



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.
A61K 31/352 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년07월03일
(11) 등록번호 10-0734341
(24) 등록일자 2007년06월26일

(21) 출원번호	10-2004-7001569	(65) 공개번호	10-2004-0054667
(22) 출원일자	2004년01월31일	(43) 공개일자	2004년06월25일
심사청구일자	2005년09월08일		
번역문 제출일자	2004년01월31일		
(86) 국제출원번호	PCT/US2002/024262	(87) 국제공개번호	WO 2003/011224
국제출원일자	2002년07월31일	국제공개일자	2003년02월13일

(30) 우선권주장	60/308,935	2001년07월31일	미국(US)
	09/975,776	2001년10월10일	미국(US)

(73) 특허권자 아르퀼 인코포레이티드
미국 매사추세츠 01801 워번 프레지덴셜 웨이 19

(72) 발명자 지양지웨이
미국매사추세츠주01519그라프톤브라이언서클1

레디다사라타지.
미국텍사스주78248샌안토니오정선리지1715

(74) 대리인 김성기
김진희

(56) 선행기술조사문헌
WO 94/04145 A1 WO 00/61142 A1
US 5969163 A

심사관 : 최원철

전체 청구항 수 : 총 75 항

(54) β -라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 함유하는약학 조성물 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 약학적으로 허용가능한 용매 내에서 거의 불용성인 β -라파콘이 인간 암 세포주에 대해 유의적인 항신생물 활성을 나타냄을 입증한다. 본 발명은 치료 유효량의 β -라파콘, 또는 이의 유도체 또는 및 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자를 포함하는 약학 조성물을 교시함으로써 이러한 중요한 제한을 극복하는데, 이때 상기 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자는 수-가용화 담체 분자, 예를 들어 히드록시프로필- β -시클로덱스트린, 또는 유계 가용화 담체 분자이며, 이들은 수성 용액 내에서 β -라파콘의 용해도를 증강시킨다. 신규한 약학 조성물은 제2 항암제와 함께 투여할 수 있고, 또한 방사선 요법과 병용할 수도 있다. β -라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체가 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자와

복합체를 형성하는 제제도 제공되는데, 상기 복합체는 동결 건조될 수 있고, 수성 용액 내에서 후속적으로 재구성되는 경우 실질적으로 가용성이라는 사실도 개시하고 있다. 또한, 약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클내 β -라파콘의 에멀션도 제공된다. 또한, 환자에게 신규한 약학 조성물 및 제제를 투여함으로써 암을 치료하는 방법도 제공되며, 약학 키트도 제공된다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 2.

비경구 투여용 수용액으로 희석시 상기 수용액 내에서 실질적으로 가용성인 상태로 존재하는 것인, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 3.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물로서, 이 약학 조성물은 동결 건조될 수 있고, 후속적으로 수용액 중에서 재구성하는 경우 실질적으로 가용성인 약학 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체는 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자와 착물을 형성하는 것인 약학 조성물.

청구항 5.

제3항에 있어서, 상기 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자는 에멀션으로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 6.

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 함유하는 하나 이상의 바이알을 포함하는, 환자의 암 치료용 키트.

청구항 7.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 8.

제7항에 있어서, 상기 조성물은 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체와 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자의 착물 또는 용액을 포함하고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 9.

제7항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자는 제1 바이알 내에 함유되어 있고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체는 제2 바이알 내에 함유되어 있는 것인 약학 조성물.

청구항 10.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하고, 동일한 바이알 또는 별도의 바이알 내에 제2 항암제를 추가로 포함하는, 포유류 종양 치료용 키트.

청구항 11.

제10항에 있어서, 하나 이상의 바이알은 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체와 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자의 착물을 포함하고, 동일한 바이알 또는 별도의 바이알 내에 제2 항암제를 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 12.

제1항에 있어서, 약학 조성물은 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체와 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자의 착물 또는 용액을 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 13.

제2항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체는 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체와 착물을 형성하는 것인 약학 조성물.

청구항 14.

제1항, 제4항 및 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물은 비경구 투여용인 약학 조성물.

청구항 15.

제1항 또는 제7항에 있어서, 약학 조성물은 수용액인 약학 조성물.

청구항 16.

제7항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자, 및 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체는 에멀션으로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 17.

비경구 투여용 수용액으로 희석시 상기 수용액 내에서 실질적으로 가용성인 상태로 존재하는 것인, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 18.

제17항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자, 및 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체는 에멀션으로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 19.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물로서, 이 약학 조성물은 동결 건조될 수 있고, 후속적으로 수용액 중에서 재구성하는 경우 실질적으로 가용성이며, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 20.

제19항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체는 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체와 착물을 형성하는 것인 약학 조성물.

청구항 21.

제7항, 제17항 및 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자는 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 단일 바이알 내에 함유되어 있는 것인 약학 조성물.

청구항 22.

제17항 또는 제19항에 있어서, 베타-라파콘, 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자는 제1 바이알 내에 함유되어 있고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체는 제2 바이알 내에 함유되어 있으며, 제1 바이알의 내용물과 제2 바이알의 내용물은 동시에 또는 순차적으로 투여되는 것인 약학 조성물.

청구항 23.

제19항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자, 및 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체는 에멀션으로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 24.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물로서, 암 치료를 위해 상기 환자에게 이 약학 조성물을 투여한 후 상기 환자에게 방사선 요법을 수행하는 것인 약학 조성물.

청구항 25.

약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클과 함께 제제화되어 비경구 투여용으로 적합한 에멀션을 형성하는 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 26.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클을 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물로서, 이 약학 조성물은 동결 건조될 수 있고, 후속적으로 재구성되는 경우 실질적으로 가용성인 약학 조성물.

청구항 27.

약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클과 함께 제제화되어 비경구 투여용으로 적합한 에멀션을 형성하는 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하며, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 28.

제27항에 있어서, 베타-라파콘, 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클을 포함하는 에멀션은

- (a) 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합되어 단일 바이알 내에 함유되거나, 또는
 - (b) 제1 바이알 내에 함유되고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체는 제2 바이알 내에 함유되는 것
- 인 약학 조성물.

청구항 29.

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 함유하는 하나 이상의 바이알을 포함하는, 환자의 암 치료용 키트.

청구항 30.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클을 포함하는 에멀션을 함유하는 하나 이상의 바이알을 포함하고, 동일한 바이알 또는 별도의 바이알 내에 제2 항암제를 추가로 포함하는, 포유류 종양 치료용 키트.

청구항 31.

약학적으로 허용가능한 비경구 투여용 지방 에멀션 비히클 내에서 제제화된 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하고, 제2 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는, 환자의 암 치료용 에멀션.

청구항 32.

약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클 내에서 제제화된 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 환자의 암 치료용 에멀션으로서, 암 치료를 위해 상기 환자에게 이 에멀션을 투여한 후 상기 환자에게 방사선 요법을 수행하는 것인 에멀션.

청구항 33.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체와 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자의 착물을 포함하는, 환자의 암 치료를 위한, 정맥내 투여용 멸균 주사가 가능한 약학 조성물.

청구항 34.

제33항에 있어서, 약학 조성물이 수용액으로 존재하는 것인 멸균 주사가 가능한 약학 조성물.

청구항 35.

제33항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린인 멸균 주사가 가능한 약학 조성물.

청구항 36.

삭제

청구항 37.

삭제

청구항 38.

제33항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자는 에멀션으로 존재하는 것인 멸균 주사가 가능한 약학 조성물.

청구항 39.

약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클 중의 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 환자의 암 치료를 위한, 정맥내 투여용 멸균 주사가 가능한 약학 조성물.

청구항 40.

제33항 또는 제39항에 있어서, 항암제 및 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 멸균 주사가 가능한 약학 조성물.

청구항 41.

국소 투여용으로 적합한 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자 및 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 42.

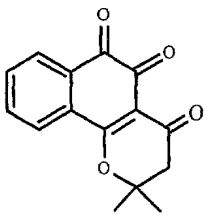
제41항에 있어서, 피부암 치료용 국소 조성물인 것인 약학 조성물.

청구항 43.

국소 투여용으로 적합한 약학적으로 허용가능한 지방 에멀션 비히클로 제제화된 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 44.

하기 화학식의 화합물:



청구항 45.

제44항의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자를 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 46.

- a) 4-아세톡시-베타-라파콘;
- b) 4-아세톡시-3-브로모-베타-라파콘; 또는
- c) 2-에틸-6-히드록시나프토[2,3-b] 푸란-4,5-디온 및

가용화 담체 분자를 포함하는, 암 치료용 약학 조성물.

청구항 47.

제1항, 제2항, 제3항, 제7항, 제17항, 제19항, 제24항, 제25항, 제26항, 제27항, 제33항 및 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 용액내 베타-라파콘의 농도는 1 mg/ml 내지 10 mg/ml 범위인 약학 조성물.

청구항 48.

제10항 또는 제30항에 있어서, 베타-라파콘의 농도는 1 mg/ml 내지 10 mg/ml 범위인 키트.

청구항 49.

제31항 또는 제32항에 있어서, 에멀션내 베타-라파콘의 농도는 1 mg/ml 내지 10 mg/ml 범위인 에멀션.

청구항 50.

제1항, 제2항, 제4항, 제7항, 제17항, 제25항, 제27항, 제33항 및 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 약학 조성물은 1주 2회 내지 4주 1회 투여를 위해 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위의 투여 단위(dosage unit)를 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 51.

제31항에 있어서, 에멀션은 1주 2회 내지 4주 1회 투여를 위해 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 범위의 투여 단위를 포함하는 것인 에멀션.

청구항 52.

제1항, 제2항, 제3항, 제7항, 제17항, 제19항, 제24항, 제41항 및 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 폴록사머, 포비돈 K17, 포비돈 K12, 트윈 80, 에탄올, 크레모포/에탄올, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 400, 프로필렌 글리콜, 트랩솔, 알파-시클로텍스트린 또는 이의 유사체, β -시클로텍스트린 또는 이의 유사체 및 감마-시클로텍스트린 또는 이의 유사체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 53.

제52항에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 베타-시클로텍스트린인 약학 조성물.

청구항 54.

제53항에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 히드록시프로필 베타-시클로텍스트린인 약학 조성물.

청구항 55.

제10항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 폴록사머, 포비돈 K17, 포비돈 K12, 트윈 80, 에탄올, 크레모포/에탄올, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 400, 프로필렌 글리콜, 트랩솔, 알파-시클로텍스트린 또는 이의 유사체, β -시클로텍스트린 또는 이의 유사체 및 감마-시클로텍스트린 또는 이의 유사체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 56.

제55항에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 베타-시클로텍스트린인 키트.

청구항 57.

제56항에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 히드록시프로필 베타-시클로텍스트린인 키트.

청구항 58.

삭제

청구항 59.

삭제

청구항 60.

삭제

청구항 61.

삭제

청구항 62.

제1항, 제2항, 제3항, 제7항, 제17항, 제19항, 제24항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 수-가용화 담체 분자가 에멀션으로 존재하는 것인 약학 조성물.

청구항 63.

제25항, 제26항, 제27항, 제28항, 제39항 및 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 지방 에멀션이 인트라리피드[Intralipid(등록상표)]인 약학 조성물.

청구항 64.

제30항에 있어서, 지방 에멀션이 인트라리피드(등록상표)인 키트.

청구항 65.

제31항 또는 제32항에 있어서, 지방 에멀션이 인트라리피드(등록상표)인 에멀션.

청구항 66.

제1항, 제2항, 제3항, 제7항, 제17항, 제19항, 제24항, 제25항, 제26항, 제27항, 제33항, 제36항, 제39항, 제45항 및 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 암은

a) 1종 이상의 고형 종양의 존재;

b) 전립선 암;

c) 다발성 골수종 ;

d) 혈액 종양;

e) 림프양 종양;

f) 난소암; 및/또는

g) 유방암

을 특징으로 하는 것인 약학 조성물.

청구항 67.

제31항 또는 제32항에 있어서, 암은

a) 1종 이상의 고형 종양의 존재;

b) 전립선 암;

c) 다발성 골수종 ;

d) 혈액 종양;

e) 림프양 종양;

f) 난소암; 및/또는

g) 유방암

을 특징으로 하는 것인 에멀션.

청구항 68.

삭제

청구항 69.

삭제

청구항 70.

제7항, 제17항, 제19항 및 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 항암제가 탁산 유도체, 바람직하게는 파클리탁셀 또는 도세탁셀인 약학 조성물.

청구항 71.

제70항에 있어서, 탁산 유도체가 파클리탁셀인 약학 조성물.

청구항 72.

제12항 또는 제30항에 있어서, 제2 항암제가 탁산 유도체, 바람직하게는 파클리탁셀 또는 도세탁셀인 키트.

청구항 73.

제72항에 있어서, 탁산 유도체가 파클리탁셀인 키트.

청구항 74.

제31항에 있어서, 제2 항암제가 탁산 유도체, 바람직하게는 파클리탁셀 또는 도세탁셀인 에멀션.

청구항 75.

제74항에 있어서, 탁산 유도체가 파클리탁셀인 에멀션.

청구항 76.

베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체 및 약학적으로 허용가능한 중합체를 포함하는, 환자의 암 치료용 약학 조성물.

청구항 77.

제76항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체는 약학적으로 허용가능한 중합체 내에 혼입되는 것인 약학 조성물.

청구항 78.

제76항에 있어서, 베타-라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체는 약학적으로 허용가능한 중합체와 혼합되는 것인 약학 조성물.

청구항 79.

제76항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 중합체가 생분해성인 것인 약학 조성물.

청구항 80.

제76항에 있어서, 약학적으로 허용가능한 중합체가 수용성인 것인 약학 조성물.

청구항 81.

제76항에 있어서, 상기 약학적으로 허용가능한 중합체가 폴리비닐피롤리돈, 피란 공중합체, 폴리히드록실프로필메타크릴아미드-페놀, 폴리히드록시에틸아스파타미드페놀, 팔미토일 잔기로 치환된 폴리에틸렌옥사이드-폴리라이신, 폴리락트

산, 폴리글리콜산, 폴리락트산과 폴리글리콜산의 공중합체, 폴리엡실론 카프로락톤, 폴리히드록시 부티르산, 폴리오르토 에스테르, 폴리아세탈, 폴리디히드로피란, 폴리시아노아크릴레이트 및 하이드로겔의 가교된 또는 양쪽성 블록 공중합체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 82.

제76항에 있어서, 수-가용화 담체 분자를 추가로 포함하는 것인 약학 조성물.

청구항 83.

제82항에 있어서, 수-가용화 담체 분자가 폴록사머, 포비돈 K17, 포비돈 K12, 트윈 80, 에탄올, 크레모포/에탄올, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 400, 프로필렌 글리콜, 트랩솔, 알파-시클로텍스트린 또는 이의 유사체, β -시클로텍스트린 또는 이의 유사체 및 감마-시클로텍스트린 또는 이의 유사체로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 약학 조성물.

청구항 84.

삭제

청구항 85.

삭제

청구항 86.

삭제

청구항 87.

삭제

청구항 88.

삭제

청구항 89.

삭제

청구항 90.

삭제

청구항 91.

삭제

청구항 92.

삭제

청구항 93.

삭제

청구항 94.

삭제

청구항 95.

삭제

청구항 96.

삭제

청구항 97.

삭제

청구항 98.

삭제

청구항 99.

삭제

청구항 100.

삭제

청구항 101.

삭제

청구항 102.

삭제

청구항 103.

삭제

청구항 104.

삭제

청구항 105.

삭제

청구항 106.

삭제

청구항 107.

삭제

청구항 108.

삭제

청구항 109.

삭제

청구항 110.

삭제

청구항 111.

삭제

청구항 112.

삭제

청구항 113.

삭제

청구항 114.

삭제

청구항 115.

삭제

청구항 116.

삭제

청구항 117.

삭제

청구항 118.

삭제

청구항 119.

삭제

청구항 120.

삭제

청구항 121.

삭제

청구항 122.

삭제

청구항 123.

삭제

청구항 124.

삭제

청구항 125.

삭제

청구항 126.

삭제

청구항 127.

삭제

청구항 128.

삭제

청구항 129.

삭제

청구항 130.

삭제

청구항 131.

삭제

청구항 132.

삭제

청구항 133.

삭제

청구항 134.

삭제

청구항 135.

삭제

청구항 136.

삭제

청구항 137.

삭제

청구항 138.

삭제

청구항 139.

삭제

청구항 140.

삭제

청구항 141.

삭제

청구항 142.

삭제

청구항 143.

삭제

청구항 144.

삭제

청구항 145.

삭제

청구항 146.

삭제

청구항 147.

삭제

청구항 148.

삭제

청구항 149.

삭제

청구항 150.

삭제

청구항 151.

삭제

청구항 152.

삭제

청구항 153.

삭제

청구항 154.

삭제

청구항 155.

삭제

청구항 156.

삭제

청구항 157.

삭제

청구항 158.

삭제

청구항 159.

삭제

청구항 160.

삭제

청구항 161.

삭제

청구항 162.

삭제

청구항 163.

삭제

청구항 164.

삭제

청구항 165.

삭제

청구항 166.

삭제

청구항 167.

삭제

청구항 168.

삭제

청구항 169.

삭제

청구항 170.

삭제

청구항 171.

삭제

청구항 172.

삭제

청구항 173.

삭제

청구항 174.

삭제

청구항 175.

삭제

청구항 176.

삭제

청구항 177.

삭제

청구항 178.

삭제

청구항 179.

삭제

청구항 180.

삭제

청구항 181.

삭제

청구항 182.

삭제

청구항 183.

삭제

청구항 184.

삭제

청구항 185.

삭제

청구항 186.

삭제

청구항 187.

삭제

청구항 188.

삭제

청구항 189.

삭제

청구항 190.

삭제

청구항 191.

삭제

청구항 192.

삭제

청구항 193.

삭제

청구항 194.

삭제

청구항 195.

삭제

청구항 196.

삭제

청구항 197.

삭제

청구항 198.

삭제

청구항 199.

삭제

청구항 200.

삭제

청구항 201.

삭제

청구항 202.

삭제

청구항 203.

삭제

청구항 204.

삭제

청구항 205.

삭제

청구항 206.

삭제

청구항 207.

삭제

청구항 208.

삭제

청구항 209.

삭제

청구항 210.

삭제

청구항 211.

삭제

청구항 212.

삭제

청구항 213.

삭제

청구항 214.

삭제

청구항 215.

삭제

청구항 216.

삭제

청구항 217.

삭제

청구항 218.

삭제

청구항 219.

삭제

청구항 220.

삭제

청구항 221.

삭제

청구항 222.

삭제

청구항 223.

삭제

청구항 224.

삭제

청구항 225.

삭제

청구항 226.

삭제

명세서

기술분야

본 발명은 상이한 용매계에서 β -라파콘(β -라파콘)의 용해도를 증강시키기 위한 가용화 담체 분자와 복합체를 형성하거나 결합된 β -라파콘, 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는 약학 조성물 및 제제, 뿐만 아니라 이들 약학 조성물 및 제제를 투여하는 방법에 관한 것이다.

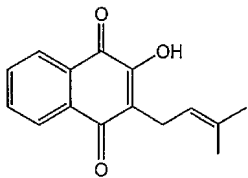
배경기술

2001년 한해에만 미국에서 1,220,000건 이상의 새로운 암이 진단될 것이다. 이로 인해 연간 563,000명 이상이 사망하므로, 암은 심장 질환에 이은 두번째 사망 원인이다(UBS Warburg "Disease Dynamics: The Cancer Market", Nov. 8, 2000). 수술 및 방사선요법은 암의 조기 발견시 유용한 치료법일 수 있지만, 전이성 질환을 위한 현재의 약물 치료는 대부분 일시적인 완화제로서의 역할에 그치고 장기간의 치료를 제공하지 못하고 있다. 새로운 화학요법제들이 시장에

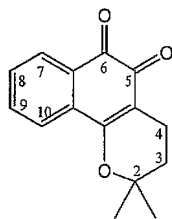
선보이고 있지만, 환자의 생존율에 대한 개선은 몇년 보다는 몇개월의 기간에서 측정되고 있고, 제1 요법으로서 기존의 제제와 병용하는 경우 및 제2 및 제3 요법으로 사용하는 경우 모두에서 내성 종양에 효과적인 신규한 약물에 대한 요구가 계속되고 있다.

과거에 가장 성공적인 약물 치료법은 작용 메카니즘이 상이하고 개별적으로 사용하는 경우 항종양 활성을 보유하는 2개 이상의 제제를 병용하는 것이었다. 이들의 작용 메카니즘이 상이함에도 불구하고, 암의 화학치료를 위해 현재 사용되는 대부분의 제제, 예를 들어 알킬화제, 백금 유사체, 안트라사이클린 및 토포이소머라제 억제제의 캄프토테신 패밀리는 공통적으로 DNA를 심각하게 손상시키는 특성을 보유하며, 따라서 이들은 "DNA-손상제"로 칭한다. 방사선요법도 유사하게 작용한다. 대부분의 DNA-손상제 뿐만 아니라 미소관-표적화 제제(예를 들어, 파클리탁셀)는 세포 주기의 G₂/M 전이기에서 세포 정지를 유발하는데, 상기 G₂/M 전이기는 세포가 DNA의 수복을 개시하거나, DNA 손상이 수복될 수 없는 경우, 아폽토시스를 수행하는, 세포 주기의 중요 체크포인트이다. 최근, 세포 체크포인트 기능을 더 이용하는 신규한 치료제를 확인하는데 관심이 집중되고 있다.

β-라파콘(3,4-디히드로-2,2-디메틸-2H-나프토[1,2-b]피란-5,6-디온), 퀴논은 라파코 나무[타베부이아 아벨라네대 (*Tabebuia avellanedae*)], 다수의 카탈파 과[비그노니아세아(*Bignoniaceae*)]로부터 분리될 수 있는 라파콜(나프토클논)에서 유래한다.



라파콜



베타-라파콘

β-라파콘 및 이의 중간체, 유도체 및 유사체는 문헌(Li, C.J. 등, J. Biol. Chem., 1993). 캄프토테신 및 토포테칸과 같이, β-라파콘은, 비록 메카니즘은 상이하지만, DNA 토포이소머라제 I을 억제한다(Li, C.J. 등, J. Biol. Chem., 1993).

다수의 β-라파콘 유사체는 본원에 참고로 인용하는 국제 특허 출원 PCT/US93/07878(W094/04145) 및 미국 특허 6,245,807와 같은 문헌에 기술되어 있는데, 다수의 치환체가 β-라파콘 화합물 상의 3 위치 및 4 위치에 부착될 수 있다. 본원에 참고 인용한 국제 특허 출원 PCT/US00/10169(W000/61142)에는 3 위치에서 뿐만 아니라 2-위치에 부착된 메틸기 대신에 다수의 치환체를 보유할 수 있는 β-라파콘이 개시되어 있다. 미국 특허 5,763,625, 5,824,700 및 5,969,163 (이들 각각은 본원에 참고 인용함)에는 2 위치, 3 위치 및 4 위치에서 다수의 치환체를 보유하는 및 유도체가 개시되어 있다. 또한, 다수의 저널을 통해 2 위치, 3 위치, 8 위치 및/또는 9 위치중 하나 이상의 위치에서 치환체를 보유하는 β-라파콘 및 유도체가 보고되었다(Sabba 등, J Med Chem 27:990-994 (1984)(2 위치, 8 위치 및 9 위치에 치환체를 보유함); (Molina Portela 및 Stoppani, Biochem Pharm 51:275-283 (1996) (2 위치 및 9 위치에 치환체를 보유함); Goncalves 등, Molecular and Biochemical Parasitology 1:167-176 (1998)(2 위치 및 3 위치에 치환체를 보유함)).

단일 제제로서, β-라파콘은 전형적으로 1~10 μM (IC₅₀) 범위의 농도에서 인간 암 세포주에 대한 유의적인 항신생물 활성을 나타내는 것으로 입증되었다. 세포독성은 전골수세포성 백혈병(Planchon 등, Cancer Res., 55 (1996) 3706), 전립선암(Li, C.J. 등, Cancer Res., 55(1995) 3712), 악성 신경교종(Weller, M. 등, Int. J. Cancer, 73 (1997) 707), 간암(Lai, C.C. 등, Histol Histopathol, 13 (1998) 8), 결장(Huang, L. 등, Md Med, 5, (1999) 711), 유방암(Wuertberger, S.M. 등, Cancer Res., 58 (1998) 1876), 난소암(Li, C.J. 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(23) (1999) 13369-74), 췌장암(Li, Y. 등, Mol Med, 6 (2000) 1008; Li, Y.Z., Mol Med, 5 (1999) 232), 및 다발성 골수종 세포주를 보유한 환자로부터 유래한 형질전환된 세포주, 예를 들어 약물 내성 세포주(Li, Y., Mol Med, 6 (2000) 1008)에서 확인되어 왔다. 정상의 새로운 인간 PBMC 또는 증식하는 인간 PBMC에서 세포독성은 관찰되지 않는다(Li, Y., Mol Med, 6 (2000) 1008).

β-라파콘은 방사선을 포함하는 DNA 손상제에 대해 세포를 감작시키는 DNA 수복 억제제로 확인되었다(Boothman, D.A. 등, Cancer Res, 47 (1987) 5361; Boorstein, R.J. 등, Biochem. Biophys. Commun., 117 (1983) 30). 그의 정확한 세포 내 표적(들) 및 세포 사멸 메카니즘은 아직 밝혀지지 않았지만, β-라파콘은 새로운 작용 메카니즘으로 인간 DNA 토포이소머라제 I(Li, C.J. 등, J. Bid. Chem., 268 (1993) 22463) 및 II(Frydman, B. 등, Cancer Res. 57 (1997) 620)를 시험관 내에서 강력하게 억제하는 것으로 확인되었다. 공유결합성 토포이소머라제-DNA 복합체를 안정화시키고 토포이소머라제

-매개된 DNA 절단을 유도하는 토포이소머라제 "포이즌"(예를 들어, 캄프토테신, 에토포시드, 독소루비신)과는 달리, β -라파콘은 상기 효소와 직접 상호작용하여 촉매 작용을 억제하고 절단가능한 복합체의 형성을 차단하거나(Li, C.J. 등, J. Biol. Chem., 268 (1993) 22463), 복합체 자체와 상호작용하여 DNA 브레이크의 재연결 및 DNA로부터 상기 효소의 분리를 유발시킨다(Krishnan, P. 등, Biochem Pharm, 60 (2000) 1367). β -라파콘 및 이의 유도체는 또한 합성되어 왔으며 항바이러스제 및 구충제로서 시험되어 왔다(Goncalves, A.M. 등, Mol. Biochem. Parasitology, 1 (1980) 167-176; Schaffner-Sabba, K. 등, J Med Chem., 27 (1984) 990-994).

더 구체적으로, β -라파콘은 DNA 복제를 방해하고, G_1 및/또는 S기에서 세포 주기를 지연시키고, 여러가지 인간 암종 세포주에서 DNA를 손상시키지 않고 또한 p53 상태와는 무관하게 아포토시스성 또는 네크로시스성 세포 사멸을 유발시킴으로써 작용하는 것으로 보인다(Li, Y.Z. 등 (1999); Huang, L. 등). 토포이소머라제 I은 염색체를 구성하는 DNA를 푸는 효소이다. 염색체는 세포가 유전 정보를 이용하여 단백질을 합성하기 위해서는 반드시 풀려야하며; β -라파콘은 염색체가 풀리지 않도록 유지함으로써 세포가 단백질을 만들 수 없도록 한다. 결과적으로, 세포 성장은 중단된다. 암세포는 지속적으로 복제하며 정상 세포에서 복제를 제한하는 다수의 메커니즘을 우회하기 때문에, 암세포는 정상 세포 보다 토포이소머라제 억제에 더 민감하다.

종양 세포에서 β -라파콘에 대한 다른 가능한 세포내 표적은 효소 NAP(P)H:퀴논 옥시도리덕타제(ZQO1)이다. 생화학적 연구 결과, NQO1에 의한 β -라파콘의 환원은 퀴논형과 히드로퀴논형 사이에 "무용의 순환(futile cycling)"을 유발하는데, 이와 동시에 환원된 NADH 또는 NAD(P)H의 상실이 동반된다(Pink, J.J. 등, J. Biol. Chem., 275 (2000) 5416). 이들 환원된 효소 보조인자의 고갈은 β -라파콘 처리후 아포토시스성 경로의 활성화에 결정적인 요인으로 작용한다.

이들 발견을 통해, β -라파콘은 암 및 종양의 치료를 위해 개발이 활성화되었다. 예를 들어, WO 00/61142에는 암 치료용 조성물과 방법이 개시되어 있는데, 이는 G_2/M 약물, 예를 들어 탁산 유도체와 함께 β -라파콘과 같은 G_1 또는 S기 약물의 유효량을 제1 화합물로서 투여하는 것을 포함한다. 또한, 미국 특허 6,245,807은 다른 β -라파콘 유도체 중에서 인간 전립선 질병의 치료를 위해 β -라파콘을 이용하는 것에 대해 기술되어 있다.

그러나, 비경구 투여 및 국소 투여를 위해 β -라파콘을 포함하는 약학 제제를 개발하는데 있어서 한가지 장애는 약학적으로 허용가능한 용매내에서 β -라파콘의 낮은 용해도이다. β -라파콘은 수중 용해도가 매우 낮으며, 국소 투여 및 비경구 투여, 구체적으로 약물의 정맥내 전달 및 피하 전달에 사용되는 통상의 용매 시스템 내에서도 제한된 용해도를 나타낸다. 결과적으로, 제제가 투여되는 환자에서 안전하며 용이하게 생체이용될 수 있는 비경구 투여 및 국소 투여용의 개선된 β -라파콘 제제가 요구되고 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명은 일반적으로 포유류 암 치료에 사용할 수 있고, 종래 조성물의 단점 및 장애를 극복한, β -라파콘을 함유하는 약학 조성물에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 포유류 암, 예를 들어 폐암, 유방암, 결장암, 난소암 및 전립선암, 다발성 골수종, 악성 흑색종, 비흑색종 피부암 뿐만 아니라 증식 장애 및 피부 질환, 예를 들어 건선의 치료에 사용하기 위한, β -라파콘 또는 이의 유도체 또는 및 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자와 복합체를 형성하거나 결합하여 단일 조성물 또는 봉입 복합체를 형성할 수 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 담체 분자는 수-가용화 담체 분자 또는 유계 가용화 담체 분자가 유익하다.

본 발명은 β -라파콘 또는 이의 유도체 또는 및 β -라파콘의 용해도를 증강시키는 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자를 포함하고, 포유류 신체 내에서 생체이용할 수 있으며, 비경구 투여 및 국소 투여에 적합한 약학 조성물을 제공한다. 용액중 β -라파콘의 농도는 1 mg/ml 이상, 바람직하게는 3 mg/ml 이상, 더욱 바람직하게는 5 mg/ml 이상이다. 농축된 약학 조성물에 있어서, 본 발명자들은 β -라파콘의 농도로 10 mg/ml 이상을 고려하였다.

또한, 본 발명은 포유류 암의 치료에 사용하기 위해, β -라파콘 및 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자와 함께 탁산 유도체 또는 다른 항암제를 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 약학적으로 허용가능한 가용화 담체 분자와 복합체를 형성하는 β -라파콘 또는 이의 유도체 또는 유사체의 제제를 제공하는데, 이때 상기 복합체는 동결 건조될 수 있고, 수성 용액 내에서 후속적으로 재구성되는 경우, 실질적으로 가용성이다.

또한, 본 발명은 환자에게 본 발명의 약학 조성물 및 제제를 투여하는 단계를 포함하는 포유류 암 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 암 환자 또는 피부 질환 환자에게 β -라파콘의 유도체 또는 유사체, 예를 들어 4-아세톡시- β -라파콘 또는 4-아세톡시-3-브로모- β -라파콘을 투여하는 단계를 포함하는, 암 및 피부 질환 치료 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 치료 유효량의 β -라파콘 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함하는 약학 조성물을 함유하는 하나 이상의 용기를 포함하는 약학 키트를 제공한다. 이러한 키트는 필요에 따라 여러가지 종래 약학 키트 성분, 예를 들어 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 보유하는 용기, 추가의 용기 등을 포함할 수 있다. 투여 성분의 양, 투여 지침 및/또는 성분들의 혼합 지침을 명시한 인쇄물, 예를 들어 동물용 또는 라벨이 키트 내에 포함될 수 있다.

상술한 내용은 본 발명의 더 중요한 특징을 다소 광범위하게 기술한 것으로서 후술하는 상세한 설명에 의해 더 명백하게 이해될 것이다. 본 발명의 다른 목적 및 특징은 후술하는 상세한 설명 및 첨부 도면에 의해 명백하게 이해될 수 있을 것이다. 그러나, 첨부 도면은 단지 본 발명의 예시를 목적으로 한 것이며, 발명을 제한하려는 의도는 없는 것이며, 본 발명의 범위는 하기 특허청구의 범위에 의해 정해될 것이다.

실시예

1. 소수성 약제 물질을 용해하는 것으로 알려진 허용 가능한 용매계의 평가

a. β -라파콘 및 히드록시프로필- β -시클로덱스트린(HPBCD) 용액의 제조

소수성 약제 물질을 용해하는 것으로 알려진 약학적으로 허용 가능한 다양한 용매계를 β -라파콘을 사용하여 평가하였다. 하기 표 5에 나타난 바와 같이, 평가한 용액 중 여러 개에서 목표한 최소 농도(10 mg/ml)를 만족하는 용액이 얻어졌다. 그러나, 이들 용매계는 용액으로부터 β -라파콘의 실질적인 침전이 일어나지 않도록 하면서 평균 염수로 5× 희석할 수 있는 것은 아무 것도 없었다. 또한, 이들 공용매와 계면활성제 대부분은 그 자체의 독성 및 내성 문제가 있기 때문에 고용량 약물 투여 중에는 관리가 필요하다.

[표 5]

용매계	비희석 (mg/ml)	5 X 희석* (mg/ml)
폴록사머 (20%)	2.0350	0.0331
포비돈 K17 (20%)	1.8250	0.0312
포비돈 K12 (20%)	1.8600	0.0313
Tween 80	11.1700	1.6550
EtOH (76%)	10.6600	0.1025
PEG 400	11.6800	0.1400
프로필렌 글리콜	8.7800	0.0950
트랩술 (20%)	1.4650	0.0300

* 0.9% 염수로 희석

상기 표로부터, 수성 용액 중의 β -라파콘 용해도를 향상시키는 데 두 가지의 다른 방법을 이용하였다. 첫째, β -라파콘을 금속 킬레이트제, 예컨대 칼슘 및 마그네슘으로 처리하여 가용성 복합체를 형성시키고, 둘째, β -라파콘을 가용화제 β -시클로덱스트린 및 γ -시클로덱스트린으로 처리하여 가용성 내포 복합체를 형성시켰다. 이들 4종의 시약을 평가하기 위해서, 소량의 에탄올 중의 ^{14}C -표지화된 β -라파콘을 상기 시약들의 수성 용액(또는 대조예로서 PBS 완충액)에 첨가한 후, 각 용액 중의 β -라파콘의 상대 용해도를 원심분리 후에 상청액 중에 남아 있는 방사능으로서 측정하였다.

구체적으로, PBS 완충액 900 μl 를 함유하는 개개의 1.5 ml 에펜도르프 튜브에 PBS 완충액 중의 CaCl_2 8 mM, PBS 완충액 중의 MgCl_2 8 mM, PBS 완충액 중의 β -시클로덱스트린 8 mM, 및 PBS 완충액 중의 γ -시클로덱스트린 8 mM을 첨가하였다. 이어서 각 튜브에 75% 에탄올 중의 ^{14}C -표지화된 β -라파콘(40,000 CPM, 0.55 μg) 10 μl 를 첨가하였다. 볼텍스(vortexing) 처리하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 베크만 섬광 계수기를 사용하여 상청액 100 μl 의 방사능을 계수하였다. 나머지 혼합물에, 75% 에탄올 중의 β -라파콘 0.5 μg (10 mg/ml 용액 50 μl) 또는 600 μg 을 첨가하였다. 볼텍스 처리하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 다시 상청액 100 μl 의 방사능을 계수하였다.

β -라파콘 0.5 μg 을 첨가하였을 때, 5종의 수성 용액의 상청액에 모두 거의 100% β -라파콘이 존재하였다. 그러나, β -라파콘 600 μg 을 첨가하였을 때, β -시클로덱스트린 용액만 상청액 중에 50% 이상의 β -라파콘을 보유하였다. 섬광 계수기로 계수하여 상청액 중의 표지된 β -라파콘 백분율을 결정하였다. 도 1은 다양한 가용화제의 수성 용액에 대한 β -라파콘의 상대 가용성을 예시한다. 도 1에서, 용액 1은 PBS 완충액으로 구성되고, 용액 2는 PBS 완충액 중의 CaCl_2 8 mM로 구성되며, 용액 3은 PBS 완충액 중의 MgCl_2 8 mM로 구성되고, 용액 4는 PBS 완충액 중의 β -시클로덱스트린 8 mM로 구성되며, 용액 5는 PBS 완충액 중의 γ -시클로덱스트린 8 mM로 구성되었다.

b. β -라파콘 용해도에 대한 히드록시프로필- β -시클로덱스트린(HPBCD) 농도의 영향

β -시클로덱스트린은 경구용으로 적합하고, 비경구 또는 국소용으로는 적합하지 않기 때문에, 추가의 연구용으로 그것의 유사체 HPBCD를 선택하였다. β -라파콘 용해도에 대한 HPBCD 농도의 영향을 시험하기 위해, 소량의 에탄올 중의 β -라파콘을 다양한 농도의 HPBCD(0~16 mM 또는 0~25%(w/w))를 함유하는 8종의 수성 용액에 첨가한 후, 원심분리 후의 상청액에 남아있는 방사능 백분율을 측정하여 상대 용해도를 결정하였다. 에탄올에 의한 임의의 영향을 배제하고 동결 건조 후에 용해도 개량이 유지될 수 있는지 여부를 결정하기 위해서, 혼합물을 동결 건조시킨 후 동일 부피의 물에 재용해시켰다. 재용해 혼합물의 상청액 중의 β -라파콘의 백분율을 측정하여 동결 건조 물질의 완전 재용해를 확인하였다.

구체적으로, 개개의 1.5 ml 에펜도르프 튜브에, 충분한 물, 50 mM, HPCD 용액 75% 에탄올 중의 ^{14}C -표지화된 β -라파콘 용액 50 mM, 에탄올 중의 β -라파콘 용액 10 mg/ml, 및 0.9% NaCl 용액을 첨가하여 성분 농도가 하기 표 6에 표시된 바와 같은 용액 1 ml를 제조하였다.

[표 6]

튜브#	1	2	3	4	5	6	7	8	9
HPCD, Mm	0	0	1	2	4	6	8	12	16
^{14}C - β -라파콘, CPM	60K	60K	60K	60K	60K	60K	60K	60K	60K
β -라파콘, mM	0	1	1	1	1	1	1	1	1
NaCl, % (w/v)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

볼텍스 처리하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 벡만 섬광 계수기를 사용하여 각 튜브로부터의 상청액 100 μl 의 방사능을 계수하였다. 나머지 혼합물(각각 900 μl)을 동결 건조시킨 후, 물 900 μl 에 재용해시켰다. 볼텍스 처리하여 다시 각 튜브로부터의 상청액 100 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 방사능을 계수하였다.

도 2는 증가된 HPBCD 농도에 의해 β -라파콘 용해도가 증가한다는 점과, β -라파콘이 동결 건조 후 완전히 재용해될 수 있다는 점을 보여준다.

c. 가열에 의한 β -라파콘 및 히드록시프로필- β -시클로덱스트린(HPBCD) 용액의 제조

에탄올 용액에 β -라파콘을 사전 가용화시키지 않고 β -라파콘/HPBCD 용액을 제조하였다. β -라파콘을 다양한 농도의 HPBCD 수성 용액과 혼합하고, 그 혼합물을 70°C로 가열한 후, 실온으로 냉각시켰다. 냉각된 용액을 여과하고(0.22 μ), 가용화된 β -라파콘의 양을 HPLC 분석에 의해 측정하였다. 다양한 HPBCD 수성 용액 중의 β -라파콘의 용해도는 하기 표 7에 나타난다.

[표 7]

HPBCD % (m/M)	β -라파콘 농도 (mg/ml)
50 (325)	19.7
40 (260)	15.8
30 (195)	10.8
20 (130)	7.4
10 (65)	3.1

β -라파콘의 최대 농도 19.7 mg/ml는 50% HPBCD 용액(최대 시험 농도)에서 얻어졌다. 염수 또는 에탄올의 첨가는 HPBCD에 대한 β -라파콘의 용해도를 실질적으로 향상시키지 않았다.

d. 75% 에탄올 중의 β -라파콘 용액과 β -라파콘-HPBCD 복합체 수성 용액의 HPLC 분석 및 UV 측정

HPLC 및 UV 분석을 위해, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에탄올 용액 또는 5 mg/ml HPBCD 용액을 물로 희석하여 β -라파콘의 5 $\mu\text{g/ml}$ 용액을 제조하였다. 통상의 절차를 이용하여 258 nm에서의 UV 측정을 수행하고 대조 용액으로서 2% 에탄올 또는 200 $\mu\text{g/ml}$ HPBCD를 사용하였다. HPLC 분석을 위해, 생성된 5 $\mu\text{g/ml}$ β -라파콘 용액 100 μl 를 C^{18} 역상 분석 컬럼에 주입하고, 유속 1 ml/분으로 10분에 걸쳐 25%에서 75%의 B 완충액 직선 구배를 적용시켰다. 258 nm에서의 UV 흡수에 의한 피크를 검출하고 외부 표준에 대한 피크면적비에 의해 정성분석하였다.

β -라파콘의 $\lambda_{\text{최대}}$ 는 UV 스펙트럼으로부터 258 nm에서 관찰되었다. 258 nm에서의 β -라파콘 용액의 UV 측정 결과, 소멸 계수는 β -라파콘 단독과 β -라파콘-HPBCD 복합체에서 모두 $26620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 이었다.

도 3은 HPLC 분석을 위해 물에 5 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석한, 20% HPBCD 중의 5 mg/ml β -라파콘 용액의 전형적인 HPLC 크로마토그램을 나타낸다. β -라파콘은 약 5.4 분만에 용리된다. 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 β -라파콘 단독 수성 용액과 유사한 5 $\mu\text{g/ml}$ β -라파콘-HPBCD 복합체 간에 체류 시간과 피크 총합 면적에 있어서 차이가 없음을 보여준다. 이러한 결과는 β -라파콘이 저농도(즉, 5 $\mu\text{g/ml}$)에서 HPBCD와 복합체화되지 않음을 나타내는 것이다. 증가된 분량의 HPBCD를 5 $\mu\text{g/ml}$ β -라파콘-HPBCD 용액에 첨가했을 때, HPLC 분석 결과, β -라파콘-HPBCD 복합체의 것으로 추정되는 컬럼의 공극 부피에서 용리하는 피크(체류시간 약 1.2분)는 크기가 증가하였고 β -라파콘 피크는 그에 상응하는 크기만큼 감소한 것으로 나타났다. 그러나, 5 $\mu\text{g/ml}$ 로의 희석이 필요한 β -라파콘 정량분석에 이용된 분석 조건하에서, ~5.4분에서의 총합 피크는 용액 중의 총 β -라파콘의 누적 정량을 제공한다.

e. β -라파콘 안정성

75% 에탄올 또는 수성 β -라파콘-HPBCD 복합체 형태의 β -라파콘 용액의 안정성을 HPLC 분석에 의해 조사하였다. 실온의 암실에서 저장할 때, β -라파콘-HPBCD 용액은 에탄올 용액보다 상당히 우수한 안정성을 나타내었다. HPBCD 용액은 저장 5일 후 검출 가능한 분해산물 피크가 없었으며, 저장 21일 후 체류시간 3.28분에서 약 0.1%의 단일의 분해산물 피크가 있었다. 비교 결과, 암실에 보관된 에탄올 용액은 저장 5일 후 β -라파콘 피크가 상당히 소실된 것으로 나타났다. 두 용액을 실온에서 통상의 실내 밝기의 광에 노출시켰을 때, 75% 에탄올 용액 중의 β -라파콘에 비해 β -라파콘-HPBCD 용액에서 상당한 안정성의 향상이 관찰되었다. 그러나, β -라파콘-HPBCD 용액은 광에 노출시키자 상당히 분해되었으며, 분해산물은 노출 21일만에 총 피크면적의 3.4%를 차지하였다.

알콜 용액 중의 β -라파콘의 분해 메카니즘은 비교적 안정한, 준환원 상태의 퀴논 라디칼로의 광환원이 관여하는 것으로 밝혀졌다(Ci, Xiohong 등, *J. Am. Chem. Soc.* 1989: 111, 1337-1343). 상기 연구에서, 에탄올 용액 중의 주요 분해산물은, β -라파콘의 붕화수소나트륨에 의한 환원을 통해 제조된 생성물과의 체류시간 비교 결과, β -라파콘의 환원된(히드로퀴논) 형태인 것으로 확인되었다. 약 6.9분에서 용리되는 이 종은 β -라파콘의 HPBCD 용액에서는 검출되지 않았는데, 이것은 다른 분해 경로를 나타내는 것으로 보인다.

2. β -라파콘/HPBCD 복합체 용액의 동결 건조

실시에 1a 및 1c에 개시한 절차에 따라 β -라파콘/HPBCD 복합체 용액 샘플을 제조하였다. 샘플을 동결 건조 용기로 옮기고 -40°C 에서 2시간동안 예비냉각시켰다. 샘플(들)의 수, 크기, 조성 및 기타 성질 및 특성에 따라 12 내지 20시간동안 용기에 진공을 가하여 동결 건조 생성물을 제공하였다. 동결 건조 샘플(들)을 교반 하에 탈이온수 5.9 mL로 재구성하여 10 mg/mL의 β -라파콘을 제공하였다. 시험 샘플의 결과는 하기 표 8에 나타난다.

[표 8]

시험 β -라파콘/HPBCD 계 (모두 80mg/바일알)

제제	부피 (ml)	건조시간/재구성
HPBCD@40%/β-라파콘@10mg/ml (밀도=1.125)	8	길다 (~20 hr)/길다 (>10 min)
HPBCD@26%/β-라파콘@6.7mg/ml	12	짧다 (~13 hr)/짧다 (~10 min)
HPBCD@20%/β-라파콘@5mg/ml	16	짧다 (~13 hr)/짧다 (~5 min)
HPBCD@10%/β-라파콘@2.5mg/ml	32	길다 (>20 hr)

상기 결과에 기초할 때, HPBCD@40%/β-라파콘@10 mg/mL는 10 내지 100배 희석을 위한 용해도 요건을 만족하였다. 저장 조건하에서 용액이 안정하면, 동결 건조하지 않아도 적당한 투명 용액이다. 동결 건조하는 것이 바람직하면, HPBCD@20%/β-라파콘@5 mg/mL를 선택하는 것이 신속한 동결 건조와 비교적 빠른 재구성을 위해 바람직한 것으로 확인되었다.

3. 탁솔(등록상표)과 배합된 β-라파콘의 시험관내 연구

IC₅₀ 농도의 탁솔(등록상표)과 배합된 종양 세포 배양물에 적용시킬 때, 마이크로몰 농도의 β-라파콘은 콜로니 형성을 완전히 방지하는 것으로 나타났다. 이러한 연구에서, 기하급수적으로 성장하는 세포를 6-웰 플레이트에 웰당 1,000개의 세포를 접종하고 48시간동안 부착시켰다. DMSO에 용해시킨 β-라파콘 및/또는 탁솔(등록상표)을 웰에 첨가하였다. 대조 웰을 동부피의 DMSO로 처리하였다. 4시간 후, 세포를 세정하고 새로운 배지를 첨가하였다. 배양물을 10 내지 20일간 매일 관찰한 후, 고정시켜 염색하였다. 세포 30개 이상으로 된 콜로니를 생존 콜로니로서 기록하였다. 도 4에 도시된 바와 같이, 생존 암 세포의 상승적 억제작용은 다양한 히스토타입(histotype)의 인간 종양 세포, 예컨대 난소, 유방, 전립선, 흑색종, 폐 및 췌장 세포주에서 나타났다. β-라파콘 또는 탁솔(등록상표) 단독의 경우는 암 세포 콜로니 형성을 감소시키는 데 훨씬 덜 효과적이었다. 생존 세포가 감소했다는 것은 MTT 및 트립판 블루 배제 분석에 의한 사멸에 기인한 것으로 나타났다. DNA 래더링 형성 및 아넥신 염색 결과, 세포 사멸은 아포토시스에 기인한 것으로 나타났다.

β-라파콘 및 탁솔(등록상표)의 약물-약물 상호작용을 2개의 난소 종양 세포주 OVCAR-3 및 MDAH-2774에 대해 아이소볼로그래프(isobologram) 분석을 이용하여 더 평가하였다. 각 약물의 개별 IC₅₀ 값을 결정한 후, 그 IC₅₀ 농도의 두 약물을 고정 비율로 배합하여 세포에 적용시켰다. 4일간 연속 노출시킨 후, MTT 분석에 의해 세포 생존율을 결정하였다. 도 5, 6 및 7에 예시된 바와 같이, 이들 세포주에서는 상기 두 약물을 배합하는 것에 의해 일정 패턴의 상승적인 세포 사멸 효과가 확인되었다.

도 5에서, 배합 커브를 해석할 때, 각 시험 배합물과 종말점(100% β-라파콘 및 100% 탁솔(등록상표))으로 통계적 비교를 수행하였다. 통계적으로 의미있는 관찰을 위해서는 배합물(β-라파콘 및 탁솔(등록상표)) 혼합도 값과 두 종말점 값(β-라파콘 또는 탁솔(등록상표) 단독) 간에 차이가 존재하여야 한다. 값의 대부분(5중 ≥3)이 통계적으로($p < 0.05$) 선 이하이면, 상승작용이 나타난다. 도 6에서, 평가된 5종의 배합물 중 3종에서 어느 하나의 약물에 비해 약물 배합물의 경우가 실질적으로 다른($p < 0.05$) 것으로 보인다. 도 7에서, 평가된 5종의 배합물 중 3종에서 어느 하나의 약물에 비해 약물 배합물의 경우가 세포독성이 실질적으로 큰 ($p < 0.05$) 것으로 보인다.

β-라파콘은 또한 시스-플라티늄 내성 세포주에 대해 활성인 것으로 나타났다. 난소 세포주 A2780DDP는 시스-플라티늄(시스플라틴) 내성이 크고, 시스플라틴의 IC₅₀ 농도가 일반적으로 $> 100 \mu\text{M}$ 이다. 도 8에 도시된 바와 같이, 단일 약제로서의 β-라파콘은 내성이 높은 세포주 및 그것으로부터 유도되는 모세포주(A2780s)와 동등한 세포독성을 갖는다. 시스플라틴-내성-세포주에 대해 β-라파콘을 시험함에 있어서, 세포를 β-라파콘 용액에 4시간동안 노출시켰다. 이어서 세포를 세정하고 새로운 배지를 첨가하였다. 배양물을 10 내지 20일간 매일 관찰한 후, 고정시켜 염색하였다. 30개 이상의 세포로 이루어진 콜로니를 생존 콜로니로서 기록하였다.

4. 탁술(등록상표)과 배합된 β -라파콘의 생체내 연구

인간 난소 암 세포(36M2, 원래 악성 배엽에서 분리된 것)를 조사(irradiation) 24시간 후 흉선이 없는 암컷 누드 마우스에 복강내 주사에 의해 접종하였다. 이 모델에서, 접종 약 1주일 후에 전이 병소가 형성되고, 4 내지 5주 내에 복강 및 악성 복수의 종양 결절이 성장하였다. 종양 접종(10×10^6 세포) 10일 후에, 치료 섭생을 개시하였다. 대조군은 비히클만으로 처리하였다. 각각의 통상적 처리 사이클에서, β -라파콘 단독 군은 리피오돌 용액 중의 β -라파콘 25~50 mg/kg으로 처리하고, 탁술(등록상표) 단독 군은 1 mg/kg(리피오돌로 희석된 탁술(등록상표) 제제)을 복강내 처리하고, 24시간 후 비히클을 복강내 주사하였다. 배합물 군에서, 누드 마우스를 25~50 mg/kg의 β -라파콘으로 처리하고, 24시간 후 1 mg/kg의 탁술(등록상표)로 처리하였다. 모든 군을 10 사이클 처리하고, 각 사이클 사이에 1일의 간격을 두었다. 최종 처리 사이클 2주 후(50일째)에 마우스를 죽여 항종양 활성을 분석하였다. 일반적인 외관과 체중을 이용해 숙주 독성을 평가하였다.

도 9는 3회의 독립된 치료 실험 중 하나에 대한 대표적인 결과를 나타내는 것으로, 각 군은 6마리의 마우스로 구성된다. 대조군과 비교했을 때의 종양 수의 감소는 β -라파콘 단독(~75%)의 경우에 분명하게 나타났다. 탁술(등록상표)만으로 처리된 마우스는 약간의 감소 효과(~60%)가 나타났고, 두 군 모두 종양 결절의 크기 및 복수의 양에 있어서 상당한 감소가 나타났다. β -라파콘 + 탁술(등록상표)로 처리된 동물에 있어서는, 복벽 절개 시에 악성 복수가 보이지 않았으며, 마우스마다 0 내지 3개의 작은 병소가 있는 것을 제외하고 복강은 깨끗하였다. 이러한 병소들을 종양 결절로서 계수하였으나, 이들은 섬유조직의 흉터인 것으로 보였다. 배합물 섭생으로 처리된 마우스는 건강하게 보였고, 처리기간 내내 체중 감소가 없었으며, 부검 결과 내부 기관의 심각한 비정상화는 전혀 보이지 않았다.

HPBCD 용액 중의 β -라파콘과 리피오돌 용액 중의 β -라파콘을 비교하여 인간 난소 이종이식편 모델에서의 유사한 연구를 수행하였다. 앞서 수행한 연구에서와 같이, 10×10^6 36M2 인간 난소 암 세포를 흉선이 없는 암컷 누드 마우스에 복강내 접종하고 10일 후에 치료를 개시하였으며, 각 군은 8마리의 마우스로 구성되고 그 마우스들은 종양 접종 전에 조사를 수행하지 않았다. 대조군은 비히클만으로 처리하였다. 각각의 통상적 처리 사이클에서, β -라파콘 단독 군은 HPBCD 용액 중의 β -라파콘 25 또는 10 mg/kg으로 처리하고, 탁술(등록상표) 단독 군은 1 mg/kg(리피오돌로 희석된 탁술(등록상표) 제제)을 복강내 처리하고, 24시간 후 비히클을 복강내 주사하였다. 두 배합물 군에서, 마우스를 25 또는 10 mg/kg의 HPBCD 중의 β -라파콘으로 처리하고, 24시간 후 1 mg/kg의 탁술(등록상표)로 처리하였다. 세 번째 배합물 군은 25 mg/kg의 리피오돌 중의 β -라파콘으로 처리하고, 24시간 후 1 mg/kg의 탁술(등록상표)로 처리하였다. 모든 군을 6 사이클 처리하고, 각 사이클 사이에 1일의 간격을 두었다. 최종 처리 사이클 약 4주 후(약 50일째)에 마우스를 죽여 항종양 활성을 분석하였다.

도 10은 상기 연구의 결과를 나타낸다. HPBCD 용액 중의 β -라파콘으로 처리한 마우스는 유사한 농도의 리피오돌 용액 중의 β -라파콘으로 처리한 마우스와 동일한 종양 결절의 감소를 나타내었다.

인간 유방암 이종이식편(MCF-7 세포주)을 가진 암컷 누드 마우스에서도 강력한 항암 활성이 입증되었다. 피하 종양 결절이 직경 ~0.5 cm에 도달한 후에 마우스의 처리를 개시하였다. 도 11에 도시된 바와 같이, β -라파콘(리피오돌 용액 중의 50 mg/kg, 복강내 투여)과 탁술(등록상표)(β -라파콘 투여 24시간 후 1 mg/kg, 복강내 투여)을 6 사이클 투여받은 마우스는 대조군에 비해 종양 부피가 극적으로 감소한 것으로 나타났다. 또한, 처리를 받은 마우스에서의 종양은 추적 조사 결과 크기가 증가하지 않았다. 도 11에서, 피하 종양 이종이식편의 부피는 차트 A에 나타내고, 처리 종료 후 6주간의 마우스의 체중은 차트 B에 나타내었다.

5. 인트라리피드(등록상표) 내 β -라파콘 제제의 연구

에탄올 중의 β -라파콘 10 mg/ml 농축액을 제조하였다. 이 농축액을 5X 희석하여 총 100 내지 500 μ l를 제공하였다. 에탄올성 용액을 인트라리피드(등록상표)에 와동하면서 적가하여 β -라파콘 2 mg/ml 농축액을 10% 인트라리피드(등록상표) 중에서 제조하였다. 침전 또는 에멀션 분해의 즉각적인 증거는 관찰되지 않았다.

이 절차를 반복하였으며, 여기서 농축액을 10X 희석하여 10% 인트라리피드(등록상표) 중의 1 mg/ml β -라파콘을 제조하였다. 에탄올 용액을 와동하면서 인트라리피드(등록상표)에 적가하였다. 침전 또는 에멀션 분해의 즉각적인 증거는 관찰되지 않았다. 3 일 후, 2 mg/ml 제제는 결정을 가졌으며, 1 mg/ml 제제는 아무런 변화를 나타내지 않았다. 6 일 후, 1 mg/ml 침전물은 여전히 아무런 변화를 나타내지 않았다.

6. 단일 제제 β -라파콘 유사체 억제

본 발명에 따른 몇 가지 바람직한 β -라파콘 및 유도체, 뿐만 아니라 두니온 및 4-헥산오일옥시-1,2-나프토크논(전술한 바와 같음, 도 12의 설명 참조)을, 이들의 성장 억제 활성에 대하여 6 개의 인간 암 세포주: A2780 및 A2780/CP(난소); MCF-7(유방); HT-29(결장); BxPC-3(췌장); 및 A549(폐) 내 β -라파콘(CO-501)과 비교하여 평가하였다. 인간 종양 세포주(미국 매릴랜드주 록빌에 소재하는 ATCC로부터 입수함)를 37°C(5% CO₂)에서 10% 태아 소 혈청(FBS, 노바 테크)을

함유하는 RPMI 배지(RPMI; 노바 테크, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재) 내에서 배양하였다. 세포의 분액을 10⁴ 세포/웰의 최종 농도로 96 웰 플레이트 마이크로타이터 플레이트의 각 웰에 시딩하고, 테스트 화합물에 노출시키기 전에 24 시간 동안 항은 처리하였다. 각 화합물의 DMSO 용액의 성장 억제 활성은 4 시간 처리, 이어서 약물 무함유 배지로 24 시간 항은 처리 후 MTS 분석에 의해 측정하였다. MTS 분석은 생존 가능한 세포가 MTS, 신규한 테트라졸륨 화합물 및 전자 커플링 시약을 세포 배양 배지에 가용성인 착색 포르마잔 생성물로 전환시킬 수 있는 능력을 토대로 하는 비색계 분석이다. 그 다음, 세포 농도는 490 nm에서의 포르마잔 생성물의 흡광도를 측정함으로써 결정한다. IC₅₀으로 표시되는 성장 억제율은 비히를 처리된 대조 세포에 대하여 산출한다. 각각의 투여 수준에 대하여 3 사본을 수반하는 3 회 개별 분석의 결과는 하기 표 9에 나타낸다.

예상된 바와 같이, 투여량 의존성 억제 효과는 6 가지 종양 세포주 내 β -라파콘(CO-501)에 대하여 관찰하였다. 두니온 유사체(CO-506)는 문헌으로부터 예측된 바와 같이, CO-501과 유사한 활성 프로필을 나타내었다. 3 종의 β -라파콘 및 유도체 중에서, CO-504(4-아세톡시 β -라파콘)도 CO-501과 억제 활성이 매우 유사하며; CO-503(4-히드록시 β -라파콘)은 모든 세포주에 걸쳐서 상당히 덜 활성이었고; CO505는 불활성이었다(20 μ M 정도로 높은 농도에서 성장 억제는 관찰되지 않음). CO-507, 나프토크논 유도체도 불활성이었다.

[표 9]

β -라파콘(CO-501)의 성장 억제 활성 및 5 가지 및 유도체						
세포주	성장 억제 활성(50% 유효 농도, IC ₅₀ , μ M 단위)					
	CO-501	CO-503	CO-504	CO-505	CO-506	CO-507
난소 A2780 (민감성)						
실험 1	2.11	2.35	1.83	*	2.47	*
실험 2	3.99	5.29	1.60	*	4.79	*
실험 3	0.876	4.857	1.19	*	3.23	*
평균 $\pm$ SE	2.32 $\pm$ 0.91	4.16 $\pm$ 0.92	1.54 $\pm$ 0.19	*	3.50 $\pm$ 0.68	*
난소 A2780CP (내성)						
실험 1	4.47	7.42	0.678	*	2.73	*
실험 2	1.61	9.38	4.00	*	3.85	*
실험 3	1.76	14.8	2.56	*	1.53	*
평균 $\pm$ SE	2.61 $\pm$ 0.93	10.5 $\pm$ 2.2	2.41 $\pm$ 0.96	*	2.70 $\pm$ 0.67	*
유방 MCF-7						
실험 1	2.37	18.8	2.59	*	2.64	*
실험 2	4.75	19.4	4.78	*	3.99	*
실험 3	2.10	19.3	4.28	*	3.53	*
평균 $\pm$ SE	3.07 $\pm$ 0.84	19.2 $\pm$ 0.17	3.88 $\pm$ 0.67	*	3.39 $\pm$ 0.40	*
결장 HT-29						
실험 1	5.37	13.2	14.1	*	17.3	*
실험 2	11.4	11.0	6.67	*	13.4	*
실험 3	9.89	12.1	3.98	*	11.2	*
평균 $\pm$ SE	8.89 $\pm$ 1.82	12.1 $\pm$ 0.63	8.25 $\pm$ 3.03	*	14.0 $\pm$ 1.78	*

채장 BxPC-3						
실험 1	11.6	*	10.5	*	5.69	*
실험 2	5.68	*	13.5	*	8.40	*
실험 3	16.5	*	2.32	*	9.22	*
평균 ±SE	11.3 ±3.12	*	8.74 ±3.33	*	7.77 ±1.07	*
폐 A549						
실험 1	4.48	14.3	19.3	*	7.50	*
실험 2	4.73	7.63	6.87	*	12.7	*
실험 3	18.7	9.77	3.75	*	15.3	*
평균 ±SE	9.30 ±4.69	10.6 ±1.98	9.97 ±4.74	*	11.8 ±2.28	*
* 20 μM 이하에서 성장 억제없음						

7. Bg-Nu-Xid 마우스의 β-라파콘의 생체내 테스트

화합물질. β-라파콘을 합성하고, 10 mg/ml의 농도로 40% 히드록시프로필 β-시클로텍스트린에 용해시켰으며, 어두운 용기 내에서 실온에서 유지시켰다. 히드록시프로필 β-시클로텍스트린을 10 mg/ml의 농도로 증류수에 용해시키고, 실온에서 유지시켰다. MATRIGEL(등록상표), 기저막 매트릭스를 벡톤 디킨슨 랩웨어(BD 바이오사이언스, 미국 매사추세츠주 베드포드 투 오크 파크 소재)에서 구입하고, 50 μg/ml 젠타마이신을 보유하는 돌베코 변성 이글 배지에 용해시켰으며, -20℃에서 동결 상태를 유지시켰다. 마트리젤(등록상표)은 세포외 매트릭스 단백질이 풍부한 종양인 엔겔브레스-홀름-스웜(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 종양에서 추출하였다. 주요 매트릭스 성분은 라미닌, 콜라겐 IV, 엔타틴 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(perlecan)이며; 또한, 이 매트릭스는 메탈로프로테이나제(TIMPS)의 임의의 억제없이, 성장 인자, 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP[콜라게나제]) 및 플라스미노겐 활성화인자를 포함한다. MATRIGEL 매트릭스는 4℃에서 용액이고, 실온에서 젤이어서 3차원 재구성 기저막을 형성한다. 이 모델 시스템은 생체내 기저막의 구조, 조성, 물성 및 기능적 특성을 밀접하게 모사하며, 세포 형태, 생화학적 기능, 이동 또는 반전 및 유전자 발현의 연구에 대해 생리학적으로 관련있는 환경을 제공한다. 동결된 마트리젤(등록상표) 매트릭스는 사용 전에 4℃에서 밤새도록 해동하였다.

세포 배양. RPMI8226 세포(인간 다발성 골수종 세포주)는 윌리엄 돌턴 박사(Dr. William Dalton, Lee Moffit Cancer Center, 미국 플로리다주 템파 소재)가 제공하였다. 이것은 162 cm² 세포 배양 플라스크(Costar(등록상표), Corning Incorporated, 미국 뉴욕주 코팅 소재) 내 2 x 10⁻³ M L-글루타민, 100 단위/ml 페니실린(Pen) 및 100 μg/ml 스트렙토마이신(Cellgro(등록상표), Mediatech Inc., 미국 버지니아주 헨돈 소재)으로 보충한 10% 태아 소 혈청(FBS)(Gibco BRL, Life Technologies, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)을 함유하는 RPMI 1640(Cellgro(등록상표), Mediatech Inc., 미국 버지니아주 헨돈 소재)에 자주 통과시킴으로써 유지시켰다. 기하급수적으로 성장하는 세포주는 CD138+ , CD38+ / CD45RA-, EBV 음성 및 무균체였다.

마우스. 40 마리의 수컷 6 주령 Bg-Nu-Xid 마우스(T, B 및 NK 세포 결핍)는 미국 매릴랜드주 베데스다 프레데릭에 소재하는 FCRDC에서 입수하였으며, DFCL의 레드스톤 동물 시설에 수용하였다. 이들 마우스는 3 개의 별도의 돌연변이, 즉 대식세포의 손상된 주화성 및 운동성과 NK 세포의 결핍과 관련된 베이지(Bg) 상염색체 열성 돌연변이; 흉선 발육 부전으로 인한 T 세포의 고갈과 관련된 누드(nu) 상염색체 열성 돌연변이; 및 B 림프구의 기능적 결함을 산출하는 X 연결 면역 결핍(xid)을 보유한다. 이 동물들은 톱밥 배당 및 19℃ 내지 22℃의 층류 공기가 있는 우리 내 배리어 시설에서 사육하였다. 설치류 음식과 멸균 음용수는 임의로 제공하였다. 이들 마우스를 검역하여 임의의 질환의 발생을 배제하였다. 이송 중에 1 마리의 마우스가 죽었으며, 다른 5 마리는 탈수(n=2), 추정상 감염(n=2) 및 외상으로 인한 과다 출혈(n=1)로 사망하였다. 1 주 후, 엔로플록사신(퀴놀론 항생제)을 모든 마우스의 음용수에 가하였다. 동물을 수반하는 모든 절차는 다나 파버 암 연구소(Dana Farber Cancer Institute; DFCI)의 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았으며, 그 지침에 따라 수행하였다.

조직학적 분석. 마우스는 종양의 최대 직경이 20 mm에 도달하거나 이들이 활동 휴지 상태가 될 때 다나 파버 암 연구소 동물 프로토콜 위원회의 정책에 따라 희생하였다. 마우스는 이소플루란으로 마취시키고, 안와후 혈액을 채혈하였다. 마우스는 경부 탈구에 의해 희생시켰다. 종양은 연질 조직(근막, 근육, 피부 등)으로부터 절제하고, 10% 중화 포르말린에 고정시

켰다. 각각의 군으로부터 간, 비장, 신장, 폐, 심장 및 뇌도 제거하였으며, 포르말린에 고정시켰다. 조직을 탈수시키고, 파라핀 블록에 삽입하였다. 이들은 5 μ m 두께의 슬라이스로 절단하고, 헤마톡실린 및 에오신(HE)으로 염색하였으며, 아포토시스의 증거를 위해 광 현미경으로 조사하였다.

통계학적 분석. 통계학적 분석은 β -라파콘과 대조군 간의 종양 부피 및 아포토시스 정도의 차를 비교하기 위하여 스튜던트 t 테스트를 사용하여 수행하였다. p 값이 <0.05이면 유의적인 것으로 간주하였다.

설계. 34 마리의 마우스를 연구에 포함시켰다. RPMI 8226(3×10^7) 다발성 골수종 세포를 3 회 세척하고, 피하 주사용 27G 바늘 및 1 ml 주사기를 사용하여 MATRIGEL(등록상표) 100 μ l와 함께 모든 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사하였다. 마우스는 건강 상태 및 종양의 성장에 대해 매일 관찰하였으며, 매주 평량하였다.

RPMI 8226 세포의 주사 후 평균 7 일째에 국소화된 촉진(觸診) 가능한 종양이 모든 마우스(n=34)에게서 발달하였다. 종양이 촉진 가능하게 되면, 이들은 수동 버니어 캘리퍼스에 의해 2 개의 직교 직경을 하루 걸러서 측정하였다. 31 마리의 마우스를 β -라파콘(n=16) 및 대조(n=15)군으로 무작위화하였다. 대조군의 마우스는 좌하복부 부위에 40% 히드록시프로필 β -시클로텍스트린 용액 50 mg/kg 체중을 하루 걸러서 복강내 수용하였다. β -라파콘 군의 마우스는 40% 히드록시프로필 β -시클로텍스트린의 β -라파콘 50 mg/kg 체중을 하루 걸러서 복강내 수용하였다(도 13). 각 주사의 통상의 부피는 125 μ l였다. 종양의 직경을 기록하고, 부피는 원통형 물체에 대한 표준 공식, 즉 $0.523 \times (\text{소직경})^2 \times \text{대직경}$ 을 이용하여 계산하였다. 마우스는 종양의 대직경이 ≥ 20 mm이거나, 이들이 활동 휴지 상태가 될 때 희생시켰다.

이종이식편 마우스 모델이 관심을 모으고 있는데, 그 이유는 이것이 용이하게 확립되고, 외부 측정에 의해 피하 종양의 성장을 모니터링할 수 있으며, 다양한 화학요법제의 효과를 연구하는 데 사용될 수 있기 때문이다. 급성장하는 종양은 약간의 아포토시스/괴사 부위를 나타낼 수 있지만, 본 발명자들의 실험에서는 다양한 신규의 잠재적인 치료제의 세포독성을 평가하는 데 주요 장애가 되지 않는다. 다발성 골수종 환자 세포의 성장 및 분열화를 연구하기 위하여 항-gp130 작동물질 모노클로날 항체(B1+I2)를 사용하는 유사 모델(Reme 등, Br. J. Haematol. 114: 406, 2001) 및 IL-6 의존성 세포주(S6B45)의 성장을 억제하기 위하여 항-인간 IL-6R 항체 PM1 및 항 인간 IL-6 항체 MH166을 사용하는 유사 모델(Suzuki 등, Eur. J. Immunol 22: 1989, 1992)이 이미 보고되었다. 다발성 골수종 치료제를 테스트하기 위한 다양한 동물 모델은 이미 보고되었다(Gado 등, Haematologica 86: 227, 2001; Dallas 등, Blood 93: 1697, 1999; Manning 등, Immunol. Cell Biol. 73: 326, 1995; Takura 등, Cancer Res. 26: 2564, 1996; Potter 등, J. Exp. Med. 161: 996, 1985; Yaccoby 등, Blood 92: 2908, 1998; Urashima 등, Blood 90: 754, 1997).

β -라파콘 및 시클로텍스트린 독성의 측정. 양 군의 마우스는 β -라파콘 및 히드록시프로필 β -시클로텍스트린을 잘 견디어 내었다. 어떠한 군에서도 마우스는 죽지 않았으며, 모두 체중이 증가하였다(도 14). 어떠한 집단에서도 β -라파콘 또는 히드록시프로필 β -시클로텍스트린의 명백한 독성 증거는 없었다. 1 마리 마우스에게서 β -라파콘 주사 후 의원성 복막내 출혈이 발생하였는데, 36 시간 이내에 해소하였다. β -라파콘 및 대조군 둘 다에서 신장의 가벼운 관상 공포화(空胞化)도 발견되었다. 이 효과는 양 군에 존재하기 때문에, 히드록시프로필 β -시클로텍스트린이 관련된 것인데, 이는 시클로텍스트린에 대해 이미 보고된 바 있으며(Frank 등, Am. J. Pathol. 83: 367, 1976), 이들 신독성 변화는 처치를 중지하면 원상태로 되돌아 간다(Donaubauer 등, Regul Toxicol Pharmacol 27: 189, 1998).

β -라파콘 종양 부피에 대한 효과. 대조군의 마우스는 히드록시프로필 β -시클로텍스트린의 최대 6 투약분을 수용한 반면, β -라파콘 군의 마우스는 이 제제의 최대 8 투약분을 수용할 수 있었다. 11 일째에 대조군에 대한 β -라파콘 군(p=0.007)의 마우스의 종양 부피는 통계학적으로 유의적으로 감소하였다(도 15). 중요하게는, 대조군과 비교하여 β -라파콘 군에게서 5, 7, 9, 11, 13, 15 및 17 일째에 생존율이 더 컸는데, 이는 β -라파콘 군의 종양 성장이 더 느림을 시사하는 것이다.

조직학적 염색. 조직병리학적 실험으로, 종양은 캡슐화되지 않았으며, 임의의 원격 전이없이 근육을 비롯한 연결 조직에 국소 침습한 것으로 밝혀졌다. 종양은 주로 그 심부에서 세포 사멸의 소폭의 가변도(0 내지 10%)로, 쥐과 기원의 혈관에 의해 혈관 형성되었다. 아포토시스는 (1) 핵 멤브레인의 회전에 의한 핵 멤브레인 부근의 크로마틴 응축 및 응집; (2) 대형화되고 비정상적으로 과립형인 핵소체; (3) 세포의 수축 및 둥글어짐; (4) 세포 멤브레인의 수포 형성; 및 (5) 내형질 세포 및 미토콘드리아의 소폭 비대를 토대로 조직병리학적으로 평가하였다. 광 현미경을 사용하여 2 회 맹검된 독립적 관찰자에 의해 평가하였을 때, 대조군(평균 $\pm$ SD = 20.0% $\pm$ 10.4)에 대하여 β -라파콘 군(평균 $\pm$ SD = 41.1% $\pm$ 12.7)의 종양 내 MM 세포 아포토시스의 통계학적으로 유의적인 증가(p=0.001)가 있었다(도 17a).

β -라파콘 군 또는 대조군에서 마우스의 간, 심장, 폐, 뇌 및 비장에 대한 β -라파콘 또는 히드록시프로필 β -시클로텍스트린의 임의의 독성의 현미경적 증거는 없었다(도 17b, c, d, e, f). 양 군의 마우스로부터의 신장은 약간의 관상 혈관 형성을

나타내었는데, 이는 히드록시프로필 β -시클로덱스트린의 관상 독성을 시사한다(도 17g, h). 이 독성은 HPBCD로 제제된 기존의 약물을 기준으로 인간에게서 기대되는 치료 투여량에서 나타날 것으로 예상되지 않는다. 이들 결과는 장기간 생체 내 숙주 생존율과 관련하여, HPBCD에서 제제된 β -라파콘이 안전하고, 종양 세포 성장을 억제하는 데 효과적임을 가리킨다. 따라서, 베타 랩은 최소 독성으로 유의적인 항종양 활성을 가지며, 생체내 다발성 골수종을 치료하는 데 사용할 수 있는 것으로 결론을 내릴 수 있다.

균등론

특정 구체예를 본 명세서에 상세하게 개시하였지만, 이는 설명의 목적을 위해 예시한 것에 불과하며, 하기 첨부된 특허 청구의 범위의 범주에 관하여 한정하려 해서는 안된다. 특히, 본 발명자들은 다양한 치환, 변경 및 수정은 특허 청구의 범위에 의해 정의된 본 발명의 사상과 범주로부터 벗어나지 않으면서 본 발명에서 이루어질 수 있는 것으로 생각한다. 제시된 특허 청구의 범위는 본 명세서에 개시된 발명을 대표하는 것이다. 또한, 다른 청구되지 않은 발명도 고려된다. 도면은 반드시 일정한 비례로 도시될 필요가 있는 것이 아니라, 이들은 단순히 개념적일 뿐이라는 것을 이해해야 한다. 본 출원인은 이후의 특허 청구 범위에서 그러한 발명을 추구할 권리를 소유한다.

도면의 간단한 설명

본 발명은 첨부 도면에 의해 더 명백하게 이해될 것이며, 이하 도면에 대한 설명을 약술한다:

도 1은 여러가지 가용화제의 수성 용액내에서 β -라파콘의 상대적인 용해도를 예시하는 막대 그래프이다.

도 2는 히드록시프로필- β -시클로덱스트린 농도(HPBCD)의 함수로서 β -라파콘의 용해도를 예시하는 막대 그래프이다.

도 3은 20% 히드록시프로필- β -시클로덱스트린 농도에서 5 mg/ml β -라파콘 용액의 HPLC 크로마토그램이다.

도 4는 β -라파콘 및 탁술(등록상표)에 의한 암 세포 생존의 억제를 예시하는 차트이다.

도 5는 MTT 분석에 의해 결정되는 바와 같이 난소 종양 세포에 대한 탁술(등록상표)과 병용하는 경우의 β -라파콘의 성장 억제 프로필을 나타내는 차트이다.

도 6은 난소 종양 세포주 OVCAR-3에서 β -라파콘과 탁술(등록상표)에 대한 상승적인 약물-약물 상호작용을 나타내는 아이소볼로그래프이다.

도 7은 MDAH-2774 난소 종양 세포주에서 β -라파콘과 탁술(등록상표)에 대한 상승적인 약물-약물 상호작용을 나타내는 아이소볼로그래프이다.

도 8은 시스플라틴-민감성(A2780) 및 시스플라틴-내성(A2780DDP) 난소 암 세포주에 대한 β -라파콘의 세포독성 효과를 예시하는 그래프이다.

도 9는 인간 난소 암종의 마우스 모델에서 β -라파콘과 탁술(등록상표)의 상승 효과를 예시하는 막대 그래프이다.

도 10은 HPBCD 용액에서 제제화되는 경우 인간 난소 암종의 마우스 모델에서 β -라파콘이 동일하게 효과적임을 예시하는 막대 그래프이다.

도 11은 인간 유방암 이종이식편 모델에서 β -라파콘 및 탁술(등록상표)의 항종양 활성을 예시하는 도면이다.

도 12는 본 발명에 따른 바람직한 β -라파콘 및 유도체를 예시하는 도면이다.

도 13은 *Bg-Nu-Xid* 마우스에서 RPMI 8226 MM 세포의 주입 및 이에 따른 종양 형성을 예시하는 모식도이다.

도 14는 연구용 마우스의 평균 체중 패턴을 나타내는 그래프이다.

도 15는 종양 부피에 대한 β -라파콘/히드록시프로필 β -시클로덱스트린의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 16은 두 군에서 마우스의 생존에 대한 β -라파콘/히드록시프로필 β -시클로텍스트린의 효과를 나타내는 그래프이다.

도 17은 종양 뿐만 아니라 간, 비장, 폐, 심장, 뇌 및 신장에 대한 β -라파콘/히드록시프로필 β -시클로텍스트린의 효과를 나타내는 대표적인 현미경 사진을 예시한다.

발명의 상세한 설명

β -라파콘, 이의 유도체 및 이의 유사체(이하에서 "활성 화합물"로 지칭함)는 문헌(Li, C. J. 등, *J. Biol. Chem.*, 1993)에 기재되어 있다. 이러한 활성 화합물은 비경구 투여에 적합한 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 이러한 조성물은 통상적으로 활성 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 보체제를 포함한다. 그러나, 약학적으로 허용가능한 용매 내에서 용해도가 낮은 β -라파콘은 비경구 투여, 특히 정맥내 및 피하 투여 각각에 적절한 제형의 개발에 있어서 걸림돌이 되어 왔었다. 하기 표 1은 약물의 정맥내 전달에 사용되는 통상의 용매계중에서의 β -라파콘의 제한된 용해도를 예시한다. 현재까지 산출된 임상전 약물역동학 데이터는 이상적인 최대 혈장 농도가 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 범위내라는 것을 시사한다. 이러한 혈장 농도를 달성하기 위하여서는 정맥내 제제의 β -라파콘 농도가 10 mg/ml 에 근접하여야만 하고, 예컨대 염수 또는 D5W와 같은 정맥내 투여용 멸균 유체로 5~10 배 희석될 수 있어야만 한다.

[표 1]

용매계	β -라파콘 용해도 (mg/ml)	
	미희석 (mg/ml)	5배 희석 (mg/ml)
폴록사머 20%	2.0350	0.0331
포비돈 K17 20%	1.8250	0.0312
포비돈 K12 20%	1.8600	0.0313
트윈 80	11.1700	1.6550
EtOH 76%	10.6600	0.1025
PEG 400	11.6800	0.1400
프로필렌 글리콜	8.7800	0.0950
트랩솔 20%	1.4650	0.0300

* 0.9% 염수중에 희석

표 1에 제시된 용매중의 β -라파콘의 최대 용해도는 약 12 mg/ml 이다. 희석시, 용해도는 모든 시스템 내에서의 희석율보다 많이 감소된다. 각종의 임상전 시험이 복강내 및 정맥내 투여를 위하여 각종의 통상의 용매계, 예컨대 리피오돌, 낙화생유, 크레모포/에탄올 또는 PEG4000를 사용하고 있기는 하나, 이러한 접근법은 임상에서 사용하기 위한 정맥내 제제의 개발에 적합성을 갖는 것으로 입증된 것은 어느 것도 없다. 그러나, 히드록시프로필- β -시클로텍스트린 (HPBCD)인 것이 이로온 약학적으로 허용가능한 수용성 담체 분자와 β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체의 조합, 혼합 및/또는 복합체화는 하기 표 2에 예시된 바와 같이 50% HPBCD 용액중에서 β -라파콘의 수용해도를 20 mg/ml 정도의 농도로 증가시키는 것으로 나타났다.

[표 2]

수중 HPBCD	β -라파콘 (고농도) (mg/ml)
10%	3.07
20%	7.04
30%	10.78
40%	15.77
50%	19.74

이러한 β -라파콘/HPBCD 용액은 실온에서 장시간 동안 안정한 것으로 입증되었으며, 정맥내 투여를 위한 멸균 유체(예, 멸균 염수, D5W)를 사용한 추가의 희석이 가능하며, β -라파콘이 침전되지 않고 24 시간 이상 동안 유지될 수 있다. 또한, β -라파콘/HPBCD 용액은 멸균 여과, 동결 건조 및 수중에서의 재구성성이 용이할 수 있다. HPBCD 약 20%/ β -라파콘 약 5 mg/ml 가 용이한 동결 건조 및 비교적 신속한 재구성을 위하여 우수한 농도인 것으로 실험에 의하여 입증되었다. 그러나, 본

발명은 이러한 구체예에 한정되는 것이 아니라, 1 mg/ml 정도로 낮은 β -라파콘의 농도가 생성되었으며, 안정하고 동결 건조 및 재구성이 가능한 것으로 측정되었다. 또한, β -라파콘과 HPBCD의 혼합 또는 복합체화는 β -라파콘과 에탄올 용액의 복합체화와 비하여 β -라파콘의 광환원에 대한 안정성이 개선된 것으로 나타났다.

HPBCD 수성 용액중에서의 β -라파콘의 추가의 연구에 의하면, β -라파콘의 용해도는 HPBCD 농도 증가와 비례 증가하는 것으로 입증되었다. 10~100 배 희석시 모든 HPCD 시스템에서의 β -라파콘 농도의 감소는 수행된 희석에 비례한다.

시클로덱스트린은 결정질이며, 전분으로부터 유래한 α -D-글루코피라노스의 비흡습성 고리형 올리고머이다. 글루코피라노스 단위를 연결시키는 결합에 대한 회전 결여에 의하여 시클로덱스트린은 원통형이 아닌 토로이드의 형태를 지닌다. 이러한 제한된 회전으로 인하여, 이들은 분자내의 글루코피라노스 단위의 수에 따라 크기가 변하는 중앙 공동을 갖는 경질 구조를 갖는다. 3 가지의 가장 흔한 시클로덱스트린으로는 α -시클로덱스트린, β -시클로덱스트린 및 γ -시클로덱스트린이 있으며, 이들은 6개, 7개 및 8개의 글루코피라노스 단위로 각각 이루어진다. 시클로덱스트린 분자 및 분자의 형태내에서의 히드록실기의 배치로 인하여 공동의 내면은 흡습성이 되며, 외면은 친수성이 된다. 1차 히드록실기는 토로이드 분자의 더 좁은 (내부) 면에 위치하며, 2차 히드록실기는 더 넓은 (외부) 에지에 위치한다. 이러한 배치는 시클로덱스트린이 포접 복합체를 형성함으로써 소수성 공동내에 각종의 작은 소수성 분자를 수용케 한다.

HPBCD는 7개의 글루코피라노스 단위를 지니며, 토로이드 구조체의 외부면에 각각의 글루코피라노스 단위에 결합된 히드록시프로필기를 갖는다. HPBCD의 수중 용해도는 β -시클로덱스트린보다 훨씬 더 우수한 것으로 나타났다. β -시클로덱스트린에 히드록시프로필기를 도입하는 것은 시클로덱스트린 공동상의 히드록실 부분간의 분자내 수소 결합을 파괴함으로써 가용성이 더 크게 된다. 그 결과, HPBCD로 형성된 포접 복합체는 β -시클로덱스트린에 의하여 형성된 포접 복합체에 비하여 수용해도가 더 높다. 치환도가 용해도 및 복합체 형성 패턴을 결정하게 된다. 그래서, 치환도가 낮을수록 결합력이 더 커져서 결합력 뿐 아니라 용해도면에서 비치환 시클로덱스트린과 유사하게 된다. 치환도가 높으면 시클로덱스트린의 수용해도가 더 커지나 결합력은 약해진다. 시클로덱스트린의 치환도는 조절이 용이하다.

본 발명에 의하여 β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체를 수용성 담체 분자로 복합체화할 경우, 복합체가 형성된 용액은 일반적으로 단일 조성물이 되거나 또는, 수용성 담체 분자가 HPBCD인 경우, 불용성 β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체가 시클로덱스트린 공동내에 존재하게 되는 포접 복합체가 형성된다. 그러나, 본 발명은 복합체의 형성에 한정되지 않는다.

HPBCD가 바람직한 가용화제이기는 하나, 본 발명은 이러한 구체예에 한정되는 것이 아니며, β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체, 예컨대 폴록사머, 포비돈 K17, 포비돈 K12, 트윈 80, 에탄올, 크레모포/에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 400, 프로필렌 글리콜 및 트랩솔과 조합하기 위한 기타의 수-가용화제도 포함한다. 또한, 본 발명은 수-가용화제에 한정되지 않으며, 유계 가용화제, 예컨대 리피오돌 및 낙화생유도 사용할 수 있다.

또한, 계면활성제는 β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체의 가용화를 위한 본 발명의 일부로서 포함한다. 그러나, 사용된 계면활성제는 β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체가 물에 희석될 경우 용액중에 β -라파콘을 유지하기에 충분히 높은 레벨로 존재하여야만 하는 것이 필수이다. 그러나, 허용 가능하지 않은 부작용이 야기되는 너무 많은 양의 계면활성제가 존재하여서는 안된다.

또한, β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체의 에멀션이 형성되며, 이는 본 발명에 포함된다. 비경구 투여를 위한 수중유 형태 에멀션이 형성될 수 있는 1 이상의 유화제 또는 유화 제제중의 치료 유효량의 β -라파콘, 이의 유도체 및 이의 유사체를 포함하는 에멀션이 생성될 수 있다. 적절한 유화제 또는 유화 제제로는 임의의 약학적으로 허용가능한 유화제, 바람직하게는 대두 또는 난황에서 추출된 인지질, 식물성 공급원으로부터의 정제된 포스파티딜 콜린 또는 합성 포스파티딜 콜린 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 수소화 유도체, 예컨대 포스파티딜 콜린 수소화 (계란) 및 포스파티딜 콜린 수소화 (대두)를 사용할 수도 있다. 또한, 유화제는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 폴록사머 (예를 들면 폴록사머 188 및 407), 폴록사민, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르 또는 소르비탄 지방산 에스테르 등이 될 수 있다. 또한, 이온성 계면활성제, 예컨대 콜산 및 데옥시콜산 또는 계면활성 유도체 또는 이의 염을 사용할 수도 있다. 또한, 유화제는 상기 성분의 1 이상의 혼합물이 될 수도 있다. 에멀션은 기타의 성분, 예컨대 완충제, 안정화제 및 기타의 지질을 추가로 포함할 수 있다.

인트라리피드(등록상표)는 주사용 지방 유제이다. 지방 유제는 난황, 대두유 및 잇꽃유를 포함할 수 있다. 미국 일리노이주 애보트 파크에 소재하는 애보트 래버러토리즈에서 상표명 리포신II(등록상표) 및 리포신 III(등록상표)로 시판되는 인트라리피드(등록상표)는 이를 투여한 환자의 체중을 유지하거나 또는 증가시키기 위한 열량 및 지방산의 공급원으로서 사용할 수 있거나 또는, 직접 주사가 불가능한 수용성이 불량한 친유성 약물의 비이클로서 사용할 수 있다. 인트라리피드(등록상표)

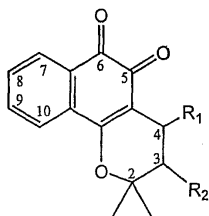
및 리포신 II(등록상표)는 모두 10% 및 20%의 농도로 시판된다. 본 발명에 의하면, β -라파콘, 이의 유도체 및 이의 및 인트라피트(등록상표) 또는 임의의 기타의 약학적으로 허용가능한 지방 유제를 포함하는 에멀션은 환자에게 비경구 투여를 위하여 제조될 수 있다.

최근의 시험관내 및 생체내 시험에 의하면, β -라파콘은 기타의 화학요법제 및 항암제, 특히 시스플라틴 및 탁산 유도체, 예컨대 탁솔(등록상표)(파클리탁셀) (미국 뉴욕주 뉴욕에 소재하는 브리스톨-마이어 스쿼프 컴파니)와의 상승 작용이 매우 큰 것으로 나타났다는 것을 알 수 있다. 예를 들면 WO00/61142에는 G_2/M 약물, 예컨대 탁산 유도체와 조합된 제1의 화합물인 G_1 또는 S기 약물, 예컨대 β -라파콘의 유효량의 투여를 포함하는 암 치료 방법 및 조성물이 개시되어 있다. 기타의 화학요법 약물과의 상승 작용 및 내성 세포에 대한 활성의 주요한 기능적 특성에 의하여, β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체는 난소암, 유방암, 전립선암, 결장암, 직장암 및 다발 골수종, 악성 흑색종 및 비-흑색종 피부암을 비롯한 다수의 암의 장기간 완화를 크게 증가시킨다. 또한, β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체는 증식 질환 및 피부 질환, 예컨대 건선의 치료에 사용될 수 있다.

언급한 바와 같이, 본 발명의 약학 조성물 및 제제는 비경구 투여, 바람직하게는 정맥내 투여를 위한 것이다. 그러나, 본 발명은 이러한 구체예에 한정되는 것이 아니며, 본 발명에 의한 액체 약학 조성물 및 제제는 경구 섭취를 위하여 생성될 수 있다.

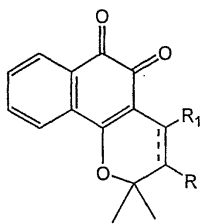
비경구 투여를 위한 약학 조성물은 HPBCD와 복합체를 형성하는 β -라파콘, 이의 유도체 및 이의 유사체의 소정량을 포함하는 것이 이롭다. 정규 β -시클로덱스트린은 비경구 투여를 위한 제제에는 적합하지 않으나, 경구 투여를 위한 제제의 제조에 사용될 수 있다. 진술한 바와 같이, β -라파콘, 이의 유도체 또는 유사체의 용해도는 HPBCD 농도의 증가에 비례하는 것으로 실험에 의하여 측정되었다.

β -라파콘은 본 발명에 의한 조성물에 사용하기에 바람직한 화합물이며, 본 발명은 이러한 구체예에 한정되지 않으며, β -라파콘 유도체 또는 유사체, 예컨대 라파콜, 및 이의 약학 조성물 및 제제는 본 발명의 일부를 이룬다. 이러한 β -라파콘 유사체는 본 명세서에서 참고로 인용하는 PCT 국제 출원 제PCT/US93/07878 (WO94/04145)호에 개시되어 있으며, 이 문헌은 하기 화학식의 화합물을 개시한다.



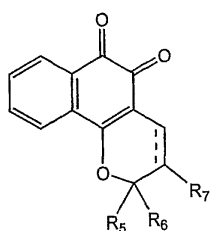
상기 화학식에서, R 및 R_1 은 각각 독립적으로 수소, 치환 및 비치환 아릴, 치환 및 비치환 알케닐, 치환 및 비치환 알킬 및 치환 또는 비치환 알콕시이다. 알킬기는 바람직하게는 C_1 -약 C_{15} , 더욱 바람직하게는 C_1 -약 C_{10} , 더더욱 바람직하게는 C_1 -약 C_6 이다. 용어 알킬은, 특별한 언급이 없는 한, 고리형 및 비고리형기 모두를 의미하나, 고리형기는 물론 3 이상의 탄소 고리원을 포함한다. 일반적으로 직쇄 또는 분지쇄 비고리형 알킬기가 고리형기보다 더 바람직하다. 일반적으로 직쇄 알킬기가 분지쇄보다 더 바람직하다. 알케닐기는 바람직하게는 C_2 -약 C_{15} , 더욱 바람직하게는 C_2 -약 C_{10} , 더더욱 바람직하게는 C_2 - C_6 이다. 특히 바람직한 알케닐기는 C_3 (즉, 1-프로페닐 또는 2-프로페닐)이며, 일릴 부분이 특히 바람직하다. 일반적으로 페닐 및 나프틸이 바람직한 아릴기이다. 알콕시기의 예로는 1 이상의 산소 결합을 포함하며, 바람직하게는 C_1 - C_{15} , 더욱 바람직하게는 C_1 -약 C_6 의 알콕시기가 있다. 치환된 R 및 R_1 기는 1 이상의 적절한 기, 예를 들면 헤테로알킬, 예컨대 1 이상의 이종원자 결합 (그리고 알콕시, 아미노알킬 및 티오알킬 포함)을 포함하는 C_1 - C_{10} 또는 C_1 - C_6 헤테로알킬을 비롯한 N, O 및 S, 알킬기, 예컨대 C_1 - C_{10} 또는 C_1 - C_6 알킬기, 알케닐기, 예컨대 C_2 - C_{10} 또는 C_2 - C_6 알케닐기, C_6 - C_{10} 아릴기, 할로젠, 예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모로 1 이상의 가용 위치에서 치환될 수 있다.

본 발명에 포함되는 기타의 β -라파콘 유사체는 본 명세서에서 참고로 인용하는 미국 특허 제6,245,807호에 개시되어 있는 것으로서, 하기 화학식의 β -라파콘 및 유도체 및 이의 염이 개시되어 있다.



상기 화학식에서, R 및 R₁은 각각 독립적으로 수소, 히드록시, 설프히드릴, 할로젠, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 알케닐, 비치환 알케닐, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 알콕시, 비치환 알콕시로부터 선택되며, 여기서 고리 탄소간의 점선의 이중 결합은 임의의 고리 이중 결합을 의미한다.

추가적 β-라파콘 및 유도체는 본 명세서에서 참고로 인용하는 PCT 국제 출원 제PCT/USOO/10169호(WOOO/61142)에 개시되어 있으며, 이 문헌에는 하기 화학식을 갖는 화합물이 개시되어 있다.

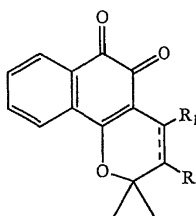


상기 화학식에서, R₅ 및 R₆은 독립적으로 히드록시, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알케닐, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, -(CH₂)_n-페닐로부터 선택될 수 있으며, R₇은 수소, 히드록실, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알케닐, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, -(CH₂)_n-아미노, -(CH₂)_n-아릴, -(CH₂)_n-헤테로아릴, -(CH₂)_n-복소환 또는 -(CH₂)_n-페닐이고, 여기서 n은 0~10의 정수이다.

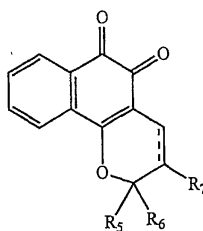
기타의 β-라파콘 및 유도체는 과학 저널 문헌, 예컨대 문헌(Sabba 등, *J Med Chem* 27: 990-994 (1984)) 뿐만 아니라 미국 특허 제5,763,625호, 미국 특허 제5,824,700호 및 미국 특허 제5,969,163호에 개시되어 있는데, 이 문헌에는 2-, 8- 및/또는 9-위치 중 1 이상에서 치환된 β-라파콘이 개시되어 있다. 참고 문헌(Portela 등, *Biochem Pharm* 51: 275-283 (1996)(2 위치 및 9 위치에서 치환); Maruyama 등, *Chem Lett* 847-850 (1977); Sun 등, *Tetrahedron Lett*, 39 :8221-8224 (1998); Goncalves 등, *Molecular and Biochemical Parasitology* 1: 167-176 (1998) (2 위치 및 3 위치에서 치환); Gupta 등, *Indian Journal of Chemistry* 16B : 35-37 (1978); Gupta 등, *Curr Sci* 46: 337 (1977)(3 위치 및 4 위치에서 치환); DiChenna 등, *J Med Chem* 44: 2486-2489 (2001) (모노아릴아미노 유도체)). 전술한 각각의 문헌은 본 명세서에서 참고로 인용한다.

본 발명에 포함되는 및 유도체는 하기 화학식 I 및 화학식 II의 화합물 및 이의 염을 포함하는 것이 더욱 바람직하다.

화학식 I



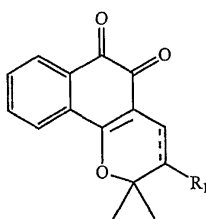
화학식 II



상기 화학식에서, 고리 탄소간의 점선의 이중 결합은 임의의 고리 이중 결합을 의미하며, R 및 R₁은 각각 독립적으로 수소, 히드록시, 설프히드릴, 할로젠, 치환 알킬, 비치환 알킬, 치환 알케닐, 비치환 알케닐, 치환 아릴, 비치환 아릴, 치환 알콕시, 비치환 알콕시으로부터 선택된다. 알킬기는 바람직하게는 C₁-약 C₁₅, 더욱 바람직하게는 C₁-약 C₁₀, 더더욱 바람직하게는 C₁-약 C₆이다. 용어 알킬은 고리형기 및 비고리형기 모두를 의미한다. 일반적으로 직쇄 또는 분지쇄 비고리형 알킬기가 고리형기보다 더 바람직하다. 일반적으로 직쇄 알킬기가 분지쇄보다 더 바람직하다. 알케닐기는 바람직하게는 C₂-약 C₁₅, 더욱 바람직하게는 C₂-약 C₁₀, 더더욱 바람직하게는 C₂-C₆이다. 특히 바람직한 알케닐기는 C₃ (즉, 1-프로페닐 또는 2-프로페닐)이고, 알릴 부분이 특히 바람직하다. 페닐 및 나프틸이 아릴기로서 바람직하다. 알콕시기의 예로는 1 이상의 산소 결합을 갖고, 바람직하게는 C₁-C₁₅, 더욱 바람직하게는 C₁-약 C₆을 갖는 알콕시기가 있다. 치환된 R 및 R₁기는 1 이상의 적절한 기, 예를 들면 헤테로알킬, 예를 들면 1 이상의 이종원자 결합(및 알콕시, 아미노알킬 및 티오알킬 포함)을 갖는 C₁-C₁₀ 또는 C₁-C₆ 헤테로알킬을 비롯한, N, O 및 S, C₁-C₁₀ 또는 C₁-C₆ 알킬기, C₂-C₁₀ 또는 C₂-C₆ 알케닐기, C₆-C₁₀ 아릴기, 할로젠, 예컨대 플루오로, 클로로 및 브로모로 1 이상의 가용 위치에서 치환될 수 있으며, R₅ 및 R₆은 독립적으로 히드록시, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알케닐, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, -(CH₂)_n-아릴, -(CH₂)_n-헤테로아릴, -(CH₂)_n-복소환 또는 -(CH₂)_n-페닐로부터 선택될 수 있으며; R₇은 수소, 히드록실, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알케닐, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, -(CH₂)_n-아미노, -(CH₂)_n-아릴, -(CH₂)_n-헤테로아릴, -(CH₂)_n-복소환 또는 -(CH₂)_n-페닐로부터 선택될 수 있고, n은 0~10의 정수이다.

또한, 본 발명에 포함되는 바람직한 및 유도체는 하기 화학식 III의 화합물 등이 있다.

화학식 III

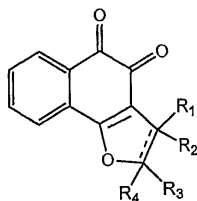


상기 화학식에서, R₁은 -(CH₂)_n-R₂이고, 여기서 n은 0~10의 정수이며, R₂는 수소, 알킬, 아릴, 헤테로방향족, 복소환, 지방족, 알콕시, 알릴옥시, 히드록실, 아민, 티올, 아마이드 또는 할로젠이다.

또한, 본 발명에 포함되는 및 유도체는 4-아세톡시-β-라파콘, 4-아세톡시-3-브로모-β-라파콘, 4-케토-β-라파콘, 7-히드록시-β-라파콘, 7-메톡시-β-라파콘, 8-히드록시-β-라파콘, 8-메톡시-β-라파콘, 8-클로로-β-라파콘, 9-클로로-β-라파콘, 8-메틸-β-라파콘 및 8,9-디메톡시-β-라파콘을 포함한다.

또한, 본 발명에 포함되는 바람직한 및 유도체는 하기 화학식 IV의 화합물을 포함한다.

화학식 IV

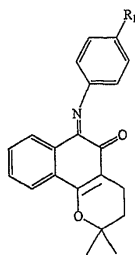


상기 화학식에서, R₁-R₄는 각각 독립적으로 H, C₁-C₆ 알킬, C₁-C₆ 알케닐, C₁-C₆ 알콕시, C₁-C₆ 알콕시카르보닐, -(CH₂)_n-아릴, -(CH₂)_n-헤테로아릴, -(CH₂)_n-복소환 또는 -(CH₂)_n-페닐로 구성된 군에서 선택되며; 또는 R₁ 및 R₂는 함께 상기 기로부터 선택된 단일의 치환체가 될 수 있고, R₃ 및 R₄는 함께 상기 기로부터 선택된 단일의 치환체가 될 수 있으며, 여기서 ---는 이중 결합이다.

또한, 본 발명에 포함되는 바람직한 및 유도체는 둔니온 및 2-에틸-6-히드록시나프토[2,3-b]-푸란-4,5-디온을 포함한다.

또한, 본 발명에 포함되는 바람직한 및 유도체는 하기 화학식 V의 화합물을 포함한다.

화학식 V



상기 화학식에서, R¹은 H, CH₃, OCH₃ 및 NO₂로부터 선택된다.

상기 화학식의 바람직한 화합물은 도 12에 도시되어 있다.

물과 비교한 40% (w/v) HPBCD 용액 중에서의 β-라파콘 및 이의 유사체의 용해도는 하기 표 3 및 4에 도시되어 있다. 용해도를 측정하기 위하여, 테스트 화합물을 우선 에탄올에 용해시켜 2.5~10 mg/ml 범위의 농도를 갖는 표준 용액을 생성한 후, 이를 10 μg/ml로 물로 희석한다. UV 주사로 10 μg/ml의 표준 용액을 얻었으며, 최대 흡광도의 파장 및 최대 흡광 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 각각의 테스트 화합물에 대하여 물 및 40% HPBCD의 50 μl 분액을 각각 약 1 mg의 화합물을 포함하는 에펜도르프 시험관에 각각 첨가하였다. 시험관을 30℃의 수조에서 가열하고, 와류 혼합한 후, 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리하였다. 이 단계를 반복한 후, 시험관을 실온으로 1 시간 동안 냉각시키고, 다시 원심분리하였다. 각각의 시험관으로부터의 상청액을 적절한 흡광도 범위내에서 물로 희석하고, 화합물의 흡광도 최대 파장에서 UV 흡광도를 측정하였다. 이러한 포화 용액의 농도를 10 μg/ml 에탄올성 표준액에 대한 비율로서 비를 연산하였다. 표 3 및 표 4에 도시한 바와 같이, 테스트 화합물의 수용해도는 40% HPBCD의 존재하에서 7~323 배로 증가하였다.

[표 3]

수성용액 중에서 그리고 40%(w/v) 히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HPBCD) 용액 중에서 β-라파콘 및 이것의 유사체의 흡광도 값

화합물	최대 흡광도에서의 파장(nm)	표준 용액 10 μg/ml의 흡광도	수성 용액		HPBCD 용액	
			Dil 인자	흡광도	Dil 인자	흡광도
β-라파콘 (βL)	258	1.041	10	0.452	2000	0.73
3-브로모-βL	256	0.788	10	0.286	1000	0.545

3,4-데히드로-β L	262	0.71	10	0.171	1000	0.41
둔니온(Dunione)	262	0.944	100	0.449	5000	0.322
4-아세톡시-β L	254	0.89	50	0.506	500	0.373
4-히드록시-β L	254	0.973	50	0.742	500	0.596
4-케토-β L	280	1.216	50	1.224	500	1.07
3-히드록시-β L	256	0.995	200	0.687	2000	0.727
3-(3-메틸-2-부테닐)-β L	258	0.697	20	0.233	1000	0.284

[표 4]

수성용액 중에서 그리고 40%(w/v) 히드록시프로필-β-시클로덱스트린(HPBCD) 용액 중에서 β-라파콘 및 이것의 유사체의 용해도

화합물	수성 용액 중에서 용해도(μg/ml)	HPBCD 용액 중에서 용해도(mg/ml)	용해도 향상 (- 배수)
β-라파콘(β L)	43	14.0	323
3-브로모-β L	36	6.9	191
3,4-데히드로-β L	24	5.8	240
둔니온	476	17.0	36
4-아세톡시-β L	284	2.1	7.4
4-히드록시-β L	381	3.1	8.0
4-케토-β L	503	4.4	8.7
3-히드록시-β L	1381	14.6	10.6
3-(3-메틸-2-부테닐)-β L	67	4.1	61

본 발명에 따른 다른 특정한 제제는 이하에서, 그리고 실시예 부분에서 설명한다. 일반적으로, β-라파콘, 이것의 유도체 및 유사체 화합물은 유기 합성의 기술 분야의 당업자에게 잘 알려진 다수의 방식으로 제조할 수 있다. β-라파콘과 이것의 유도체 및 유사체는 해당 기술 분야의 당업자가 이해하고 있는 바와 같이 합성에 관한 유기 화학의 기술 분야에 공지된 합성 방법과 함께 이하에서 일반적으로 설명한 방법 또는 그 변형 방법을 이용하여 합성할 수 있다. 바람직한 방법으로는 본 명세서에서 설명된 합성 및 제제화 방법을 들 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.

β-라파콘 및/또는 이것의 유도체 및 유사체를 합성하기 위한 다수의 방법이 해당 기술 분야에 공지되어 있다. 제1 방법은 문헌(Schaffner-Sabba, K. 등, β-Lapachone: Synthesis of Derivatives and Activities in Tumor Models, *J. Med. Chem.*, 27(1984) 990-994)에 기재되어 있으며, 칼륨염 방법으로서 공지되어 있다. 제2 방법은 문헌(Sun, J.S. 등, A Preparative Synthesis of Lapachol and Related Naphthoquinones, *Tetrahedron Letters*, 39(1998) 8222-8224)에 기재되어 있으며, 리튬염 방법으로서 공지되어 있다. 이들 2가지 방법은 모두 초기에 β-라파콘이 합성되는 중간체인 라파콜을 생성시킨다. 이들 방법은 모두 금속염의 형성을 필요로 한다. 추가적으로, 문헌(Amaral, A., 등, in The Total Synthesis of β-lapachone, *J. Heterocyclic Chem.*, 29(1992) 1457-1460)에는 8 단계의 β-라파콘 α-나프톨의 합성이 기재되어 있으며, 그 합성 결과로서 상기 나프톨은 전체 수율이 단지 23%에 지나지 않았다. 미국 특허 제5,763,625호에서는 먼저 라파콜이 3-브로모라파콘으로 전환되고, 이어서 2 단계 순서로 3-히드록시-β-라파콘으로 전환된다. 더구나, 동시 계류 중인 미국 특허 출원 연속 제09/975,776호에서 설명된 바와 같이, 제1 단계로서 퀴논 용액에 수소화리튬을 첨가하거나 또는 별도로 수산화칼륨을 첨가함으로써 동일계에서 2-히드록시-1,4-나프토크논의 금속(리튬 또는 칼륨) 염을 제조하고, 이어서 상기 금속염을 브로마이드 화합물과 반응시켜서 라파콜을 형성시키는 보고된 방법과는 달리, 동시 계류 중인 미국 특허 출원 연속 제09/975,776호에서 설명한 방법은 그러한 제1 단계를 생략하고, 요오드화나트륨 및 약염기, 예컨대 트리에틸아민, 피리딘, 트리메틸아민, N,N-디이소프로필에틸아민, 2,6-루티딘의 존재 하에 2-히드록시-1,4-나프토크논을 직접 출발물질로 하여 1-브로모-3-메틸-2-부텐과 반응시켜서 β-라파콘이 결국 합성되는 라파콜을 형성시킨다.

상기 논의한 바와 같이, 단일 제제로서 β -라파콘은 폭넓게 다양한 암 세포주에 대하여 저(1-10) μmol 범위의 IC_{50} 값으로 유의적인 세포독성 활성을 갖는 것으로 밝혀지고 있다. 시험관내 연구들을 통해 밝혀진 바와 같이, 이들 마이크로몰 농도의 β -라파콘을 IC_{50} 레벨의 탁솔(등록상표)와 함께 종양 세포 배양물에 적용하는 경우, 콜로리는 전혀 형성되지 않았다. 게다가, 이들 연구는 β -라파콘이 활성 화합물 파클리탁셀을 함유하는 탁솔(등록상표)과 상승 효과적으로 작용하여 부수적인 독성의 증가 없이 둘 중 한 제제 단독의 유효성을 유의적으로 증가시킨다는 것을 보여 주었다(Li, C.J. 등, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96(1999) 13369).

β -라파콘과 탁솔(등록상표)의 조합에 의한 생체내 종양 성장의 유효한 억제제는 누드 마우스내 사람 난소암의 이종이식편 모델에서 입증되었다. 또한, 유효한 항종양 활성은 사람 유방암 이종이식편을 보유하는 암컷 누드 마우스에서 입증되었다(하기 실시예에서 보다 상세하게 논의된다).

또한, 가용화된 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체는 다른 탁산 유도체 및 항암제와 조합할 수 있다. 이러한 조합에서, 가용화된 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체는 항암제 또는 탁산 유도체와 혼합되고 단일 바이알 내에 제공될 수 있거나, 또는 별도의 바이알 내에 각자 제공될 수 있다. 가용화된 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체, 그리고 항암제 또는 탁산 유도체가 별도의 바이알 내에 제공되는 경우, 각 바이알의 내용물은 동시에 또는 순차적으로 환자에게 투여할 수 있다.

또 다른 실시양태에서, 가용화된 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체는 방사선 요법과 조합으로 투여할 수 있다. 유리하게도, 환자는 환자를 치료하는 의학적 임상예에 의해 결정되는 바와 같이 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체 투여 이전 또는 이후에 예정된 시간 동안 방사선 요법을 수행한다.

β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체의 종류 및 양과, 사용된 HPBCD 또는 다른 담체는 온혈 동물의 종 또는 사람, 체중, 및 치료 중인 종양에 따라 광범위하게 다양하다. 마찬가지로, 투여 용량은 공지된 인자, 예컨대 특정한 제제의 약동력학적 특징과 그 투여 방식 및 경로, 연령, 환자의 건강 상태 및 체중; 증후의 성질 및 정도; 동시 수반하는 치료 유형, 치료 빈도; 및 소정의 효과에 따라 달라진다.

투여되는 용량은 공지된 인자, 예컨대 특정한 활성 성분의 약동력학적 특징과 그 투여 방식 및 경로; 환자의 연령, 성별, 건강 상태, 신진대사율, 흡수 효율 및/또는 체중; 증후의 성질 및 정도; 동시 수반하는 치료의 유형, 치료 빈도; 및 소정의 효과에 따라 달라진다. 바람직한 실시양태에서, 용량은 1주 2회 내지 4주 마다 1회로 투여되는 대략 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 사이에 존재할 수 있다.

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "치료 유효량"이란 연구자 또는 임상예에 의해 탐구되고 있는 동물 또는 사람의 조직, 계의 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 약물 또는 약학 제제의 양을 의미한다.

투여의 용이성 및 용량의 균일성을 위한 단위 제형(dosage unit form)으로 경구 또는 비경구 조성물을 제제화하는 것이 특히 유리하다. 제형 단위는 단일 화합물, 즉 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체, 또는 이들과 다른 화합물 또는 다른 암 억제 화합물 또는 종양 성장 억제 화합물 또는 항바이러스성 화합물과의 혼합물을 포함할 수 있다. 유리하게도, 비경구 투여에 적합한 조성물로는 항산화제, 버퍼, 정균제(bacteriostatics), 및 제제를 의도한 환자의 혈액과 같은 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 멸균 주사 용액 뿐만 아니라 비수성 용액; 및 현탁제 및 점증제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 들 수 있다. 제제는 단위 투여량 용기 또는 복수 투여량 용기 내에 존재할 수 있으며, 예를 들면 앰플 및 바이알 내에 밀봉될 수 있으며, 본 명세서에 논의되어 있는 바와 같이, 사용하기 직전에 주사액의 경우 단지 멸균 액상 담체, 예를 들면 물만을 첨가하는 것을 필요로 하는 동결 건조 조건 하에 저장할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이 단위 제형은 치료하고자 하는 환자에 대하여 단일 용량으로서 적합한 물리적으로 불연속 단위를 의미하며, 각 단위는 필요한 약학 담체와 회합으로 원하는 치료 효과를 생성하도록 계산되는 예정된 정량의 활성 화합물을 함유한다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 그러한 용액의 제조에 대하여 해당 기술 분야에서 공지된 바와 같이 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조할 수 있다. 본 발명의 제형 단위에 관한 명세서 설명은 활성 성분의 독특한 특징 및 달성하고자 하는 특정한 치료 효과, 그리고 개별 치료를 위한 그러한 활성 화합물의 배합 기술에 있어서의 고유 한계점에 따라 직접 좌우되는 것으로 기술되어 있다.

본 발명의 특수한 조성물 및 제제에 관하여 구체적으로 언급한 성분들 이외에도, 본 발명의 조성물 및 제제는 해당 제제의 유형에 관하여 해당 기술 분야의 관용적인 다른 제제, 예를 들면 풍미제 및 착색제를 비롯하여 경구 투여에 적합한 것들을 포함할 수 있다는 점을 이해해야 한다.

본 발명에 따라 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체와 HPBCD와의 복합체 이외에도, 또한 주사 또는 주입을 통한 비경구 투여에 적합한 약학 조성물로는 멸균 수성 용액(수용성의 경우) 또는 분산액 및 이 멸균 주사 가능한 용액 또는 분산액을 즉석 제조하기 위한 멸균 분말을 들 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 적합한 담체로는 생리학적 식염수, 정균성 물, 크레모포 EL(상품명)(뉴저지주 파르시파니 소재, BASF 제품) 또는 인산염 완충된 식염수(PBS)를 들 수 있다. 상기 담체는, 예를 들면 물, 에탄올, 폴리에틸렌(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 오일 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 모든 경우에서, 조성물은 멸균되어야 하며, 용이한 주사능(syringeability)이 존재할 정도로 유체적이어야 한다. 상기 조성물은 제조 및 저장의 조건 하에 안정해야 하며, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다. 적당한 유동성(fluidity)은, 예를 들면 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지성(maintenance)에 의해, 그리고 계면활성제에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 진균제, 예를 들면 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성할 수 있다. 많은 경우에서, 상기 조성물은 등장화제, 예를 들면 당, 폴리알콜, 에컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사 가능한 조성물의 장시간 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들면 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함시킴으로써 발생시킬 수 있다. 또한, 비경구 및 정맥내 조성물은 사용하고자 하는 주사 또는 전달 시스템의 유형과의 상용성을 용이하게 하는 미네랄 및 다른 물질도 포함할 수 있다. 추가로, 비경구 투여용 용액은 활성 화합물의 수용성 염, 적합한 안정화제, 및 필요한 경우 버퍼 물질을 함유할 수 있다. 항산화제, 에컨대 중아황산나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산은 단독 또는 조합 형태로 존재하며, 적합한 안정화제이다. 또한, 시트르산 및 이것의 염과 나트륨 EDTA도 사용된다. 또한, 비경구 용액은 보존제, 에컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤 및 클로로부탄올을 함유할 수 있다.

멸균 주사 가능한 용액은 필요한 경우 여과 멸균 처리를 수행한 후 활성 화합물을 필요한 양으로 상기 열거한 성분들 중 하나 또는 그 조합물과 함께 적당한 용매 중에 혼입시킴으로써 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거한 것들 중의 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 부형제 내로 활성 화합물을 혼입시킴으로써 제조한다. 멸균 주사 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 활성 성분과 미리 멸균 여과 처리된 용액으로부터 유래하는 원하는 임의 추가 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조법 및 동결 건조법이다. 본 명세서에 설명된 β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체의 복합체는 동결 건조한 후, 수성 용액 중에 재구성하여 실질적으로 용해시킬 수 있다(하기 실시예 5 참조).

액상 제형으로 경구 투여하는 경우, 경구 약물 성분은 β -시클로덱스트린과 조합하는 것이 바람직하고, 히드록실프로필- β -시클로덱스트린과 조합하는 것이 보다 바람직하다. 그러나, 본 발명은 이에 관하여 제한되어 있지 않으며, 경구 약물 성분은 임의의 경구용 비독성의 약학적으로 허용 가능한 불활성 담체, 에컨대 에탄올, 글리세롤, 물, 오일 등과 조합할 수 있다. 게다가, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 활택제, 붕해제, 및 착색제도 혼합물 내에 혼입시킬 수 있다. 적합한 결합제로는 전분, 젤라틴, 천연 당, 에컨대 글루코즈 또는 베타-락토스, 옥수수 감미제, 천연 및 합성 감, 에컨대 아카시아, 트라카칸트 또는 알긴산나트륨, 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등을 들 수 있다. 이러한 제형에 사용된 활택제로는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨 등을 들 수 있다. 붕해제로는 전분, 메틸 셀룰로즈, 한천, 벤토나이트, 크산탄 검 등을 들 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 경구 투여용 액상 제형은 환자의 수용성을 증가시키는 착색제 및 풍미제를 함유할 수 있다.

적합한 액상 제형의 추가 예로는 물, 약학적으로 허용 가능한 지방 및 오일, 에스테르를 비롯한 알콜 또는 다른 유기 용매 중의 용액 또는 현탁액, 에멀션, 시럽 또는 엘릭시르, 현탁액, 비기포성 과립으로부터 재구성된 용액 및/또는 현탁액 및 기포성 과립으로부터 재구성된 기포성 제제를 들 수 있다. 또한, 이러한 액상 제형은 추가의 용매, 보존제, 유화제, 현탁제, 희석제, 감미제, 점증제 및 용융화제(melting agent)를 함유할 수 있다.

또한, 활성 화합물은 표적화 가능한 약물 담체로서 수용성 중합체와 커플링할 수 있다. 이러한 중합체로는 폴리비닐피롤리돈, 피란 공중합체, 폴리히드록시프로필메타크릴아미드-페놀, 폴리히드록시에틸아스파타미드페놀 또는 팔리토일 잔기에 의해 치환된 폴리에틸렌옥사이드-폴리리신을 들 수 있다. 게다가, 본 발명의 화합물은 약물의 방출 제어를 달성하는 데 유용한 생분해성 중합체의 부류, 예를 들면 폴리락트산, 폴리글리콜산, 폴리락트산과 폴리글리콜산의 공중합체, 폴리엡실론 카르포락톤, 폴리히드록시 부티르산, 폴리오르토에스테르, 폴리아세탈, 폴리디히드로피란, 폴리시아노아실레이트, 및 히드로겔의 가교성 또는 양친매성 블록 공중합체와 커플링할 수 있다.

본 발명의 활성 화합물은 체내에서 제제의 작용 부위와 활성 화합물의 접촉을 생성하는 임의의 수단으로 암 치료제 및 종양 억제제로서 투여하기 위한 것이다. 기술한 바와 같이, β -라파콘, 이것의 유도체 및 유사체를 투여하는 바람직한 방식은 활성 화합물을 비경구 투여, 바람직하게는 (볼러스 또는 주입) 정맥내 투여하는 것이다. 그러나, 본 발명은 이에 관하여 제한되는 것이 아니며, 본 발명에 따른 활성 화합물은 약제들과 병용하여 사용하기에 이용 가능한 임의의 종래 수단으로 투여할 수 있는데, 상기 약제들은 개별 치료제로서 투여하거나, 또는 종양을 억제하기 위한 다른 치료제와의 조합물로서 투

여할 수 있다. 예를 들면, 또한 활성 화합물은 복강내, 피하내 또는 근육내 투여할 수 있다. 또한, 활성 화합물은 피부암, 예컨대 기저 세포암, 상피(squamous) 세포암, 카포시 육종 및 흑색종의 치료를 위한 국소 투여용으로 제제화할 수 있다. 활성 화합물은 단독으로 투여할 수 있지만, 일반적으로 선택된 투여 경로 및 표준 약학 관례를 토대로 선택된 약학적 담체와 함께 투여할 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 조성물 및 제제를 환자에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 상기 방법은 상기 설명한 바와 같이 바람직하게는 정맥내 주사 또는 주입을 통해 조성물 및 제제를 환자에게 비경구 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 본 발명의 조성물 및 제제를 국소 투여하는 것을 포함한다. "국소 도포", "국소 도포되는", "국소 투여" 및 "국소 투여되는"의 용어는 치료가 필요한 환자의 피부 표면에 본 발명에 따른 1종 이상의 조성물을 도포 또는 전연시키는 공정을 의미하는 데 상호 호환적으로 사용되고 있다. 국소 제제는 수중유 크림 에멀션으로 구성될 수 있지만, 이에 관하여 국한되는 것은 아니다. 본 발명에 의해 고려되는 국소 제제로는 β -라파론 및 유도체의 느린 방출을 생성시킬 수 있는 서방형(delayed release) 조성물을 들 수 있다.

국소 투여용 제제는 전체적 필요성, 외관, 물성 및/또는 물리적 감촉을 개량할 목적의 다양한 첨가제 성분들을 임의로 함유할 수 있다. 단 그러한 임의의 첨가제들은 전술한 필수 성분들과 물리적 및 화학적으로 상용성이어야 하고 안정성, 안전성 또는 효능을 지나치게 손상시켜서는 안 된다. 임의의 첨가제들은 본 조성물의 담체에 분산, 용해 등을 시킬 수 있다. 임의의 첨가제에는 에스테터 성분(예를 들면, 화장용 클레이 형태의 오일 흡수제 및 중합체 흡수제를 비롯한 흡수제), 연마제, 케이크 방지제, 소포제, 추가의 향미생물제, 결합제, 완충제, 팽화제, 화장용 살생물제, 추가의 변성제 및 침투제(전술한 바와 같음), 화장용 수렴수, 약물 수렴수, 외용 진통제, 막 형성제, 불투명화제, 방향제, 향료, 안료, 착색제, 피부 진정제, pH 조절제, 킬레이트제, UV 흡수제, 가소제, 방부제, 방부 향상제, 탈모제, 표피박리제 및 엑스폴리양, 콜라겐 및 그것의 분해 생성물, 막 형성제 등이 포함된다. 그러한 물질의 대표적인 예는 문헌[Harry's Cosmeticology, 7th Ed., Harry & Wilkinson(Hill Publishers, London 1982); in Pharmaceutical Dosage Forms--Disperse Systems; Lieberman, Rieger & Banker, Vols. 1(1988) & 2(1989); Marcel Decker, Inc.; in The Chemistry and Manufacture of Cosmetics, 2nd. Ed., deNavarre(Van Nostrand 1962-1965); and in The Handbook of Cosmetic Science and Technology, 1st Ed. Knowlton & Pearce(Elsevier 1993)]에 개시되어 있다.

다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 조성물은 친수상 및 소수상을 가진 조성물을 포함한다. 적합한 비천연 소수상 성분의 예에는 하기의 것들이 포함되나 이들에 한정되는 것은 아니다: (i) 석유(64, 65)에서 얻은 액상 탄화수소의 비독성 및 비발암성 혼합물; (ii) 비직쇄상의 고상 탄화수소 및 고비점 액상 탄화수소의 비독성, 비발암성 콜로이드상 시스템(여기서, 대부분의 액상 탄화수소는 미셀(64, 66, 67)임); (iii) 약 7 내지 약 40개의 탄소원자를 함유하는 비독성 및 비발암성 직쇄 및 분지쇄 탄화수소, 예를 들면 도데칸, 이소도데칸, 스쿠알렌, 콜레스테롤, 수소화 폴리이소부틸렌, 도코산(즉, 탄소수 22개 이하의 탄화수소), 헥사데칸, 이소헥사데칸(Permethy. RTM 101A, Presperse, South Plainfield, N. J.) 등; (iv) 탄소수 1 내지 30개 이하의 카르복실산 및 탄소수 2 내지 30개 이하의 디카르복실산의 비독성 및 비발암성의 탄소수 1 내지 30개 이하의 알콜 에스테르, 예컨대 직쇄 및 분지쇄 물질과 방향족 유도체(예를 들면, 디이소프로필 세바케이트, 디이소프로필 아디페이트, 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 메틸 팔미테이트, 미리스틸 프로피오네이트, 2-에틸헥실 팔미테이트, 이소데실 네오펀타노에이트, 디-2-에틸헥실 말레에이트, 세틸 팔미테이트, 미리스틸 미리스테이트, 스테아릴 스테아레이트, 이소프로필 스테아레이트, 메틸 스테아레이트, 세틸 스테아레이트, 베헤닐 베헤네이트, 디옥틸 말레에이트, 디옥틸 세바케이트, 디이소프로필 아디페이트, 세틸 옥타노에이트, 디이소프로필딜리놀레이트); (v) 탄소수 1 내지 30개 이하의 카르복실산의 비독성 및 비발암성 모노-, 디- 및 트리-글리세라이드, 예컨대 카프릴/카프릭 트리글리세라이드, PEG-6 카프릴/카프릭 트리글리세라이드, PEG-8 카프릴/카프릭 트리글리세라이드; (vi) 탄소수 1 내지 30개 이하의 카르복실산의 비독성 및 비발암성 알킬렌글리콜 에스테르, 예컨대 에틸렌 글리콜 모노- 및 디-에스테르, 및 탄소수 1 내지 30개 이하의 카르복실산의 프로필렌 글리콜 모노- 및 디-에스테르, 예컨대 에틸렌 글리콜 디스테아레이트; (vii) 전술한 물질들의 비독성 및 비발암성 프로폭시화 및 에톡시화 유도체; 및 (viii) 모노사카라이드 및 올리고사카라이드의 비독성 및 비발암성의 탄소수 1 내지 30개 이하의 모노- 및 폴리-에스테르. 소수상에서 유용할 수 있는 액상 에스테르의 예에는 글루코즈 테트라-올레에이트; 대두유 지방산(불포화)의 글루코즈 테트라-에스테르; 혼합 대두유 지방산의 만노즈 테트라-에스테르; 올레산의 갈락토즈 테트라-에스테르; 리놀레산의 아라비노즈 테트라-에스테르; 자일로즈 테트라-리놀레에이트; 갈락토즈 펜타-올레에이트; 소르비톨 테트라-올레에이트; 불포화 대두유 지방산의 소르비톨 헥사-에스테르; 자일리톨 펜타-올레에이트; 수크로즈 테트라-올레에이트; 수크로즈 펜타올레에이트; 수크로즈 헥사-올레에이트; 수크로즈 헵타-올레에이트; 수크로즈 옥타-올레에이트; 및 이들의 혼합물이 포함된다.

다른 실시양태에서, 본 발명에 의한 국소 투여에 적합한 조성물에는 대안적 담체를 함유하는 조성물이 포함된다. 대안적 담체의 예에는 아크릴산, 치환 아크릴산, 그러한 아크릴산 및 치환 아크릴산의 염 및 에스테르에서 유도된 1종 이상의 단량체를 함유하는 가교결합 중합체 화합물이 포함되며, 가교결합체는 2종 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 함유하고, (i) 아

크릴산 단독중합체성 다가 알콜, 예컨대 (예를 들면, C_{1-4} 알킬, $--CN$, 또는 $--COOH$ 치환된) 아크릴산 단량체 또는 그 유도체(여기서, 아크릴산은 2 및 3번 탄소 위치에 치환체를 가짐), 예컨대 아크릴산, 메타크릴산, 에타크릴산 및 그 혼합물; 또는 (ii) 아크릴산 단량체(또는 그 유도체) 및 C_{1-4} 알콜 아크릴레이트 에스테르 단량체(또는 그 유도체)와 제2 단량체, 즉 장쇄 알콜(예를 들면, C_{8-40}) 아크릴레이트 에스테르 단량체(또는 그 유도체), 예를 들면 아크릴산, 메타크릴산, 에타크릴산 및 그 혼합물을 둘 다 함유하는 가교결합 아크릴레이트 공중합체에서 유도된다. 후자의 두 형태의 중합체 조합물 또한 본 발명의 치료 방법에 사용하기 위한 특정 조성물에 유용할 수 있다.

피부암과 같은 질환을 치료하는 것 외에, 본 발명의 제제는 다양한 피부과 증상 또는 질환을 치료하는 데 사용할 수 있다. 피부과 증상이란 피부와 관련된 모든 질환일 수 있다. 피부과 증상에는 다음과 같은 피부염 증상이 포함되는데, 이들에 한정되는 것은 아니다: 접촉성 피부염; 아토피성 피부염; 지루성 피부염; 화폐성 피부염; 손과 발의 만성 피부염; 전신성 박탈성 피부염; 울혈성 피부염; 및 국소성 소피 피부염; 피부의 박테리아 감염증, 예를 들면 피부의 포도상구균성 질환, 열상; 단독; 모낭염; 절종; 종창; 한선염; 파로니키알(paronychia) 감염증 및 홍색 음선; 표재성 진균 감염증, 예를 들면 피부사상균 감염증; 효모 감염증; 칸디다증; 및 어루러기; 피부의 기생충 감염증, 예를 들면 개선증; 이증; 및 유충피부내 이행증; 모낭 및 피지선의 질환, 예를 들면 여드름; 주사; 구주위 피부염; 다모증; 무모증; 수발 가성모낭염; 및 케라틴성 낭종; 스케일링 구진성 질환, 예를 들면 건선; 장미색 비강진; 및 편평 태선; 욕창; 양성 종양 및 악성 종양.

본 발명에 의한 조성물 및 제제를 제조하는 방법과 그들에 포함되는 성분들에 관한 추가의 정보는 당해 분야의 표준 참고 문헌[예를 들면, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easter, PA, 15th Ed.(1975)]에서 찾아 볼 수 있다.

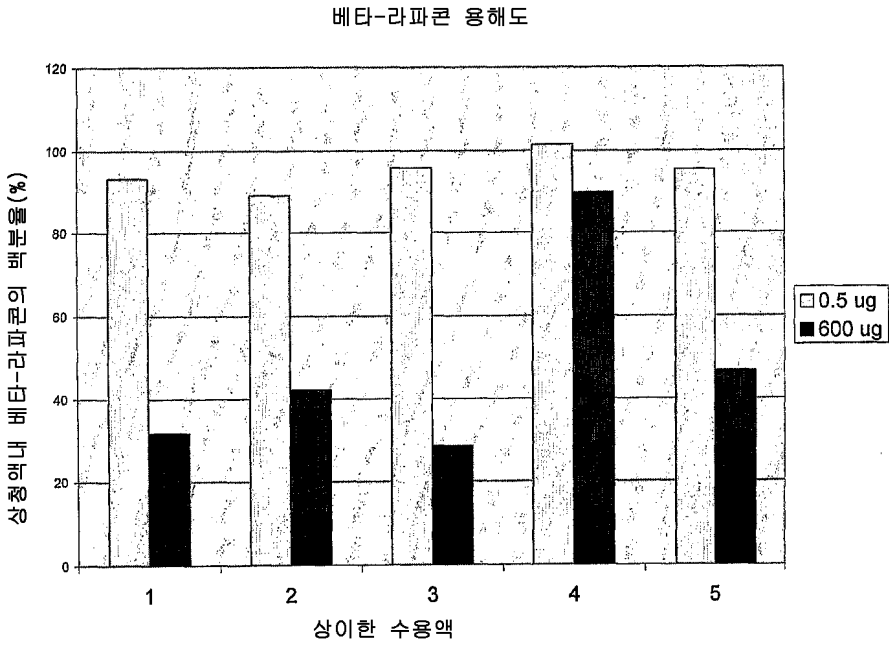
본 발명은 또한 치료 유효량의 활성 화합물을 포함하는 약학 조성물을 함유하는 하나 이상의 용기를 포함하는 약학적 키트를 포함한다. 그러한 키트는 또한 필요에 따라 하나 이상의 통상의 약학적 키트 성분, 예컨대 당업자들이 용이하게 알 수 있는 1종 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유하는 용기, 추가의 용기 등을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, β -라파콘 또는 그 유도체 또는 동족체를 함유하는 하나 이상의 바이알을 포함하는 악성 종양 치료용 키트가 제공된다. 다른 바람직한 실시형태에서, 치료 유효량의 β -라파콘 또는 그 유도체 또는 동족체와 약학적으로 허용 가능한 수용해성 담체 분자의 복합체를 함유하는 하나 이상의 바이알과, 그 바이알 또는 별도의 바이알 내에 항암제, 특히 탁세인 유도체를 더 포함하는 악성 종양 치료용 키트가 제공된다.

키트에는 성분의 투여량, 투여 지침 및/또는 성분들의 혼합 지침을 표시하는 인쇄물이 삽입물 또는 라벨 형태로 포함될 수도 있다. 본 상세한 설명에 있어서 특정된 물질 및 조건은 본 발명을 실시함에 있어서 중요한 것들이지만, 본 발명의 효과를 달성함에 있어서 방해가 되는 것이 아닌 한 특정되지 않은 물질 및 조건들이 배제되는 것은 아님을 알아야 한다.

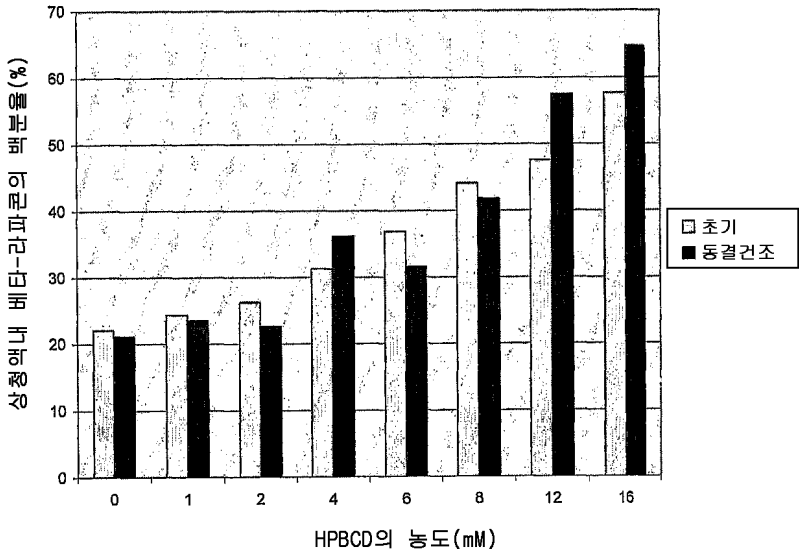
다음은 실시예를 참조하여 본 발명을 일층 상세히 설명하고자 하나, 이들 실시예에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다. 당업자라면 본 발명의 목적 및 중요 사항을 벗어나는 일없이 물질 및 방법 모두에 대해 다양한 변경을 실시할 수 있을 것이다.

도면

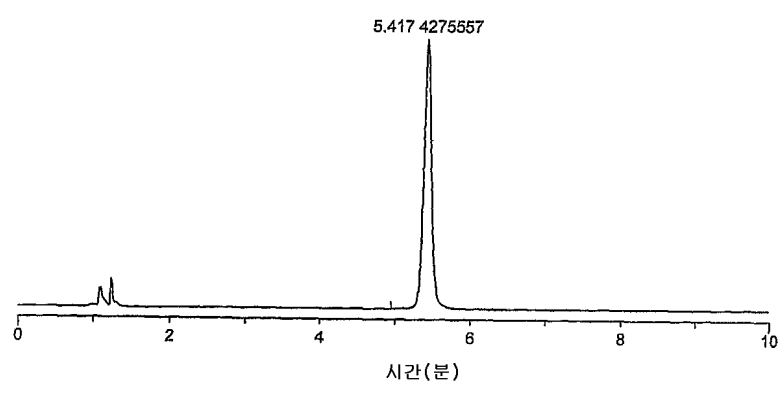
도면1



도면2



도면3



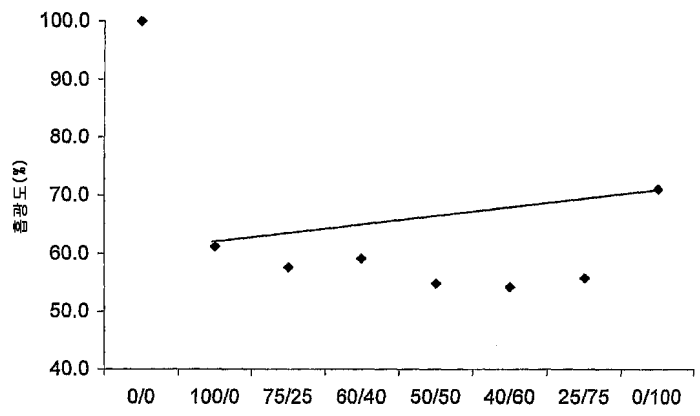
도면4

세포주	조직 기원	적용된 약물 농도(μM)		클로니, 대조군의 백분율(%)		
		β-라파콘	탁솔	β-라파콘	탁솔	β-라파콘 + 탁솔
A2780DDP	난소	2	0.2	77 (1.1)	39 (0.8)	0
MCF-7	유방	4	0.1	46 (1.4)	45 (0.3)	0
21MT	유방	4	0.1	56 (5.0)	63 (7.0)	0
Skmel-28	흑색종	4	0.1	56 (1.4)	44 (5.1)	0
HT-29	결장	4	0.1	42 (1.4)	64 (2.5)	0
ASPC-1	췌장	4	0.2	45 (1.9)	71 (0.8)	0
G480	폐	4	0.2	32 (0.3)	39 (2.6)	2 (0.1)
DU145	전립선	4	0.2	50 (2.2)	30 (0.9)	0

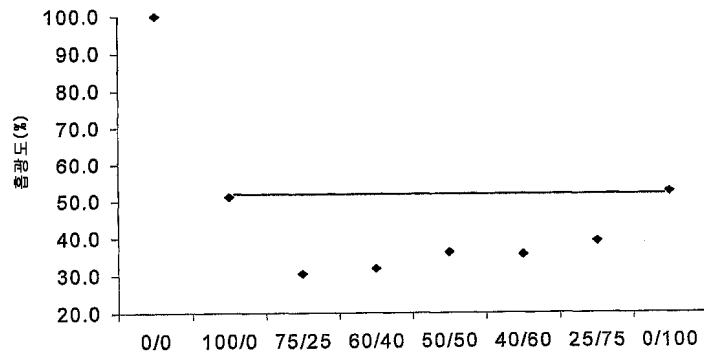
도면5

β-라파콘/탁솔 비, %IC50	OVCAR-3 세포주		MDAH 2774 세포주	
	% 흡광도	유의성*	% 흡광도	유의성*
0/0	100		100	
100/0	61.2		51.2	
75/25	57.6	p < 0.05	30.5	p < 0.05
60/40	59.2		32.0	p < 0.05
50/50	54.9	p < 0.05	36.2	p < 0.05
40/60	54.3	p < 0.05	35.6	p < 0.05
25/75	55.8		39.2	p < 0.05
0/100	71.0		52.6	

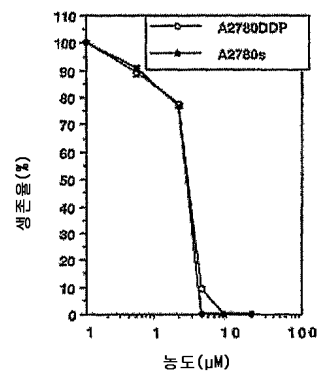
도면6



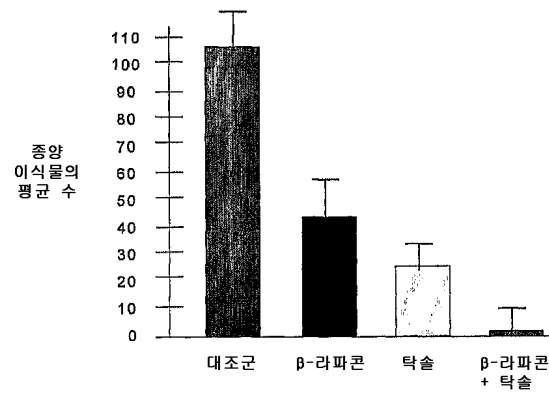
도면7



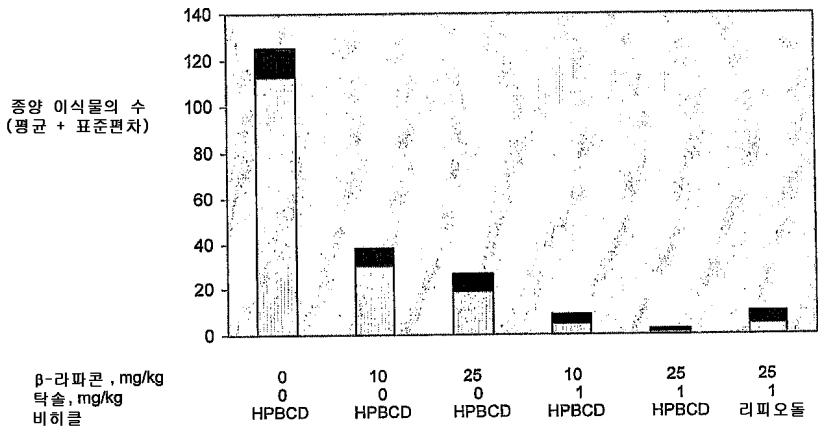
도면8



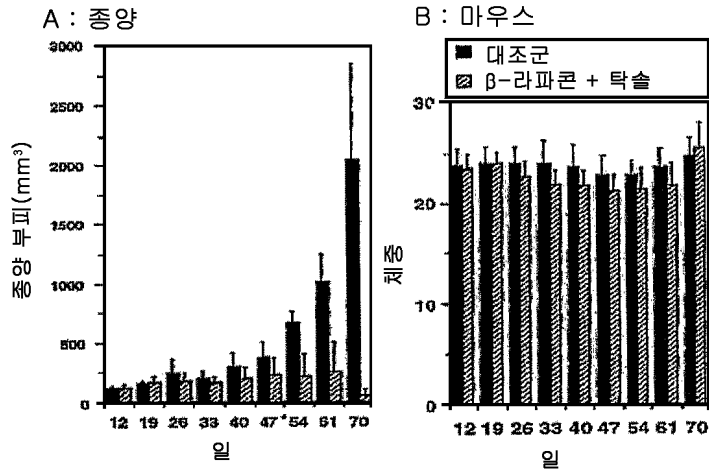
도면9



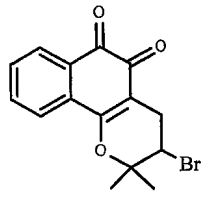
도면10



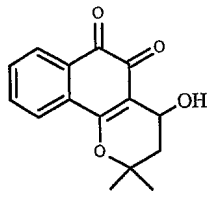
도면11



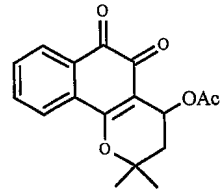
도면12



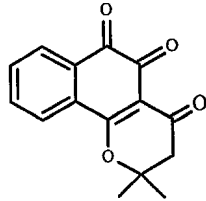
3-브로모-β-라파콘
(MW 321)
(CO-502)



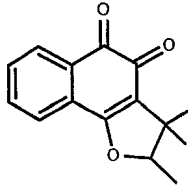
4-히드록시-β-라파콘
(MW 258)
(CO-503)



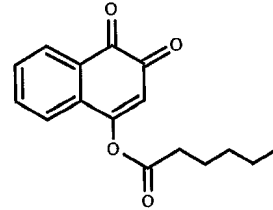
4-아세톡시-β-라파콘
(MW 300)
(CO-504)



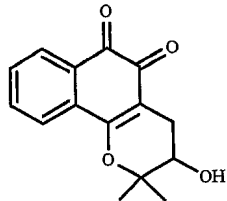
4-케토-β-라파콘
(MW 256)
(CO-505)



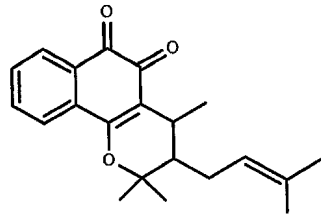
두니온 유사체
(MW 242)
(CO-506)



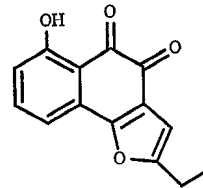
4-헥사노일-1,2-
-나프토크논
(MW 272)
(CO-507)



3-히드록시-β-라파콘
(MW 258)

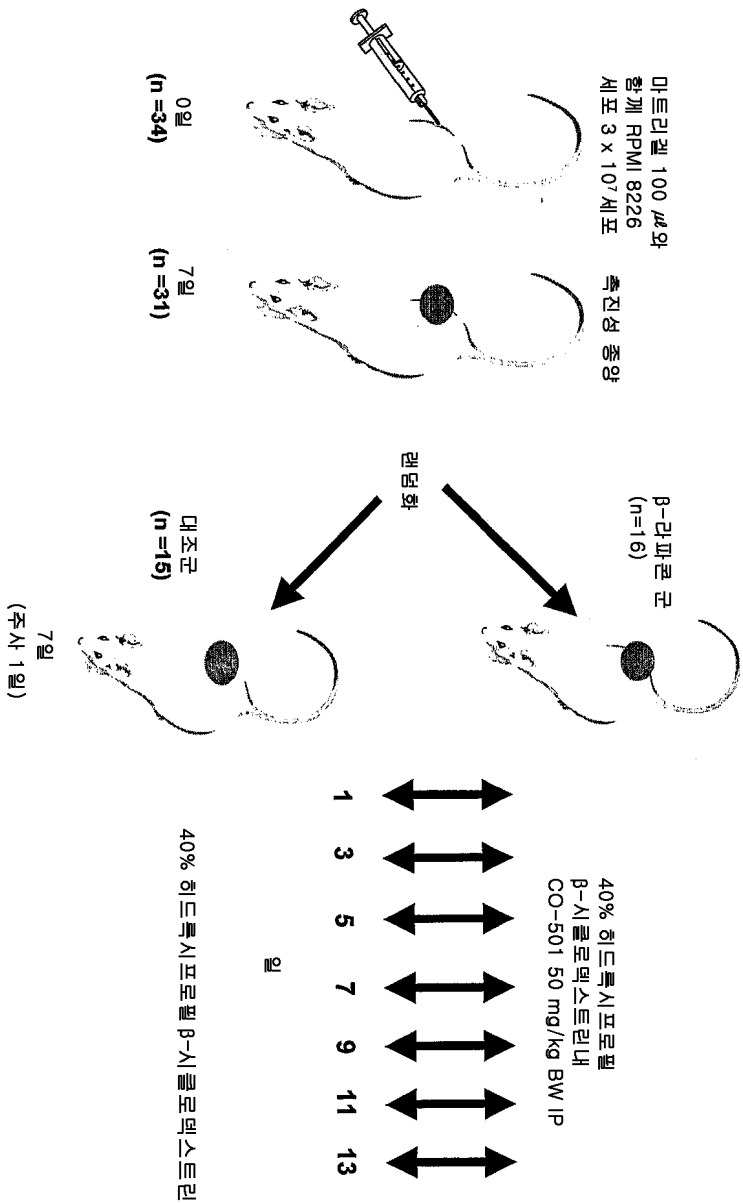


3-(3-메틸-2-부테닐)-
4-메틸-β-라파콘

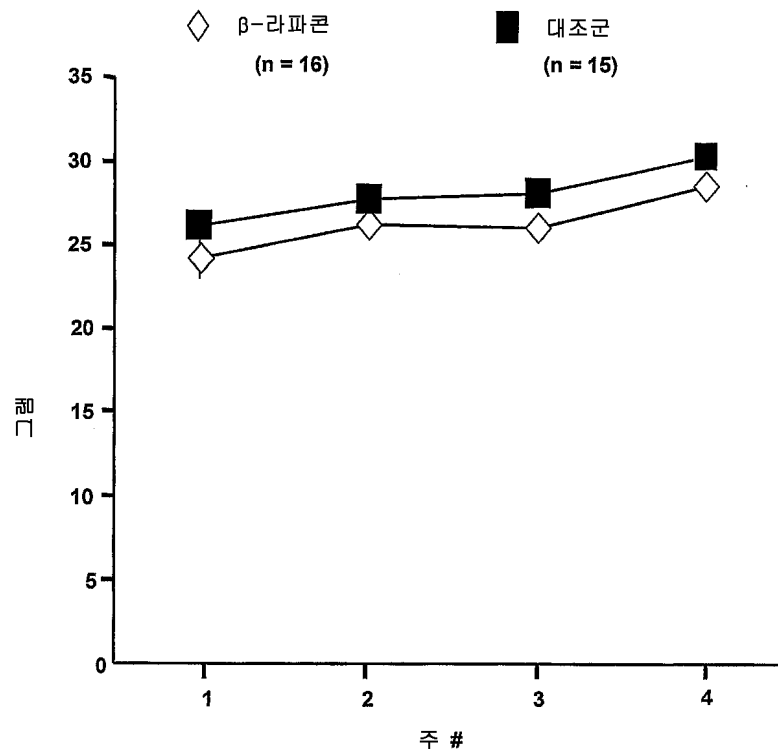


2-에틸-6-히드록시
나프토[2,3-b]-푸란-4,5-디온

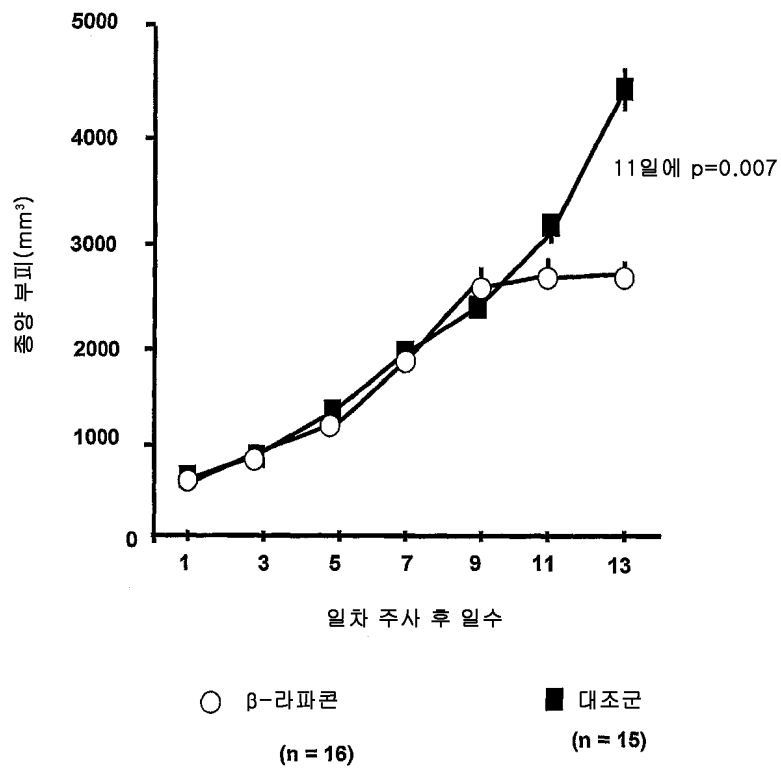
도면13



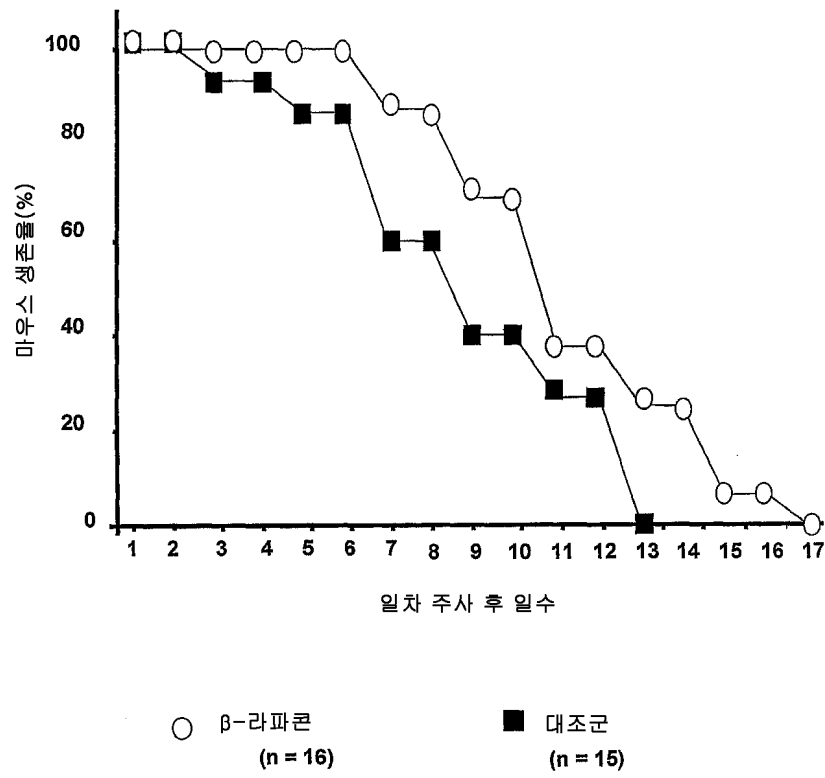
도면14



도면15



도면16



도면17

