



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월18일

(11) 등록번호 10-2056586

(24) 등록일자 2019년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/497 (2006.01) A61K 31/495 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7011670

(22) 출원일자(국제) 2012년10월01일

심사청구일자 2017년09월29일

(85) 번역문제출일자 2014년04월29일

(65) 공개번호 10-2014-0068254

(43) 공개일자 2014년06월05일

(86) 국제출원번호 PCT/US2012/058374

(87) 국제공개번호 WO 2013/049859

국제공개일자 2013년04월04일

(30) 우선권주장

61/542,084 2011년09월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020110096158A\*

논문1\*

KR1020110096158 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

버텍스 파마슈티칼스 인코포레이티드

미국 매사추세츠주 02210 보스턴 15쓰 플로어 노던 애비뉴 50

(72) 발명자

플라드 존 로버트

영국 옥스퍼드셔 오엑스14 4알와이 어빙턴 밀턴파크 유닛 88

리퍼 필립 마이클

영국 옥스퍼드셔 오엑스14 4알와이 어빙턴 밀턴파크 유닛 88

(74) 대리인

장훈

전체 청구항 수 : 총 21 항

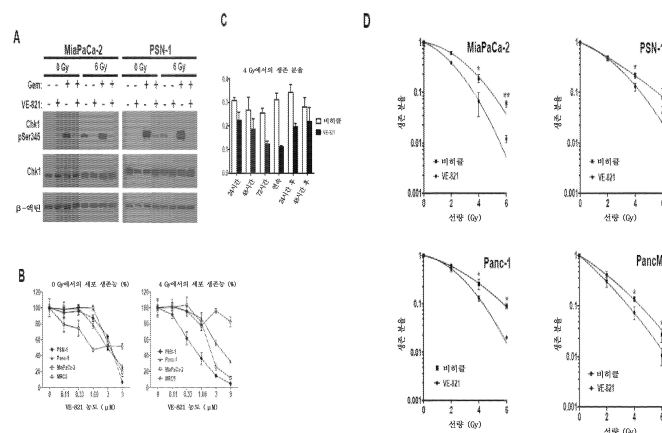
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 ATR 억제제를 이용한 췌장암 및 비소세포 폐암의 치료

## (57) 요약

본 발명은 췌장암 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 소정의 ATR 억제제를 젬시타빈 및/또는 방사선 요법과 병용하여 췌장암을 치료하는 것에 관한 것이다. 또한 본 발명은 비-소세포 폐암의 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 ATR 억제제를 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및 이온화 방사선과 병용하여 비-소세포 폐암을 치료하는 것에 관한 것이다.

## 대표도 - 도1

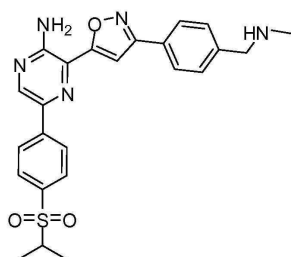


## 명세서

## 청구범위

### 청구항 1

하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 췌장암을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 켄시타빈, 방사선 요법, 또는 켄시타빈과 방사선 요법 둘 모두로부터 선택되는 또다른 암 요법(cancer therapy)과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암 요법이 켄시타빈인, 약제학적 조성물.

### 청구항 3

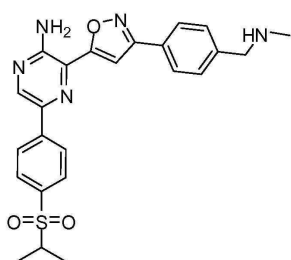
제1항에 있어서, 상기 암 요법이 방사선 요법인, 약제학적 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 암 요법이 켄시타빈과 방사선 요법 둘 모두인, 약제학적 조성물.

### 청구항 5

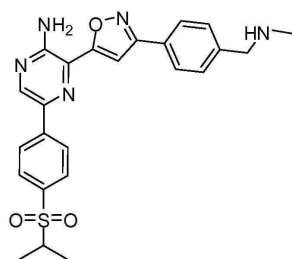
화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 환자에 있어서 켄시타빈 또는 방사선 요법으로부터 선택되는 암 요법에 대한 췌장암 세포의 감수성을 증가시키기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 켄시타빈 또는 방사선 요법으로부터 선택되는 상기 암 요법과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 6

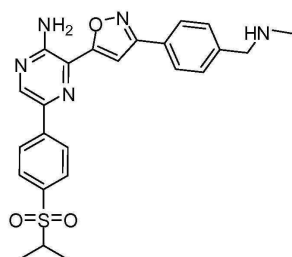
하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 켄시타빈 및 방사선 요법으로부터 선택되는 암 요법에 대한 저산소성 췌장암 세포를 감작(sensitizing)시키기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 켄시타빈 및 방사선 요법으로부터 선택되는 상기 암 요법과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 7

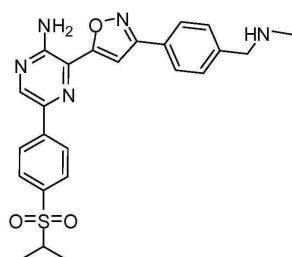
하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 저산소성 췌장암 세포를 방사선 감작시키기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 방사선 요법과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 8

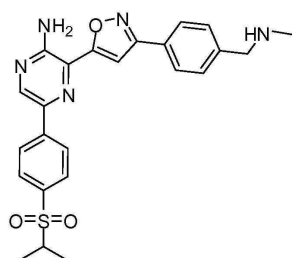
하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 저산소성 췌장암 세포를 감작시키기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 젬시타빈과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 9

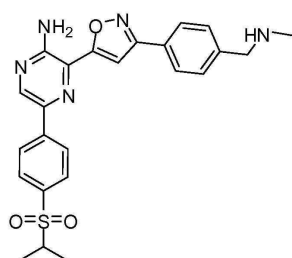
하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 화학방사선(chemoradiation)에 대해 췌장암 세포를 감작시키기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 화학방사선과 병용되며, 상기 화학방사선이 젬시타빈을 포함하는, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 10

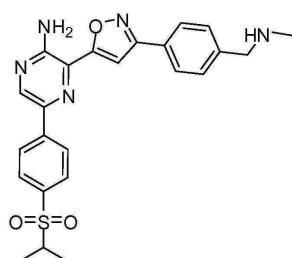
하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 환자에서 손상-유도된 세포 주기 체크포인트(cell cycle checkpoint)를 파괴하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 방사선 요법과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 11

하기 화학식 822의 ATR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 췌장암 세포에 있어서 상동 재조합에 의한 DNA 손상의 복구를 저해하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 방사선 치료와 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



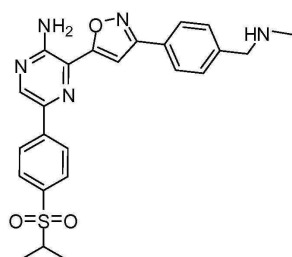
822.

### 청구항 12

제6항 내지 제9항 및 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 췌장암 세포가 암 환자에게 있는 것인, 약제학적 조성물.

### 청구항 13

하기 화학식 822의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 환자에서 비-소세포 폐암을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물이 하기 암 요법: 시스플라틴(Cisplatin) 또는 카르보플라틴(Carboplatin), 에토포시드(Etoposide), 잼시타빈 및 이온화 방사선 중 하나 이상과 병용되는 것인, 약제학적 조성물:



822.

### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 및 에토포시드, 및 이온화 방사선인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 15

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 시스플라틴 또는 카르보플라틴 및 에토포시드인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 시스플라틴 또는 카르보플라틴 및 이온화 방사선인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 17

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 에토포시드 및 이온화 방사선인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 18

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 에토포시드인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 19

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 이온화 방사선인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 20

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 시스플라틴 또는 카르보플라틴인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 21

제13항에 있어서, 상기 암 요법이 젬시타빈인, 약제학적 조성물.

#### 청구항 22

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

### 배경 기술

- [0001] 췌장암은 새로운 암종 열 번째로 가장 흔한 부위이며, 모든 암 관련 사망 중 6%의 원인이 된다. 5년 생존율은 5% 미만이다.
- [0002] 현재의 요법제는 화학요법제 (예를 들어, 젬시타빈을 이용) 및/또는 방사선 요법에 의한 신보조(neoadjuvant) 치료 또는 외과적 제거에 이은 보조 화학요법제 (예를 들어, 젬시타빈을 이용) 또는 방사선 요법 중 어느 하나를 포함한다. 젬시타빈의 치료에 의한 생존율이 5년 생존율을 10%로부터 20%까지 증가시키지만, 췌장암 치료를 위한 더욱 우수한 요법제에 대한 강한 필요성이 여전히 있다.
- [0003] 몇몇 치료제가 제II기 및 제III기 시험에서 시험되었지만, 결과는 그다지 전도 유망하지 않았다. 경구용 파르네실트랜스퍼라아제 억제제인 티피파르닙(Tipifarnib)은 젬시타빈과 병용될 때 전체 생존성의 유의한 개선을 나타내지 않았다. 이와 유사하게, 상피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor; EGFR), 세록시맙도 젬시타빈과 병용될 때 어떠한 임상 효과도 나타내지 않았다. 전체 생존성의 단지 적은 증가 (6.24개월 대 5.91개월)가 관찰되었다.
- [0004] 폐암은 두 번째로 가장 흔한 형태의 암이며, 암-관련 사망의 주요한 원인이다. 비-소세포 폐암 (NSCLC)은 가장 일반적인 형태의 폐암이며, 이는 모든 폐암 사례의 약 85%를 차지한다. 대부분의 환자는 진행성 제III기 또는 제IV기 NSCLC을 나타내며, 이때 5년 생존율은 각각 24% 및 4%이다. 표현(presentation)시에 질환의 진행된 성질 때문에, 외과적 절제는 흔히 옵션(option)이 아니다. 대다수의 환자에 있어서 요법제는 화학요법제 및/또는 방

사선 치료를 포함한다. 화학요법제의 선택은 병기, 환자 수행 기준 및 지리적인 지역적 선호도를 기초로 하면 매우 가변적이다. 대부분의 경우에, 화학요법제는 백금화합물화 제제(platinating agent), 예를 들어 시스플라틴(Cisplatin) 또는 카르보플라틴(carboplatin) 및 제2 세포독성 약물, 예를 들어 젬시타빈, 에토포시드(etoposide) 또는 탁소테레를 포함하는 이중체(doublet)를 기반으로 한다. 소수의 환자에 있어서, 요법제는 ALK 및 EGFR과 같이 돌연변이되거나 또는 이상조절되는 특정 단백질을 표적화하는 제제 (예를 들어, 크리조티닙, 제피티닙 및 에를로티닙)를 이용한 치료를 포함할 수 있다. 환자는 유전자 마커 또는 프로테오마 마커(proteomic marker)를 기반으로 한 이들 표적 치료를 위하여 선택된다. 매우 많은 수의 제제들이 후기 NSCLC 임상 연구에서 평가되었지만, 대부분은 화학요법제를 기반으로 한 치료에 비하여 매우 적은 효과를 나타냈으며, 이때 총 생존 기간 중앙값은 전형적으로 11개월 미만이다.

[0005] 따라서, 개선된 췌장암 및 비-소세포 폐암 치료에 대한 새로운 계획이 굉장히 필요하다.

[0006] ATR ("ATM 및 Rad3 관련") 키나아제는 소정의 형태의 DNA 손상 (예를 들어, 이중 가닥 파괴 및 복제 스트레스)에 대한 세포 응답에 연루된 단백질 키나아제이다. ATR 키나아제는 ATM ("운동실조 모세관 확장증 돌연변이(ataxia telangiectasia mutated)") 키나아제, 및 일반적으로 DNA 손상 응답(DNA Damage Response; "DDR")으로 칭해지는, 이중 가닥 DNA 파괴 및 복제 스트레스에 대한 세포 응답을 조절하는 많은 다른 단백질과 함께 작용한다. DDR은 세포 주기 체크포인트(checkpoint)을 활성화시켜 DNA 복구를 촉진하고, 생존을 촉진시키며, 세포 주기 진행을 지연시키는데, 상기 체크포인트는 복구를 위한 시간을 제공한다. DDR 없이도, 세포는 DNA 손상에 대하여 훨씬 더 민감하며, DNA 복제와 같은 내인성 세포 과정에 의해 유발되는 DNA 손상 또는 암 요법에 통상 사용되는 외인성 DNA 손상제로 쉽게 사멸된다.

[0007] 건강한 세포는 DDR 키나아제 ATR 및 ATM을 비롯하여 DNA 복구를 위한 다수의 상이한 단백질을 필요로 할 수 있다. 경우에 따라서는, 이들 단백질은 기능적으로 잉여적인 DNA 복구 과정을 활성화하여 서로 보상할 수 있다. 이와는 대조적으로, 많은 암세포는 몇몇 이들 DNA 복구 과정, 예컨대 ATM 시그널링에서의 결함을 안고 있으므로, ATR을 포함하는 이들의 남아 있는 온전한 DNA 복구 단백질에 대하여 높은 의존도를 나타낸다.

[0008] 게다가, 많은 암세포는 활성화 암 유전자를 발현하거나 주요 종양 억제자가 결여되어 있으며, 이는 상기 암세포가 DNA 복제의 이상 조절 단계로 쉽게 이르게 할 수 있으며, 이는 다시 DNA 손상을 야기한다. ATR은 파괴된 DNA의 복제에 대한 응답에 있어서 DDR의 중요한 성분으로서 연루되었다. 그 결과, 이들 암세포는 생존을 위하여 건강한 세포보다도 ATR 활성화에 더욱 의존한다. 따라서, ATR 억제제는 건강한 정상 세포에서보다 많은 암세포에서 세포 생존을 위해 더욱 중요한 DNA 복구 메커니즘(mechanism)을 섀다운(shut down)하기 때문에, 단독으로 사용하거나 또는 DNA 손상제와 병용하여 암 치료에 유용할 수 있다.

[0009] 사실상, ATR 기능의 파괴 (예를 들어, 유전자 결실에 의한)는 DNA 손상제의 부재 및 존재 하에 암세포사를 촉진시키는 것으로 나타났다. 이는 ATR 억제제가 방사선 요법 또는 유전 독성 화학 요법에 대한 강력한 감작제(sensitizer) 또는 단일 제제로서 효과적일 수 있음을 시사한다.

[0010] 더욱이, 고형 종양은 흔히 저산소 (낮은 산소 수준) 영역인 영역을 포함한다. 이것은 현저하며, 그 이유는 저산소 암세포가 치료, 가장 특히 IR 치료에 대하여 내성을 갖는 것으로 공지되어 있고 매우 공격적이기 때문이다. 이 관찰에 대한 하나의 이유는, DDR의 성분들이 저산소 조건 하에서 활성화될 수 있기 때문이며, 또한 저산소 세포는 생존을 위하여 DDR의 성분들에 더욱 의지하는 것으로 밝혀졌다.

[0011] 모든 이러한 이유로, 췌장암 치료, 폐암 치료를 위한 강력한 그리고 선택적인 ATR 억제제의 개발, 및 저산소 및 정상산소 암세포 둘 모두에 대하여 효과적인 제제의 개발에 대한 필요성이 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

(특허문헌 0001) 국제공개공보 제W02010/071837호 (2010년 6월 24일 공개)

### 비특허문헌

(비특허문헌 0001) 문헌 [Yokoi et al., 2004, "Hypoxia Increases Resistance of Human Pancreatic Cancer Cells to Apoptosis Induced by Gemcitabine," Clinical Cancer Res. 10:2299-2306].

(비특허문헌 0002) 문헌 [Van Cutsem et al., 2004, "Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer," J Clin Oncol. 22(8):1430-8].

(비특허문헌 0003) 문헌 [Burris et al., 2008, "New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: targeting the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor pathways," Oncologist 13(3):289-98].

(비특허문헌 0004) 문헌 [Yang et al., 2004, "ATR and ATR: sensing DNA damage," World J Gastroenterol. 10(2):155-60].

## 발명의 내용

[0012]

본 발명은 췌장암 및 비-소세포 폐암 치료에 있어서의 ATR 억제제의 용도에 관한 것이다. 췌장암과 관련하여, 본 발명은 환자 (예를 들어, 인간)에 있어서 췌장암을 켄시타빈 및/또는 방사선 요법과 병용하여 ATR 억제제로 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 출원인은 클론 형성 및 생존능 분석법에 있어서 일차 종양주 (예를 들어, Panc-M) 뿐만 아니라 췌장암 세포주 (예를 들어, PSN-1, MiaPaCa-2 및 Panc-1)에 대해서도 켄시타빈 및/또는 방사선 요법과 병용된 ATR 억제제의 상승 작용적 효능을 입증하였다. ATR 활성의 파괴는 DNA 손상 유도된 Chk1 (Ser 345)의 인산화의 평가 및 DNA 손상 초점들(damage foci) 및 RAD51 초점의 평가 (조사 후)에 의해 측정되었다.

[0013]

비-소세포 폐암과 관련하여, 본 발명은 ATR 억제제를 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및 이온화 방사선과 병용하여 비-소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 출원인은 생존능 분석에 있어서 35가지의 인간 폐암 세포주의 패널에 대하여 ATR 억제제를 시스플라틴, 에토포시드, 켄시타빈, 옥사플라틴 및 이리노테칸과 병용한 것의 상승 작용을 입증하였으며, 이외에도, 폐암 생쥐 모델에서 시스플라틴과 병용된 것의 생체 내 효능을 입증하였다.

## 도면의 간단한 설명

[0014]

<도 1>

VE-821에 의해 췌장 종양 세포가 방사선 감작된다.

A) Chk1 억제제의 웨스턴(Western) 블롯 분석. 세포를 100 nM의 켄시타빈으로 1시간 동안 처리하고, 1시간 후에 1  $\mu$ M의 VE-821을 첨가하고, 그 1시간 후 세포를 조사하였다 (6 Gy). 약물들을 실험 지속 기간 동안 방치하고, 세포를 조사 후 2시간에 용해시키고(lysed), 웨스턴 블롯 분석을 하였다.

B) VE-821에 의해 췌장 종양 세포가 방사선 감작되지만 정상 섬유아세포는 방사선 감작되지 않는다. PSN-1, Panc-1, MiaPaCa-2 췌장암 세포주 및 MRC5 섬유아세포를 VE-821 첨가 후 1시간에 4 Gy 방사선과 병용하여 또는 상기 방사선과 병용하지 않고서 증가하는 농도의 VE-821로 96시간 동안 처리하였다. 세포 생존능은 8일 후 측정되었으며, DMSO-처리된 세포에 대하여 정규화된 것으로 나타났다.

C) VE-821의 일정 계획은 방사선 감작성에 영향을 준다. PSN-1 세포를 단일 세포로서 도말하고, 4 Gy 조사와 관련하여 상이한 시점들에 1  $\mu$ M의 VE-821로 처리하고, 10일 후 콜로니 형성에 대하여 평가하였다. 처리 일정들 각각에 있어서 4 Gy에서의 생존 분율은 비조사된 세포의 관련 도말 효율을 고려하여 결정하였다.

D) ATR 억제에 대한 응답에 있어서의 췌장암 세포의 클론 형성성 세포 생존. 세포를 도말한지 4시간 후 및 조사하기 1시간 전에 1  $\mu$ M의 VE-821로 처리하였다. 약물을 72시간 후에 제거하고, 콜로니-형성 능력을 10 내지 21일 후에 평가하였다. (n=3). \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01 (DMSO-처리된 대조군에 비하여).

<도 2>

VE-821에 의해 저산소 조건 하에서 췌장 종양 세포가 방사선 감작된다.

A) 저산소 조건 하에서 1  $\mu$ M의 VE-821 및 조사에 의해 처리된 세포의 클론 형성성 생존 곡선. 도말된 세포를 저산소 조건 (0.5%의 O<sub>2</sub>)으로 옮기고, 6시간 동안 적응시켰다. 그 후, VE-821 (1  $\mu$ M)을 조사 전 1시간에 첨가하고, 72시간 동안 방치하고, 그때 배지를 교환하였다. 세포를 조사 후 1시간에 정상산소 조건으로 옮겼다.

B) 상기에 그리고 도 1에 설명된 바와 같이, 6 Gy로 조사하고 산소 및 저산소 (0.5% O<sub>2</sub>) 조건에서 1  $\mu$ M의 VE-821로 처리한 후 세포의 클론 형성성 생존성 ( $n=3$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (DMSO-처리된 대조군에 비하여).

<도 3>

VE-821은 췌장암 세포를 켄시타빈 처리에 대하여 감작시킨다.

A) 켄시타빈 및 1  $\mu$ M의 VE-821로 처리된 세포의 클론 형성성 생존성. 세포를 증가하는 농도의 켄시타빈으로 24시간 동안 처리하고, 이어서 1  $\mu$ M의 VE-821로 72시간 동안 처리하였다. 콜로니 형성 능력을 10 내지 21일 후에 평가하였다.

B) 저산소에서 켄시타빈으로 처리된 세포의 클론 형성성 생존성. 도말된 세포를 저산소 조건 (0.5%의 O<sub>2</sub>)으로 옮기고, 6시간 동안 적응시켰다. 그 후, 세포를 증가하는 농도의 켄시타빈으로 24시간 동안 처리하고, 이어서 1  $\mu$ M의 VE-821로 72시간 동안 처리하였다. 저산소 세포를 VE-821을 첨가한지 1시간 후에 정상산소 조건으로 옮겼다.

C) 상기에 기재된 바와 같이, 산소 및 저산소 (0.5% O<sub>2</sub>) 조건에서 20 nM의 켄시타빈 및 VE-821로 처리 후 클론 형성성 생존성.

D) 켄시타빈 및 조사로 처리된 세포의 클론 형성성 생존성. PSN-1 및 MiaPaCa-2 세포를 각각 5 nM 또는 10 nM의 켄시타빈으로 24시간 동안 처리하고, 그 후 배지를 교환하고, 4 Gy의 조사 후 72시간 이전에 1시간으로부터 1  $\mu$ M의 VE-821을 첨가하였다. 콜로니 형성 능력을 10 내지 21일 후에 평가하였다

( $n=3$ ). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  (DMSO-처리된 대조군에 비하여).

<도 4>

VE-821은 췌장암 세포에서 조사-유도된 세포 주기 체크포인트를 동요시킨다.

VE-821 (1  $\mu$ M)을 6 Gy의 조사 1시간 전에 첨가하고, 실험 지속 시간 동안 방치하였다. 조사 후 12시간 또는 24시간에 세포를 리프팅(lift)하여 고정시키고, 프로피듐 요오다이드로 염색하고, 유세포 분석법에 의해 세포 주기 분포에 대하여 분석하였다 ( $n=3$ ).

<도 5>

VE-821은 53BP1 및  $\gamma$  H2AX 초점의 수를 증가시키며 RAD51 초점의 형성을 감소시킨다.

나타낸 바와 같이, 세포를 6 Gy의 조사와 관련하여 다양한 시점에서 1  $\mu$ M의 VE-821로 처리하고, 조사 후 24시간에 고정시켰다. 후속적으로, 세포를 (A)  $\gamma$  H2AX 및 (B) 53BP1 초점에 대하여 염색시키고, 각각 세포당 7개 초과 및 5개 초과 초점을 갖는 세포의 백분율을 정량화하였다. C, Rad51 초점의 형성을 분석하기 위하여, 세포를 조사 후 6시간에 고정시키고, 세포당 9개 초과 초점을 갖는 세포의 백분율을 정량화하였다. 대표적인 이미지를 우측에 나타낸다 ( $n=3$ ). \*,  $P < 0.05$

보충 도면.

<보충용 도 1>

도말 효율에 대한 VE-821 인큐베이션 시간의 영향.

PSN-1 세포를 단일 세포로서 도말하고, 1  $\mu$ M의 VE-821로 다양한 기간 동안 처리하고, 10일 후 콜로니 형성에 대하여 평가하였다.

<보충용 도 2>

VE-821은 저산소 조건에서 췌장암 세포에서 조사-유도된 G2/M 체크포인트를 동요시킨다.

세포를 저산소 (0.5% O<sub>2</sub>) 조건에서 6시간 동안 예비인큐베이션하고, 1  $\mu$ M의 VE-821을 조사 (6 Gy) 1시간 전에 첨가하였다. 세포를 조사한지 1시간 후에 정상산소 조건으로 옮기고, 조사 후 12시간 또는 24시간에 세포를 리프팅하여 고정시키고, 프로피듐 요오다이드로 염색하고, 유세포 분석법에 의해 세포 주기 분포에 대하여 분석하였다 ( $n=3$ ).



<도 1X>

화합물들 821, 822, 823, 및 824에 의해 유도되는 방사선 감작성에 있어서의 용량 응답 관계.

소규모 클론 형성성 생존성 분석들을 증가하는 농도의 상이한 ATR 억제제들로 처리하고 이어서 6 Gy로 조사한 HeLa 세포에서 수행하였다. 조사된 (SF 6Gy, 분홍색 선) 그리고 비조사된 세포 (도말 효율, PE; 청색 선) 둘 모두에 있어서 DMSO-처리된 세포와 관련하여 클론 형성성 생존성의 감소로서 데이터를 도시한다. 고도의 증가된 방사선 감작성은, 특정 약물 농도에서 비조사된 경우의 생존성의 적은 감소가 수반되는, 조사 후 생존성의 큰 감소로서 관찰될 수 있다.

<도 2X>

종양 세포 및 정상 세포에서의 방사선 감작성의 평가.

A) 조사의 부재 하에서의 약물 처리 후의 클론 형성성 생존성. PSN1 및 MiaPaca 세포를 낮은 밀도로 도말하고, 나타낸 약물로 처리하고, 클론 형성성 생존성에 대하여 평가하였다.

B) 화합물들 821, 822, 823 및 824 약물로 전처리되고 이어서 조사된 PSN1, MiaPaca, 및 MRC5 세포의 클론 형성성 생존성. 세포를 낮은 밀도로 도말하고, 조사하기 1시간 전에 나타낸 약물로 처리하고, 클론 형성성 생존성에 대하여 평가하였다.

<도 3X>

방사선 감작성에 대한 약물 첨가 및 제거 타이밍(timing)의 의존성의 평가.

MiaPaca 세포를 낮은 밀도로 도말하고, 약물을 4 Gy의 조사 처리와 관련하여 하기의 다양한 시점들, 즉 IR 1시간 전, IR 5분 후, IR 2시간 또는 4시간 후에 첨가하고; 하기의 다양한 시점들, 즉 IR 5분 후, 1시간 후 또는 19시간 후에 제거하였다. 클론 형성성 생존성을 14일 후에 평가하였다. DMSO-처리된 세포와 비교하여 4 Gy에서의 생존 분율 (상부 패널) 또는 방사선 감작 백분율 (중간 패널)로서 결과를 나타낸다. 상이한 처리 일정들은 도말 효율의 차이들을 야기하지 않았다 (하부 패널).

<도 4X>

화합물 822의 처리 및 조사 후 DNA 손상 초점의 분석.

A) 6 Gy에서의 IR 후 24시간에서의 gH2AX, 53BP1 초점의 평가 및 IR 후 6시간에서의 RAD51 초점의 평가. MiaPaca 세포를 조사 1시간 전 또는 조사 1시간 후에 80 nM의 화합물 822로 처리하고, IR 후 5분에 또는 IR 후 1시간에 약물을 세척 제거하였다. 세포를 6시간 후에 (RAD51 초점의 경우) 또는 24시간 후에 (gH2AX 및 53BP1 초점의 경우) 고정하였다. 특정한 수 초과 수의 초점을 포함하는 세포의 백분율을 정량화하였다.

B) DNA 손상 초점의 시간 경로. 세포를 A에서와 같이 처리하고, 나타낸 시점들에서 고정하고, 이어서 gH2AX, 53BP1 및 RAD51 초점에 대하여 염색하였다. 데이터는 특정한 시점에서의 초점의 평균 수 (상부 패널) 또는 특정한 수 초과 수의 초점을 포함하는 세포의 백분율 (하부 패널)로서 나타낸다.

<도 5X>

6 Gy의 조사 후 화합물 822-처리된 세포의 세포 주기 분석.

PSN1 세포를 삼중 웰에서 6 Gy 조사 1시간 전에 40 nM의 화합물 822로 처리하였다. 세포를 IR 후 몇몇 시점들에서 리프팅하여 고정시키고, 프로피듐 요오다이드로 염색하고, 유세포 분석법에 의해 분석하였다.

A) 세포 주기 히스토그램 그래프. 피팅된(fitted) 피크들은 G1기의 경우 적색이고, S기의 경우 음영 처리되고, G2/M기의 경우 녹색이다. 3개의 웰 중 하나를 각각의 시점 및 처리에 대하여 예시한다.

B) 시간이 지남에 따른 평균 세포 주기 백분율. 세포 주기 백분율 값들을 피팅된 히스토그램 그래프 (n=3)로부터 얻고, 대조군 처리된 그리고 화합물 822-처리된 세포에 대하여 도시하였다.

<도 6X>

화합물 822에 있어서 시간이 지남에 따른 MiaPaCa 종양의 부피.

<도 7X 및 도 8X>

화합물 822에 있어서 시간이 지남에 따른 PSN-1 종양의 부피.

<도 1Y>

폐암 세포 스크린: VE-822는 폐세포 생존능 분석에서 폐암 세포주들의 폐닐에 걸쳐 화학독성물질과 상승 작용을 한다.

<도 2Y>

폐암 세포 스크린: VE-822는 세포 생존능 분석에서 폐암 세포주들에서 화학독성물질과 3배 초과와 상승 작용을 나타낸다.

<도 3Y>

췌장암 세포 스크린: VE-822는 세포 생존능 분석에서 췌장암 세포주들에서 시스플라틴 및 켄시타빈과 상승 작용을 한다.

<도 4Y>

췌장암 세포 스크린: VE-822는 세포 생존능 분석에서 췌장암 세포주들에서 화학독성물질과 3배 초과와 상승 작용을 나타낸다.

<도 5Y>

SCID 생쥐에서 원발성 선암종 NSCLC 이종이식편에서 종양 부피 및 체중에 대한 VE-822 및 시스플라틴의 영향.

<도 6Y>

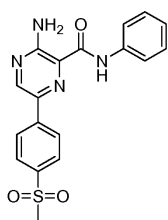
PSN1 췌장암 이종이식편을 지닌 생쥐의 종양 부피에 대한, 켄시타빈 (15 mg/kg, 복강내, 매 3일마다)과 병용하여 10, 30 또는 60 mg/kg으로 매 2일마다 경구 투여된 VE-822의 영향.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

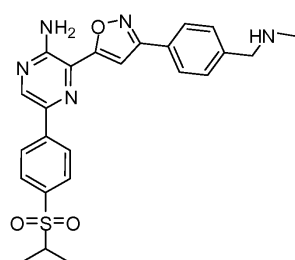
- [0015] 본 발명의 일 태양은 환자에게 ATR 억제제를 다른 공지된 췌장암 치료제와 병용하여 투여함으로써 환자에 있어서 췌장암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 태양은 ATR 억제제를 켄시타빈과 병용하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 췌장암은 하기 세포주 중 하나를 포함한다: PSN-1, MiaPaCa-2 또는 Panc-1. 다른 태양에 따르면, 암은 원발성 종양주 Panc-M을 포함한다.
- [0016] 본 발명의 다른 태양은 환자에게 ATR 억제제를 방사선 요법과 병용하여 투여함으로써 환자에 있어서 암 (예를 들어, 췌장암 또는 비-소세포 폐암)을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 태양은 환자에게 ATR 억제제를 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및/또는 이온화 방사선과 병용하여 투여함으로써 환자에 있어서 비-소세포 폐암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 출원인은 생존능 분석에 있어서 35가지의 인간 폐암 세포주의 폐닐에 대하여 ATR 억제제를 시스플라틴, 에토포시드, 켄시타빈, 옥살리플라틴 및 이리노테칸과 병용한 것의 상승 작용을 입증하였으며, 이외에도, 폐암 생쥐 모델에서 시스플라틴과 병용된 것의 생체 내 효능을 입증하였다. 또한 본 발명은 비-소세포 폐암의 치료에 있어서 ATR 억제제를 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및/또는 이온화 방사선과 병용하는 것에 관한 것이다.

[0018] ATR 억제제의 예를 하기 표 1에 나타낸다:

[0019] [표 1]



821



822

[0020]

- [0021] 화합물들 821 및 822를 칭하는 용어는 각각 VE-821 및 VE-822와 호환가능하다.
- [0022] 다른 태양은 표 1의 화합물로부터 선택된 ATR 억제제를 하나 이상의 암 요법제와 병용하여 췌장암 세포에 투여함으로써 췌장암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, ATR 억제제는 화학방사선, 화학요법제 및/또는 방사선 요법과 병용된다. 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 화학방사선이란 화학요법제 (예를 들어, 젬시타빈) 및 방사선을 포함하는 치료 레지멘(regimen)을 말한다. 일부 실시 양태에서, 화학요법제는 젬시타빈이다.
- [0023] 또 다른 태양은 암 요법제와 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택된 ATR 억제제를 투여하여, 젬시타빈 또는 방사선 요법으로부터 선택되는 암 요법제에 대한 췌장암 세포의 감수성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0024] 일부 실시 양태에서, 암 요법제는 젬시타빈이다. 다른 실시 양태에서, 암 요법제는 방사선 요법이다. 또 다른 실시 양태에서, 암 요법제는 화학방사선이다.
- [0025] 다른 태양은 젬시타빈 (예를 들어, 100 nM) 및/또는 방사선 (예를 들어, 6 Gy)으로 처리 후 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 췌장암 세포에 투여하는 단계를 포함하는, 췌장암 세포에서 Chk1 (Ser 345)의 인산화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0026] 다른 태양은 저산소 PSN-1, MiaPaCa-2 또는 PancM 종양 세포를 방사선 감작시키는 방법으로서, 이는 방사선 요법과 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 상기 종양 세포에 투여하는 단계에 의한 상기 방법을 제공한다.
- [0027] 또 다른 태양은 저산소 PSN-1, MiaPaCa-2 또는 PancM 종양 세포를 감작시키는 방법으로서, 젬시타빈과 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 상기 종양 세포에 투여하는 단계에 의한 상기 방법을 제공한다.
- [0028] 다른 태양은 PSN-1 및 MiaPaCa-2 종양 세포를 화학방사선에 대하여 감작시키는 방법으로서, 화학방사선과 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 상기 종양 세포에 투여하는 단계에 의한 상기 방법을 제공한다.
- [0029] 다른 태양은 손상-유도된 세포 주기 체크포인트를 파괴하는 방법으로서, 방사선 요법과 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 췌장암 세포에 투여하는 단계에 의한 상기 방법을 제공한다.
- [0030] 다른 태양은 췌장암 세포에서의 상동 재조합에 의한 DNA 손상의 복구의 억제 방법으로서, 하기 치료제들 중 하나 이상과 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 투여하는 단계에 의한 상기 방법을 제공한다: 화학방사선, 화학요법제, 및 방사선 요법.
- [0031] 일부 실시 양태에서, 화학요법제는 젬시타빈이다.
- [0032] 다른 태양은 췌장암 세포에서의 상동 재조합에 의한 DNA 손상의 복구의 억제 방법으로서, 젬시타빈 및 방사선 요법과 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 투여하는 단계에 의한 상기 방법을 제공한다.
- [0033] 일부 실시 양태에서, 췌장암 세포는 PSN-1, MiaPaCa-2 또는 Panc-1로부터 선택되는 췌장 세포주로부터 유래된다.
- [0034] 다른 실시 양태에서, 췌장암 세포는 암 환자에 존재한다. 다른 실시 양태에서, 암세포는 종양의 일부이다.
- [0035] 다른 실시 양태는 ATR 억제제를 다른 공지된 비-소세포 폐암 치료제와 병용하여 환자에게 투여함으로써 환자에 있어서 비-소세포 폐암을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 일 태양은 ATR 억제제를 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및/또는 이온화 방사선과 병용하여 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0036] 다른 태양은 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 하나 이상의 암 요법제와 병용하여 환자에게 투여함으로써 비-소세포 폐암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, ATR 억제제는 화학방사선, 화학요법제 및/또는 방사선 요법과 병용된다. 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 화학방사선이란 화학요법제 (예를 들어, 시스플라틴, 카르보플라틴 또는 에토포시드) 및 방사선 둘 모두를 포함하는 치료 레지멘을 말한다. 일부 실시 양태에서, 화학요법제는 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 및 에토포시드를 포함한다.
- [0037] 또 다른 태양은 하나 이상의 암 요법제와 병용하여 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 환자에게 투여함으로써 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및 이온화 방사선으로부터 선택되는 암 요법제에 대한 비-소세포 폐암 세포의 감수성을 증가시키는 방법을 제공한다.

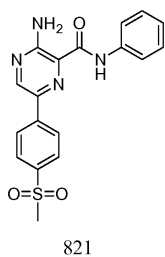
[0038] 일부 실시 양태에서, 암 요법제는 시스플라틴 또는 카르보플라틴이다. 다른 실시 양태에서, 암 요법제는 방사선 요법이다. 또 다른 실시 양태에서, 암 요법제는 에토포시드이다.

[0039] 일부 실시 양태에서, 암 요법제는 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드 및 이온화 방사선의 병용 요법제이다. 일부 실시 양태에서, 암 요법제는 시스플라틴 또는 카르보플라틴 및 에토포시드이다. 다른 실시 양태에서 암 요법제는 시스플라틴 또는 카르보플라틴 및 에토포시드 및 이온화 방사선이다. 또 다른 실시 양태에서 암 요법제는 시스플라틴 또는 카르보플라틴 및 이온화 방사선이다.

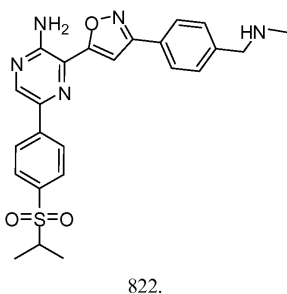
[0040] 다른 태양은 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 비-소세포 폐암에서 Chk1 (Ser 345)의 인산화를 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, ATR 억제제는 켄시타빈 (예를 들어, 100 nM), 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드, 이온화 방사선 또는 방사선 (예를 들어, 6 Gy)과 병용하여 비-소세포 폐암 세포에 투여된다.

[0041] 다른 실시 양태에서, 비-소세포 폐암 세포는 암 환자에 존재한다.

[0042] 일부 실시 양태에서, ATR 억제제는 하기 화합물 또는 이의 염이다:



[0043] 다른 실시 양태에서, ATR 억제제는 하기 화합물 또는 이의 염이다:



[0045] 용도

[0046] 다른 태양은 췌장암 치료에 있어서의, 켄시타빈 및 방사선 요법과 병용되는 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제의 용도를 제공한다.

[0047] 다른 태양은 비-소세포 폐암의 치료에 있어서의, 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드, 및 이온화 방사선과 병용되는 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제의 용도를 제공한다.

[0048] 일부 실시 양태에서, ATR 억제제는 화합물 VE-821 또는 이의 염이다. 다른 실시 양태에서, ATR 억제제는 화합물 VE-822 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다.

[0049] 의약의 제조

[0050] 다른 태양은, 췌장암 치료용 의약의 제조에 있어서의, 켄시타빈 및 방사선 요법과 병용되는 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제의 용도를 제공한다.

[0051] 다른 태양은 비-소세포 폐암 치료용 의약의 제조에 있어서의, 시스플라틴 또는 카르보플라틴, 에토포시드, 및 이온화 방사선과 병용되는 표 1의 화합물로부터 선택되는 ATR 억제제의 용도를 제공한다.

[0052] 일부 실시 양태에서, ATR 억제제는 화합물 VE-821이다. 다른 실시 양태에서, ATR 억제제는 화합물 VE-822이다.

- [0054] 실시에
- [0055] 실시예는 단지 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 어떤 식으로도 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0056] 세포 생존능 분석
- [0057] MiaPaCa-2, PSN-1, Panc1 및 MRC5 세포 ( $5 \times 104$ 개)를 96웰 플레이트에 도말하고, 4시간 후에 증가하는 농도의 VE-821로 처리하고, 1시간 후에 6 Gy의 단일 선량으로 조사하였다. 배지를 조사한지 96시간 후에 교환하고, 이 시점에서 알라마르 블루(Alamar Blue) 분석법 (레사주린(Resazurin) 기질, 시그마(SIGMA))을 사용하여 생존능을 측정하였다. 상이한 처리 조건들에 대하여, 세포를 증식시켜 세포 생존능을 8일에 다시 분석하였다. 세포 생존능 및 생존 분율을 비처리 (대조) 군에 대하여 정규화하였다.
- [0058] 클론 형성성 생존성 분석
- [0059] 대수적으로 성장 중인 세포를 인비보2(InVivo2) 300 챔버 (영국 소재의 러스킨 테크놀로지(Ruskin Technology))를 사용하여 산소 (21% O<sub>2</sub>) 또는 저산소 (0.5% O<sub>2</sub>) 조건 하에서 6웰 조직 배양 디쉬 내에 삼중으로 도말하였다. 세포를 밀폐 챔버를 사용하여 산소 또는 저산소 조건 하에서 조사 전 6시간 동안 인큐베이션하였다. 표적 O<sub>2</sub> 수준을 가스화한지 6시간 이내에 성취하고, 조사 동안 유지하였으며, 이는 옥시라이트(OxyLite) 산소 탐침자 (옥스포드 옵트로닉스(Oxford Optronix))에 의해 확인한 바와 같았다. 저산소 조건 하에서 조사한 세포를 조사 후 1시간에 정상산소 조건에 노출시켰다. 표준물로서, VE-821 (1  $\mu$ M)을 조사 (6 Gy)하기 1시간 전에 첨가하고, 조사한지 72시간 후에 세척 제거하였다. 화학요법제 실험에 있어서, 처음에 세포를 증가하는 농도의 젬시타빈 (5, 10 및 20 nM)에 24시간 동안 노출시킨 후 VE-821 (1  $\mu$ M)을 추가로 72시간 동안 부가하였다. 조사와, VE-821 및 젬시타빈의 삼중 병용의 효과를 또한 검토하였다. 콜로니가 0.5% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색될 때까지 세포를 10 내지 21일 동안 인큐베이션하고, 셀카운트(CellCount) 자동 콜로니 계수기 (옥스포드 옵트로닉스)에서 계수하였다. 콜로니 형성성 생존성을 계산하고, 데이터를 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 4.0 (미국 캘리포니아주 소재의 그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software))에서 피팅하였다.
- [0060] 웨스턴 블롯
- [0061] MiaPaCa-2 및 PSN-1 세포를 젬시타빈 및/또는 1  $\mu$ M VE-821 약물에 노출시키고, 1시간 후에 6 Gy의 단일 선량으로 조사하였다. 세포를 조사한지 2시간 후에 RIPA 완충제에서 용해시키고, SDS-PAGE 전기영동 및 면역블로팅을 하였다. 화학발광 (수퍼시그널(SuperSignal), 밀리포어(Millipore)) 및 필름 노출을 이용하여 항체 결합을 검출하였다. 노출된 필름을 디지털화하고, 도면들을 마이크로소프트 파워포인트(Microsoft PowerPoint)를 이용하여 어셈블리(assembly)하였다.
- [0062] 핵 초점 분석
- [0063] 96웰 플레이트에서 성장 중인 세포를 1  $\mu$ M VE-821 약물로 처리하고, 1시간 후에 6 Gy로 조사하고, 다수의 시점들에서 3% 포름알데히드에서 고정하였다. 후속적으로, 세포를 투과화하고, 0.1% 트리톤(Triton) 1% BSA (w/v)를 포함하는 PBS에서 차단시켰다. 세포를 4℃에서 하룻밤 일차 항체와 함께 인큐베이션하고, PBS 세척 후, 형광 표지된 이차 항체와 함께 인큐베이션하고, 이어서 PBS로 세척하고, DAPI로 핵 염색하였다. IN 셀 애널리저(Cell Analyzer) 1000 자동 낙사형광 현미경(epifluorescence microscope) 및 분석 소프트웨어 (영국 찰폰트 세인트 자일즈 소재의 지이 헬스케어(GE Healthcare))를 사용하여 이미지들을 획득하여 초점을 정량화하였다.
- [0064] 세포 주기 분석
- [0065] 6웰 디쉬에서 성장 중인 세포를 1  $\mu$ M VE-821 약물로 처리하고, 1시간 후에 6 Gy로 조사하였다. 세포를 밀폐 챔버를 사용하여 산소 (21% O<sub>2</sub>) 또는 저산소 (0.5% O<sub>2</sub>) 조건 하에서 조사 전 6시간 동안 인큐베이션하였다. 다수의 시점들에서, 세포를 트립신에서 리프팅하고, 70% 에탄올에서 고정시키고, 4℃에서 보관하였다. 세포를 실온에서 1시간 동안 프로피듐 요오다이드 (200  $\mu$ g/ml RNase를 함유하는 PBS 중 50  $\mu$ g/ml)와 함께 인큐베이션하고, 유세포 분석법 (FACSort, 벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))에 의해 분석하였다. 세포 주기를 모드핏(ModFit) 세포 주기 분석 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.
- [0066] 폐암 세포 스크린을 위한 세포 접종 및 화합물 첨가
- [0067] 모든 세포주를 384웰 불투명 바닥 분석 플레이트 내로, 10% FBS를 함유하는 조직 배양 배지 30  $\mu$ l 중에 접종하였다. 접종 밀도는 각각의 세포주의 대수기 성장 속도를 기반으로 하였다. 24시간 후에, 화합물 스톡 용액들



을 각각의 웰에 첨가하여, VE-822의 경우 5가지의 농도 및 화학독성물질의 경우 6가지의 농도로 이루어진 매트릭스를 생성하였다. 각각의 웰은 단독의 상기 제제, 또는 둘 모두의 제제들의 배합물 중 어느 하나를 포함한다. VE-822의 최종 농도 범위는 25 nM-2  $\mu$ M이었다. 화학독성물질들의 농도 범위들은 하기와 같았다: 에토포시드, 10 nM-10  $\mu$ M; 젬시타빈, 0.16 nM-160 nM; 시스플라틴, 20 nM-20  $\mu$ M; 옥살리플라틴, 40 nM-40  $\mu$ M; 이리노테칸 (SN-38), 0.12 nM-120 nM. 그 후, 세포를 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 습도의 분위기에서 37°C에서 96시간 동안 인큐베이션하였다.

[0068] 체장암 세포 스크린을 위한 세포 접종 및 화합물 첨가

[0069] 모든 세포주를 384웰 불투명 바닥 플레이트 내로, 10% FBS를 함유하는 조직 배양 배지 30  $\mu$ l 중에 접종하였다. 접종 밀도는 각각의 세포주의 대수가 성장 속도를 기반으로 하였다. 24시간 후에, 화합물 스톱 용액들을 각각의 웰에 첨가하여, VE-822의 경우 9가지의 농도 및 젬시타빈 및 시스플라틴의 경우 7가지의 농도로 이루어진 매트릭스를 생성하였다. 각각의 웰은 단독의 상기 제제, 또는 둘 모두의 제제들의 배합물 중 어느 하나를 포함한다. 최종 농도 범위들은 하기와 같았다: VE-822, 0.3 nM-2  $\mu$ M; 젬시타빈, 0.3 nM-0.22  $\mu$ M; 시스플라틴, 30 nM-20  $\mu$ M. 그 후, 세포를 5% CO<sub>2</sub> 및 95% 습도의 분위기에서 37°C에서 96시간 동안 인큐베이션하였다.

[0070] 세포 생존능 분석

[0071] 이 분석은 대사적 활성 세포에 존재하는 ATP의 정량화를 기반으로 하여 배양물 중 생존가능 세포의 수를 측정한다.

[0072] 셀타이터-글로(CellTiter-Glo) 시약 (미국 위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가(Promega))을 제조업자의 지시에 따라 준비하고, 화합물 첨가 (25  $\mu$ l/웰)를 한지 96시간 후에 첨가하여 세포 생존능을 측정하였다. 발광 신호를 PHERASStarFS (미국 노스캐롤라이나주 캐리 소재의 비엠지 랩테크(BMG Labtech)) 자동 플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다. 모든 세포주를 이중으로 스크리닝하였다.

[0073] 발광 셀타이터-글로 (CTG) 원시값(raw value)들을 각각의 분석 플레이트 상의 음성 대조 DMSO-처리 샘플들의 평균 CTG 값에 대하여 정규화하였다. 단독의 화학독성물질의 IC<sub>50</sub> 값들을 단독의 화학독성 화합물로 처리한 샘플들의 DMSO-정규화된 세포 생존율 값들을 이용하여 계산하였다. VE-822의 존재 하에서의 세포 생존 분율을 결정하기 위하여, CTG 원시값들을, 화학독성 화합물의 부재 하에서 동일 농도의 VE-822에 노출시킨 샘플들의 평균 CTG 값에 대하여 정규화하였다. VE-822-처리된 화학독성물질의 IC<sub>50</sub> 값들은 VE-822의 주어진 농도에서 그 화학독성물질로 처리한 모든 샘플들의 VE-822-정규화된 세포 생존율 값들을 이용하여 계산하였다. IC<sub>50</sub>의 3배 이상의 감소를 이용하여 VE-822와 화학독성물질 사이의 강한 상승 효과를 확인하였다.

[0074] 원발성 선암종 NSCLC 이종이식편 모델

[0075] 불량하게 분화된 선암종을 갖는 환자로부터 종양 조직을 잘라냈다. 이 종양 조직을 SCID 생쥐의 옆구리에 피하 이식하고, 2회 계대한 후 화합물을 시험하였다. 화합물 시험에 있어서, 제2 계대 종양 조직을 SCID 생쥐의 옆구리에 피하 이식하고, 종양을 약 200 mm<sup>3</sup>의 부피로 성장시켰다. 단독의 시스플라틴을 1 또는 3 mg/kg로 복강내로, 2주 동안 주당 1회 (복강내, 매 7일마다, 매주마다 2일에) 투약하였다. VE-822를 단독의 용액으로서 60 mg/kg으로, 주당 4일 연속의 사이클로 경구 투약하였다 (4일 매일, 매주마다 1일, 2일, 3일 및 4일에 투약). 2개의 병용 군들은 단일 제제 군과 동일한 일정으로 1 또는 3 mg/kg의 시스플라틴 + 60 mg/kg의 VE-822의 경구 투약을 받았다. 대조군은 단독의 비히클 (물 중 10%의 비타민 E TPGE, 경구, 4일 매일)을 받았다. 모든 약물 처리를 28일에 중단하였다. 비히클, 시스플라틴 (1 mg/kg) 및 VE-822 (60 mg/kg) 군을 희생시키고, 나머지를 추가로 40일 동안 모니터링하여 종양 재성장을 평가하였다.

[0076] PSN1 체장암 이종이식편 모델

[0077] PSN1 세포 (생쥐당  $1 \times 10^6$  개의 세포)를 매트릭젤(Matrigel) 중 혼합물 (생쥐당 100  $\mu$ l)로서 암컷 누드(nude) MF1 생쥐의 옆구리 내에 이식하고, 약 200 mm<sup>3</sup>의 부피로 성장시킨 후 화합물을 투여하였다. 최대 10회의 사이클에 대하여, 물 중 0.5% 메틸셀룰로오스 중 젬시타빈을 3일마다 1회, 복강내로 (복강내, 매 3일마다), 15 mg/kg으로 단독으로 투약하였다. VE-822를 물 중 0.5% 메틸셀룰로오스 중 현탁물로서 단독으로 28일 동안 격일로, 10, 30 또는 60 mg/kg으로 경구로 (경구, 매 2일마다) 투약하였다. 3개의 병용 군들은 단일 제제 군과 동일한 일정으로 15 mg/kg의 젬시타빈 + 10, 30 또는 60 mg/kg의 VE-822를 경구로 받았다. 대조군은 단독의 비히클 (0.5% 메틸셀룰로오스, 복강내, 매 3일마다)을 받았다. 모든 약물 처리를 30일에 중단하였다. 비히클 및 VE-

822 군을 과도한 종양 부피로 인하여 13일에 희생시켰다.

[0078] 결과

[0079] 화합물들 VE-821 및 VE-822는 췌장암 세포를 방사선 요법에 대하여 감작시킨다.

[0080] 화합물 VE-821은 켄시타빈 (100 nM), 방사선 (6 Gy) 또는 이들 둘 모두에 의한 처리 후 Chk1 (Ser 345)의 인산화를 억제한다 (도 1A 참조). 화합물 VE-821에 의해 췌장 종양 세포가 방사선 감작되지만, 정상 세포는 방사선 감작되지 않는다. 세포를 화합물 VE-821의 존재 하에 조사할 때, 생존 분율의 감소가 관찰되었으며, 이러한 방사선 감작 효과는 조사 후 약물 인큐베이션 시간이 연장될수록 증가하였다 (도 1C 참조).

[0081] 화합물 VE-821에 의해 저산소 조건 하에서 종양 PSN-1, MiaPaCa-2 및 PancM 세포가 방사선 감작된다 (도 2A 내지 도 2B 참조). 화합물 VE-821은 또한 정상산소 및 저산소 암세포를 켄시타빈에 대하여 감작시킨다 (도 3B 내지 도 3C 참조). 화합물 VE-821은 PSN-1 및 MiaPaCa-2 암세포 둘 모두에 있어서 화학방사선의 효과를 강화한다 (도 3D 참조). 화합물 VE-821은 손상-유도된 세포 주기 체크포인트를 파괴한다 (보충용 도 2 참조). 화합물 VE-821은 상동 재조합에 의한 DNA 손상의 복구를 억제한다 (도 5A, 도 5B, 및 도 5C 참조).

[0082] 화합물들 821 및 822에 대한 결과를 도 1X 내지 도 8X 및 도 1Y 내지 도 6Y에 나타낸다. VE-821 및 VE-822는 암세포를 방사선 요법에 대하여 감작시킨다 (도 1X 내지 도 5X 참조).

[0083] VE-822는 이종이식편 모델에서 암 요법제들의 항종양 효과를 향상시킨다.

[0084] VE-822는 MiaPaCa 췌장암 이종이식편 모델에서 (도 6X 참조), 그리고 PSN-1 췌장암 이종이식편 모델에서 (도 7X 및 도 8X 참조) 이온화 방사선의 항종양 효과를 향상시킨다.

[0085] VE-822는 원발성 선암종 NSCLC 이종이식편 모델에서 시스플라틴의 항종양 효과를 향상시킨다. 도 5Y는 SCID 생쥐에서 원발성 선암종 NSCLC 이종이식편에서 종양 부피 및 체중에 대한 VE-822 및 시스플라틴의 영향을 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  sem, n = 9-10이다. 흑색의 채워진 원은 비히클 처리이며; 적색의 채워진 마름모는 시스플라틴 처리 (1 mg/kg, 매 7일마다)이며; 청색의 채워진 원은 비히클 처리이며; 적색의 채워진 마름모는 시스플라틴 처리 (3 mg/kg, 매 7일마다)이며; 녹색의 채워진 정사각형은 VE-822 처리 (60 mg/kg, 4일 매일)이며; 녹색의 빈 삼각형은 시스플라틴 (1 mg/kg) 및 VE-822 (60 mg/kg, 4일 매일)이며; 청색의 빈 삼각형은 시스플라틴 (3 mg/kg) 및 VE-822 (60 mg/kg, 4일 매일)이다 (도 5Y 참조).

[0086] 또한 VE-822는 PSN1 췌장암 이종이식편 모델에서 켄시타빈의 항종양 효과를 향상시킨다. 도 6Y는 PSN1 췌장암 이종이식편을 지닌 생쥐의 종양 부피에 대한, 켄시타빈 (15 mg/kg, 복강내, 매 3일마다)과 병용하여 10, 30 또는 60 mg/kg으로 매 2일마다 경구 투여된 VE-822의 영향을 나타낸다. 나타낸 데이터는 평균 종양 부피  $\pm$  SEM (n = 군당 8마리)이다. 적색의 채워진 원은 VE-822 처리이며; 흑색의 채워진 정사각형은 비히클 처리이며; 녹색의 채워진 원은 켄시타빈 처리이며; 청색의 채워진 원은 켄시타빈 및 VE-822 (10 mg/kg) 처리이며; 적색의 채워진 원은 켄시타빈 및 VE-822 (30 mg/kg) 처리이며; 분홍색의 채워진 원은 켄시타빈 및 VE-822 (60 mg/kg) 처리이다.

[0087] VE-822는 폐암 세포주들의 폐닐에 걸쳐 화학독성물질과 상승 작용을 한다.

[0088] 히트맵(heat map)은 96시간 동안 VE-822와 병용될 때 성취되는 각각의 화학독성물질의 IC<sub>50</sub>의 최대 이동을 나타낸다. 색은 -10 (길항 작용, 청색)으로부터 10 (상승 작용, 적색)까지의 IC<sub>50</sub> 이동 범위를 나타낸다 (도 1Y 참조). VE-822는 폐암 세포주에서 시스플라틴, 에토포시드, 켄시타빈, 옥사플라틴 및 이리노테칸과 3배 초과 상승 작용을 나타낸다 (도 2Y 참조).

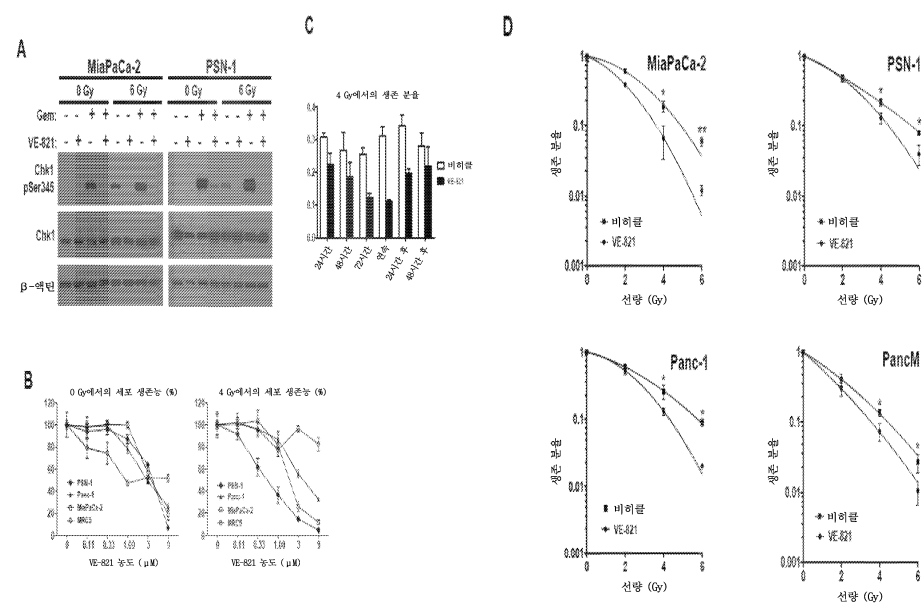
[0089] VE-822는 췌장암 세포주들에서 시스플라틴 및 켄시타빈과 상승 작용을 한다.

[0090] 히트맵은 96시간 동안 VE-822와 병용될 때 성취되는 각각의 화학독성물질의 IC<sub>50</sub>의 최대 이동을 나타낸다. 색은 -10 (길항 작용, 청색)으로부터 10 (상승 작용, 적색)까지의 IC<sub>50</sub> 이동 범위를 나타낸다 (도 3Y 참조).

[0091] 본 발명자가 다수의 본 발명의 실시 양태에 대하여 설명하였지만, 본 발명의 기본 예는 본 발명의 화합물, 방법, 및 공정을 이용하는 다른 실시 양태를 제공하도록 변경될 수 있다. 따라서, 본 발명의 범주가 본 명세서에서 예로서 나타낸 특정 실시 양태보다는 첨부된 특허청구범위에 의해 규정되는 것으로 인지될 것이다.

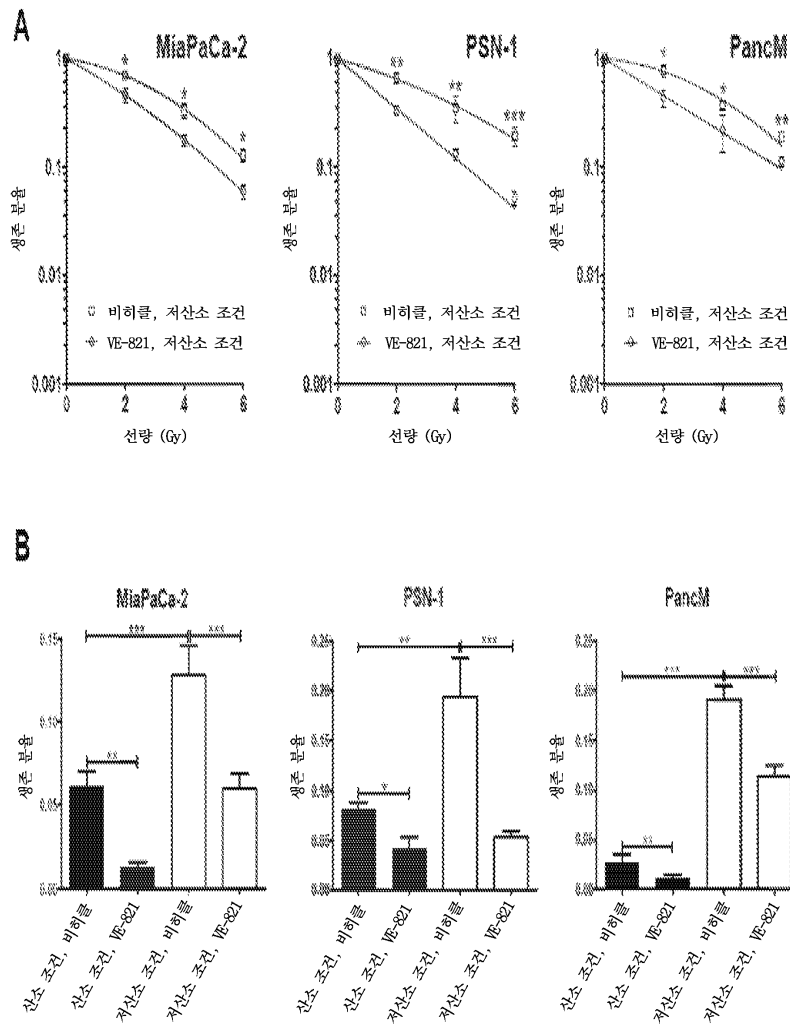
도면

도면1

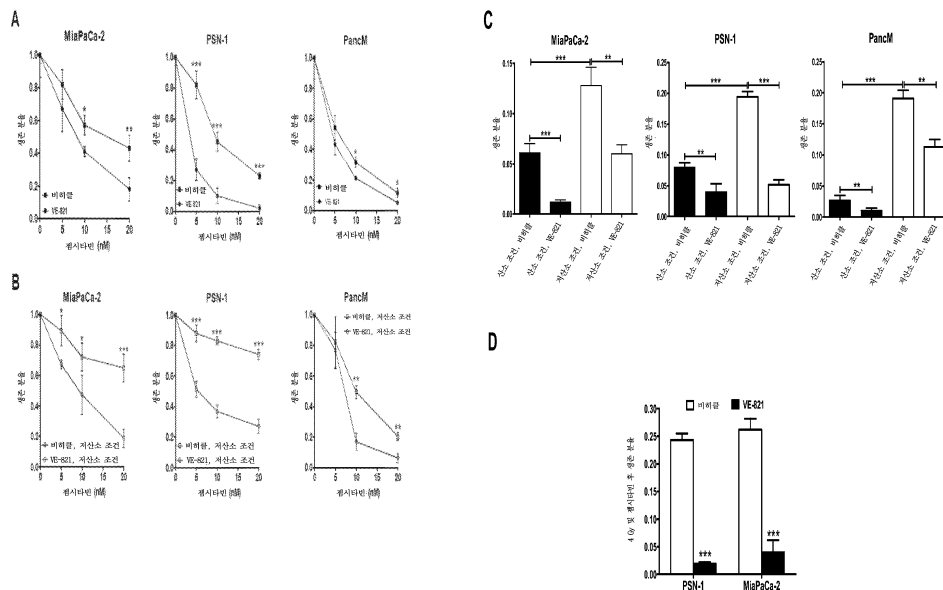




도면2

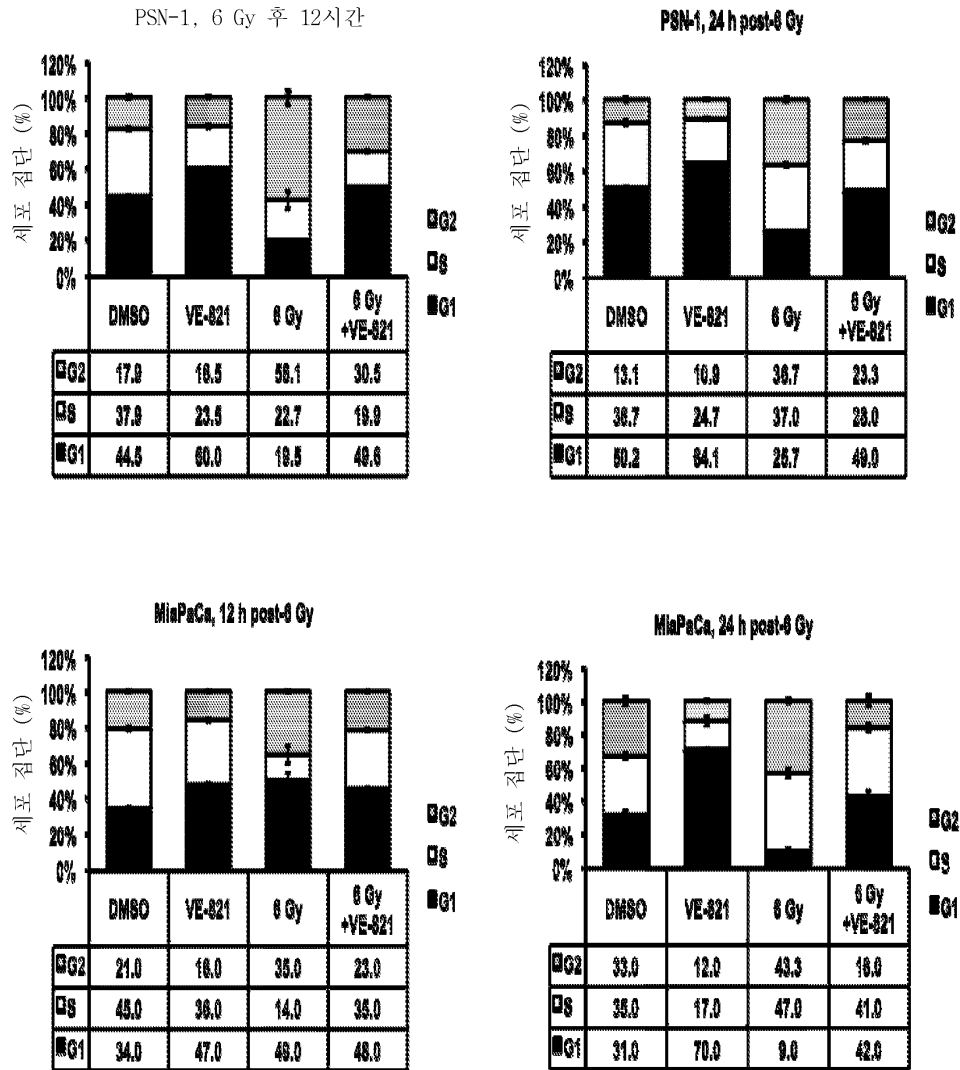


도면3

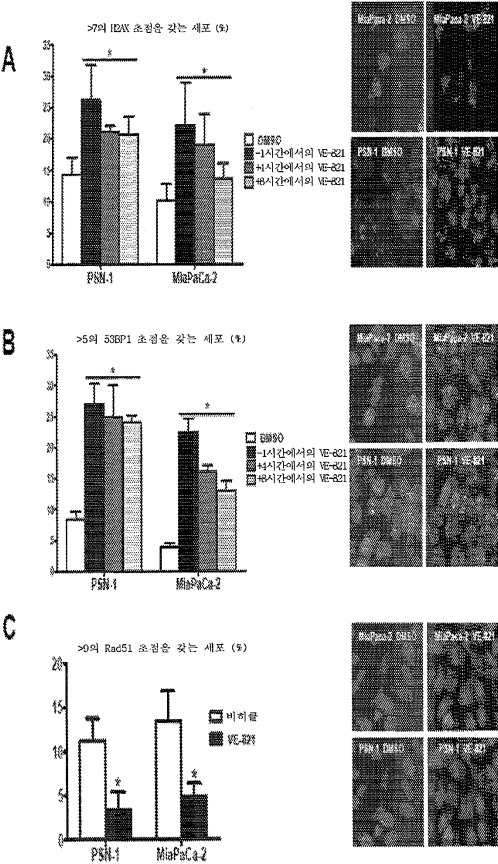


도면4

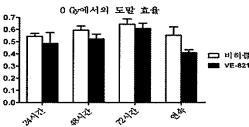
A



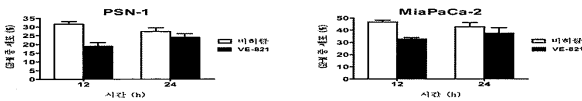
도면5



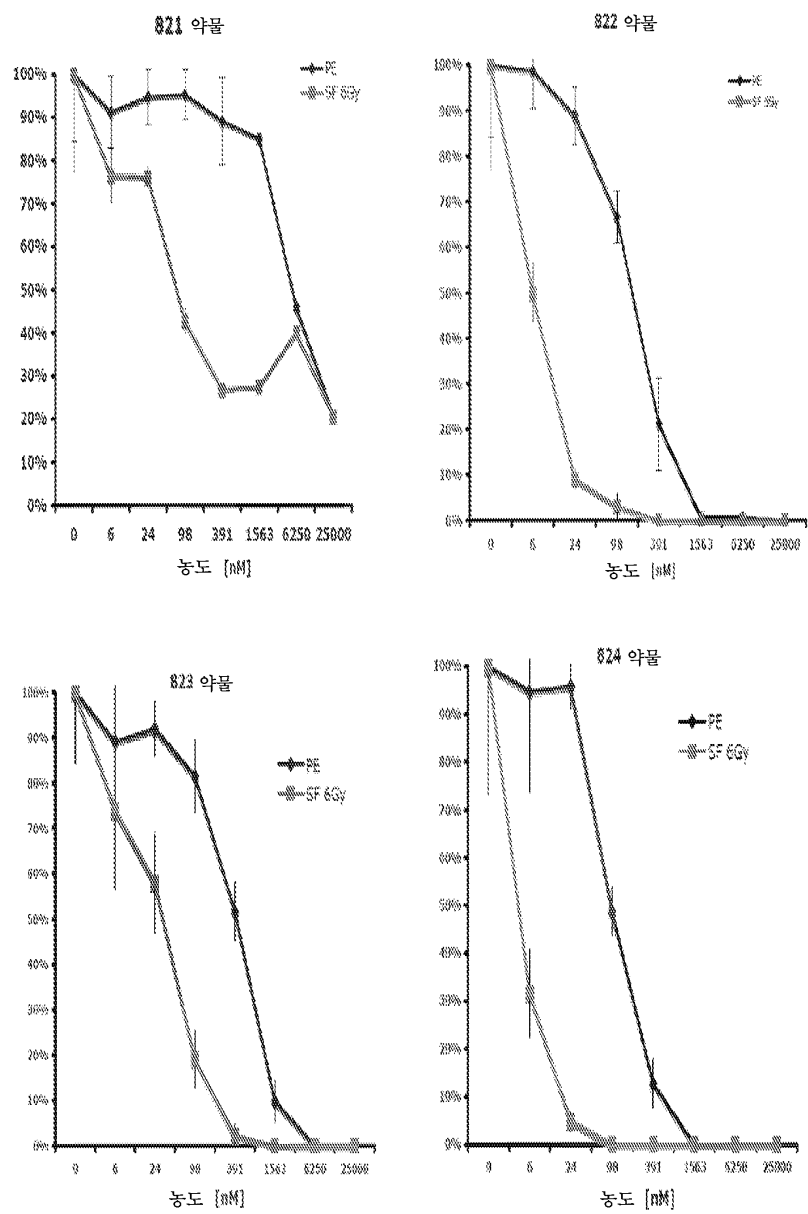
【보충용 도 1】



【보충용 도 2】

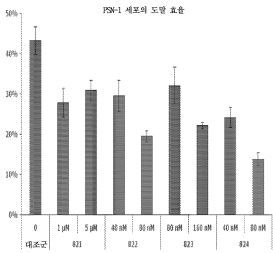


도면1x

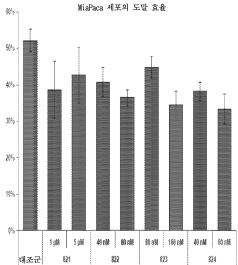


도면2x

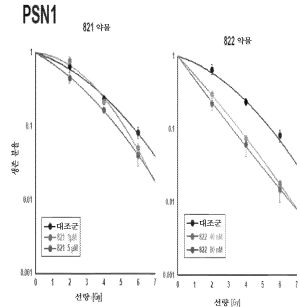
A



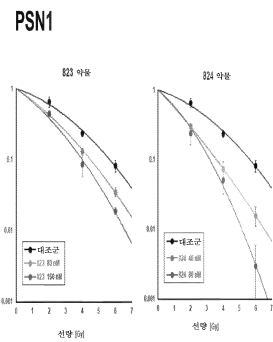
A



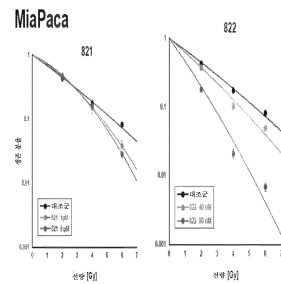
B



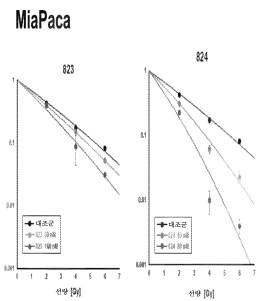
B



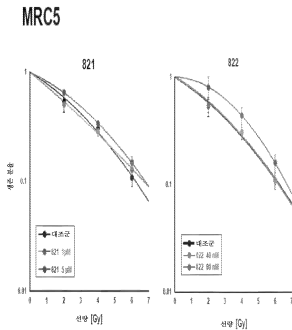
B



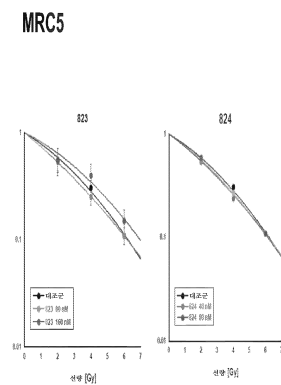
B



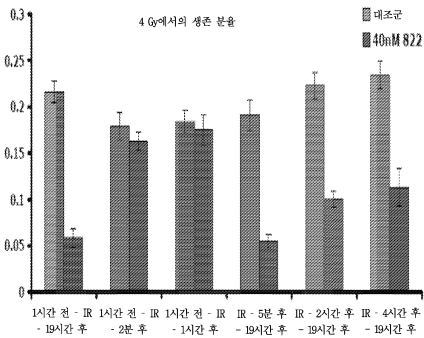
B



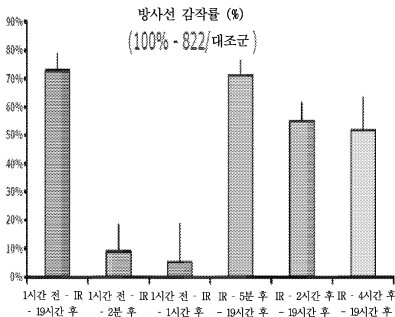
B



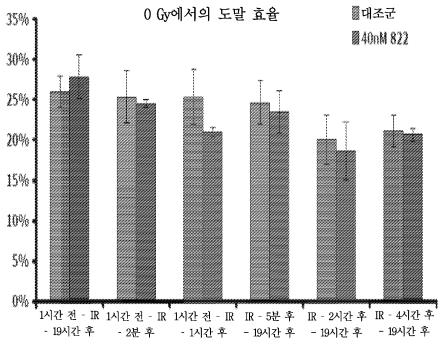
도면3x



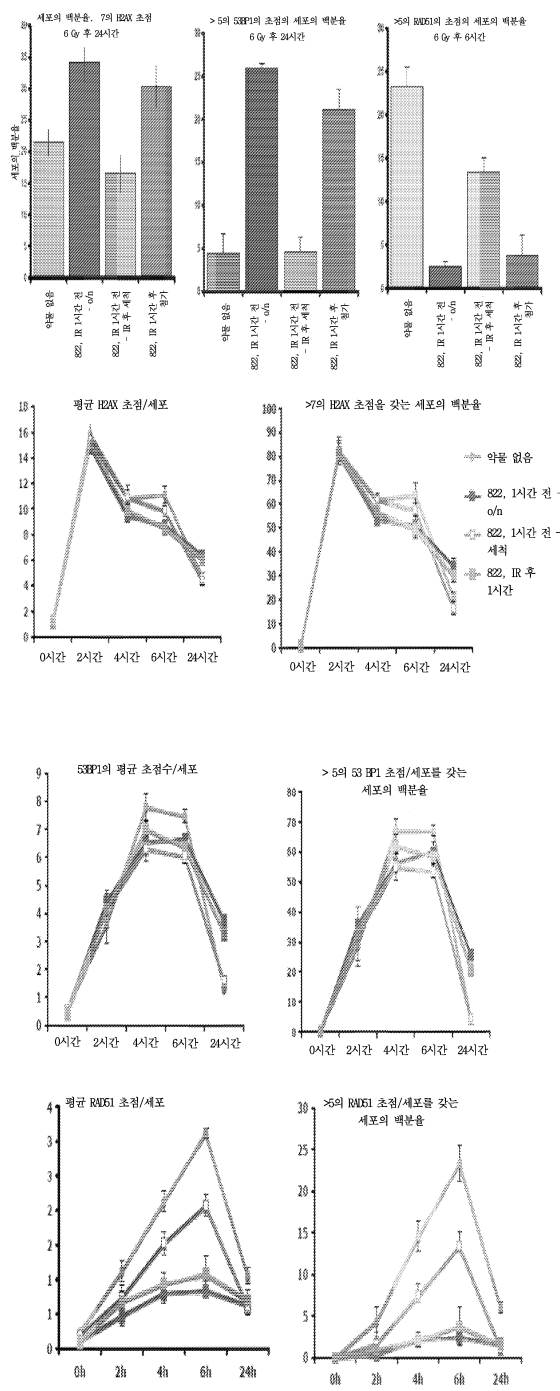
약물의 첨가 및 제거 시점



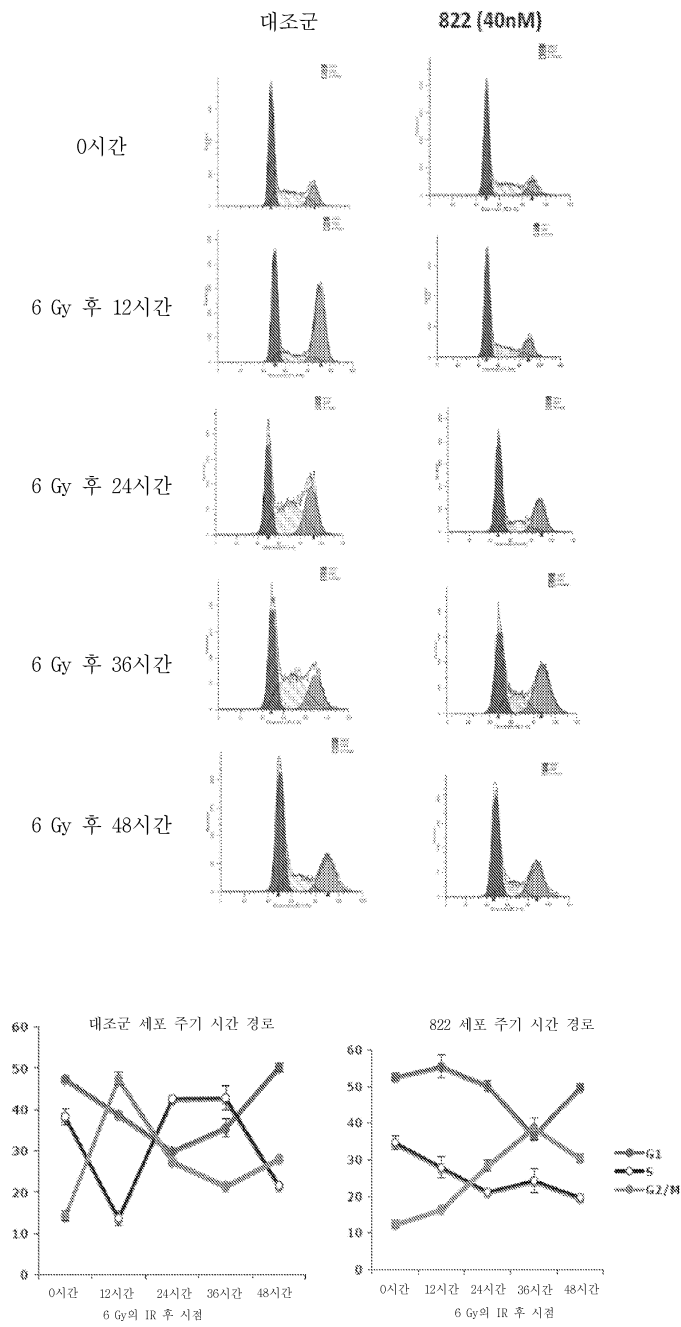
약물의 첨가 및 제거 시점



도면4x

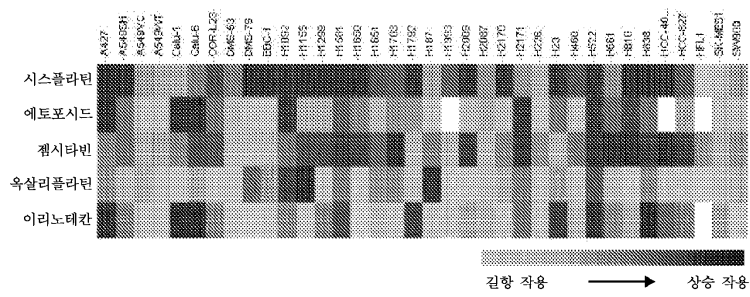


도면5x

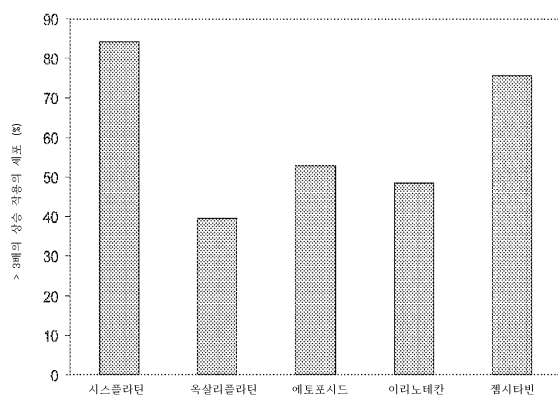




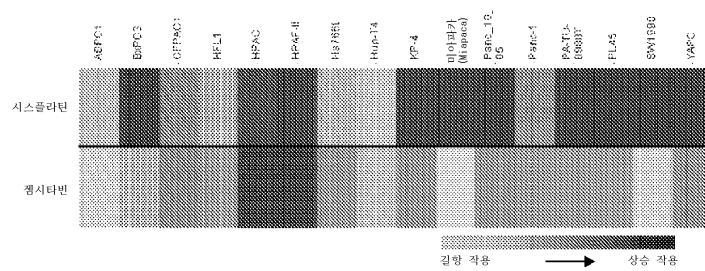
도면 1y



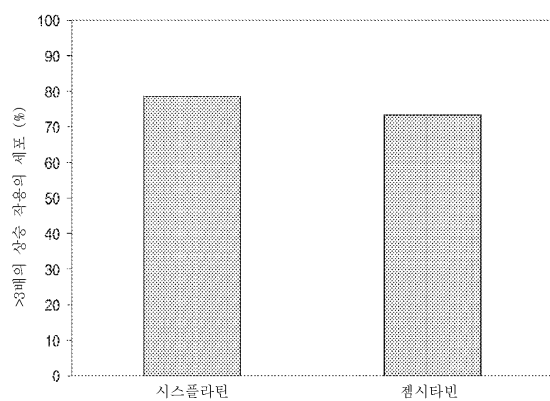
도면 2y



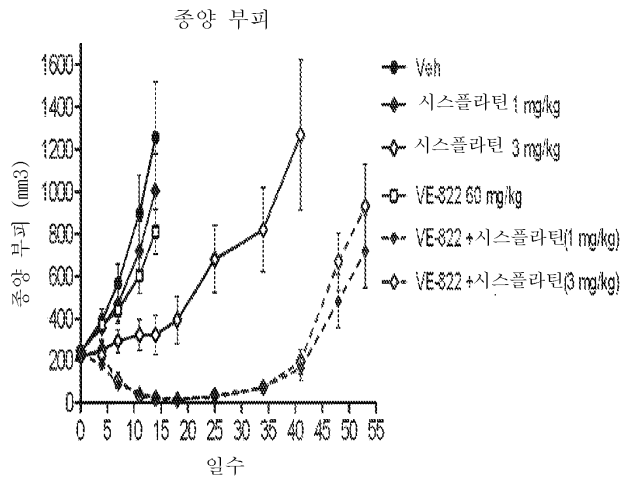
도면 3y



도면4y



도면5y



도면6y

