

[0440] 화학요법-유도된 탈모증에 대한 보호제를 시험하는 경우, 시험 물질이 모낭 및 또한 암 세포를 화학요법으로부터 보호하고/하거나 요법을 간섭하는지를 측정하는 것이 바람직하다. 지메네즈 등에 의해 개발된 신생아 래트 백혈병 모델은 백혈병의 발병, 백혈병의 치료, 화학요법제와의 잠재적 상호작용에 대한 비타민 D 화합물의 임의의 효과 및 화학 유도된 탈모증의 예방에 대한 비타민 D 화합물의 효과를 동시에 시험할 기회를 제공한다. 당해 모델은 또한 동일한 동물에서 시험 제제의 다중 사이클이 모낭의 보호를 수회 야기할 것인지의 문제에 답한다. 또한, 착색된 롱 에반스 래트를 사용함으로써, 당해 연구는 또한 시험 제제가 모발 색을 보호하는지를 측정하게 한다.

[0441] 칼시트리올 제형은, USP 등급의 프로필렌 글리콜(40% w/w) 및 무수의 순수 에탄올, 200 proof(60% w/w)를 함유하는 비히클 중에 USP 등급의 칼시트리올을 함유하는 투명한 무수 액체이다. 이들 연구에서 칼시트리올의 농도는 약 $0.2\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ ($2\mu\text{g}/\mu\text{L}$)이다. 시험 물질은 얼음 위에 제공하고, 도착시 4 내지 5°C에서 즉시 저장하였다. 이어서, 콧트는 4.5mL 튜브로 세분하고, 얼음 위에 유지시킨다. 동물 그룹은 변수당 40개 이상일 것이며, 각 4.5mL 단위의 시험 물질은 콧트 번호와 함께 4 내지 5°C에서 폴리프로필렌 튜브에 팩킹될 것이다. 4.5mL 튜브의 시험 물질은 암실 박스에 유지시키고, 실험당 필요한 양만을 냉장고에서 꺼낸다. 4.5mL 튜브에 팩킹된 시험 물질 샘플은 칼시트리올 수준을 측정하기 위해 규칙적인 간격으로 분석될 것이다. 실험시, 튜브는 얼음 위에 유지시키고, 래트를 처리한다.

[0442] 비히클은 USP 등급의 프로필렌 글리콜(40% w/w) 및 USP 등급의 무수의 비변성 순수 에탄올, 200 proof(60% w/w)로 구성된다. 실험시, 대조군 비히클은 엄밀히 시험 물질로서 취급한다.

[0443] 시험 물질 뿐만 아니라 비히클 자체 둘 다를 시험한다. 각 시험 그룹은 40마리 동물로 이루어지고, 이는 본 연구를 위해 통계학적으로 유의하다. 이 숫자는 모델 감소를 포함하고, 동물 수를 감소시키는 임의의 결과를 설명한다. 모든 동물은 이들이 5일령이 된 때에 MIAC51을 주사한다. 5가지 화학요법 용법을 시험한다: 사이클로포스파미드, 사이클로포스파미드/독소루비신, 사이클로포스파미드/독소루비신/시타라빈, 사이클로포스파미드/파클리탁셀/에토포사이드 및 독소루비신/파클리탁셀/에토포사이드. 시험 그룹은 다음과 같다: 화학요법 없음, 화학요법 단독, 화학요법 + 비히클, 화학요법 + 시험 물질 = 160마리 동물/화학요법 용법. 따라서, 사용된 동물의 최종 평가된 수는 다음과 같다: 5가지 병용 화학요법 용법 \times 160마리 동물 = 800마리 새끼/래트. 제2 성장기 성인 래트 모델을 사용한 실험의 경우, 암 부재 동물(예를 들면, 화학요법에서 생존한 동물들)만이 사용되고, 백혈병의 초기 징후를 나타내는 동물은 안락사시킨다.

[0444] 샤이(Shay) 녹색백혈병 MIAC51 세포주의 배양: MIAC51을 문헌[참조: Science 1987; 238: 1278-80]에 이미 기재

된 바와 같이 37℃에서 100% 습도로 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 세포는 L-글루타민 및 10% 소 태아 혈청(Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) 중의 비조직 배양-처리된 플라스크(Falcon)에서 성장시킨다. 세포를 동물에게 주입하기 전에, 이들은 50% 컨플루언스까지 성장시키고, 원추형 튜브에 수집하였다. 이어서, 세포를 10분 동안 실온에서 600g으로 원심분리하고, 소 태아 혈청이 부재하는 RPMI 1640에서 농도 1×10^6 으로 재현탁시켰다. 이어서, 세포 현탁액을 멸균 조건하에 29게이지(ga). 1/2cc 인슐린 시린지로 옮겼다.

[0445] MIAC51의 주입: 모든 새끼는 MIAC51의 주입시에 5일령이고, 수동으로 억제한다. 우측 다리를 부드럽게 잡아당기고, 이 부분을 알콜 면봉으로 세정한다. 이어서, MIAC51을 복강내 주사한다. 시린지 내의 바늘, 경로 및 세포는 멸균시키고, 각 주사마다 새로운 시린지를 사용한다. 백혈병의 초기 징후의 발병은 통상 21 내지 33일 동안 관찰된다. 따라서, 혈액 도말표본은 23일째 및 31일째에 수행한다. 암이 없는 동물만을 31일째에 면도하고, 나머지는 안락사시킨다.

[0446] 신생아 래트에서 제1 성장기에 시험 및 대조군 물품 투여: 각각의 한배 새끼에게 약 2cm²의 두경부 상에 국소적으로 비히클 또는 시험 물품을 투여한다. 5일 및 6일령 래트의 경우, 100 μL를 더 작은 크기로 적용하기 위해 4개 분취량의 25 μL로 4회 적용한다. 시험 물품 또는 비히클은 200 μL 멸균 팁을 사용하여 보정된 마이크로피펫으로 적용한다. 시험 물품 또는 비히클이 머리 표면에 존재하는 경우, 이를 완전히 흡수될 때까지 장갑을 낀 손가락으로 문지른다. 즉시, 또다른 분취량을 두부에 적용하고, 당해 방법을 100 μL 총 시험 물품 또는 비히클이 적용될 때까지 반복한다. 7일, 8일, 9일 및 10일령 동물의 경우, 50 μL 분취량을 2회 적용한다. 보다 나이가 많은 동물에게는, 100 μL를 1회 용량으로 적용할 수 있다. 시험 물품의 적용은 두경부에 적용하고, 우측 집게손가락으로 10초 동안 용매 내성 니트릴 장갑을 사용하여 문지른다. 이러한 적용 용법에 대한 이유는 상이한 연령에서 포화 속도가 상이할 수 있고 시험 물품 또는 비히클의 전달이 또한 상이할 수 있기 때문이다. 용액이 피부에 완전히 침투되면, 새끼를 6시간 동안 특별하게 설계된 격리 구획을 갖는 케이지에 격리하여 유지시킬 수 있다. 이어서, 새끼를 마일드 실험실용 손 비누(Soft-Cide EC, VWR International)로 세척하고, 종이 타월로 주의 깊게 건조시킨다.

[0447] 신생아 래트의 제1 성장기에서 화학요법의 투여: 40마리 새끼에게 각각 화학요법 용법을 제공하고, 40마리에게 각각의 화학요법 용법 및 시험 물품을 제공하며, 40마리에게 각각의 화학요법 용법 및 비히클을 투여한다. 대조군으로서, 40마리 동물에게 화학요법을 제공하지 않는다. 각 한배 새끼의 중량 평균을 수득하고, 이를 사용하여 화학요법의 적합한 농도를 제조한다. 화학요법은 29 ga. 1/2cc 인슐린 시린지를 사용하여 동물의 중량에 따라 대략 100 μL의 용적으로 복강내 주사한다. 주사할 때, 각 새끼의 우측 다리를 부드럽게 잡아당긴 다음, 당해 부분을 알콜 면봉으로 세정한다.

[0448] 성인 래트의 제2 성장기에서 시험 및 대조군 물품 투여: 혈액 도말표본의 혈액학적 분석에 따라 31일째에 암이 없는 것으로 증명된 생존자를 수동으로 저지하고, 두경부 영역(2 내지 3cm²)을 면도하였다. 9일 후, 래트가 포괄적으로 40일령 내지 45일령인 경우, 비히클 또는 시험 물품을 두경부에 적용한다. 100 μL의 양을 두경부에 1회 용량으로 적용하고, 용매 내성 니트릴 장갑으로 10초 동안 우측 집게손가락으로 문지른다. 용액이 피부를 완전히 침투한 경우, 단일 래트를 케이지에 격리하여 유지시킨다. 이어서, 래트를 마일드 실험실용 손 비누(Soft-Cide EC, VWR International)로 세척하고, 종이 타월로 주의깊게 건조시킨다.

[0449] 제2 성장기 성인 래트에서 화학요법의 투여: 각 그룹에게, 병용 시타라빈을 제공한 것들에 대해 47일째에 개시하여 53일째에 종료하는 5개의 상이한 화학요법 용법 중의 하나를 제공한다. 중량 평균을 수득하고, 이를 사용하여 화학요법의 적합한 농도를 제조한다. 화학요법제를 29ga. 1/2cc 인슐린 시린지를 사용하여 동물의 중량에 따라 약 100 μL의 용적으로 복강내 주입한다. 화학요법제를 투여하기 위해, 마취제를 사용하지 않고서 래트를 수동으로 저지한다. 주사 부분은 알콜 면봉으로 세정한다.

[0450] 투여 경로: 시험 물품 및 비히클을 피부 적용한다. 화학요법을 복강내 주사한다.

[0451] 투여 빈도 및 투여 기간 및 용량 수준 및 용적: 시험 물품 및 비히클은 제1 및 제2 성장기 사이클 둘 다에 대해 6일 동안 매일 투여한다. 시험 물품은 프로필렌 글리콜/에탄올 중에 2μg/mL 칼시트리올의 농도를 함유하고, 비히클은 프로필렌 글리콜/에탄올 비히클만을 함유한다. 화학요법은 중량 기준으로 약 100 μL의 용적으로 복강내 제공한다.

[0452] 겔보기 관찰 및 탈모증의 등급화: 전체(두경부) 또는 완전한 신체 탈모증은 다음 척도를 사용하여 등급화한다:

0 = 탈모증 없음; 1+ = 0 내지 25% 탈모증; 2+ = 25 내지 50% 탈모증; 3+ = 50 내지 75% 탈모증; 4+ = 75 내지 100% 탈모증. 겔보기 관찰 척도를 매일 사용하여, 통상의 케이지 관찰을 수행하면서 탈모증을 등급화한다. 또한, 이러한 척도는 전체 한배 새끼 또는 성인 래트가 모발을 소실하는 경우에 사진 증거를 보충한다.

- [0454] 실시예 11: 피부 흡수 연구: 고틡겐 미니피그(Göttingen Minipigs®)에서 칼시트리올 용액의 국소 적용 및 생체 외 돼지 피부에서 칼시트리올의 정량화
- [0455] 돼지는, 돼지의 피부가 사람과 매우 유사하기 때문에, 피부 전달 경로를 수반하는 독성 연구에 빈번히 사용된다. 따라서, 돼지를 본 연구에 사용하여, 피부 투여 7일 후, 고틡겐 미니피그®에서 칼시트리올 국소 제형의 피부 내성 및 피부 침투성을 평가한다.
- [0456] 3마리 수컷 및 3마리 암컷의 고틡겐 미니피그의 하나의 처리 그룹에게 0(위약), 1, 3, 10 및 30 μ g/mL의 투약 농도로 5개의 별개의 투여 부위에 시험 또는 위약 물품을 피부로 투약하였다. 1마리 수컷 미니피그의 추가 처리 그룹에게 각각 0(위약) 및 100 μ g/mL의 투약 농도로 2개의 별개 투여 부위에 시험 또는 위약 물품을 피부로 투여 하였다. 위약 또는 시험 물품은 두 그룹에게 각종 농도의 활성 성분 및 비히클을 함유하는 시험 용액을 적용 부위당 4mg/cm²(6cm × 6cm 시험 부분에서 144mg에 상응한다), 또는 166 μ L의 적용 비율로 연구 동안 7일간 약 6시간 간격으로 매일 2회 투여하였다.
- [0457] 질병률, 사망률, 손상 및 식품 및 물의 적용성에 대한 관찰은 모든 동물에 대해 매일 2회 수행하였다. 임상적 관찰은 매일 수행하였다. 피부 반응의 평가는 시험전, 및 투여 전에 매일 수행하였다. 체중을 측정하고, 시험 전 및 말기(7일째)에 기록하였다. 신체 검사는 시험전에 수행하였다. 연구 말기에, 부검 조사를 수행하고, 처리 및 미처리 피부의 절편을 수집하여 보존하였다. 처리 부위 근처의 미처리 피부 부위 뿐만 아니라 피부 부위 각각의 현미경 검사를 수행하였다.
- [0458] 결과는 고틡겐 미니피그®에 대한 0, 1, 3, 10, 30 및 100 μ g/mL의 농도로 칼시트리올 국소 제형의 피부 투여는 충분히 내성이 있음을 나타낸다. 어떠한 처리 효과도 임의의 처리 부위에서 생존률, 임상 발견, 피부 자극, 체중, 피부의 육안 또는 현미경 검사에서 관찰되지 않았다(테이타는 도시하지 않음). 조직 분포 연구로부터의 테이타는 칼시트리올이 대부분의 각질층 및 표피 샘플의 기타 부분에서 측정가능하지만, 진피 샘플에서 측정불가능함(단일 수컷 미니피그에 대한 100 μ g/mL 용량 적용의 단일 예외를 포함함)을 나타낸다. 이 실험의 세트에서, 수컷은 암컷보다 큰 칼시트리올 조직 수준을 증명하는 것으로 나타났다. 조직 수준에 대한 가장 명백하게 적용된 용량 상관관계는 3 μ g/mL로부터 100 μ g/mL로 칼시트리올 농도의 증가가 거의 선형 증가로 표피에서 관찰되었다.
- [0459] 구체적으로, 위약(프로필렌 글리콜(USP) 및 무수 에탄올(비변성), 200 proof - U.S., USP의 40/60 혼합물(w/w)) 및 칼시트리올 국소 제형을 1, 3, 10, 30 및 100 μ g/g의 예비 제형화된 농도로 사용하였다. 시험 물품을 순수하게 (희석하지 않고) 투여하였다. 위약 및 시험 물품의 제형은 1일 사용을 위해 한번 각 요구되는 농도로 분배하고, 실온에서 저장하였다.
- [0460] 3마리 수컷 및 3마리 암컷 실험용 비처리(naive) 고틡겐 미니피그®(대략 4 내지 5개월령) 전체를 마샬 바이오 리소스(Marshall BioResources, North Rose, New York)로부터 제공받았다. 추가의 수컷(수령시 대략 4.5개월령)을 저장 콜로니로부터 나중에 옮겼다. 단일 랜덤화 절차를 사용하여, 4마리 수컷 및 3마리 암컷 동물(무작위로 각각 체중 11.75 내지 15.55kg 및 14.50 내지 16.65kg)을 위약 및 처리 그룹으로 할당하였다. 위약 및 시험 물품을 연구 동안 7일간 대략 6시간 간격으로 매일 2회 피부로 투여하였다. 투약 농도는 0, 1, 3, 10, 30 및 100 μ g/mL이었고, 4mg/cm²(시험 용액 144mg 또는 166 μ L에 상응함)의 적용율로 투여하였다. 투여를 개시하기 전(각각 그룹 1 및 2에 대해 -4일째 및 -5일째)에, 모발을 전기 클리퍼를 사용하여 적용 부위로부터 깎았다. 피부의 침식을 피하도록 주의해야 한다. 각 동물의 척추 표면을 그룹 1에 대해 5개의 적용 부위로, 그룹 2에 대해 2개의 적용 부위로 나눈다. 각각의 적용 부위는 각 부위 사이에 적어도 2cm 공간을 갖는 대략 6 × 6cm 이었다. 위약 및 시험 물품 제형은 유리 교반 막대 또는 적절한 장치로 명시된 적용 부위에 균일하게 적용하였다. 투약 전에, 이전 용량으로부터의 잔류 시험 물품은 수돗물로 습윤된 연질 종이 타월(즉, WyPall®)을 사용하여 부드럽게 제거하였다.
- [0461] 연구 말기에, 피부를 복부 중앙 절개로부터 반사시키고, 처리 및 비처리 피부의 절편을 수집하여 보관하였다. 각각 6 × 6cm 투약 부위의 절편을 마일드 비누 및 물 혼합물(예를 들면, 물 중의 1% Ivory Soap 또는 등가물)로 전체적으로 표면 세척하여 임의의 잔류하는 국소 시험 제형을 제거하였다. 이어서, 세척된 피부 절편을 에탄올로 깨끗하게 세정하고, 지방 층을 포함하도록 하향 절개하였다. 절개된 부분이 투약 부분보다 큰 경우, 투

약 부분은 지울수 없는 잉크로 경계를 지정하여, 투약된 피부 영역을 나타내었다. 1.5cm × 1.5cm 절편을 평편하게 놓고, 2개 층의 사란(Saran) 랩(또는 등가물)으로 감싸고, 액체 질소로 순간 동결시켰다. 샘플은 -70℃에서 저장하고, 분석을 위해 밤새 태백를 통해 드라이 아이스 상에서 운송하였다. 각 피부 절편은 적절한 것으로 동정되었다(예를 들면, 동물 동정, 연구 수, 날짜 등).

[0462] 분석 위치에 도착시, 피부 절편을 수 긴밀 플라스틱 백에 위치시키고, 온수(약 30℃ 내지 35℃)에 담가 해동시켰다. 각 피부 절편을 증류된 탈이온수로 서서히 세정하여 임의의 잔류 시험 물질 및 혈액을 제거하였다. 모든 피하 조직(예를 들면, 지방)은 수동 외과용 메스 제거로 제거하였다. 투약된 영역의 중심 지역 내에서, 4개의 개별적인 1cm² 원(복제물)을 경계 추정하고, 각 부위를 후속적으로 동정하고, 실제 영역을 기록하였다. 이어서, 복제 시험 부위를 1cm² 펀치를 사용하여 피부 시트로부터 절제하였다. 피부 절편을 칭량하고, 중량을 기록하였다. 각 복제 경계 지정된 영역은 영역 표면의 약 10% 내지 25%가 반짝거림(glistening)을 나타낼 때까지 충분한 회수(약 10회 내지 약 20회) 테이프 박리시켰다(TransporeTM, 3M). 이 방법은 각질층 및 임의의 잔류 표면 용량을 제거하였다.

[0463] 테이프 박리 후, 피부를 60℃로 약 1 내지 1.5분 동안 가열 노출시킴으로써 표피(각질층 없는, 이후 본원에서 단순히 "표피"로서 칭명됨) 및 진피로 분리하였다. 이어서, 피부 층을 파인-팁 검자 및 외과용 메스를 사용하여 별도로 떼어냈다. 표피 및 진피를 칭량하고, 중량을 기록하였다.

[0464] 추출을 위해, 모든 피부 샘플을 1mL의 무수 에탄올(Sigma-Aldrich, USP/NF 등급) 중에서 추출하였다. 테이프 스트립은 5mL 아세토니트릴(EMD, HPLC 등급) 중에서 추출하였다. 모든 추출은 실온에서 약 24시간 동안 수행하였다. 500μL의 테이프 스트립 추출물의 양을 진공 원심분리로 건조시키고, 100μL 무수 아세토니트릴로 재구성하였다. 표피 추출물을 또한 건조시키고, 100μL의 80:20 에탄올:물로 재구성하였다.

[0465] 칼시트리올의 정량화는 자외선 및 질량 분석 검출기를 갖는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 수행하였다. 검출 하한치는 0.4ng/mL에서 계산된다.

[0466] 각질층(테이프 스트립), 표피 및 진피로부터 칼시트리올의 정량화 결과는 표 11-1 내지 11-4에 요약된다. 도 25a 및 25b는 각각 각질층 및 표피에서의 수준을 예시하고, 도 26은 단지 수컷에서의 표피 수준을 예시한다. 각질층 데이터는 샘플 면적의 함수로서 테이프 박리된 샘플 중에서 회수된 칼시트리올의 양을 반영하기 위한 ng/cm², 및 μg/mg 조직으로서 계산된 2개의 상이한 단위로 제공된다. 그러나, μg/mg으로서 기록된 농도는 (테이프 스트립에 대한 이의 부착성에 기인하여 실제 중량보다는) 층 분리 전 총 샘플 중량에서 그 샘플의 표피 및 진피의 중량을 뺀 차이로 측정된다. 표피 및 진피 샘플은 피부 층의 실제 습윤 중량으로 나누어진 샘플로부터 측정된 양을 사용하여 조직 농도(ng/mg)로서 기록된다.

[0467] [표 11-1]

[0468] 회수된 칼시트리올의 각질층(ng/cm²) 평균 ± SD(n= 동물의 수[4개의 복제물/동물])

치료	수컷 미니피그	암컷 미니피그
비처리	0 ± 0* (1)	na
위약	30.2 ± 35.0 (4)	0 ± 0 (3)
1 μg/mL	56.1 ± 17.4 (3)	0.76 ± 1.3 (3)
3 μg/mL	62.4 ± 7.91 (3)	1.12 ± 1.49(3)
10 μg/mL	59.6 ± 14.1 (3)	1.65 ± 1.80 (3)
30 μg/mL	54.6 ± 32.5 (3)	20.2 ± 11.7 (3)
100 μg/mL	118.1 ± 11.4 (1)	na

[0469]

[0470] * 제로 값은 검출 하한치 이하의 결과를 나타낸다.

[0471] ** 피부로부터 방출되는 내인성 칼시트리올인 것으로 간주된다.

[0473] [표 11-2]

[0474] 회수된 칼시트리올의 추정된 각질층(ng/mg) 평균 \pm SD(n= 동물의 수[4개의 복제물/동물])

치료	수컷 미니피그	암컷 미니피그
비처리	$0 \pm 0^*$ (1)	na
위약	0.92 ± 1.07 (4)	0 ± 0 (3)
1 $\mu\text{g/mL}$	1.54 ± 0.79 (3)	0.03 ± 0.05 (3)
3 $\mu\text{g/mL}$	1.63 ± 0.25 (3)	0.04 ± 0.06 (3)
10 $\mu\text{g/mL}$	2.02 ± 0.39 (3)	0.05 ± 0.04 (3)
30 $\mu\text{g/mL}$	1.51 ± 0.89 (3)	0.64 ± 0.37 (3)
100 $\mu\text{g/mL}$	4.52 ± 1.21 (1)	na

[0475]

[0476] * 제로 값은 검출 하한치 이하의 결과를 나타낸다.

[0477] ** 피부로부터 방출되는 내인성 칼시트리올인 것으로 간주된다.

[0479] [표 11-3]

[0480] 회수된 칼시트리올의 표피(ng/mg) 평균 \pm SD(n= 동물의 수[4개의 복제물/동물])

치료	수컷 미니피그	암컷 미니피그
비처리	$0 \pm 0^*$ (1)	na
위약	0.12 ± 0.23 (4)	0 ± 0 (3)
1 $\mu\text{g/mL}$	0.16 ± 0.28 (3)	0 ± 0 (3)
3 $\mu\text{g/mL}$	0.14 ± 0.23 (3)	0 ± 0 (3)
10 $\mu\text{g/mL}$	0.23 ± 0.20 (3)	0.02 ± 0.04 (3)
30 $\mu\text{g/mL}$	0.38 ± 0.33 (3)	0.34 ± 0.24 (3)
100 $\mu\text{g/mL}$	2.09 ± 1.0 (1)	na

[0481]

[0482] * 제로 값은 검출 하한치 이하의 결과를 나타낸다.

[0483] ** 피부로부터 방출되는 내인성 칼시트리올인 것으로 간주된다.

[0485] [표 11-4]

[0486] 회수된 칼시트리올의 진피(ng/mg) 평균 \pm SD(n= 동물의 수[4개의 복제물/동물])

치료	수컷 미니피그	암컷 미니피그
비처리	0.08 ± 0.01 (1)	na
위약	0.02 ± 0.03 (4)	$0 \pm 0^*$ (3)
1 $\mu\text{g/mL}$	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
3 $\mu\text{g/mL}$	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
10 $\mu\text{g/mL}$	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
30 $\mu\text{g/mL}$	0 ± 0 (3)	0 ± 0 (3)
100 $\mu\text{g/mL}$	0.13 ± 0.04 (1)	na

[0487]

[0488] * 제로 값은 검출 하한치 이하의 결과를 나타낸다.

[0489] ** 피부로부터 방출되는 내인성 칼시트리올인 것으로 간주된다.

[0491] 데이터는 칼시트리올이 대부분의 각질층 및 표피 샘플에서 뿐만 아니라 진피 샘플에서도(단일 수컷 미니피그에게 100 $\mu\text{g/mL}$ 용량 적용의 단일 예외를 포함함) 측정가능하였다는 것을 나타낸다. 이는 실시예 1에서 상기 기술된 프란츠 사람 피부 유한 용량 모델에서 수득된 결과와 일치한다.

[0492] 평가된 조직 샘플에 걸쳐서, 수컷 미니피그는 일반적으로 암컷 미니피그보다 더 큰 칼시트리올 조직 수준을 나타내는 것으로 나타났다.

[0493] 칼시트리올의 최고 농도는 각질층에 존재하는 것으로 관찰되었다. 각질층 함량이 추정된 값이지만, 이의 보다 높은 농도는 표면 세척 방법에 의해서 제거되지 않은 피부 모공 깊이 칼시트리올의 존재를 반영할 수 있거나, 각질층의 매우 친지성 매트릭스 중에서의 칼시트리올의 용해도에 기인할 수 있다.

[0494] 그러나, 조직 수준에 대한 가장 명료한 적용 용량 상관관계는 3 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 적용으로부터 칼시트리올 농도에

서 거의 선형으로 증가하는 것으로, 표피에서 관찰되었다.

[0496] 실시예 12. 다중 코스 화학요법을 제공한 녹색백혈병 래트의 국소 용액 연구

[0497] 룡 에반스 래트(Harlan Laboratories, Inc)는 도착시 3일령이었다. 동물의 체중은 도착시 및 실험 결론까지 매일 전자 저울(American Scientific Products TL 410s)을 사용하여 측정하였다. 래트를 실험 시작 전 2일 동안 하우징하였다. 이어서, 동물들을 4 그룹으로 무작위 추출하였다. 모든 래트에게 이하 기술된 바와 같이 MIAC51을 제공하였다.

[0498] ■ 그룹 1(n=27)은 추가 처리를 제공하지 않았다.

[0499] ■ 그룹 2(n=40)는 화학요법만을 제공하였다.

[0500] ■ 그룹 3(n=40)은 이하 기술된 바와 같이 화학요법 및 국소 비히클을 제공하였다.

[0501] ■ 그룹 4(n=40)는 화학요법 및 국소 칼시트리올을 제공하였다.

[0503] 생후 6일째 처리를 개시하였다. 0.1mL의 국소 칼시트리올의 양을 래트의 두경부 상부에 국소 적용하였다. 제1 성장기 사이클을 위해, 6일 및 7일째에, 비히클 또는 칼시트리올을 포화를 피하기 위해 25 μ L 용적으로 4회 적용하였다. 8, 9, 10 및 11일째에, 50 μ L 용적을 2회 적용하였다. 제2 성장기 사이클을 위해, 래트를 40 내지 45 일째에 매일 0.1mL의 비히클 또는 칼시트리올로 처리하였다. 각 적용은 10초 동안 니트릴 시험 장갑으로 덮힌 오른쪽 집게 손가락으로 2cm² 영역을 문질렀다. 처리 완료 후, 각 래트를 6시간 동안 개별적으로 분리하였다. 후속적으로, 각 래트의 머리 및 등을 마일드 손 비누(Soft CIDE-EC; VWR International) 및 증류수로 세척하였다. 다시 어미와 함께 두었던 새끼를 동물 사육실로 다시 옮겼다. 제2 성장기 사이클을 위해, 성인 래트를 그들의 한배 새끼와 함께 케이지에 다시 위치시키고, 다시 동물 사육실로 옮겼다.

[0504] 생후 5일째에, 모든 래트에게 0.1mL의 혈청 부재(SF) RPMI 중에서 1x10⁵ MIAC51을 복강내로 제공하였다. MIAC51을 5% CO₂, 100% 습도 배양기 중에서 37°C에서 L-글루타민 및 10% 소 태아 혈청으로 보충된 RPMI 1640 중에서 배양하였다. 세포를 50% 컨플루언시(1.5x10⁶ml)로 성장시키고, 50ml 원뿔형 튜브에서 수집하고, 실온에서 10분 동안 600g에서 원심분리하고, 주사 전에 1x10⁶/ml의 농도에서 SF-RPMI에 재현탁시켰다.

[0505] 생후 23일째에, 혈액 샘플을 모든 래트로부터 수집하고, 분별을 수행하였다. 백혈병을 갖는 래트는 희생시킨 반면, 백혈병을 갖지 않는 래트는 추가 실험에 사용하였다. 제2 분별을 31일째에 수행하였고, 백혈병 동물은 희생시켰다. 생존 동물은 제2 세트의 비히클 투여 또는 칼시트리올 처리 전 2cm² 영역을 면도하고, 제2 과정의 화학요법을 15일 후에 제공하였다. 제2 및 제1 성장기 모두에서, 탈모증은 화학요법 처리 후 10일에 기록하였다.

[0506] 각 래트에 대한 탈모증 정도는 다음 척도로 측정되었다:

[0507] 0 = 탈모증 없음

[0508] 1+ = 0 내지 25% 탈모증

[0509] 2+ = 25 내지 50% 탈모증

[0510] 3+ = 50 내지 75% 탈모증

[0511] 4+ = 75 내지 100% 탈모증

[0513] 실험 화합물

[0514] 2.3 μ g/g 칼시트리올 제형을 비히클(40중량% 프로필렌 글리콜 및 60중량% 무수 200 proof 에탄올)로 최종 농도 2 μ g/ml로 희석시켰다. 1mL의 바이알을 세분화하고, 4°C에서 냉장고에 유지시켰다. 각 실험에 대해, 2.3 μ g/g 칼시트리올 및 비히클의 바이알 하나를 꺼내어 실험 과정 동안 얼음 위에 두었다. 사용되지 않은 제제는 폐기하였다.

[0516] A. 사이클로포스파미드 단독

[0517] 화학요법의 투여

[0518] 새끼 래트: 13일째에, 모든 래트에게 사이클로포스파미드(CTX)(Sigma Aldrich, Lot #068k1131) 37.5mg/kg을

총 용적의 0.1mL H₂O/만니톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 복강내로 투여하였다.

성인 래트: 화학요법의 제2 과정을 위해, 150mg/kg 사이클로포스파미드를 총 용적의 0.1mL H₂O/만니톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 마취된(50mg/kg 케타민/5mg/kg 크실라진) 47일령 래트에게 복강내 투여하였다.

결과는 표 12-1 및 12-2에 제시된다. 구체적으로, 제1 라운드 화학요법후(표 12-1 및 도 27), 사이클로포스파미드 단독 또는 비히클과 조합한 사이클로포스파미드를 투여한 모든 래트는 심각한 탈모증(+4)을 앓았다. 대조적으로, 칼시트리올과 병용된 사이클로포스파미드를 투여한 모든 래트는 대조군 그룹과 유사하게 어떤 탈모증 징후도 나타내지 않았다. 유사한 결과가 표 12-2(참조: 도 28)에 제시된 바와 같이 제2 라운드 화학요법 후에 획득되었다.

[표 12-1]

제1 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX)로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/확률	그룹/확률
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
1. 대조군(화학요법 없음)	27					27	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=1.000
2. CTX					40	40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p<0.01
3. CTX + 비히클					40	40	1 vs 4 p=1.000	3 vs 4 p<0.01
4. CTX + 칼시트리올	40					40		

[표 12-2]

제2 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX)로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/확률
	0	1+	2+	3+	4+	합계	
2. CTX 단독					8	8	2 vs 3 p=1.000
3. CTX + 비히클					9	9	2 vs 4 p<0.01
4. CTX + 칼시트리올	10					10	3 vs 4 p<0.01

추가로, 이 실험은 칼시트리올의 국소 제형을 투여한 래트의 생존률이 화학요법 단독으로 또는 비히클과 조합하여 투여한 래트의 생존률과 실질적으로 유사함을 나타내었다. 표 12-3에서 제시된 바와 같이, 사이클로포스파미드 및 칼시트리올의 국소 제형으로 처리된 동물들의 생존률(25%)은 사이클로포스파미드 단독으로 처리된 래트의 생존률(20%) 및 사이클로포스파미드 및 비히클로 처리된 래트의 생존률(23%)과 유사하였다.

[표 12-3]

두 라운드의 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX)로 처리된 래트의 생존률

그룹	치유			전체	그룹/확률	그룹/확률
	치유	%				
1. 대조군(화학요법 없음)	0	0	27			
2. CTX	8	20	40	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=0.7846	
3. CTX + 비히클	9	23	40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p=0.5923	
4. CTX + 칼시트리올	10	25	40	1 vs 4 p<0.01	3 vs 4 p=0.7927	
합계	27	18	147			

요약하면, 사이클로포스파미드 그룹에서, 칼시트리올은 둘 다의 사이클에서 CIA로부터 100% 보호를 제공하고, 20 내지 25% 범위내에 있는 치유율을 간섭하지 않았다.

B. 사이클로포스파미드 및 독소루비신

화학요법의 투여

새끼 래트: 13일째에, 모든 래트에게 사이클로포스파미드(CTX)(Sigma Aldrich, Lot #068k1131) 37.5mg/kg을 총 용적의 0.1mL H₂O/만니톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 복강내로 투여하였다. 13, 14 및 15일째에, 래트에게 0.1ml 증류수 중의 독소루비신 하이드로클로라이드(Sigma Aldrich, Lot #038k1349)(ADM) 2.5mg/kg을 복강내로(I.P.) 투여하였다.

성인 래트: 제2 과정의 화학요법의 경우, 47일째에 150mg/kg 사이클로포스파미드를 총 용적의 0.1mL H₂O/만니

톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 마취된(50mg/kg 케타민/5mg/kg 크실라진) 래트에게 복강내 투여하였다. 제2 과정의 화학요법의 경우, 래트에게 상기한 바와 같이 47일 내지 49일째에 20mg/kg ADM을 투여하였다.

결과는 표 12-4 및 12-5에 제시된다. 구체적으로, 제1 라운드 화학요법후(표 12-4 및 도 29), 사이클로포스파미드 및 독소루비신 단독으로 또는 비히클과 조합하여 투여한 모든 래트는 심각한 탈모증(+4)을 앓았다. 대조적으로, 칼시트리올과 병용된 사이클로포스파미드 및 독소루비신을 투여한 모든 래트는 대조군 그룹과 유사하게 어떤 탈모증 징후도 나타내지 않았다. 유사한 결과가 표 12-5(참조: 도 30)에 제시된 바와 같이 제2 라운드 화학요법 후에 획득되었다.

[표 12-4]

제1 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX) 및 독소루비신(ADM)으로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/파블	그룹/파블
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
1. 대조군(화학요법 없음)	40					40	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=1.000
2. CTX + ADM					40	40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p<0.01
3. CTX + ADM + 비히클 Car					40	40	1 vs 4 p=1.000	3 vs 4 p<0.01
4. CTX + ADM + 칼시트리올	40					40		

[표 12-5]

제2 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX) 및 독소루비신(ADM)으로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/파블	그룹/파블
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
2. CTX + ADM					21	21	2 vs 3 p=1.000	
3. CTX + ADM + 비히클					22	22	2 vs 4 p<0.01	
4. CTX + ADM + 칼시트리올	20					20	3 vs 4 p<0.01	

추가로, 이 실험은 칼시트리올의 국소 제형을 투여한 래트의 생존률이 화학요법 단독으로 또는 비히클과 조합하여 투여한 래트의 생존률과 실질적으로 유사함을 나타내었다. 표 12-6에서 제시된 바와 같이, 칼시트리올의 국소 제형과 병용된 사이클로포스파미드 및 독소루비신으로 처리된 동물들의 생존률(50%)은 화학요법 단독으로 처리된 래트의 생존률(53%) 및 화학요법 및 비히클로 처리된 래트의 생존률(55%)과 유사하였다.

[표 12-6]

두 라운드의 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX) 및 독소루비신(ADM)으로 처리된 래트의 생존률

그룹	치유 %			합계	그룹/파블	그룹/파블
	치유	%	합계			
1. 대조군(화학요법 없음)	0	0	40			
2. CTX + ADM	21	53	40		1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=0.8225
3. CTX + ADM + 비히클	22	55	40		1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p=0.8230
4. CTX + ADM + 칼시트리올	20	50	40		1 vs 4 p<0.01	3 vs 4 p=0.9336
합계	63	39	160			

요약하면, 사이클로포스파미드 및 독소루비신 그룹에서, 칼시트리올은 둘 다의 사이클에서 CIA로부터 100% 보호를 제공하고, 50 내지 55% 범위내에 있는 치유율을 간섭하지 않았다.

C. 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈

화학요법의 투여

새끼 래트: 13일째에, 모든 래트에게 사이클로포스파미드(CTX)(Sigma Aldrich, Lot #068k1131) 30mg/kg을 총 용적의 0.1mL H₂O/만니톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 복강내로 투여하였다. 13, 14 및 15일째에, 래트에게 0.1ml 증류수 중의 2.0mg/kg 독소루비신 하이드로클로라이드(Sigma Aldrich, Lot #038k1349)(ADM)를 복강내로 투여하고, 13 내지 19일째에, 래트에게 50mg/kg 시타라빈을 투여하였다.

성인 래트: 제2 과정의 화학요법의 경우, 1일 동안 100mg/kg 사이클로포스파미드를 마취된(50mg/kg 케타민/5mg/kg 크실라진) 래트에게 투여하고, 3일 동안 20mg/kg 독소루비신을, 7일 동안 100mg/kg 시타라빈을 투여하였다.

[0560] 결과는 표 12-7 및 12-8에 제시된다. 구체적으로, 제1 라운드 화학요법후(표 12-7 및 도 31), 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈 단독으로 또는 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈을 비히클과 조합하여 투여한 모든 래트는 심각한 탈모증(+4)을 앓았다. 대조적으로, 칼시트리올과 병용된 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈을 투여한 모든 래트는 대조군 그룹과 유사하게 어떤 탈모증 징후도 나타내지 않았다. 유사한 결과가 표 12-8(참조: 도 32)에 제시된 바와 같이 제2 라운드 화학요법 후에 획득되었다.

[0561] [표 12-7]

[0562] 제1 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX), 독소루비신(ADM) 및 시타라빈(ARA-C)으로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/파클	
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
1. 대조군(화학요법 없음)	40					40	1 vs 2	p<0.01
2. CTX + ADM + ARA-C				40	40	80	1 vs 3	p<0.01
3. CTX + ADM + ARA-C + 비히클				40	40	80	1 vs 4	p=1.000
4. CTX + ADM + ARA-C + 칼시트리올	40					40	3 vs 4	p<0.01

[0563]

[0565] [표 12-8]

[0566] 제2 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX), 독소루비신(ADM) 및 시타라빈(ARA-C)으로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/파클	
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
2. CTX + ADM + ARA-C						32	2 vs 3	p=1.0000
3. CTX + ADM + ARA-C + 비히클						30	2 vs 4	p<0.01
4. CTX + ADM + ARA-C + 칼시트리올	31					31	3 vs 4	p<0.01

[0567]

[0569] 추가로, 이 실험은 칼시트리올의 국소 제형을 투여한 래트의 생존률이 화학요법 단독으로 또는 비히클과 조합하여 투여한 래트의 생존률과 실질적으로 유사함을 나타내었다. 표 12-9에서 제시된 바와 같이, 칼시트리올의 국소 제형과 병용된 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈으로 처리된 동물들의 생존률(78%)은 화학요법 단독으로 처리된 래트의 생존률(80%) 및 화학요법 및 비히클로 처리된 래트의 생존률(75%)과 유사하였다.

[0570] [표 12-9]

[0571] 두 라운드의 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX), 독소루비신(ADM) 및 시타라빈(ARA-C)으로 처리된 래트의 생존률

그룹	치유			합계	그룹/파클	
	치유	%				
1. 대조군(화학요법 없음)	0	0	40			
2. CTX + ADM + ARA-C	32	80	40		1 vs 2	p<0.01
3. CTX + ADM + ARA-C + 비히클	30	75	40		1 vs 3	p<0.01
4. CTX + ADM + ARA-C + 칼시트리올	31	78	40		1 vs 4	p<0.01
합계	93	58	160		3 vs 4	p=0.7927

[0572]

[0574] 요약하면, 사이클로포스파미드, 독소루비신 및 시타라빈 그룹에서, 칼시트리올은 둘 다의 사이클에서 CIA로부터 100% 보호를 제공하고, 75 내지 80% 범위내에 있는 치유율을 간섭하지 않았다.

[0576] D. 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드

[0577] 화학요법의 투여

[0578] 새끼 래트: 13일째에, 모든 래트에게 사이클로포스파미드(CTX)(Sigma Aldrich, Lot #068k1131) 37.5mg/kg을 총 용적의 0.1mL H₂O/만니톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 복강내로 투여하였다. 11 내지 13일째에, 래트에게 0.1ml 디메틸 설펍사이드 중의 2.5mg/kg 파클리탁셀(탁셀)(Sigma Aldrich, Lot #078K1428) 및 특수한 용매(참조: Standard Operating Procedures) 및 HBSS로 희석된 1.5mg/kg 에토포사이드(VP-16)(Sigma Aldrich, Lot #047K1162)를 동시에 투여하였다.

[0579] 성인 래트: 제2 과정의 화학요법의 경우, 47일에 150mg/kg 사이클로포스파미드를 총 용적의 0.1mL H₂O/만니톨 혼합물 중에서 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 마취된(50mg/kg 케타민/5mg/kg 크실라진) 래트에게

복강내 투여하였다. 제2 과정의 화학요법의 경우, 래트에게 상기한 바와 같이 45 내지 48일째에 10mg/kg 탁솔 및 15mg/kg VP-16을 투여하였다.

결과는 표 12-10 및 12-11에 제시된다. 구체적으로, 제1 라운드 화학요법후(표 12-10 및 도 33), 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드 단독으로 또는 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드를 비히클과 조합하여 투여한 모든 래트는 심각한 탈모증(+4)을 앓았다. 대조적으로, 칼시트리올과 병용된 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드를 투여한 모든 래트는 대조군 그룹과 유사하게 어떤 탈모증 징후도 나타나지 않았다. 유사한 결과가 표 12-11(참조: 도 34)에 제시된 바와 같이 제2 라운드 화학요법 후에 획득되었다.

[표 12-10]

제1 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX), 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/파블	
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
1. 대조군(화학요법 없음)	40					40	1 vs 2	p<0.01
2. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드				40	40	80	1 vs 3	p<0.01
3. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 비히클				40	40	80	1 vs 4	p=1.000
4. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 칼시트리올	40					40	2 vs 3	p=1.000
							2 vs 4	p<0.01

[표 12-11]

제2 라운드 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX), 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						그룹/파블	
	0	1+	2+	3+	4+	합계		
2. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드						33	2 vs 3	p=1.0000
3. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 비히클						31	2 vs 4	p<0.01
4. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 칼시트리올	33					33	3 vs 4	p<0.01

추가로, 이 실험은 칼시트리올의 국소 제형을 투여한 래트의 생존률이 화학요법 단독으로 또는 비히클과 조합하여 투여한 래트의 생존률과 실질적으로 유사함을 나타내었다. 표 12-12에서 제시된 바와 같이, 칼시트리올의 국소 제형과 병용된 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 동물들의 생존률(83%)은 화학요법 단독으로 처리된 래트의 생존률(83%) 및 화학요법 및 비히클로 처리된 래트의 생존률(78%)과 유사하였다.

[표 12-12]

두 라운드의 화학요법 후 사이클로포스파미드(CTX), 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 래트의 생존률

그룹	치유 %			그룹/파블	
	치유	%	합계		
1. 대조군(화학요법 없음)	0	0	40		
2. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드	33	83	40	1 vs 2	p<0.01
3. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 비히클	31	78	40	1 vs 3	p<0.01
4. CTX + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 칼시트리올	33	83	40	2 vs 4	p=0.5762
				3 vs 4	p=0.5762

요약하면, 사이클로포스파미드, 파클리탁셀 및 에토포사이드 그룹에서, 칼시트리올은 둘 다의 사이클에서 CIA로부터 100% 보호를 제공하고, 78 내지 83 범위내에 있는 치유율을 간섭하지 않았다.

E. 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드

화학요법의 투여

새끼 래트: 13일 내지 15일째에, 모든 래트에게 0.1ml 증류수 중의 독소루비신 하이드로클로라이드(Sigma Aldrich, Lot #038k1349)(ADM) 2.5mg/kg을 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 복강내로 투여하였다. 동시에, 래트에게 2.5mg/kg 파클리탁셀(탁솔)(Sigma Aldrich, Lot #078k1428) 및 1.5mg/kg 에토포사이드(VP-16)(Sigma Aldrich, Lot #047k1162)를 투여하였다.

성인 래트: 제2 과정의 화학요법의 경우, 상기 화학요법을 47 내지 49일째에 총 용적 0.1mL로 ½cc 인슐린 시린지 29G ½"(B-D)를 사용하여 마취된(50mg/kg 케타민/5mg/kg 크실라진) 래트에게 복강내 개시하였다. 제2 과정을 위한 용량은 다음과 같다: 20mg/kg ADM, 10mg/kg 탁솔 및 15mg/kg VP-16.

결과는 표 12-12 및 12-14에 제시된다. 구체적으로, 제1 라운드 화학요법후(표 12-13 및 도 35), 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드 단독으로 또는 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드를 비히클과 조합하여 투여한 모든 래트는 심각한 탈모증(+4)을 앓았다. 대조적으로, 칼시트리올과 병용된 독소루비신, 파클리탁셀 및 에

토포사이드를 투여한 모든 래트는 대조군 그룹과 유사하게 어떤 탈모증 징후도 나타나지 않았다. 유사한 결과가 표 12-14(참조: 도 36)에 제시된 바와 같이 제2 라운드 화학요법 후에 획득되었다.

[표 12-13]

제1 라운드 화학요법 후 독소루비신(ADM), 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 래트의 탈모증 정도

그룹	탈모증						탈모증	
	0	1+	2+	3+	4+	합계	그룹/확률	그룹/확률
1. 대조군(화학요법 없음)	40					40	1 vs 2 p<0.01	2 vs 3 p=1.000
2. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드					40	40	1 vs 3 p<0.01	2 vs 4 p<0.01
3. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 비히클					40	40	1 vs 4 p=1.000	3 vs 4 p<0.01
4. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 칼시트리올	40					40		

[표 12-14]

제2 라운드 화학요법 후 독소루비신(ADM), 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 래트의 탈모증 정도

GROUP	탈모증						탈모증	
	0	1+	2+	3+	4+	합계	그룹/확률	그룹/확률
2. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드						32	2 vs 3 p=1.0000	
3. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 비히클						33	2 vs 4 p<0.01	
4. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 칼시트리올	32					32	3 vs 4 p<0.01	

추가로, 이 실험은 칼시트리올의 국소 제형을 투여한 래트의 생존률이 화학요법 단독으로 또는 비히클과 조합하여 투여한 래트의 생존률과 실질적으로 유사함을 나타내었다. 표 12-15에서 제시된 바와 같이, 칼시트리올의 국소 제형과 병용된 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 동물들의 생존률(80%)은 화학요법 단독으로 처리된 래트의 생존률(80%) 및 화학요법 및 비히클로 처리된 래트의 생존률(83%)과 유사하였다.

[표 12-15]

두 라운드의 화학요법 후 독소루비신(ADM), 파클리탁셀 및 에토포사이드로 처리된 래트의 생존률

그룹	치유 %			합계	그룹/확률		그룹/확률	
	0	1	2		1 vs 2	p	2 vs 3	p
1. 대조군(화학요법 없음)	0	0	40					
2. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드	32	80	40		1 vs 2	p<0.01	2 vs 3	p=0.7745
3. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 비히클	33	83	40		1 vs 3	p<0.01	2 vs 4	p=0.1000
4. ADM + 파클리탁셀 + 에토포사이드 + 칼시트리올	32	80	40		1 vs 4	p<0.01	3 vs 4	p=0.7745

요약하면, 독소루비신, 파클리탁셀 및 에토포사이드 그룹에서, 칼시트리올은 둘 다의 사이클에서 CIA로부터 100% 보호를 제공하고, 80 내지 83% 범위내에 있는 치유율을 간섭하지 않았다.

실시예 13. 고팅겐 미니피그®에게 국소 칼시트리올의 4주 피부 독성 연구

대조군, 비히클 및 시험 물질 제제: 새로운 대조군 물질, 주사용 0.9% 염화나트륨, USP를 주간 연구에 사용하기 위해 분배하고, 냉장고에 저장하였다. 비히클, 프로필렌 글리콜, USP 및 에탄올(비변성됨, 무수) 200 proof USP의 40/60 중량(w/w) 혼합물, 및 비중이 0.875인 칼시트리올, USP를 함유하는 시험 물질을 제공된 바와 같이 사용하고, 순도에 대해 어떤 조절도 수행하지 않았다. 시험 물질은 5.07, 10.31 및 55.34 μ g/mL의 농도로 제공하였다. 시험 물질은 순수하게 (희석하지 않고) 투여하였다. 비히클 및 시험 물질을 주간 연구에 사용하기 위해 분배하고, 냉장고에 저장하였다. 수시로, 연구 동안 필요에 따라 추가의 시험 물질을 분배하였다.

투여: 투여 전에, 모발을 동물의 등으로부터 깎았다. 대조군 동물은 2개의 시험 부위를 가졌다: 부위 1은 비히클로 처리하고, 부위 2는 염수로 처리하였다. 각 부위는 450cm² 이고, 척추에 의해 쌍방향으로 나뉘지고 지워지지 않는 마커로 코너에서 표시하였다. 대조군 그룹을 위한 두 시험 부위를 균일하게 분배하였다. 모발의 반복 깎기를 필요에 따라 수행하였다. 피부 침식을 피하기 위해 주의를 기울였다. 대조군 물질, 비히클 및 시험 물질을 연구 동안 4주 동안(29일 연속) 1일당 2회 약 6시간 간격으로 피부로 투여하였다. 제형은 유리 교반 막대 또는 적합한 기구를 사용하여 적용 부위에 균일하게 적용하였다. 임의의 잔류 시험 물질은 다음 투약 전에 수돗물로 습윤된 와이폴(Wypall)로 서서히 제거하였다. 경우에 따라, 부위를 깨끗하고 건조된 와이폴로 건조시켰다. 모든 동물에게 투여된 용량은 1800mg의 적합한 제형이었다. 투약 농도는 5.07, 10.31 및 55.34 μ g/mL였고, 용량 용적 2.1mL로 투여하였다. 대조군 물질 및 비히클을 처리 그룹과 동일한 방식으로 대조군에 투여하였다. 대조군 동물을 위한 용량 용적은 비히클 1.0mL 및 염수 0.9mL였다. 관찰된 임상적 징후의 중증도에

기인하여, 23일째에 55.34 μ g/mL에서 모든 동물에게 투여하지는 않았다. 24일에 모든 동물을 위해 다시 투여를 개시하였다.

[0619] **결과:** 이 연구는 4주 동안 피부 적용을 통해 하루에 2회 투여될 경우, 칼시트리올 국소 용액의 잠재적인 아-만성 독성을 평가하기 위해 수행하였다. 고팅겐 미니피그의 4마리 동물/성/그룹의 세 처리 그룹에게 칼시트리올 국소 용액을 각각 투약 농도 5.07, 10.31 및 55.34 μ g/mL로 투여하였다. 4마리 동물/성의 하나의 추가 그룹은 대조군으로 작용하고, 비히클, 프로필렌 글리콜, USP 및 에탄올(비변성됨, 무수) 200 proof USP의 40/60 중량(w/w) 혼합물 및 대조군 물품, 주사용 0.9% 염화나트륨, USP를 제공하였다. 칼시트리올 국소 용액 또는 비히클을 모든 그룹에게 피부 적용을 통해 29일 연속 하루에 2회 450cm² 시험 부위에 대해 4mg/cm²의 용량 용적으로 투여하였다.

[0620] 질병률, 사망률, 손상, 및 식품 및 물의 유용성에 대한 관찰을 모든 동물에 대해 매일 2회 수행하였다. 임상적 관찰을 매주 수행하였다. 체중을 매주 측정하고 기록하였다. 피부 자극 특점은 적용 부위에서 변화를 위해 1주 동안에는 각 투여 후, 이어서, 2 내지 4주 동안에는 주당 2회(제2 투여 후) 수행하였다. 검안경 검사는 예비시험 및 말기 부검 전 모든 생존자에 대해 수행하였다. 신체 검사는 예비시험을 수행하였다. 심전도기록법 검사는 시험전 투여전, 1일째 제1 용량 후 1 내지 2시간 및 마지막 주 투여 동안 수행하였다. 임상 병리학 평가를 위한 혈액 및 뇨 샘플을 모든 동물 시험전 및 말기 부검 전에 수집하였다. 시험 물품의 혈장 농도를 측정하기 위한 혈액 샘플을 1일 및 27일째에 지정된 시점에서 모든 생존 동물로부터 수집하였다. 독성동태학(TK) 파라미터를 시험 중에서 농도-시험 데이터로부터 시험 물품에 대해 측정하였다. 연구 종료시, 부검 검사를 수행하고, 기관 중량을 기록하고, 선별된 조직을 현미경 조사하였다.

[0621] 55.34 μ g/mL 농도에서 한마리 수컷을 연구 28일에 극단적으로 안락사시켰다. 이 동물에서 안락사 전에 감소된 활성, 식욕 부진 및 떨림을 관찰하였다. 이 동물의 사망 원인은 치사율에 근접한 높은 칼슘 혈액 수준인 것으로 간주되었다. 모든 잔류 미니피그는 연구 30일째에 이들의 일정 종료시까지 생존하였다. 감소된 활성, 식욕 부진, 구토 및 떨림이 연구 3주 및 4주 동안 55.34 μ g/mL 농도에서 대부분의 미니피그에서 관찰되었다. 완만한 자극은 연구 마지막 주 또는 2일 동안 55.34 μ g/mL 농도에서 수컷 및 암컷에서 관찰되었다. 5.07 및 10.31 μ g/mL에서 처리된 수컷 및 암컷의 평균 체중 및 체중 증가는 대조군에 필적할 만하였다. 55.34 μ g/mL 농도에서 모든 수컷 및 암컷은 연구 마지막 2주 동안 상당량의 체중이 감소되었고, 이 시간 동안 수컷 및 암컷에게서 평균 체중은 상당히 감소되었다.

[0622] 예비시험 및 말기 검안경 검사에서 임의 동물에서는 어떤 검안경 이상도 관찰되지 않았다. 칼시트리올 국소 용액은 정량적 심전도 이상을 일으키지 않았지만 말기 투여전 및 투여후 간격에서 그룹 평균 심박수가 완만하게 증가하였다. 이러한 심박수의 증가는 연구 동안 이들 미니피그의 칼슘 수준의 현저한 증가와 명백히 관련된다. 정량적 심전도 파라미터에 대한 칼시트리올 국소 용액의 기타 용량 관련 효과는 없었다. 어떤 칼시트리올 국소 용액 관련 혈액학, 응고 또는 뇨 검사 변경도 말기 평가에서 수컷 및 암컷에게서 관찰되지 않았다. 일부 임상 화학 변경이 55.34 μ g/mL 농도에서 관찰되었고, 가장 현저한 것은 거의 치명적인 수준인 것으로 관찰된 높은 칼슘 수준이었다. 제시된 기타 변화는 더 낮은 클로라이드 값, 및 더 높은 콜레스테롤, 글루코스, 우레아 질소 및 트리글리세라이드 값이었다.

[0623] 칼시트리올 국소 용액 관련 육안 병리학 발견은 55.34 μ g/mL 농도에서 완만하고 불규칙한 표면으로 이루어진 한마리 암컷의 위 점막으로 제한되었다. 신장의 절대적 및 상대적 증가 중량 및 흉선의 감소된 중량이 대조군과 비교하여 55.34 μ g/mL 농도에서 두 성별에서 나타났다. 직접적인 칼시트리올 국소 용액 관련 현미경 발견은 골, 신장, 심장, 처리된 피부, 흉선 및 갑상선에서 존재하였다. 또한, 직접적인 칼시트리올 국소 용액 관련 발견은 다중심적 혈관 변화 및 다중심적 점막 광화작용을 포함한다. 간접적인 시험 물품 관련 현미경 발견이 폐장에서 주시되었다. 이러한 현미경 발견은 두 성별에서 존재하였고, 55.34 μ g/mL 농도에서 투여된 동물에게 제한되었다.

[0624] 대퇴골, 흉골 및 늑골 뼈의 현미경 변화는 골간 피지 골 및 골 공동에 제한되었다. 이들은 골형성 이상증 및 호염기성 매트릭스의 침착을 특징으로 하였다. 신장 현미경 관찰은 광화 작용, 관 퇴화/재생 및 아급성 염증을 특징으로 하였다. 심근의 현미경 관찰은 근섬유 광화 작용, 아급성 염증 및 혈관 변화였다. 또한, 한마리 수컷 및 한마리 암컷은 심장내 광화 작용을 가졌다. 다중심성 점막/표피 광화 작용은 감소하는 순서로 위점막, 폐, 후두, 기관, 전립선, 턱밑 침샘 및 방광 내에서 관찰되었다. 칼시트리올 국소 용액 관련 혈관 변화는 광범위하였고, 주로 작은 크기 내지 중간 크기 혈관에 영향을 미쳤다. 이들은 주로 심장 및 골 공동 내에서 및 산발적으로 상이한 기관/시스템 내에서 관찰되었다. 처리된 피부의 현미경 변화는 표피 과형성 및 과각화증 및

외관상 진피를 갖는 혈관 주위 혼합 세포 염증을 특징으로 하였다. 흉선, 갑상선 및 췌장의 현미경 변화는 각각 림프성 소모, 소낭 모양 세포 비대 및 과형성 및 단세포 괴사를 특징으로 하였다.

[0625] 이 연구 결과를 토대로 하여, 무해영향관찰용량(no-observed-adverse-effect-level; NOAEL)은 55.34 μ g/mL 농도에서 보여진 임상 화학 및 현미경 변화에 기초하여 10.31 μ g/mL인 것으로 간주되었다.

[0627] 참조문헌:

Diker-Cohen T, Koren R, Liberman UA, Ravid A Vitamin D protects keratinocytes from apoptosis induced by osmotic shock, oxidative stress, and tumor necrosis factor.” *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1010:350-3.

(ClinicalTrials.gov, Mosby's Drug Consult, 13th Edition).

Genever PG, Moxfield, SJ, Kennovin GD, Maltman J, Bowgen CH, Raxworthy MJ, Skerry TM. Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1999 Mar; 112 (3): 337-42.

Kiryu-Seo S, Gamo K, Tachibana T, Tanaka K, Kiyama H. Unique anti apoptotic activity of EAAC1 in injured motor neurons. *The EMBO Journal* (2006) 25, 3411-3421.

Nollen EA, Brunsing JF, Roelofsen H, Weber La, Kampinga HH. In vivo chaperon activity of heat shock protein 70 and thermotolerance. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2069-79.

Rocchi P, Jugpal P, SoA, Sinneman S, Ettinger S, Fazli L, Nelson C, Gleave M. Small interference RNA targeting heat shock protein 27 inhibits the growth of prostatic cell lines and induces apoptosis via caspase 3 activation in vitro *BJU Int* 2006.

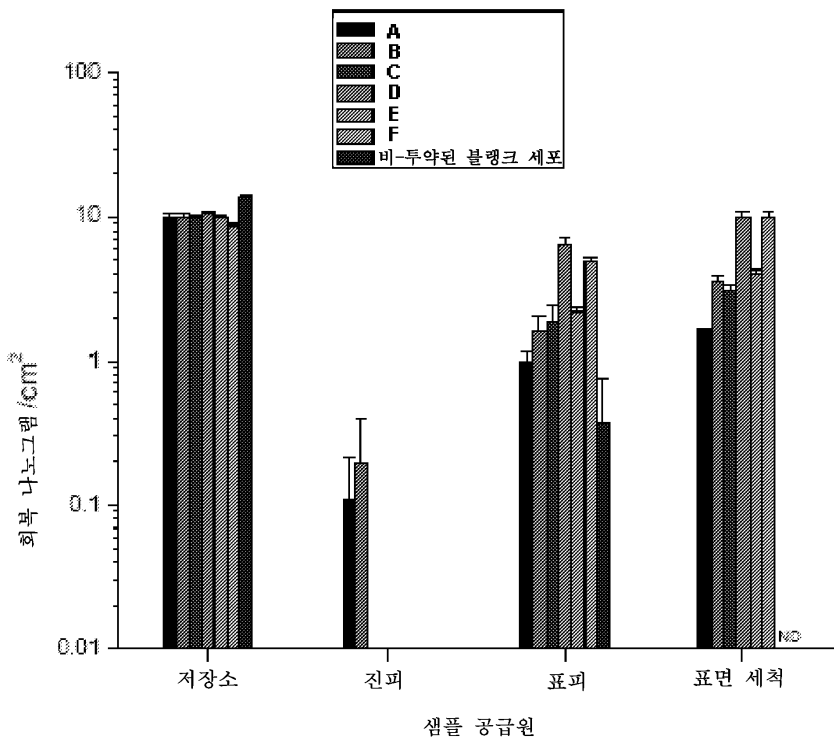
Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G (2004). S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 (4): 1111-22.

[0628]

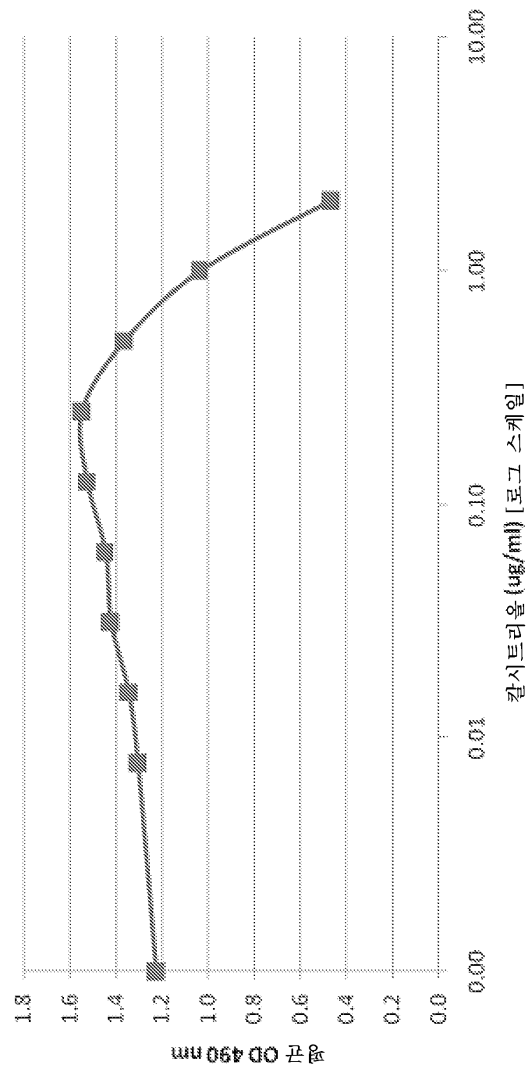
[0629] 본원에서 인용된 모든 참조문헌은 참조로서 인용된다.

도면

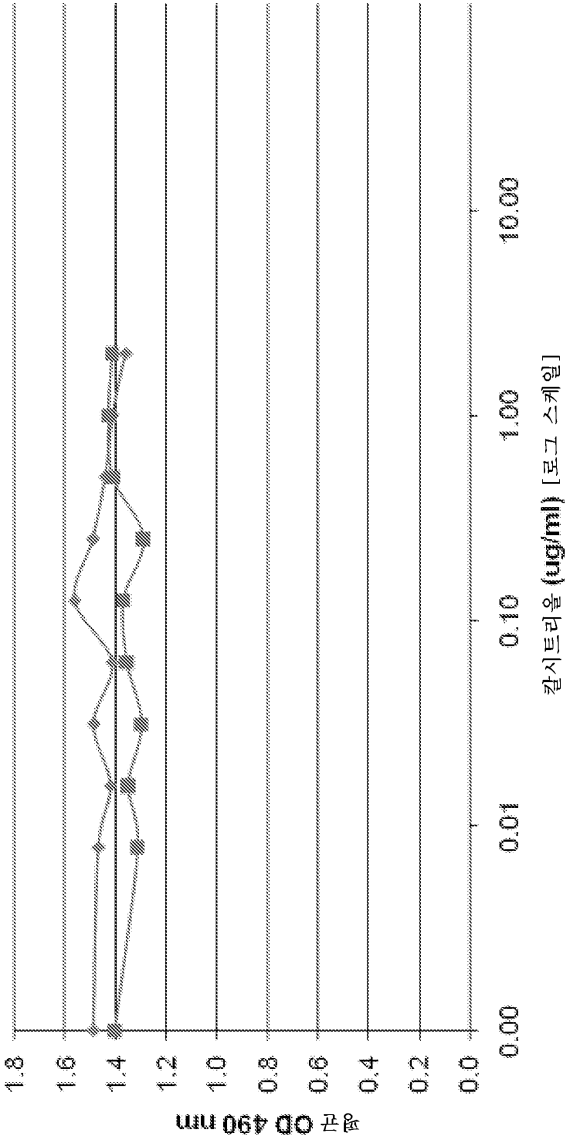
도면1



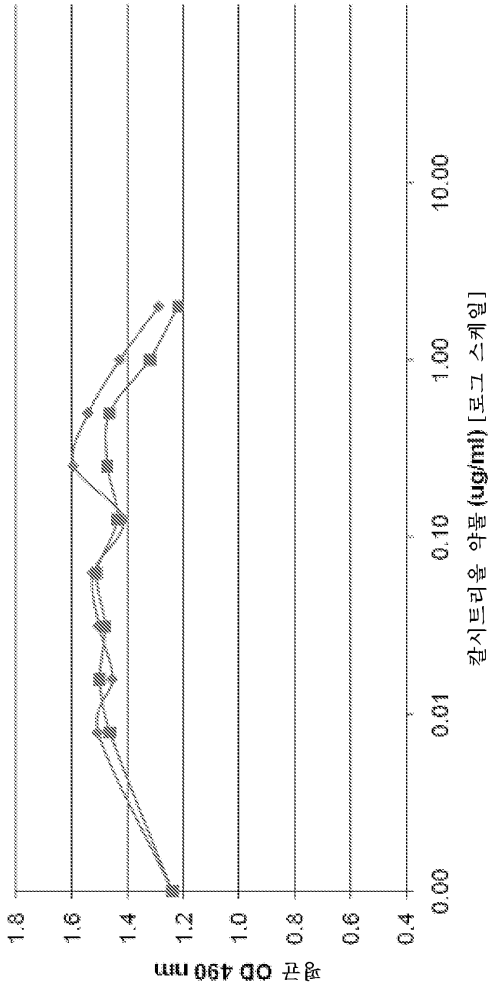
도면2



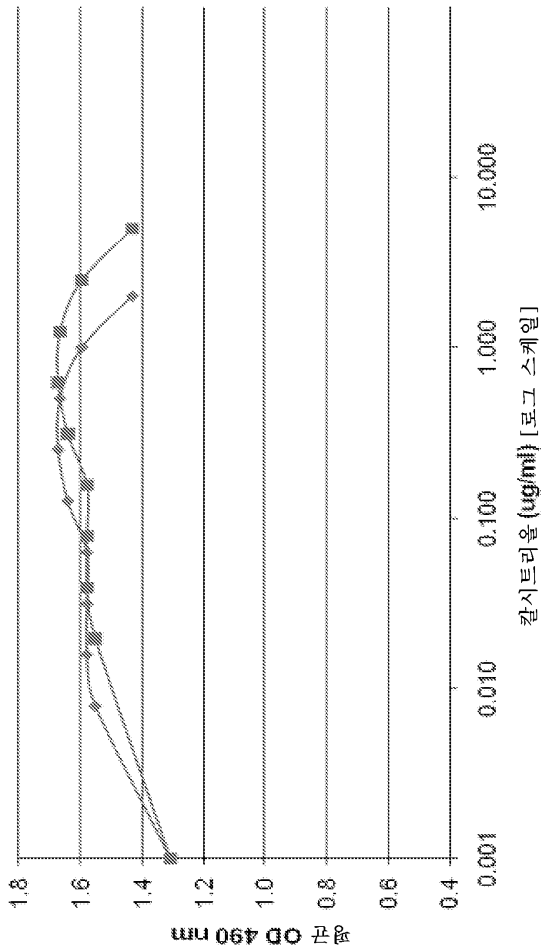
도면3



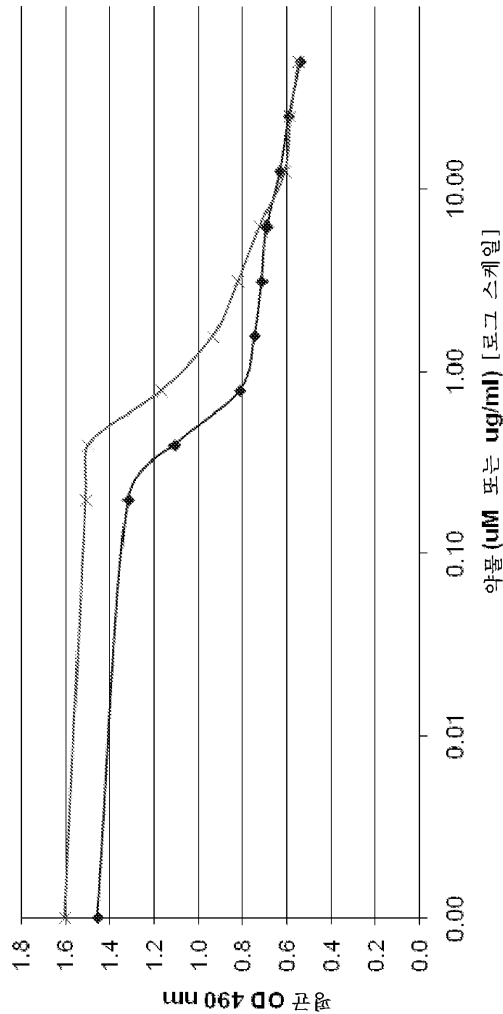
도면4a



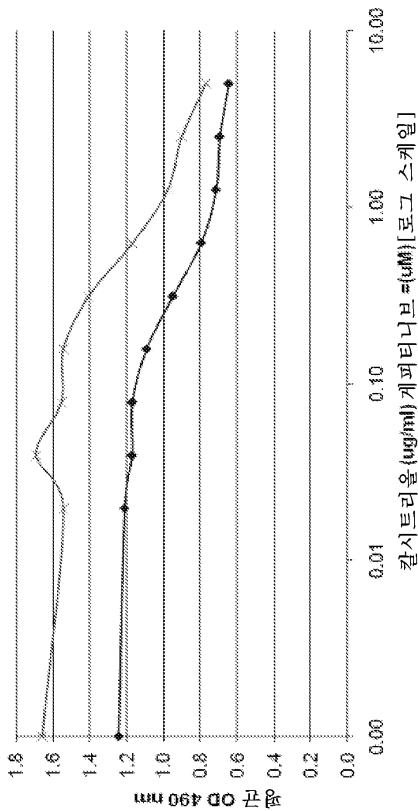
도면4b



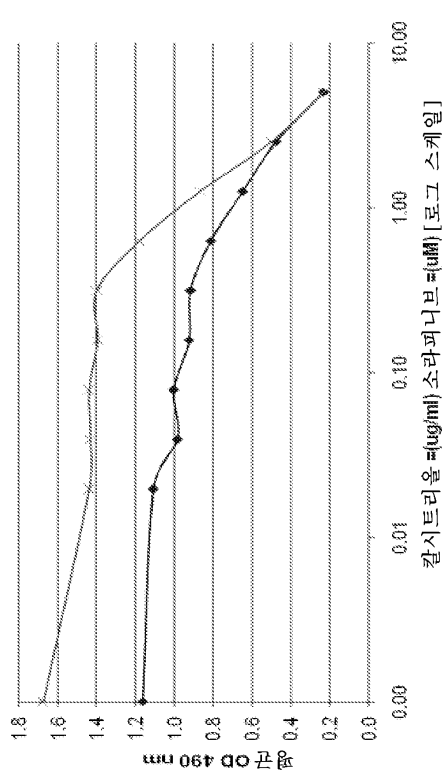
도면5



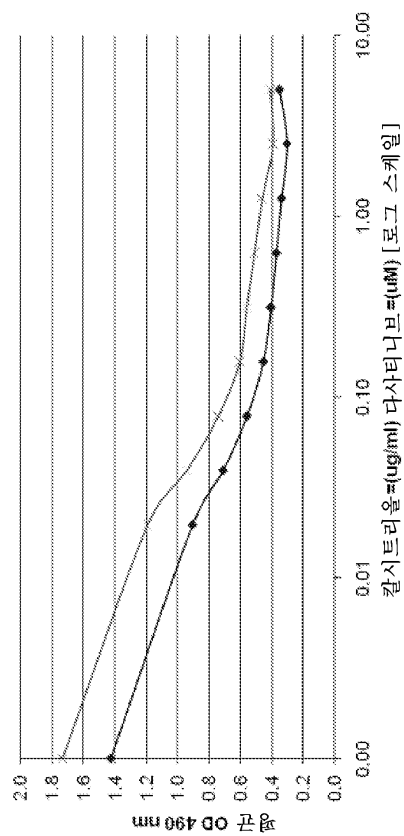
도면6



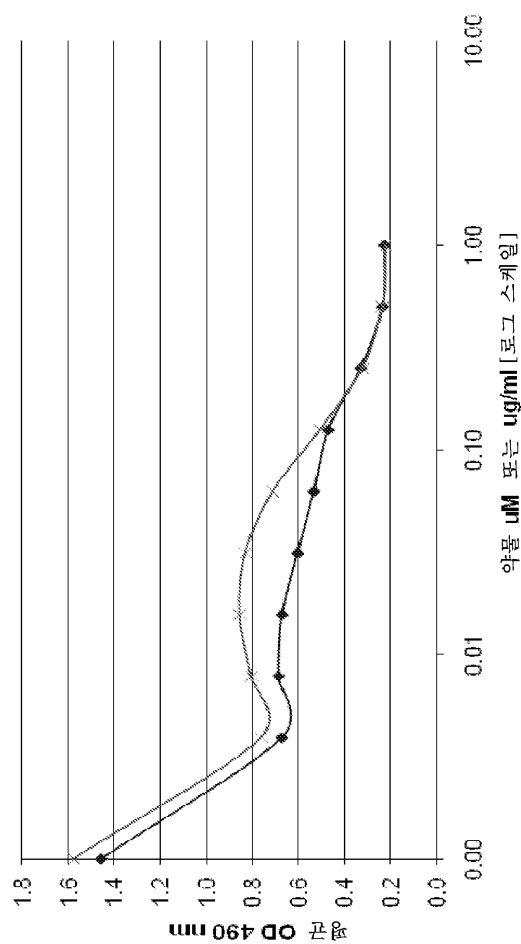
도면7



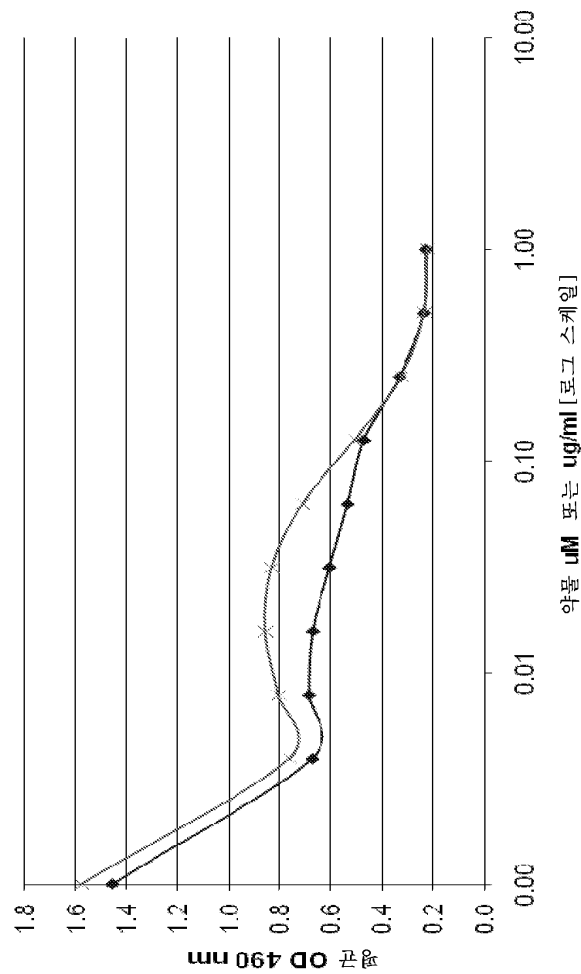
도면8



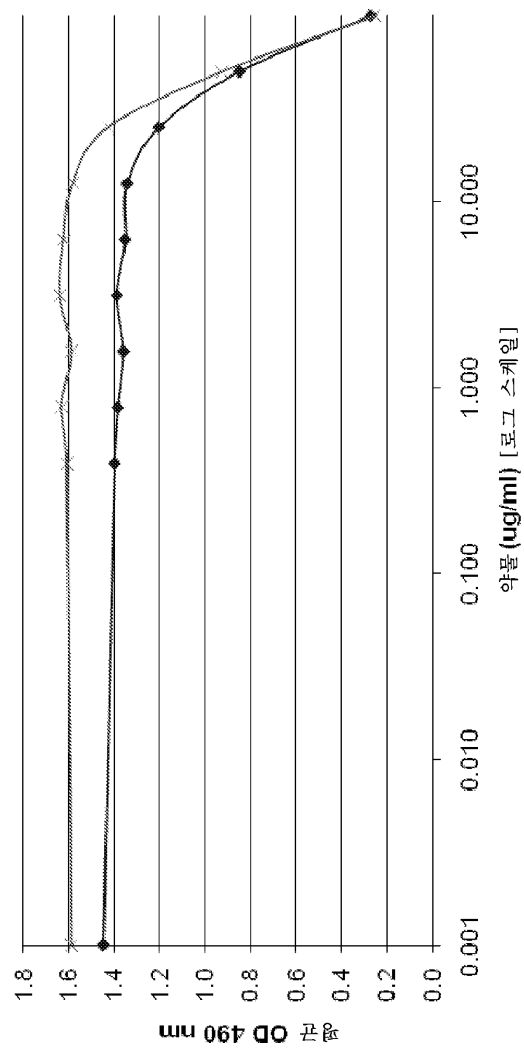
도면9



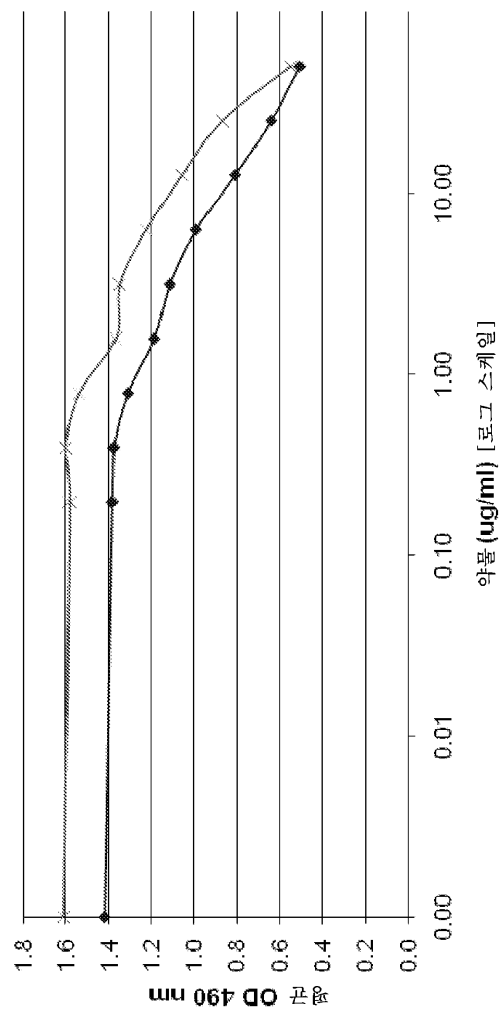
도면10



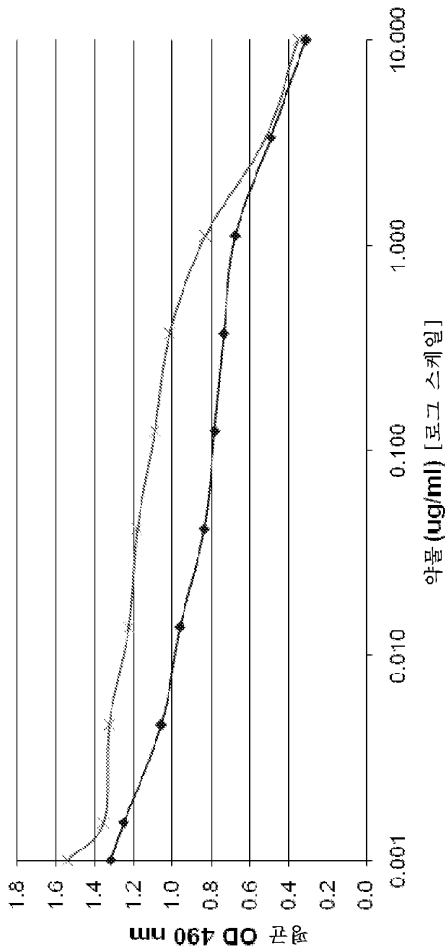
도면11



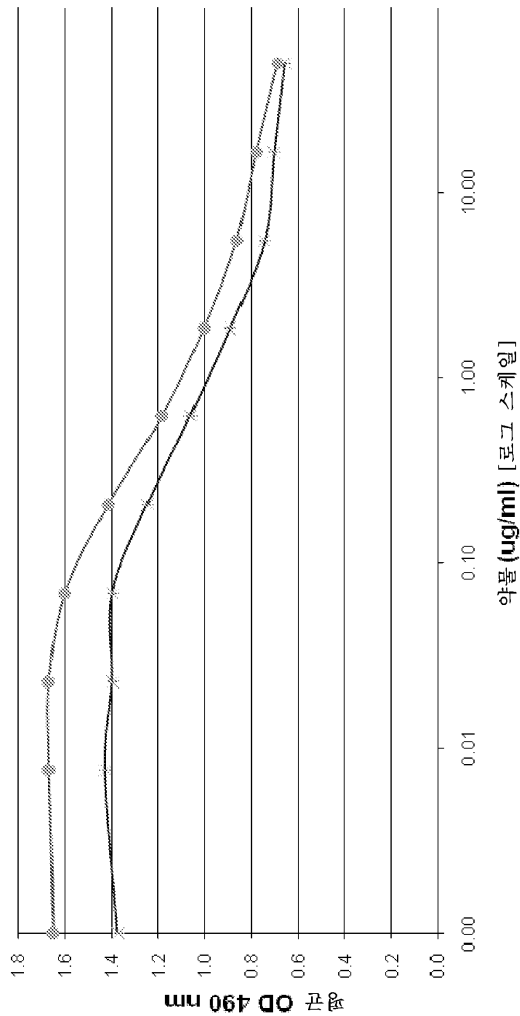
도면12



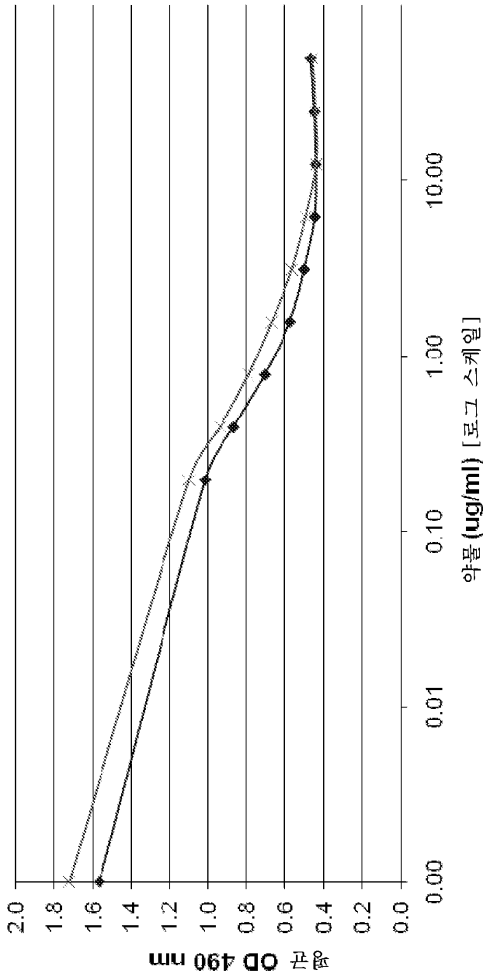
도면13



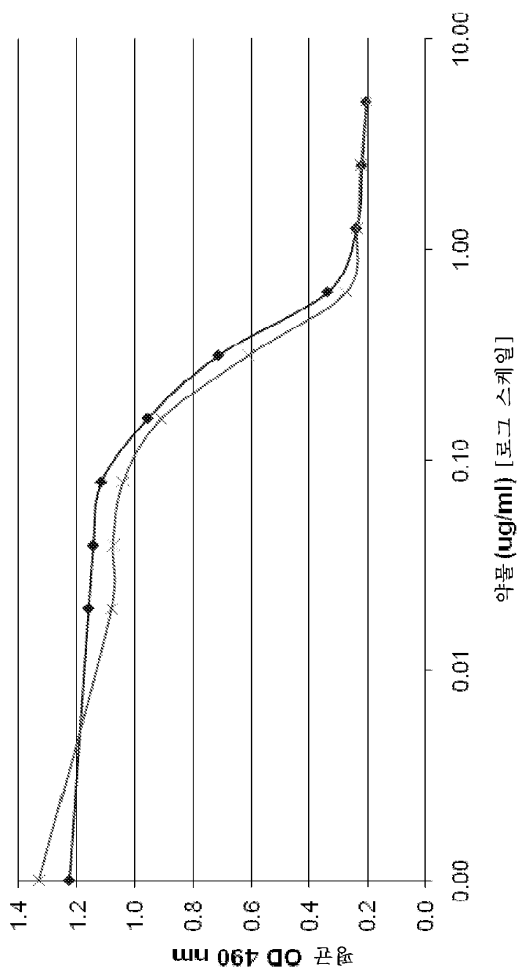
도면14



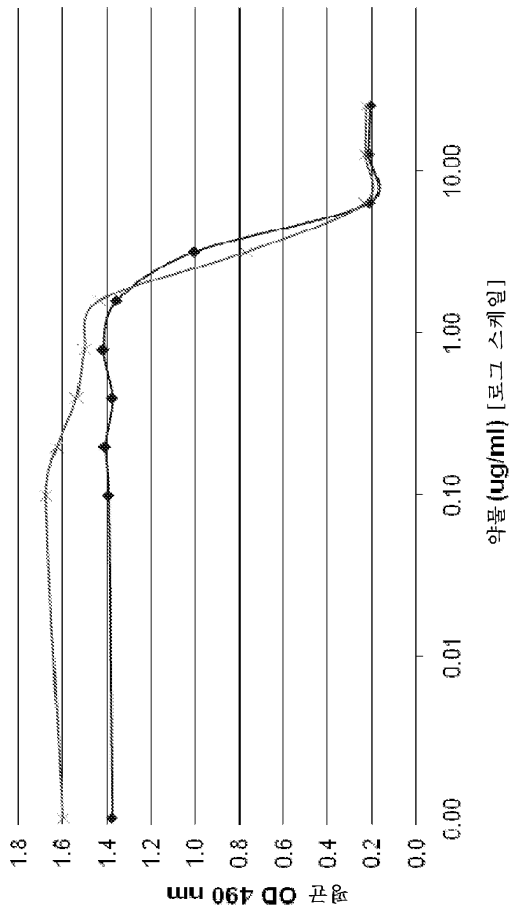
도면15



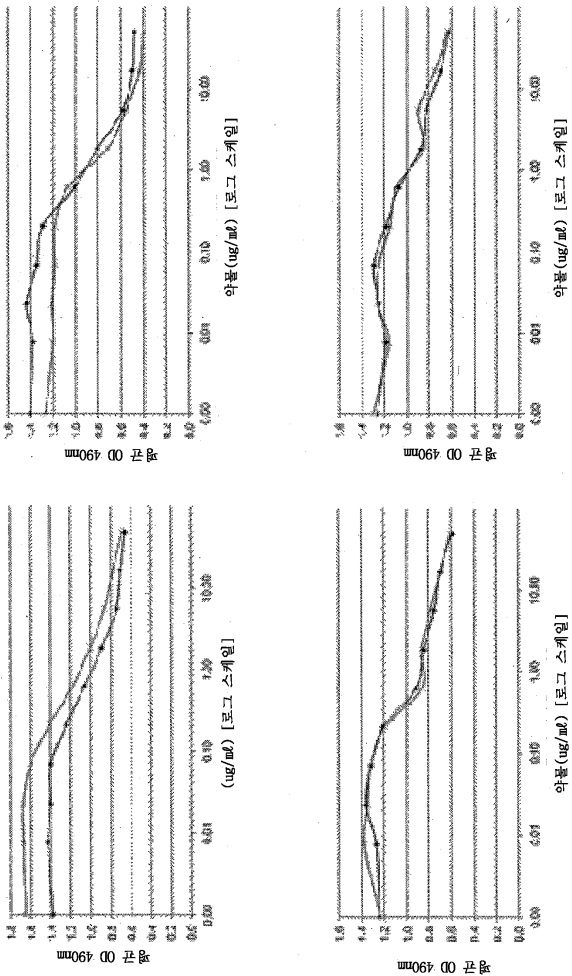
도면16



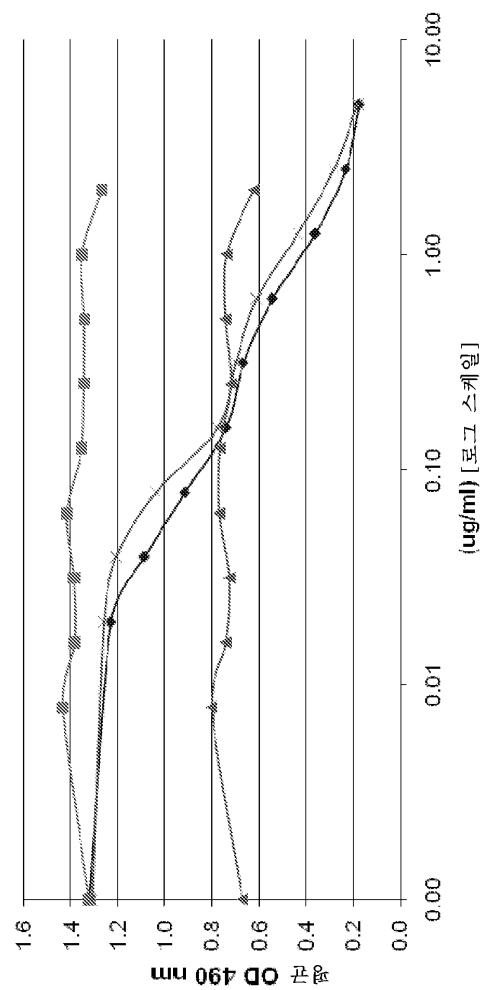
도면17



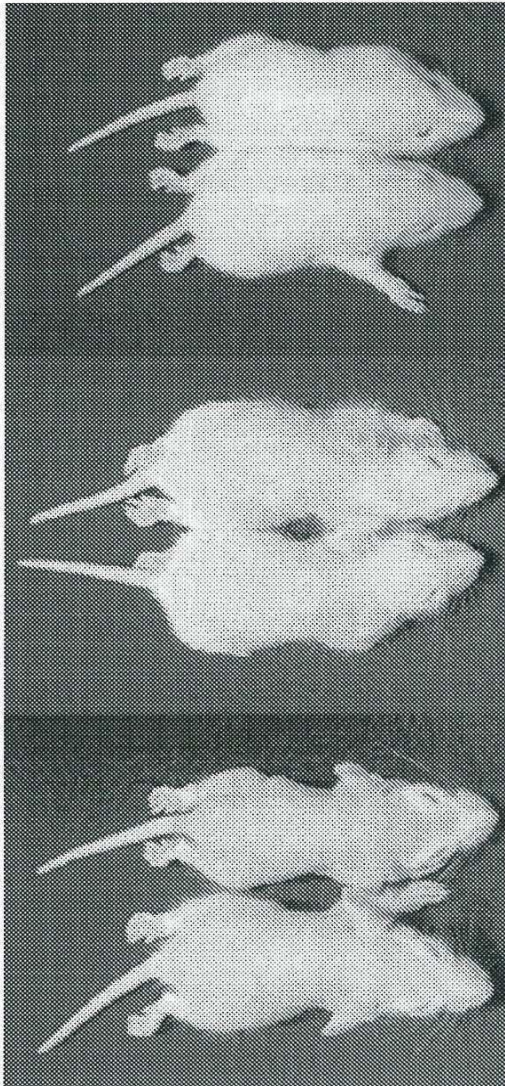
도면18



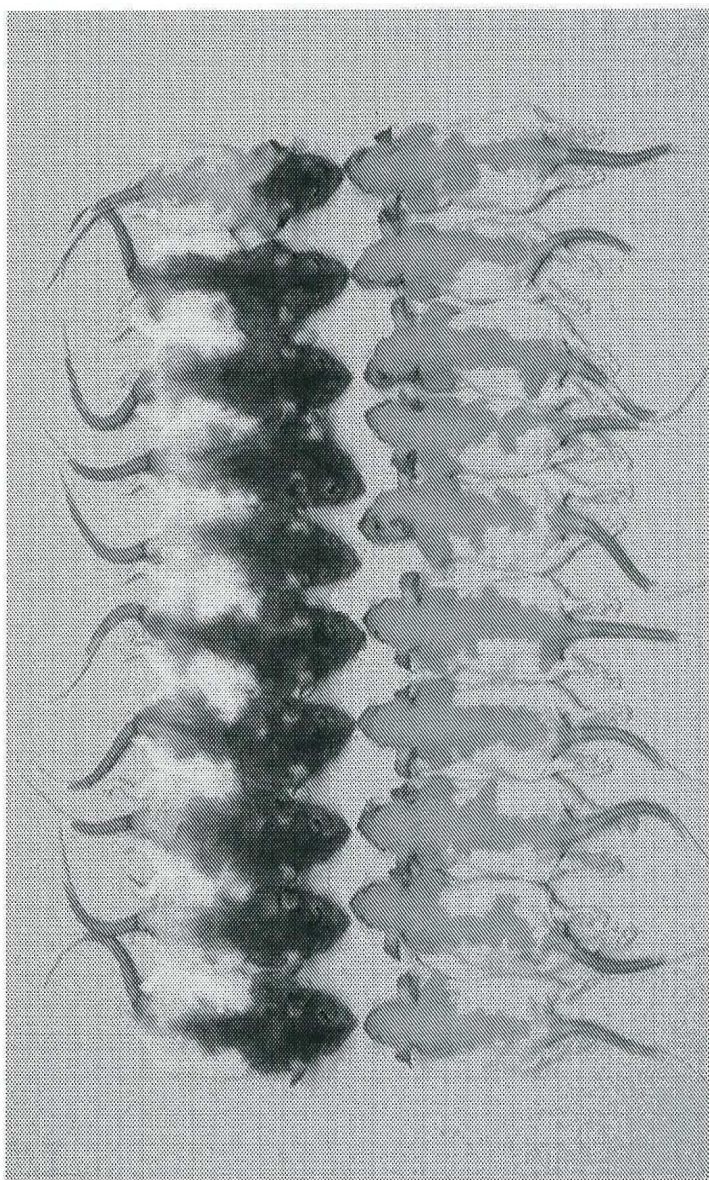
도면19



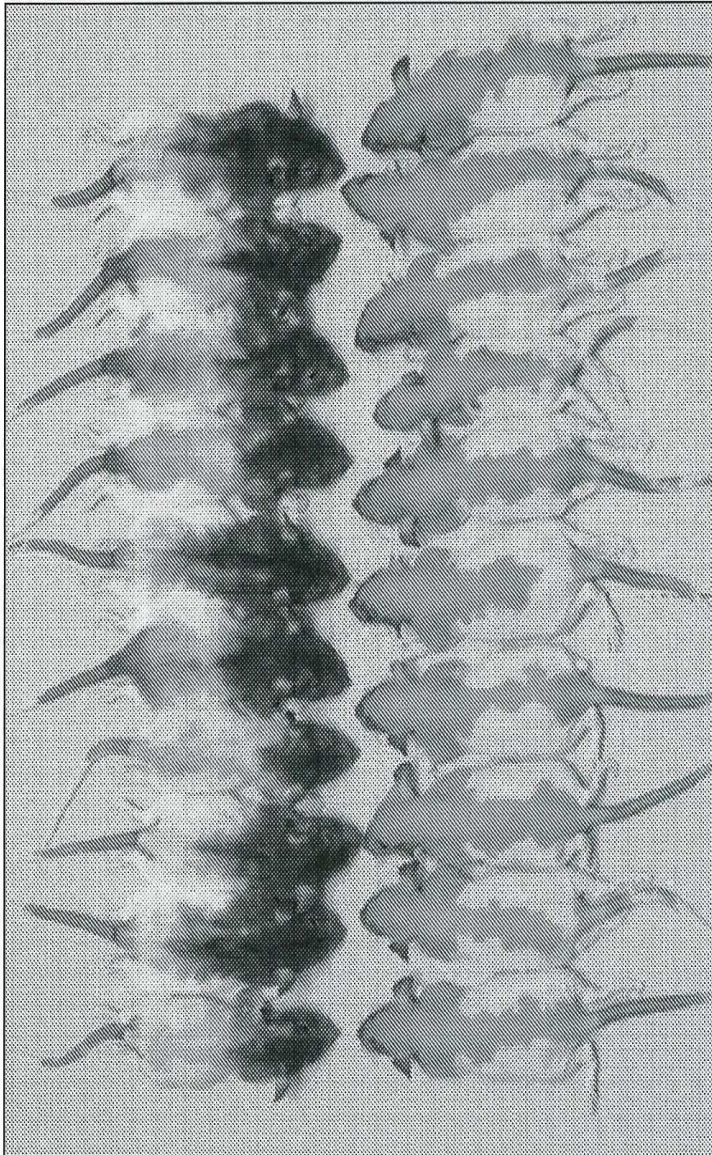
도면20a



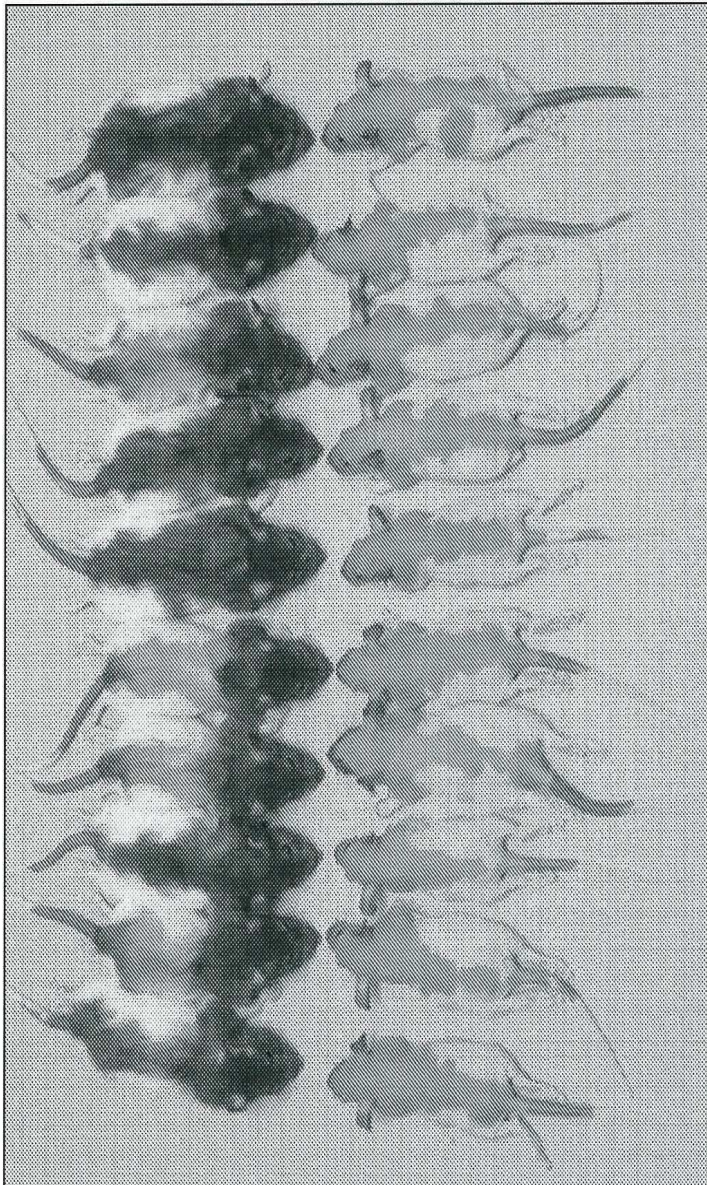
도면20b



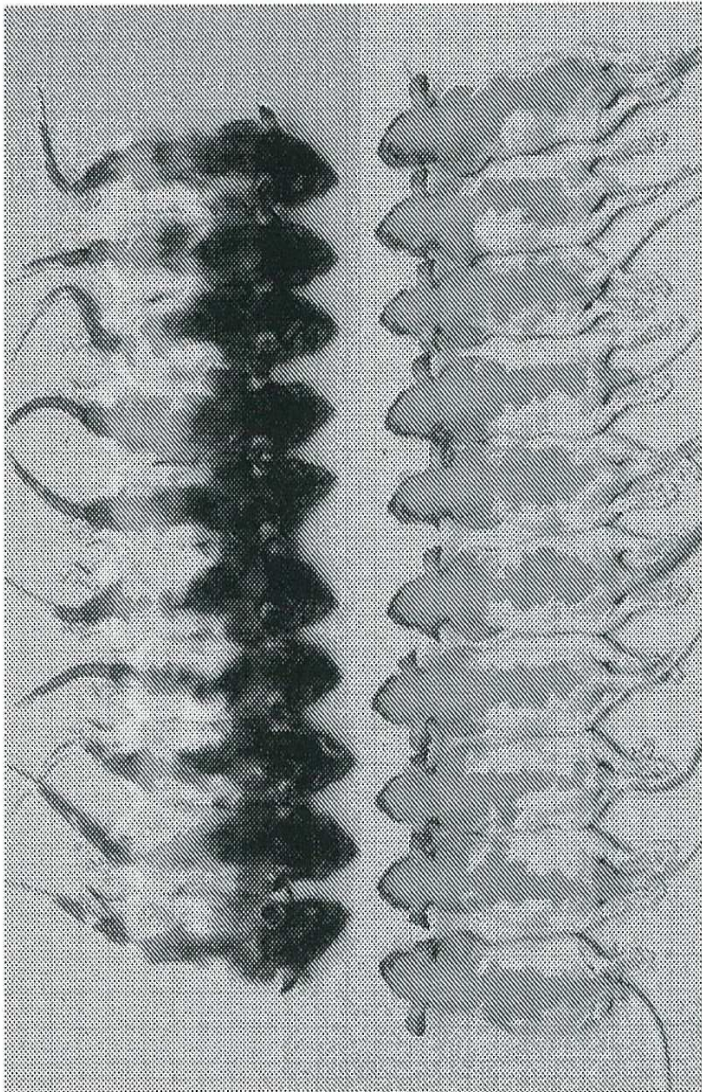
도면21



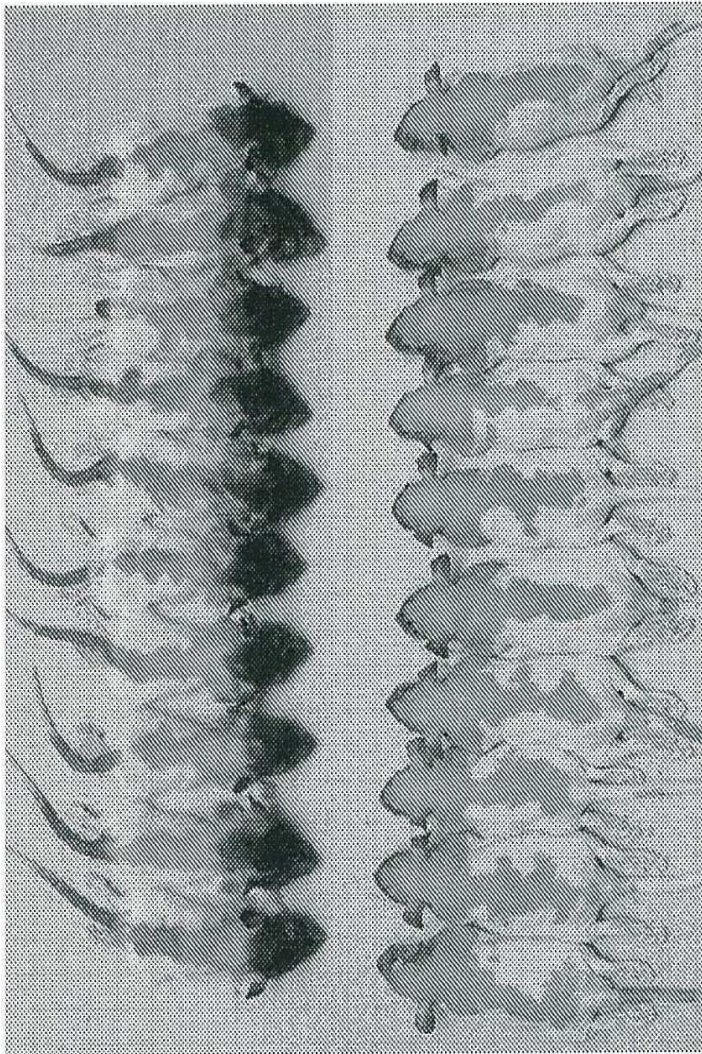
도면22a



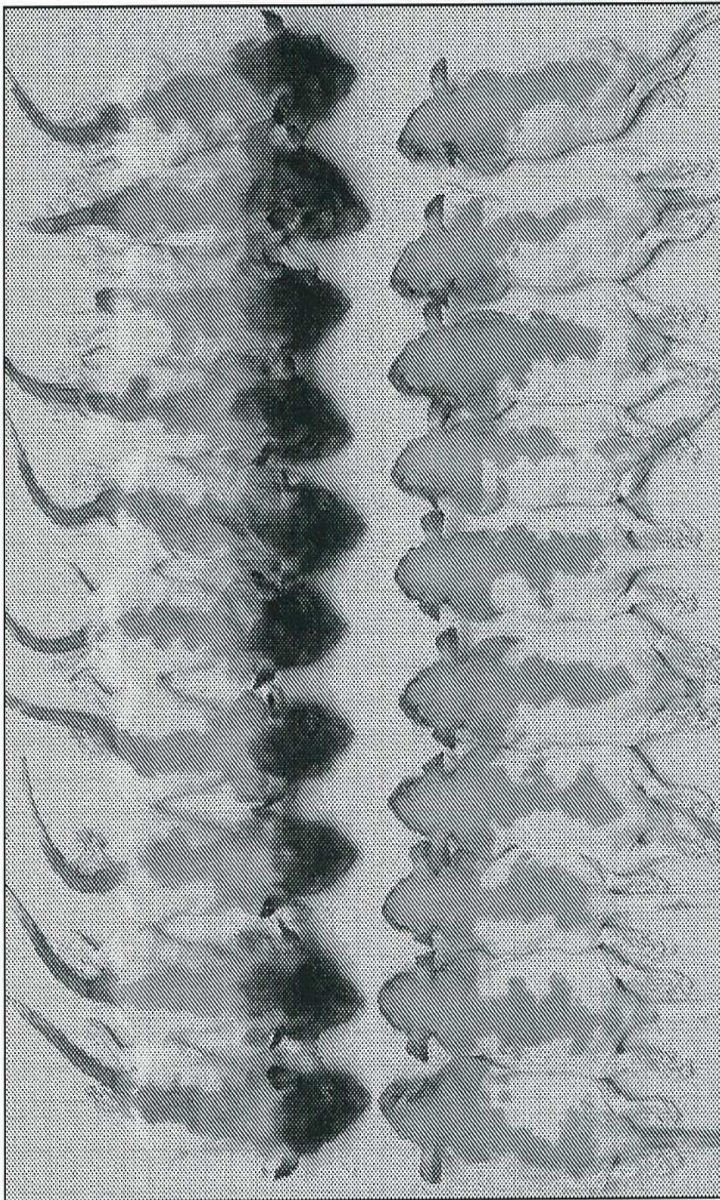
도면22b



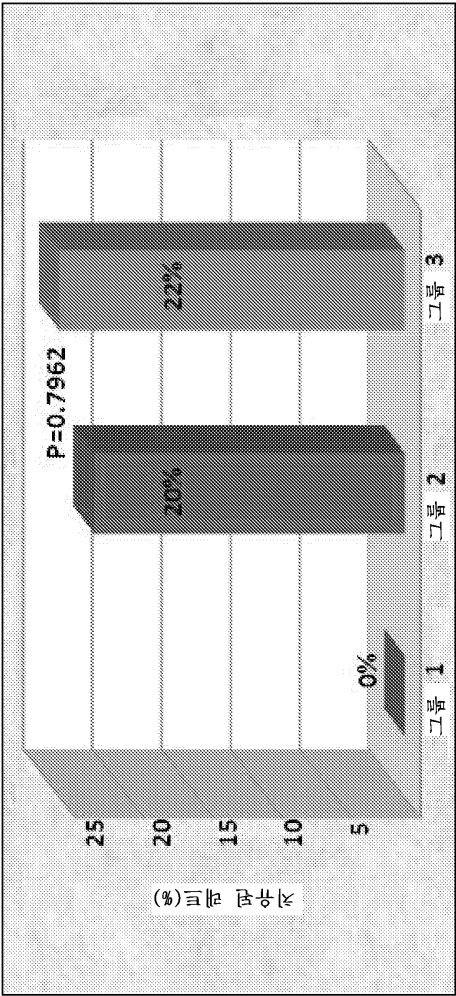
도면22c



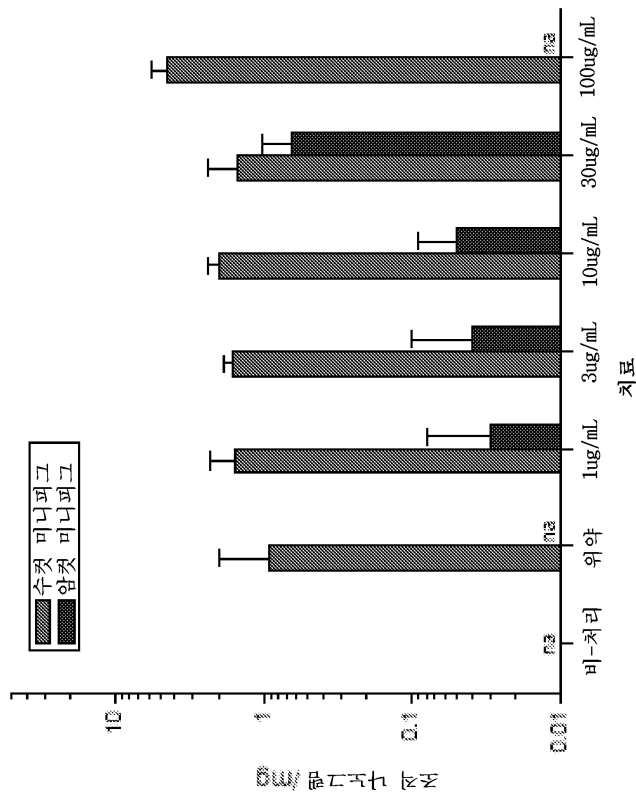
도면23



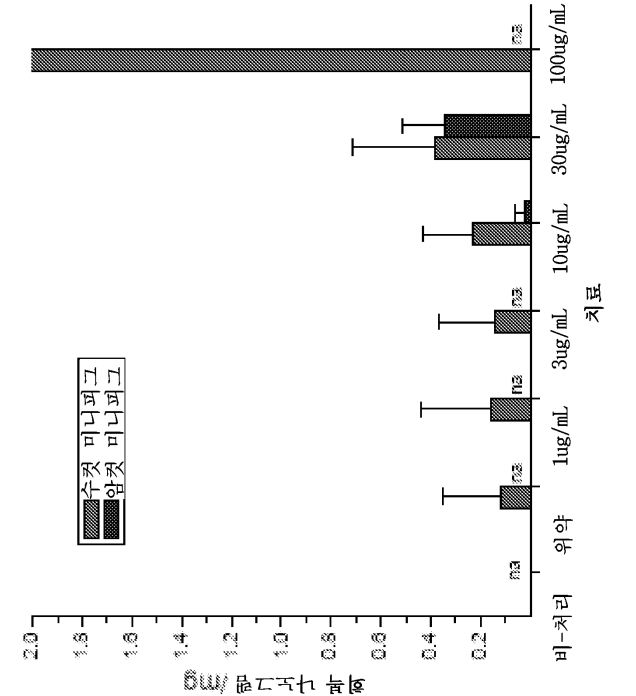
도면24



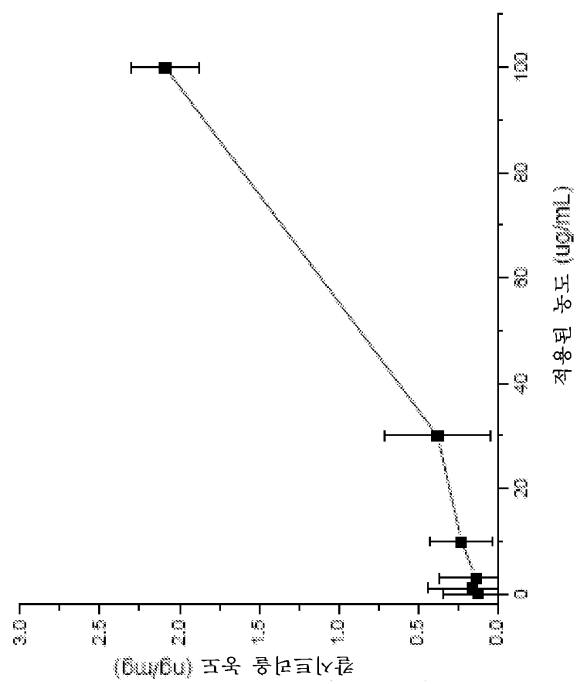
도면25a



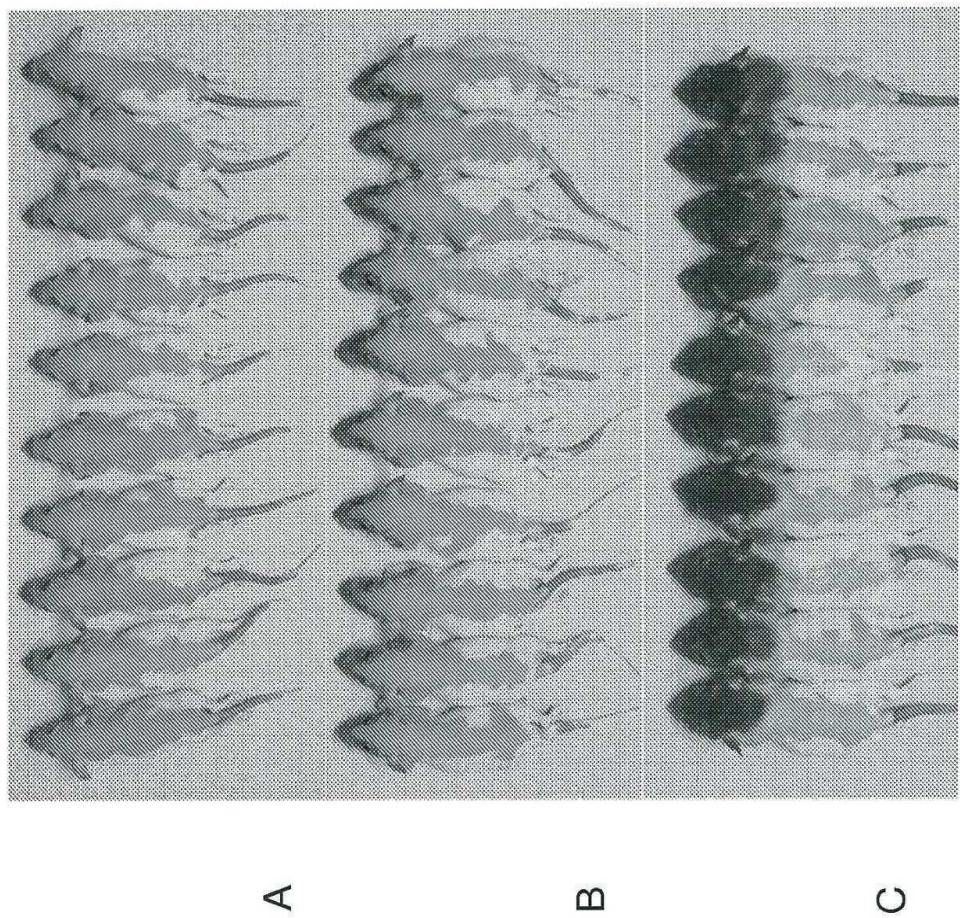
도면25b



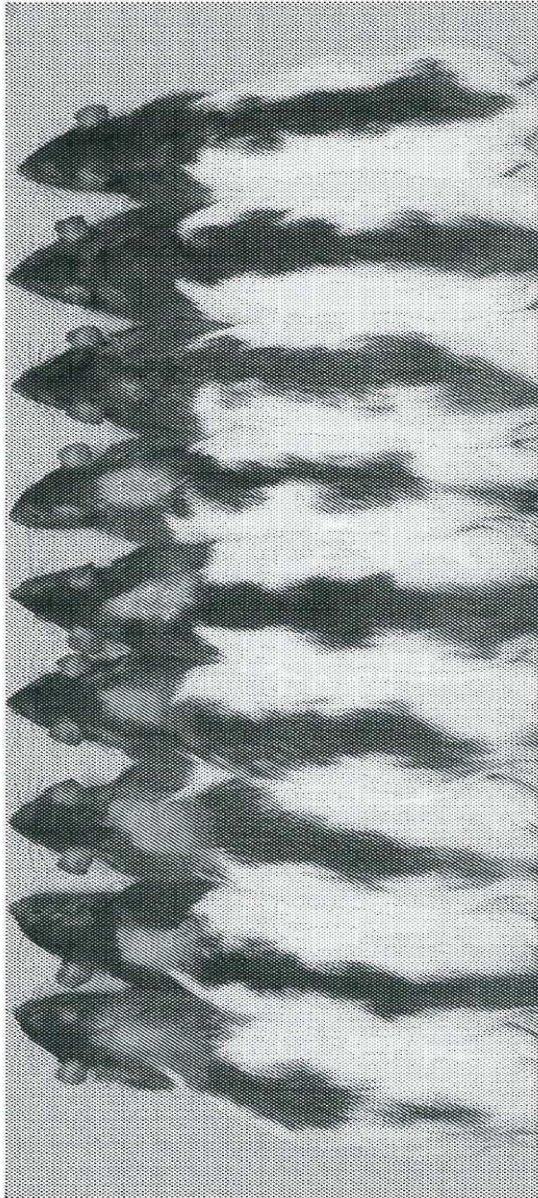
도면26



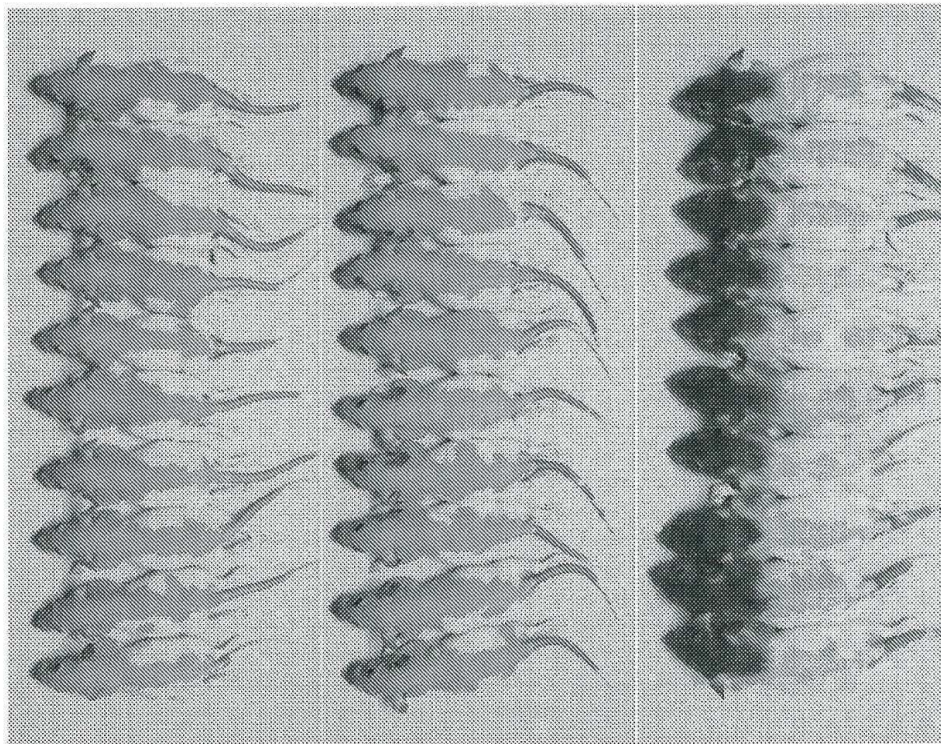
도면27



도면28



도면29

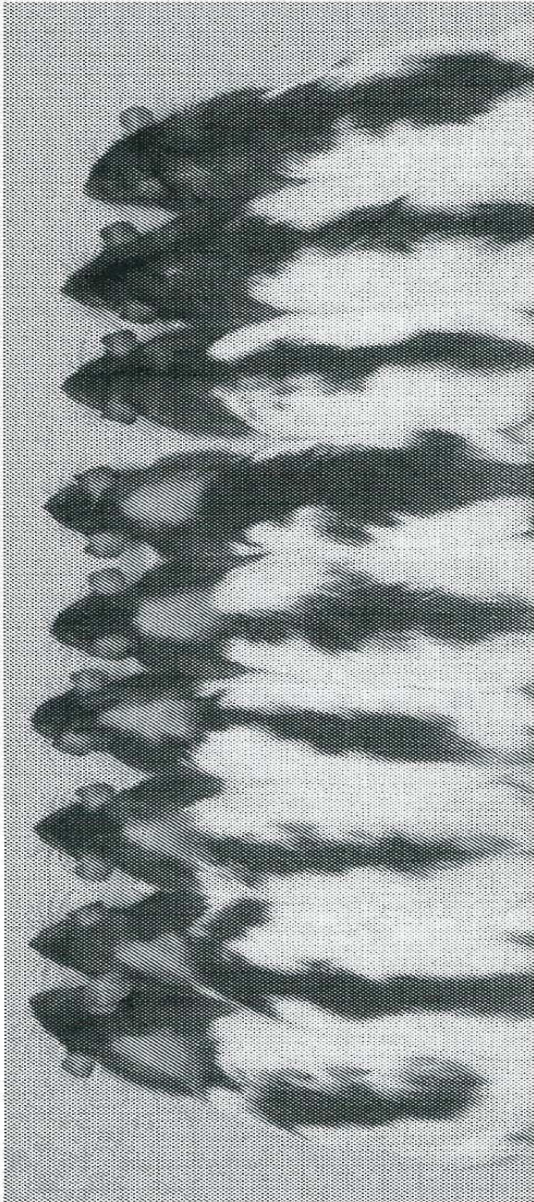


A

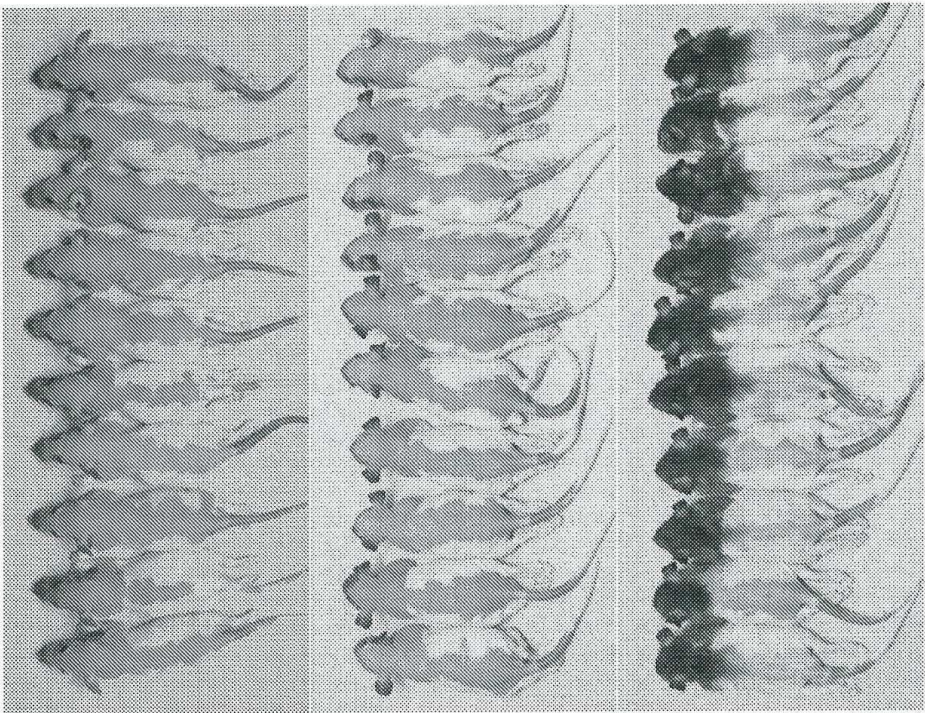
B

C

도면30



도면31

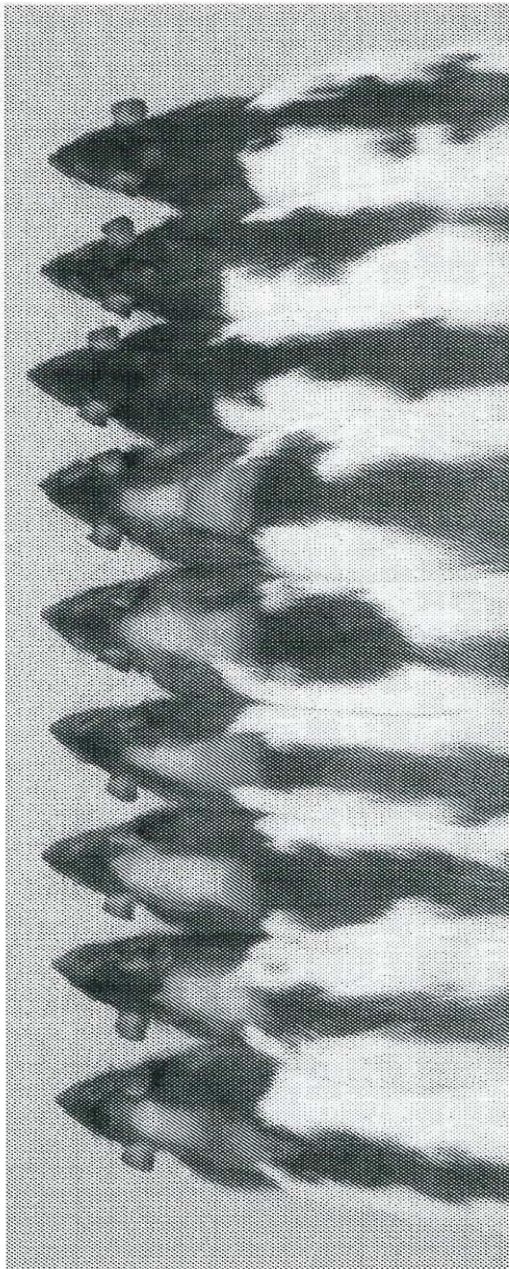


A

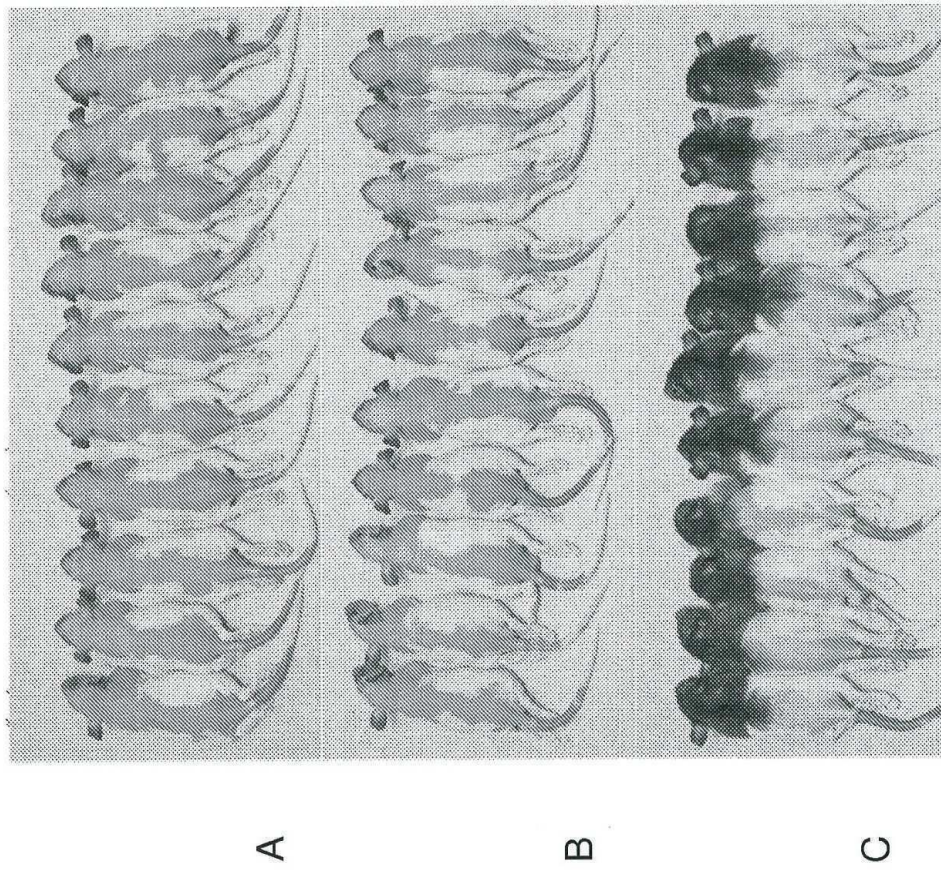
B

C

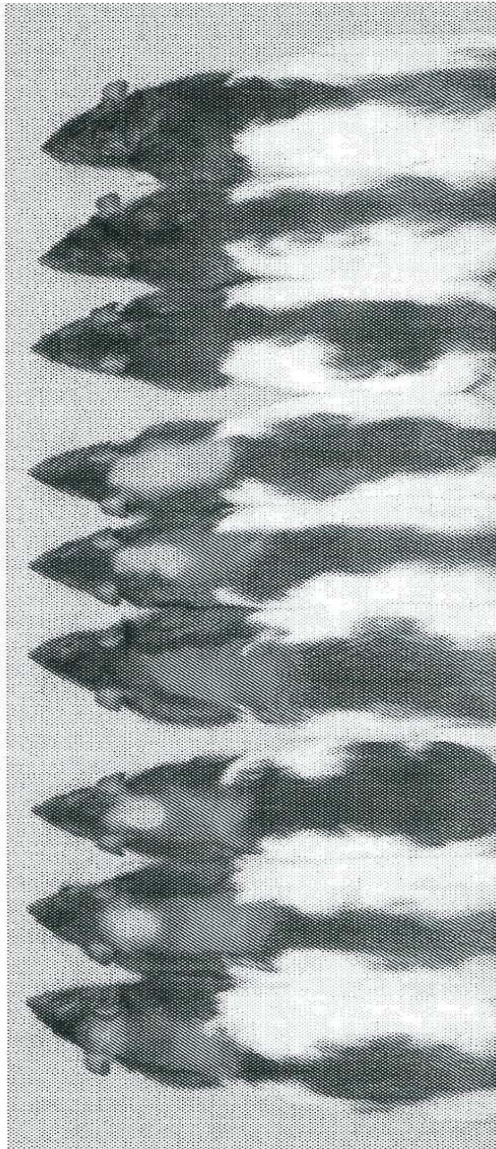
도면32



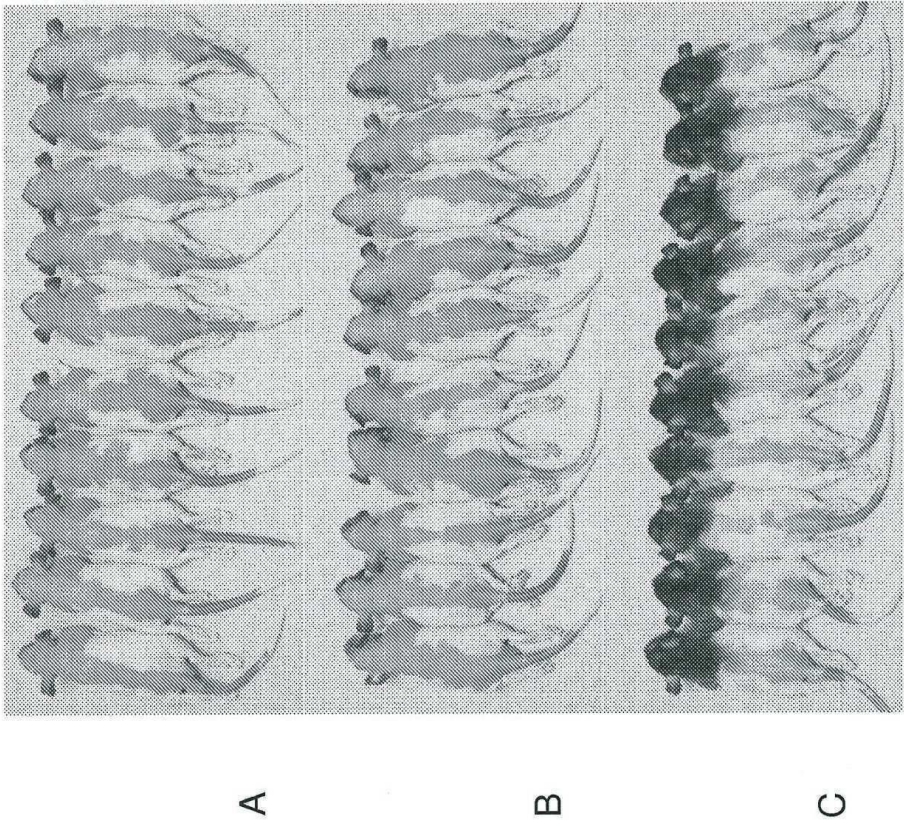
도면33



도면34



도면35



도면36

