



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월30일

(11) 등록번호 10-1507178

(24) 등록일자 2015년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/16 (2006.01) *A61K 31/337* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61K 38/10* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7001590

(22) 출원일자(국제) 2007년07월20일
심사청구일자 2012년07월02일

(85) 번역문제출일자 2009년01월23일

(65) 공개번호 10-2009-0034355

(43) 공개일자 2009년04월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/074036

(87) 국제공개번호 WO 2008/016793

국제공개일자 2008년02월07일

(30) 우선권주장

11/461,961 2006년08월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2004037235 A2*

Breast Cancer Research and Treatment, Vol.
94, pages 237-247 (2005)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

스펙트럼 파마슈티컬즈 임크

미국 네바다 (우편번호 89052) 헨더슨 사우쓰 이
스턴 애비뉴 11500 스위트 240더 보오드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티
오브 일리노이즈미국 61801 일리노이 어바나 사우쓰 라이트 스트
리트 506 헨리 어드미니스트레이션 빌딩 352

(72) 발명자

굴라티 아널

미국 60665 일리노이주 나퍼빌 리손 로드 1929

레디 구루

미국 92620 캘리포니아주 어바인 아덴 120

레나즈 루이지

미국 18940 펜실베니아주 뉴튼 플레인트리 코오트
11

(74) 대리인

김진희

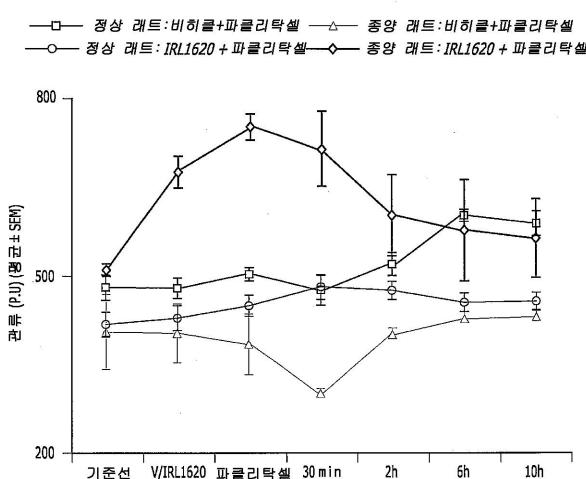
전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 암 치료에 기여하는 방법, 조성물 및 제조품

(57) 요약

본 발명은 고형 종양을 비롯한 암의 치료에 기여하는 방법, 조성물 및 제조품을 개시하고 있다. 상기 방법, 조성물 및 제조품은 전달을 향상시키기 위해 엔도셀린 B 효능제(ETB) 및 화학요법제의 결과적인 효능을 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1

특허청구의 범위

청구항 1

엔도셀린 B(ET_B) 수용체 효능제 및 화학요법제를 포함하는 전립선암 치료용 복합제제로서, 엔도셀린 B(ET_B) 수용체 효능제가 IRL1620(N-suc-[Glu⁹, Ala^{11,15}]ET-1 (8-21))이고, 화학요법제가 독소루비신 또는 5-플루오로우라실인 복합제제.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 IRL1620이 1 nmol/kg~6 nmol/kg의 양으로 투여되는 것인 복합제제.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 화학요법제가 독소루비신인 복합제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 독소루비신이 2.5 mg/kg~5 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 복합제제.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 화학요법제가 5-플루오로우라실인 복합제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 5-플루오로우라실이 25 mg/kg~50 mg/kg의 양으로 투여되는 것인 복합제제.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 ET_B 수용체 효능제가 전립선암으로의 혈액 공급을 선택적으로 증가시키는 것인 복합제제.

청구항 15

제14항에 있어서, 전립선암으로의 혈액 공급의 증가가 전립선암으로의 상기 화학요법제의 전달을 증가시키는 것

인 복합제제.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 ET_B 수용체 효능제 및 상기 화학요법제가 동시에 투여되는 것인 복합제제.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 ET_B 수용체 효능제 및 상기 화학요법제가 단일 조성물로서 투여되는 것인 복합제제.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 ET_B 수용체 효능제 및 상기 화학요법제가 순차적으로 투여되는 것인 복합제제.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 화학요법제가 상기 ET_B 수용체 효능제 이전에 투여되거나, 또는 상기 ET_B 수용체 효능제가 상기 화학요법제 이전에 투여되는 것인 복합제제.

청구항 20

화학요법제, ET_B 수용체 효능제 및 선택적인 부형제를 포함하는 전립선암 치료용 조성물로서, ET_B 수용체 효능제가 IRL1620(N-suc-[Glu⁹, Ala^{11,15}]ET-1 (8-21))을 포함하고, 화학요법제가 독소루비신 또는 5-플루오로우라실인 조성물.

청구항 21

ET_B 수용체 효능제를 포함하는 조성물, 화학요법제를 포함하는 조성물, 및 고형 전립선 종양을 치료하기 위해 상기 화학요법제를 포함하는 조성물과 함께 상기 ET_B 수용체 효능제를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 지시하는 지시 정보를 포함하는 제조품으로서, ET_B 수용체 효능제가 IRL1620(N-suc-[Glu⁹, Ala^{11,15}]ET-1 (8-21))을 포함하고, 화학요법제가 독소루비신 또는 5-플루오로우라실인 제조품.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 화학요법제가 독소루비신인 제조품.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 화학요법제가 5-플루오로우라실인 제조품.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2002년 10월 24일에 출원된 미국 특허 출원 제60/420,960호의 이익을 주장하는 2003년 10월 23일에 출원된 미국 특허 출원 제10/691,915호의 일부계속출원인, 2006년 2월 22일 출원된 미국 특허 출원 제11/360,236호(2005년 2월 22일에 출원된 미국 특허 출원 제60/655,656호; 제60/655,654호; 및 제60/655,643호의 이익을 주장함)의 부분계속출원인 2006년 8월 2일 출원된 미국 특허 출원 제11/461,961호에 대해 우선권을 청구한다. 모든 이러한 특허들의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 엔도셀린 효능제 및 화학요법제의 투여를 통해 고형 종양을 비롯한 암의 치료에 기여하는 방법, 조성물 및 제조품에 관한 것이다.

배경기술

[0005] 종양 세포의 문자 생물학의 이해가 증가하고 증가된 수의 잠재적인 치료제의 입수가능성에도 불구하고, 고형 종양을 비롯한 암의 성공적인 치료는 충족되지 않은 의학 목표로 남아있다. 예를 들어, 유방 암 발병률은 지난 10년간 실질적으로 증가하였고, 미국에서 40-49세 여성 사망의 주된 원인이다.

[0006] 암의 치료에 있어서 한가지 문제점은, 다양한 잠재적 화학요법제의 유효량이 정상 세포에 대한 이들 제제의 비선택적 높은 독성 효과에 의해 제한된다. 결과로서, 대부분의 환자들이 치료의 이점을 얻지 못하고 화학요법의 부작용을 겪고 있다. 예를 들어, 화학요법제 파클리탁셀은 세포 증식을 억제하고, 종양 세포의 아폽토시스를 유도한다. 하지만, 파클리탁셀의 임상적인 용도는 과민증, 호중구감소증 및 말초신경장애를 비롯한 그것의 용량 제한 독성에 의해 제한된다. 따라서, 보다 특이적이면서 독성이 적은 암 치료법을 개발할 필요성이 있다.

[0007] 종양에 대한 화학요법제의 표적화 전달은 화학요법제의 이점을 향상시키는 한편, 그들의 전반적인 독성 효과를 최소화하는 이점을 가질 수 있었다. 이러한 표적화 전달은 또한 화학요법제의 필요 투여량을 낮춰주어 잠재적으로 이러한 제제의 수용할 수 있는 부작용을 감소시킬 수 있다. 화학요법제의 표적화 전달을 달성하기 위한 한가지 가능한 방법은 종양 맥관 구조의 특이한 성질을 이용하는 것이다.

[0008] 크기가 몇 밀리미터보다 더 큰 종양은 일정한 영양 공급을 필요로 하므로, 그들 자신의 혈관상 및 혈류를 개발한다. 문헌[Folkman, Cancer Res, 46:467 (1986)]. 이러한 개발된 혈관으로부터 일정한 영양공급이 없으면, 종양은 산소결핍이 되고, 다음에 사라진다. 미리존재하는 혈관으로부터의 새로운 맥관 구조의 보충은 "혈관신생"이라고 한다.

[0009] 혈관신생 동안, 종양 혈관은 실질적으로 정상 맥관 구조로부터 상이하게 성장하고, 상이한 특성을 가진다. 단층 상피세포는 먼저 급하게 형성된 종양 혈관이다. 이러한 새롭게 형성된 종양 혈관은 평활근 층 또는 신경 분포를 가지지 않는다. 종양은 또한 모든 그들의 자가조절 작용을 소유하는 성숙 혈관을 포함한다. 문헌[Mattsson et al., Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, pg. 129 (1979); Reinhold, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, pg. 115 (1979); Warren, Tumor Blood Circulation, CRC Press, Boca Raton, pg. 26 (1979)].

[0010] 혈관 긴장도(혈관이 팽창하거나 수축하는 정도)는 H^+ , K^+ , Ca^{2+} , pO_2 , pCO_2 및 일산화질소(NO)를 비롯한 내생 인자의 숙주뿐 아니라, 엔도셀린(ET-1)과 같은 다른 조절 물질에 의해 결정된다. 문헌[Secombe et al., Landes, Austin, pg. 40 (1994); Luscher et al., The endothelium: modulator of cardiovascular function, CRC Press, Boca Raton, pg. 61 (1990)]. ET-1은 혈관 긴장도를 조절하는 데 유의적으로 기여하고(Yanagisawa et al., Nature, 332:411 (1988)), 조사자는 유방 암종을 비롯한 고형 종양에서 ET₁ 및 ET_B 수용체 발현의 증가를 나타내고 있다. 문헌[Alanen et al., Histopathology, 36:161 (2000); Nelson et al., Cancer Res, 56:663 (1996); Kar et al., Biochem Biophys Res Commun 216:514 (1995); Pagotto et al., J Clin Invest, 96:2017 (1995); Yamashita et al., Cancer Res, 52:4046 (1992); Yamashita et al., Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 74:363 (1991)]. 또한, ET_B 수용체의 자극은 종양 혈관의 혈관확장을 통해 종양으로의 혈액 공급의

증가를 야기한다. 본 발명은 ET_B 수용체 효능제를 사용함으로써 종양으로의 혈류를 선택적으로 증가시켜 화학요법제의 표적화 전달을 향상시킨다는 사실을 장점으로 한다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

본 발명은 엔도셀린 효능제 및 고형 종양을 비롯한 암의 치료에 기여하기 위한 화학요법제의 투여에 관한 것이다. 특히, 종양은 결합 시에 혈관확장을 야기하는 증가된 수의 ET_B 수용체를 포함하는 특정한 맥관 구조를 가진다. ET_B 수용체는 혈관확장제이기 때문에, 화학요법제와 병용하는 ET_B 수용체 효능제는 유방 암에서 발견된 것과 같은 고형 종양의 치료에 있어서 유용하다. ET_B 수용체 효능제는 화학요법제를 종양으로 더욱 효과적으로 전달하여 치료 향상의 결과를 낳을 수 있다.

특히, 본 발명에 따른 일 구체예는 ET_B 효능제 및 화학요법제를 투여하는 것을 포함하는 암의 치료에 기여하는 방법을 포함한다. 본 발명에 따른 방법 중 다양한 구체예에 있어서, 상기 ET_B 효능제 및 화학요법제는 실질적으로 동시에 투여할 수 있거나 또는 순차적으로 투여할 수 있다(상기 화학요법제를 상기 ET_B 효능제 전에 투여하거나 또는 상기 ET_B 효능제를 상기 화학요법제 전에 투여). 본 발명에 따른 소정의 구체예에 있어서, 상기 ET_B 효능제 및 화학요법제를 실질적으로 동시에 투여할 때, 그것들은 단일 조성물로서 투여될 수 있다.

본 발명에 따른 다른 구체예는 화학요법제, ET_B 효능제 및 선택적인 부형제를 포함하는 조성물을 포함한다. 본 발명에 따른 다른 구체예는 ET_B 효능제를 포함하는 조성물, 및 고형 종양을 치료하기 위한 화학요법제와 함께 조성물을 투여하는 것을 지시하는 지시 정보를 포함하는 제조품을 포함한다. 본 발명에 따른 제조품은 1 이상의 화학요법제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 제조품이 1 이상의 화학요법제를 포함할 때, 상기 ET_B 효능제 및 화학요법제는 동일 조성물의 일부이거나, 별개의 조성물로서 제공되거나 또는 둘 다일 수 있다.

본 발명에 따른 방법, 조성물 또는 제조품으로 치료되는 암은 이에 국한되는 것은 아니지만, 난소 종양, 결장 종양, 카포시 육종, 유방 종양, 흑색종, 전립선 종양, 수막종, 간 종양, 유방 엽상 종양 및 이들의 조합을 비롯한 고형 종양을 포함할 수 있다.

본 발명의 방법, 조성물 또는 제조품에 따라 사용된 엔도셀린 B 효능제는 고형 종양으로의 혈액 공급을 선택적으로 증가시켜 상기 고형 종양으로의 화학요법제의 전달을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 엔도셀린 B 효능제는 이에 국한되는 것은 아니지만, ET-1, ET-2, ET-3, BQ3020, IRL1620(N-suc-[Glu⁹, Ala^{11,15}]ET-1 (8-21)), 사라포톡신 S6c, [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 및 이들의 조합 중 1 이상을 포함할 수 있다. 화학요법제는 이에 국한되는 것은 아니지만, 아드리아마이신, 캄토테신, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 알파 인터페론, 베타 인터페론, 감마 인터페론, 인터루킨 2, 이리노테칸, 도세탁센, 파클리탁센, 토포테칸, 5-플루오로우라실 및 이들의 조합 중 1 이상을 포함할 수 있다. 특히 본 발명에 따른 방법, 조성물 또는 제조품은 파클리탁센, 독소루비신, 5-플루오로우라실 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화학요법제와, ET_B 효능제로서 IRL1620을 포함할 것이다.

[도면의 간단한 설명]

도 1은 종양 관류의 파클리탁센 유발 변화에 대한 IRL1620의 효과를 나타낸다;

도 2A~2E는 암이 없고 유방 종양을 보유한 래트의 전신 혈역학에 대한 ET-1의 효과를 나타낸다;

도 3A~3B는 암이 없고 유방 종양을 보유한 래트의 유방 조직에 있어서 혈류 및 국부 혈관 저항에 대한 ET-1의 효과를 나타낸다;

도 4A~4C는 암이 없고 유방 종양을 보유한 래트의 유방 조직에 있어서 관류, 이동 혈액 세포(CMBC)의 농도 및 혈액 세포의 속도에 대한 ET-1의 효과를 나타낸다;

도 5A~5C는 암이 없고 유방 종양을 보유한 래트의 유방 조직에 있어서 혈액 관류, CMBC 및 혈액 세포의 속도의 ET-1 유발 변화에 대한 BQ788의 효과를 나타낸다;

도 6은 정상 래트 및 종양 보유 래트에 있어서 HPLC에 의해 결정된 파클리탁센 분석의 혈장 약물동력학에 대한

비히를 또는 IRL1620의 효과를 나타낸다;

[0024] 도 7 및 8은 액체 섬광 계측기에 의해 결정된 [³H]-파클리탁셀의 혈장 약물동력학에 대한 비히를 또는 IRL1620의 효과를 나타낸다;

[0025] 도 9A 및 9B는 레이저 도플러 유속측정기에 의해 측정된 유방 종양 관류에 대한 IRL1620의 효과를 나타낸다;

[0026] 도 10은 종양 및 유방 종양 보유 래트의 기관에 있어서 [³H] 파클리탁셀 농도에 대한 IRL1620 투여의 시간 의존적 효과를 나타낸다;

[0027] 도 11은 치료의 초기와 비교한 유방 종양 보유 래트의 체중의 차이%를 나타낸다;

[0028] 도 12는 유방 종양 보유 래트의 종양 체적에 대한 IRL1620 투여의 효과를 나타낸다;

[0029] 도 13은 유방 종양 보유 래트에 있어서 종양 진행, 정체 및 퇴보에 대한 IRL1620 투여의 효과를 나타낸다;

[0030] 도 14A 및 14B는 레이저 도플러 유속측정기에 의해 측정한 전립선 종양 관류에 대한 상이한 투여량 또는 IRL1620의 효과(14A) 및 IRL1620의 투여에 따른 기준선으로부터의 전립선 종양의 관류 변화%를 나타낸다(14B);

[0031] 도 15는 종양 및 전립선 종양 보유 래트의 다른 주요 기관에 있어서 [¹⁴C]-독소루비신(DOX) 농도에 대한 IRL1620의 효과를 나타낸다;

[0032] 도 16은 IRL1620 및 DOX 투여에 따른 전립선 종양 보유 래트의 체중(16A); 종양 체적(16B); 및 종양 중량(16C)을 나타낸다;

[0033] 도 17은 체중(17A); IRL1620 및 5-플루오로우라실(5-FU)의 투여에 따른 전립선 종양 보유 래트의 종양 체적(17B); 및 종양 중량(17C)을 나타낸다;

[0034] 도 18A 및 18B는 레이저 도플러 유속측정기에 의해 측정한 흑색종 종양 관류에 대한 IRL1620의 효과(18A) 및 IRL1620의 투여에 따른 기준선으로부터의 흑색종 종양의 관류 변화%(18B)를 나타낸다;

[0035] 도 19는 종양 및 흑색종 종양 보유 래트의 다른 주요 기관에 있어서 [³H]-파클리탁셀 농도에 대한 IRL1620의 효과를 나타낸다.

[0036] 도 20은 시간에 따른 종양 체적에 대한 방사가 있고 없을 때 다양한 농도의 IRL 1620의 효과를 나타낸다. 비교목적에 있어서, 염수 및 방사의 효과를 나타내고, 종양 체적에 대한 치료가 없음을 나타낸다.

[상세한 설명]

I. 정의

[0039] 지시 정보: 본원에서 사용한 바와 같이, "지시 정보"라는 용어는 내과 의사, 약사 및 환자가 약학 제품의 사용에 관한 결정을 분별하게 하기에 필요한 안정성 및 효능 데이터와 함께 상기 제품을 투여하는 방법의 설명을 제공하는 제품을 수반하는 물질을 의미하는 것이다. 이 지시 정보는 일반적으로 약학 제품에 있어서 "라벨"로서 간주된다. 지시 정보는 이에 국한되는 것은 아니지만, 삽입 종이, c.d. 롬 또는 약학 제품에 관련한 정보를 포함하는 웹 사이트 표기를 비롯한 여러 형태가 될 수 있다.

[0040] 프로드러그: 본원에서 사용한 바와 같이, "프로드러그"라는 용어는 생체 내에서 예를 들어, 가수분해에 의해 본 발명에 유용한 화합물로 빠르게 변형하는 화합물을 의미한다. 프로드러그의 상세한 기술은 문헌[Higuchi et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14, of the A.C.S.D. Symposium Series, and in Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987]에서 제공된다.

[0041] 치료하다, 치료 또는 치료에 기여: 본원에서 사용한 바와 같이, "치료하다", "치료" 및 "치료에 기여"라는 용어는 고형 종양을 비롯한 암의 예방, 진행 또는 성장의 저연, 위축 또는 제거를 의미한다. 이처럼, 이러한 용어는 적절하게 의학적 치료상 및/또는 예방적 투여 둘 다를 포함한다.

[0042] 실질적으로 동시에: 본원에서 사용한 바와 같이, "실질적으로 동시에"라는 용어는 2개의 약학 조제물(즉, ET_B 효능제 및 화학요법제)이 동시에 투여되는 것을 의미한다. 이 정의에 따르면, "동일한 시간"은 정확히 동시에 아니라 약 10분 이내를 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

- [0043] 대부분의 화학요법제는 암 세포를 파괴하기 위해 표적화되는 세포독성 특성을 가지고, 그 과정에서 신체의 정상 생리학적 시스템에 상당한 손상을 준다. 그러므로, 고형 종양에 화학요법제를 선택적으로 운반하여 이러한 암 치료의 부정적인 영향을 피하도록 하는 것이 이로울 것이다.
- [0044] 종양 혈관의 맥관구조학은 정상 혈관의 것과 상이하다. 문헌[Carmeliet & Jain, Nature, 407:249 (2000)]. 그러므로, 종양의 혈관 반응성은 정상 조직의 것과 상이하다. 예를 들어, 일산화질소 도너, 니코틴아미드 및 브레 디키닌 효능제의 투여는 종양으로의 혈류를 조절한다. 문헌[Jordan *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 48:565 (2000); Fukumura *et al.*, Am J Pathol, 150:713 (1997); Hirst *et al.*, Br J Radiol, 67: 795 (1994)].
- [0045] 엔도셀린은 혈류를 조절하는 혈관에 작용하는 물질로서, 정상 유방 조직에 비해 유방 암종 조직에서 큰 농도로 존재한다(특히, 엔도셀린은 정상 유방 조직 중 약 0.12 pg/mg에 비해 유방 암종 조직 중 약 12 pg/mg의 양으로 존재할 수 있다). 문헌[Kojima *et al.*, Surg Oncol, 4(6):309 (1995); Kurbel *et al.*, Med Hypotheses, 52(4):329 (1999); Patel *et al.*, Mol Cell Endocrinol, 126(2):143 (1997); Yamashita *et al.*, 암 Res, 52(14):4046 (1992); Yamashita *et al.*, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 74(3):363 (1991)]. 엔도셀린은 포유동물에서 3가지 아이소형, ET-1, ET-2 및 ET-3을 포함하는 21개의 아미노산을 가진 환형 웨티드의 부류이다. 문헌[Inoue *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA 86:2863 (1989); Yanagisawa *et al.*, Nature, 332:411 (1988)]. 엔도셀린은 2개의 별개의 세포 표면 수용체, ET_A 및 ET_B에 결합함으로써 그들의 영향을 발휘한다. 상기 ET_B 수용체는 동등한 친화력으로 3가지 웨티드 아이소타입에 결합한다. 반대로, 상기 ET_A 수용체는 다른 아이소형보다 더 높은 친화력으로 ET-1에 결합한다. 둘 다의 수용체는 G 단백질 결합 수용체 시스템에 속하고, 성장 인자, 혈관에 작용하는 폴리웨티드, 신경전달물질 및 호르몬을 비롯한 다양한 자극으로부터 생물학적 반응을 조정한다. 문헌[Masaki, J Cardiovasc Pharmacol, 35:S3 (2000); Gulati, Preface. Adv Drug Deliv Rev, 40:129 (2000); Gulati *et al.*, Am J Physiol, 273:H827 (1997); Levin, N Engl J Med, 333:356 (1995)]. 본 발명의 초점인 ETB 수용체는 내피세포(EC) 및 혈관 평활근 세포(VSMC) 둘 다에 존재하고, 정상 유방 조직과 비교할 때 유방 암 조직(인간의 침윤뿐 아니라 관성 및 소엽성 유방 암종 조직을 포함)에서 증가된다. 문헌[Wulffing *et al.*, Oncol Rep, 11:791 (2004); Wulffing *et al.*, Clin Cancer Res, 9:4125 (2003); Alanen *et al.*, Histopathology, 36(2):161 (2000)]. 엔도셀린은 ET_B 수용체에 작용하여 혈관 팽창을 산출하고 유방 종양 조직으로의 혈류를 증가시킨다. EC에 우세한 ET_B 수용체는 프로스타시클린 및 일산화질소와 같은 인자의 방출을 통해 혈관확장을 산출한다. 문헌[de Nucci *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 85:9797 (1988)]. ET-1은 ET_B 수용체를 자극함으로써 종양으로의 혈류 증가를 산출하기 때문에, ET_B 수용체 효능제는 종양으로의 혈액 공급을 선택적으로 증가시켜, 화학요법제의 표적화 전달 및 얻어지는 효능을 증가시키는 데 사용될 수 있다.
- [0046] 예를 들어, ET_B 수용체는 이에 국한되는 것은 아니지만, 난소암, 근섬유모 세포, 카포시 육종 종양과 종양내 혈관, 유방암 및 흑색종에서 나타난다. 문헌[Bagnato *et al.*, Am J Pathol, 158:841 (2001); Alanen *et al.*, Histopathology, 36(2):161 (2000); Bagnato *et al.*, Cancer Res, 59:720 (1999); Kikuchi *et al.*, Biochem Biophys Res Comm, 219:734 (1996)]. 그러므로, 화학요법제와 병행한 ET_B 수용체 효능제의 투여는 이에 국한되는 것은 아니지만, 난소암, 대장암, 카포시 육종, 유방암 및 흑색종을 비롯한 고형 종양의 치료에 기여하는 데 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따라 유용한 ET_B 효능제는 이에 국한되는 것은 아니지만, ET-1, ET-2, ET-3, BQ3020, IRL1620(N-suc-[Glu⁹, Ala^{11,15}]ET-1 (8-21)), 사라포톡신 S6c, [Ala^{1,3,11,15}]ET-1 및 이들의 조합을 포함한다. [Ala^{1,3,11,15}]ET-1은, 이황화 다리가, Cys 잔기가 Ala로 치환되는 것에 의해 제거된 ET-1의 선형 유사체이다. 문헌[Saeki *et al.*, Biochem Biophys Res Commun, 179:286 (1991)]. BQ3020 및 IRL1620은 ET-1의 절단된 선형 합성 유사체이고, 가장 널리 사용되는 선택적인 합성 효능제이다. IRL1620은 구조가 ET-1의 카복시 말단을 기초로 하는 선형 ET 유사체로서, ET_B 수용체에 대해 120,000배의 선택성을 갖는다. 문헌[Okada & Nishikibe, Cardiovasc Drug Rev, 20:53 (2002); Douglas *et al.*, Br J Pharmacol, 114:1529 (1995)]. IRL1620은 매우 선택적이고, 강력한 ET_B 효능제이며, ET_{B2} 서브타입에 비해 우선적으로 ET_{B1} 수용체 서브타입에 대한 선택성을 갖는다는 증거가 보고되어 있다. 문헌[Brooks *et al.*, J Cardiovasc Pharmacol, 26 Suppl 3:S322 (1995)].
- [0048] 예를 들어, 본 발명에 따라 유용한 화학요법제는 이에 국한되는 것은 아니지만 알킬화제, 대사길항물질, 호르몬

및 이의 길항제, 방사성 동위원소, 항체뿐 아니라 천연 생성물, 및 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, ET_B 효능제는 독소루비신 및 다른 안트라시클린 유사체와 같은 항생물질, 이에 국한되는 것은 아니지만 시클로포스포아미드와 같은 질소 머스타드, 이에 국한되는 것은 아니지만 5-플루오로우라실, 시스플라틴, 히드록시우레아와 같은 피리미딘 유사체 및 이의 천연 및 합성 유도체 등과 함께 투여될 수 있다. 다른 예로서, 종양이 성선 자극 호르몬 의존 세포 및 성선 자극 호르몬 비의존적 세포를 포함하는 유방의 선암과 같은 혼합 종양의 경우에, 상기 ET_B 효능제는 이에 국한되는 것은 아니지만 류프로리드 또는 고세릴린(LH-RH의 합성 웨터드 유사체)과 함께 투여될 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 화학요법제의 추가적인 비제한적인 예로는 아드리아마이신, 캄토테신, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 인터페론(알파, 베타 및/또는 감마), 인터루킨 2, 이리노테칸, 도세탁셀, 파클리티셀, 토포테칸 및 치료상 유효 유사체 및 이의 유도체가 있다.

[0049] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 엔도셀린 효능제는 고형 종양의 치료에 기여하는 화학요법제와 함께 사용된다. 이 방법에 있어서, 상기 엔도셀린 효능제, 주로 ET_B 효능제는 ET_B 수용체가 풍부한 종양으로의 혈류를 증가시킨다. 그러므로, ET_B 효능제는 화학요법제에 대한 보다 선택적인 표적을 제공하고, 제제의 화학치료적 효과를 향상시킨다.

[0050] 엔도셀린 효능제는 ET_B 수용체를 자극하여 종양 혈관을 팽창시킴으로써 종양으로의 혈류 및 화학요법제의 결과적인 전달을 증가시킨다는 이론이 있으나 본원에서는 의존하지 않는다. 엔도셀린 효능제에 의해 야기된 종양의 증가된 혈액 관류는 또한 조직의 산화를 증가시킨다. 향상된 산화는 화학요법제의 치료 작용을 증가시킨다. 엔도셀린은 또한 유사분열 특성을 가질 수 있다. 엔도셀린의 유사분열 작용은 함께 투여될 때 화학요법제의 작용을 증가시킬 수 있다. 엔도셀린 효능제의 유사분열 작용은 종식 세포로의 그들의 통합을 향상시킴으로써 화학요법제의 작용을 증가시키고, 따라서 그들의 효능을 증가시킬 수 있다.

[0051] 화학요법은 암의 치료에 있어서 수술에 보조로서 종종 나타난다. 보조 석치에 있어서 화학요법의 목적은 1차 종양이 제어될 때 재발의 위험을 감소시키고 질환이 없는 생존을 증가시키는 것이다. 화학요법은 종종 상기 질환이 전이성인 경우에 암에 대한 치료 보조로서 이용된다. 그러므로, ET_B 효능제는 특히 화학요법과 병행하는 고형 종양의 치료에 있어서 수술 전 또는 후에 유용하다.

실시 예

유방 종양 모델

실시예 1. 유방 종양 관류에 대한 IRL1620 및 파클리티셀의 효과

[0054] 정상 래트 및 유방 종양 보유 래트에서 ET-1의 전신 혈역학 및 국부 회로 효과를 조사하기 위해 후술하는 연구들을 수행하였다.

[0055] 하나의 널리 연구된 유방 종양 모델은 화학적으로 유발된 래트 유방의 발암 모델이다. 문헌[van Zwieten, The rat as animal model in breast cancer research. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pg. 206 (1984); Dao *et al.*, J Natl Cancer Inst, 71:201 (1983); Russo *et al.*, J Natl Cancer Inst, 61:1439 (1978); Huggins *et al.*, Science, 137 (1962); Huggins *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 45:1294 (1959)]. 래트에서 화학적으로 유발된 유방의 발암은 인간의 암을 가장 가깝게 닮은 모델이다. 문헌[Russo *et al.*, Lab Invest, 62:244 (1990)]. 조직 구조에 의해, 래트의 유방선은 여성의 것에 비교할만한다. 그것은 도관 및 폐포를 덮는 상피 및 기질, 이 기관의 결합 조직 골격에 의해 형성된다. 이러한 2개의 구획은 배아기 성장 동안 및 성인기를 통해 연속적인 상호작용을 한다. 그러므로, 이 자생의 실험 모델은 현재 기술된 연구에 있어서 인간의 암에 가장 근접하게 닮은 모델로서 선택되었다. *Id.*

[0056] 화학적으로 유발된 래트 유방의 발암은 전형적으로 7,12-디메틸벤젠(a)안트라센(DMBA) 또는 N-메틸니트로소우레아(MNU)의 투여에 의해 달성된다. 문헌[Rogers *et al.*, Chemically induced mammary gland tumors in rats: modulation by dietary fat. Alan R. Liss, Inc., New York 255 (1996)]. DMBA 또는 MNU에 유발된 종양은 상이한 형태학적 특성을 가진다. 특히, MNU에 의해 유발된 종양은 유방에 더욱 국소화되고, 전이되기 쉽지 않다. 문헌[Macejova *et al.*, Endocr Regul, 35:53 (2001)]. 그러므로, MNU는 종종 래트에서 유방 종양의 특이적 유발을 위한 화학제로서 선택된다. 이러한 유방 종양은 섬유선종 및 유두종을 가진 양성일 수 있거나, 또는 그것들은 악성일 수 있다. 문헌[van Zwieten, Martinus Nijhoff Publishers, Boston, pg. 206 (1984)]. 래트는 6쌍의 유방선(경추 부위에 1쌍, 흉부 부위에 2쌍, 복부 부위에 1쌍 및 혀 부위에 2쌍)을 가진다. *Id.*; 문헌[Astwood

et al., Am J Anat, 61 (1937)]. MNU으로 처리한 동정 래트는 복부 부위보다는 흉부 부위에서 더 많은 종양을 성장시킨다. 문헌[Russo *et al.*, Lab Invest, 57:112 (1987)].

[0057] 체중이 180~200 그램(g)인 암컷 Sprague Dawley 래트(Harlan Co., Madison, Wis.)를 사용하였다. 모든 동물들은 온도 조절된 방(23±1°C)에서, 습도(50±10%) 및 인공 빛(0600~1800 hr)으로 우리 당 3마리씩 길렀다. 상기 동물들에게 먹이와 물을 자유 급식(*ad libitum*)으로 주었다. 동물들이 상기 환경에 적어도 4일 동안 순응된 후에 실험을 수행하였다.

[0058] N-메틸니트로소우레아(MNU)는 Ash Stevens Inc.(Detroit, Mich)로부터 구입하였다. IRL1620 및 엔도셀린-1(ET-1)은 미국 웨피트 컴퍼니 주식회사(Sunnyvale, Calif)로부터 얻었다. ET-1은 0.1% 알부민에 용해시켰다.

[0059] MNU(50 mg/kg) 또는 염수(1 ml/kg)를 암컷 Sprague Dawley 래트에게 복강내(i.p.)로 투여하였다. 종양이 직경 약 2~4 cm에 도달한 후, 혈류 실험을 수행하였다.

[0060] 혈류 실험 동안, 래트를 우레탄(1.5 g/kg, i.p.)(Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)으로 마취시키고, 약물 투여를 위해 좌측 대퇴부 정맥에 캐뉼러(PE 50 tubing, Clay Adams, Parsippany, N.J.)를 꽂았다.

[0061] 동물들을 하기의 그룹으로 구분하였다:

[0062] 그룹 I: 정상 래트(N=4)에 염수 + 파클리탁셀(택솔; 3 mg/kg; 염수 투여 15분 후);

[0063] 그룹 II: 정상 래트(N=4)에 IRL1620(3 nmol/kg) + 파클리탁셀(3 mg/kg; IRL1620 투여 15분 후);

[0064] 그룹 III: 종양 보유 래트(N=4)에 염수 + 파클리탁셀(3 mg/kg; 염수 투여 15분 후); 및

[0065] 그룹 IV: 종양 보유 래트(N=4)에 IRL1620(3 nmol/kg) + 파클리탁셀(3 mg/kg; IRL1620 투여 15분 후).

[0066] 상기 래트의 유방선으로의 혈액 관류는 레이저 도플러 유속측정기를 이용하여 측정하였다. 문헌[Song *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 18:903 (1990); Song *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 17:1041 (1989)] 참조. 이 절차에 있어서, 동물들의 젖꼭지 주변을 면도하고, 유방선을 둘러싼 피부를 절개하였다. 표준 모델 섬유 광학 프로브를 유방의 동맥에 단단하게 하고, Periflux PF2b 4000 레이저 도플러 유속측정기(Perimed KB, Stockholm, Sweden)에 연결하였다. 시간 상수를 1.5 초로 하고, 밴드 너비를 4 KHz로 하였다. 데이터는 분산분석(ANOVA) 후 던칸 검증을 이용하여 분석하였다. p<0.05의 수준을 유의적으로 간주하였다.

[0067] 염수 또는 IRL1620과 파클리탁셀의 투여에 따른 정상 래트의 유방 조직으로의 혈류 변화는 관찰되지 않았다. 기준선으로부터 유의적인 차이는 IRL1620 주사(36.3%, p<0.05) 및 파클리탁셀에 이은 IRL1620 투여(51.9%, p<0.05) 후에 종양 조직 중 혈류 사이에서 관찰되었다(도 1 참조). 따라서, 이 연구는 화학요법제의 투여를 비롯한 암 치료에 중요한 보조를 제공할 수 있음을 증명한다.

실시예 2. 정상 래트 및 종양 보유 래트의 전신 혈역학 및 유방 조직으로의 혈류에 대한 ET-1 주입의 효과.

[0068] 연구에 앞서 3개월간 i.p. 주사로서 MNU 및 염수 처리를 수행하였다. 상기 처리 후 4주부터 시작하여 규칙적으로 래트를 촉진하였다(palpate). 일단 종양이 직경 약 4~8에 도달하면, 실험을 시작하였다.

[0069] 래트를 우레탄(1.5 g/kg, i.p.)(Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)으로 마취시켰다. 모든 수술 부분을 면도하고, 알코올 솜으로 세척하였다. 약물 투여를 위해 좌측 대퇴부 정맥에 캐뉼러(PE 50 tubing, Clay Adams, Parsippany, N.J.)를 꽂았다. 상기 좌측 대퇴부 동맥에 캐뉼러(PE 50 tubing)를 꽂고, 마이크로스피어 연구에 있어서 회수 펌프(모델 22, Harvard Apparatus, South Natick, Mass.)를 이용한 기준 혈액 샘플의 회수에 사용하였다. 우측 대퇴부 동맥에 캐뉼러(PE 50 tubing)를 꽂고, 7PI 전치 증폭기를 통해 Grass P7D 폴리그래프(Grass Instrument Co., Quincy, Mass., USA)에 대한 혈압을 측정하기 위해 Gould P23 ID 압력 변환기에 연결하였다. 혈압 신호로부터 유발된 7P4B Grass 태코그래프(Grass Instrument Co., Quincy, Mass.)를 통해 심박동수(HR)를 측정하였다. 우측 경동맥을 노출시키고, PE 50 판을 공동의 경동맥을 통해 좌심실 안으로 인도하였다. 좌심실 중 캐뉼러의 존재는 Statham P23 DC 압력 변환기(Grass Instrument Co., Quincy, Mass.)를 이용한 Grass 폴리그래프에서의 압력을 측정함으로써 확인하였다. 상기 캐뉼러가 좌심실에 도달할 때; 최소 혈압은 0으로 떨어졌다. 혈액 pO₂, pCO₂ 및 pH 상수를 유지하고 혈압 및 HR에 대한 호흡의 효과를 피하기 위해, 동물들은 동물용 인공호흡기(모델 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, Mass.)에 연결된 기관내의 캐뉼러를 삽입함으로써 일정한 비율 인공 호흡을 유지하였다.

[0070] 초기에 래트를 2 그룹으로 나누고, 각각 후술하는 처리 중 하나를 받았다:

- [0072] 그룹 I: 염수로 처리한 래트(정상 래트)(N=6)에서 30 분간 ET-1(50 ng/kg/min) 주입; 및
- [0073] 그룹 II: MNU로 처리한 래트(50 mg/kg, i.p.; 종양 래트)(N=6)에서 30 분간 ET-1(50 ng/kg/min) 주입.
- [0074] 전신 혈역학 및 국부 순환 파라미터는 ET-1(50 ng/kg/min) 주입 시작 후 기준선, 30, 60, 및 120 분에서 측정하였다. ET-1 주입을 30 분간 수행하였기 때문에, 30 분 데이터는 ET-1의 효과를 보여주고, 60 분 및 120 분 데이터는 ET-1 효과의 지속을 가리킨다.
- [0075] 전신 혈역학 및 국부 혈액 순환은 문헌에 기재된 절차를 이용하여 측정하였다. 문헌[Gulati *et al.*, J Lab Clin Med, 126:559 (1995); Gulati *et al.*, Life Sci., 55:827 (1994); Sharma *et al.*, Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 22:593 (1994)] 참조. 각각의 측정에서, 0.2 ml 염수 중 ^{46}Sc (스칸듐), ^{113}Sn (주석), ^{141}Ce (세륨) 또는 ^{95}Nb (니오븀)으로 표지된 대략 100,000 마이크로스피어($15\pm1 \mu\text{m}$ 직경)(New England Nuclear Corporation, Boston, Mass., USA)의 완전히 혼합한 혈액을 좌심실 안으로 주입하고, 15 초 기간에 걸쳐 0.3 ml 염수로 씻어내렸다. 혈류를 계산하기 위해, 동맥혈을 우측 대퇴부 동맥을 통해 0.5 ml/min의 비율로 회수하였다. 마이크로스피어 주사 전 약 5~10초에 시작하여 90 초간 혈액을 회수하였다.
- [0076] 래트의 유방선으로의 혈액 관류를 레이저 도플러 유속측정기를 이용하여 측정하였다. 문헌[Song *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 18:903 (1990); Song *et al.*, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 17:1041 (1989)] 참조. 동물들의 젖꼭지 주변을 면도하였다. 유방선을 둘러싸는 피부를 약 6 cm 너비 및 약 4 cm 길이의 조각으로서 잘라내었다. 표준 모델 섬유 광학 프로브를 상기 조각의 표면에 적용하고, 양면 테이프로 상기 조직을 단단히 묶었다. 이 조각을 금속 홀더에 놓고, 움직임을 방지하기 위해 테이프를 감은 후, Periflux PF2b 4000 레이저 도플러 유속측정기(Perimed KB, Stockholm, Sweden)에 연결하였다. 시간 상수를 1.5 초로 설정하고, 밴드 너비는 4 KHz로 설정하였다. 데이터는 분산분석 후 던칸 검증을 이용하여 분석하였다. p<0.05의 수준을 유의적으로 간주하였다.
- [0077] 실험의 마지막에, 동물들을 과량의 펜토바르비탈 나트륨으로 희생시켰다. 모든 조직 및 기관을 절개하고, 무게를 달아, 바이알에 놓았다. 표준에서 방사능, 혈액 샘플 및 조직 샘플을 동위 원소 에너지를 구별하는 미리조절한 윈도우를 이용한 Packard Minaxi Auto-감마 5000 시리즈 감마 계측기(Packard Instruments Co., Downers Grove, III.)에서 계수하였다. 다음의 파라미터들을 계산하였다: (1) 심박출량(CO)((주입된 방사능 x 동맥혈의 회수율)/동맥혈 샘플 중 방사능), (2) 행적 체적(SV)(CO/HR), (3) 전말초저항(TPR)(평균 동맥압(MAP)/CO), (4) 국부 혈류((조직 중 방사능 x 동맥혈의 회수율)/동맥혈 샘플 중 방사능), 및 (5) 국부 혈관 저항 (MAP/국부 혈류). 이 데이터는 문헌에 기재된 컴퓨터 프로그램을 이용하여 계산하였다. 문헌[Saxena *et al.*, Comput Programs Biomed, 12:63 (1980)].
- [0078] 정상(염수 처리한) 래트 중 기준선 전신 혈역학 파라미터는 MAP이었다: $111.1\pm4.8 \text{ mmHg}$; CO: $268.6\pm17.6 \text{ ml}/\text{min}$; SV: $0.87\pm0.06 \text{ ml}$; TPR: $419.6\pm24.37 \text{ mmHg}.\text{min}/\text{ml}$; 및 HR: $312.5\pm0.2 \text{ 비트}/\text{min}$. 정상 래트에 있어서, ET-1 주입에 따른 MAP의 유의적인 증가는 30 분(14.5%; p<0.05)에 관찰되었고, 120 분(17.8%; p<0.05) 감소가 관찰되었다. TPR은 120 분(49.2%; p<0.05)에서 증가하였다. CO는 ET-1 주입 후 60 분 및 120 분(각각 22.9% 및 42.5%; p<0.05)에 감소하였다. SV는 60 분 및 120 분(각각 20.9% 및 36%; p<0.05)에서 감소하였다. HR은 아무런 유의적인 변화도 관찰되지 않았다(도 2A-2E).
- [0079] 종양 보유(MNU 처리한) 래트에서 기준선 전신 혈역학 파라미터는 정상 래트의 것과 유사하다. 종양 보유 래트에 있어서 ET-1 주입에 따른 MAP의 유의적인 증가는 30 분(19.1%; p<0.05) 및 60 분(15.3%; p<0.05)에 관찰되었다. TPR은 ET-1의 투여 후 30 분(73.9%; p<0.05), 60 분(39.7%; p<0.05) 및 120 분(71.4%; p<0.05)에서 증가하였다. CO는 30 분, 60 분 및 120 분(각각 29.4%, 16.7% 및 36.1%; p<0.05)에서 감소하였다. SV는 30, 60 및 120 분(각각 31.1%, 17.9% 및 32.1%; p<0.05)에서 유의적으로 감소하였다. HR은 아무런 변화도 관찰되지 않았다(도 2A-2E).
- [0080] ET-1의 투여 후에 정상 염수 처리한 래트의 유방 조직으로의 혈류의 유의적인 변화 또는 혈관 저항의 변화는 관찰되지 않았다. 유의적인 차이점은 정상(염수 처리한) 래트에 비해 종양 보유(MNU 처리한) 래트의 유방 조직 중 혈류와 국부 혈관 저항 사이에서 관찰되었다. 정상 래트에 비해 종양 보유 래트의 유방 조직으로의 혈류의 유의적인 증가(153%; p<0.05)는 ET-1의 투여 후 60 분에 관찰되었다. 종양 보유 래트 중 혈관 저항은 정상 래트에 비해 기준선(102%; p<0.05) 및 ET-1 투여 후 60 분(147%; p<0.05)에서 유의적으로 상이하였다(도 3A-3B).
- [0081] 도 4A-4C는 종양 보유 및 정상 래트의 유방 조직에서 관류, 이동 혈액 세포(CMBC)의 농도 및 적혈구 세포(RBC)

의 속도의 변화를 나타낸다. 정상 래트의 유방 조직에서 혈액 관류는 ET-1 투여 후에 유의적으로 변화하지 않았다. 종양 보유 래트의 유방 조직 중 관류는 ET-1 투여 후 30 분에 정상 래트에 비해 유의적으로 증가하였다(176%; p<0.05). 관류의 이 증가는 종양 보유 래트에서 ET-1 투여 후 60 분 및 120 분에서 기준선으로 돌아갔다.

[0082] 종양 보유 래트에서 CMBC는 정상 래트와 비교 시 ET-1 투여 60 분 후에 유의적으로 증가하였다(54%; p<0.05). CMBC는 ET-1 투여 후 120분에 기준선으로 돌아갔다. RBC의 속도는 정상 래트에 비해 ET-1 투여 후 30 분에 유의적으로 증가하였다(252%; p<0.05). ET-1 투여 후 2 시간(120 분), 종양 보유 래트에서 RBC의 속도는 기준선으로 돌아갔다(도 4A~4C).

[0083] 다른 연구는 정상 래트 및 유방 종양을 가진 래트의 전신 혈역학 및 유방의 조직으로의 혈류에 있어서 ET-1 주입에 의해 유도된 변화에 대한 ET_B 수용체의 역할을 평가하였다. BQ788(즉, N-시스-2,6-디메틸페리디노카보닐-L-감마-메틸-유실-D-1-메톡시카보닐트립토파닐-D-Nle)은 IC₅₀ 값이 1.2 nM인 ET_B 수용체로의 결합을 억제하는 특이적 ET_B 수용체 길항제이다. 그러므로, BQ788은 유방 종양의 ET-1 유도된 혈관확장에서 ET_B 수용체의 역할을 결정하는 데 사용되었다. 이 연구는 동물들을 하기의 그룹으로 나누는 것을 제외하고는 이전 연구에서 기술한 방법을 이용하였다:

[0084] 그룹 I: 정상 염수 처리한 래트(N=5)에서 20 분간 BQ788(미국 웨朋友们对 캠파니 주식회사(Sunnyvale, Calif) 0.5 pmol/kg으로 염수 중 용해) 주입한 후 30 분간 ET-1(50 ng/kg/min) 주입; 및

[0085] 그룹 II: 종양 보유 MNU 처리한 래트(50 mg/kg, i.p.) (N=5)에서 20 분간 BQ788(0.5 pmol/kg) 주입한 후 30 분간 ET-1(50 ng/kg/min) 주입.

[0086] 도 5A~5C는 각각 종양 보유 래트 및 정상 래트에서 혈액 관류, CMBC 및 RBC 속도의 ET-1에 의해 유도된 변화에 대한 BQ788의 효과를 나타낸다. 정상 래트의 유방 조직에서 혈액 관류는 BQ788 투여 또는 ET-1 주입 후에 유의적으로 변화하지 않았다. 하지만, 종양 보유 래트의 유방 종양 조직 중 관류는 BQ788을 미리 처리한 래트에서 ET-1 주입에 따라 30 분(25.25.+-5.7%; P<0.05) 및 60 분(25.17.+-2.8%; P<0.05)에서 유의적으로 감소하였다. BQ788을 사용한 전처리는 종양 보유 래트에서 ET-1에 의해 유도된 관류 증가를 약하게 하였다. BQ788을 전처리한 래트에서 ET-1 투여 후 종양 보유 래트와 정상 래트의 유방 조직 중 관류 사이에 아무런 차이 점도 관찰되지 않았다. 이 결과는 ET-1 유도된 혈관확장 반응이 ET_B 수용체를 통해 조정됨을 제시한다.

[0087] 종양 보유 래트에서 기준선 CMBC는 정상 래트의 유방 조직의 기준선 CMBC보다 유의적으로 더 높다(42.4%; P<0.05). 하지만, BQ788 주입 후, 종양 보유 래트 및 정상 래트의 CMBC 사이에 아무런 차이 점도 관찰되지 않았다. 또한, 2개의 그룹 사이에 RBC의 속도 차이는 전혀 관찰되지 않았다(도 5A~5C).

[0088] 앞선 검증은 염수 처리한 래트와 MNU 처리한 종양 보유 래트의 전신 혈역학 및 유방 조직으로의 혈류에 대한 ET-1의 효과를 나타낸다. ET-1은 VEGF의 생성을 촉진함으로써 혈관신생을 자극하는 것으로 알려져 있다. 연구는 ET-1이 유방 암종(Yamashita *et al.*, Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 74:363 (1991)), 유방 염상 종양(Yamashita *et al.*, Cancer Res, 52:4046 (1992)), 전립선 암종(Nelson *et al.*, Cancer Res, 56:663 (1996)), 간 암종(Kar *et al.*, Biochem Biophys Res Commun 216:514 (1995)) 및 몇몇 수막종(Pagotto *et al.*, J Clin Invest, 96:2017 (1995))과 같은 대부분의 암 조직에서 증가됨을 보여주고 있다. 앞선 검증은 유방 종양에서 ET-1 유도된 혈관 반응에서 변화를 증명한다. 이러한 검증에서 사용된 방법은 전신 혈역학 및 국부 혈액 순환을 연구하기 위해 잘 수립된 방사성 마이크로스피어 기술이었다. 문헌[Gulati *et al.*, Am J Physiol, 273:H827 (1997); Gulati *et al.*, Crit Care Med, 24:137 (1996); Gulati *et al.*, J Lab Clin Med, 126:559 (1995); Gulati *et al.*, Life Sci, 55:827 (1994)].

실시예 3. 파클리탁셀의 약물동력학에 대한 IRL1620의 효과

[0089] 신체에서 혈류 동력학을 변경하는 것은 치료 부분의 약물 동력학에 유의적으로 영향을 미치며, 파클리탁셀은 복합적인 약물동력학 특성을 가지는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Sparreboom *et al.*, Cancer Res 56:2112 (1996a); Gianni *et al.*, J Natl Cancer Inst 87:1169 (1995b); Sonnichsen & Relling, Clin Pharmacokinet 27:256 (1994); Huizing *et al.*, J Clin Oncol 11:2127 (1993); Brown *et al.*, J Clin Oncol 9: 1261 (1991); Longnecker *et al.*, Cancer Treat Rep 71:53 (1987); Wiemik *et al.*, Cancer Res 47:2486 (1987b)] 참조. 그러므로, 파클리탁셀의 혈장 약물동력학에 대한 IRL1620의 영향을 이해하는 것이 중요하다. 그려므로, 현재 기술되는 연구는 IRL1620, 선택적인 ET_B 수용체 효능제가 유방 종양 보유 래트에서 파클리탁셀의

약물동력학을 변경시키는지를 결정하기 위해 수행하였다.

[0091] 48일(120~140 g)된 동정 암컷 Sprague Dawley 래트(Harlan Co., Madison, WI)를 이 연구에서 사용하였다. 도착하자마자, 온도 조절된 방($23\pm1^{\circ}\text{C}$)에서, 습도($50\pm10\%$) 및 인공 빛(0600~1800 hr)으로 우리 당 3마리씩 길렀다. 상기 동물들에게 먹이와 물을 자유 급식(*ad libitum*)으로 주었다. 동물들이 상기 환경에 적어도 4일 동안 순응된 후에 실험을 수행하였다.

[0092] IRL1620을 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 파클리탁셀(6 mg/mL 용액)은 Ben Venue Laboratories Inc.(Bedford OH)로부터 구입하였다. 케타민 및 자이라진은 Phoenix Scientific, Inc.(St. Joseph, MO)로부터 구입하였다. [^{3}H]-파클리탁셀(1mCi, 6.4 Ci/mmol, 특이적 활성)은 Moravek Biochemicals(Moravek Biochemicals, CA)로부터 구입하였다. 우레탄은 Sigma Aldrich(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)로부터 구입하였다.

[0093] N-메틸-n-니트로소우레아(MNU)를 50 mg/kg의 투여량으로 i.p. 투여하고, 래트를 주당 2번씩 촉진하였다. 종양이 약 75~100mm³에 도달하면, 약물동력학 연구를 수행하였다.

[0094] HPLC-UV 연구. 래트를 우레탄(1.5 mg/kg)(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)의 단일 i.p. 주사로 마취시켰다. 우측 대퇴부 부위를 면도하고, 수술용 살균제 및 알코올로 씻어주었다. 우측 대퇴부 동맥 및 정맥을 노출시키고, 멸균 PE-50 관을 사용하여 캐뉼러를 꽂았다. 목을 면도하고, 수술용 살균제 및 알코올로 씻어주었다. 목 부위 주변에 중앙 절개를 하고, 호흡관을 삽입하여 동물용 인공호흡기(모델 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA)에 연결하였다. 모든 수술들은 마취 상태 하에 수행하였다. 네오스포린 항생물질 크림(Pfizer, Morris Plains, NJ)을 상처에 발라 감염을 방지하였다. 약물 투여 전에 45 분 회복 기간을 주었다.

[0095] 정상(염수 처리한) 래트 및 종양 보유(MNU 처리한) 래트를 사용하였다. IRL1620(3 nmol/kg) 또는 비히를 (염수, 3 mL/kg) 투여 15 분 후에 파클리탁셀을 i.v. (3 mg/kg) 주었다. IRL1620 투여 전에 혈액을 모아서 기준선 값을 제공하였다. 파클리탁셀 투여 후 기준선, 5 분, 30 분 및 2 시간, 6 시간 및 10 시간에 상기 래트로부터 혈액 0.5 mL를 혈액 분리기로 채혈하였다. 샘플을 원심분리하고, 혈장을 모아 분석할 때까지 -80°C에서 저장하였다.

[0096] 혈장 샘플은 HPLC 시스템을 이용하여 파클리탁셀에 대해 분석하였다. 즉, 혈장을 해동시키고, 13 x 100 유리 배양튜브에서 체내 기준 N-시클로헥실 벤즈아미드(3 mM, 하부 표준 곡선 및 30 mM, 상부 표준 곡선) 50 μl 및 에틸렌 에테르(Fisher Scientific, Chicago, IL) 3 mL와 혼합하였다. 이 혼합물을 왕복식 진탕기를 이용하여 5 분간 진탕시킨 후 4°C에서 3,000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다. 얻어진 상청액을 13 x 100 봉규산염 유리 배양튜브로 옮기고, 가열된 수조(37°C)에서 질소의 흐름 하에 증발시켰다. 잔여물을 이동상 A(50% 탈이온수, 50% 아세토니트릴) 200 μl 를 사용하여 원래대로 하였다. 원래대로 한 물질의 약수 100 μl (하부 표준 곡선 및 IV 투여 후 수집된 샘플)를 227 nm에서 설정된 Waters 2487 흡광도 측정기에 연결된 Waters 2695 분리 모듈을 이용하여 4 mm NovaPak 20 x 3.9 mm C18 전치 칼럼 다음의 4 mm NovaPak 150 x 3.9 mm C18 칼럼(Waters Associates, Milford, MA)에 주입하였다. 직선 구배가 1 mL/min의 유속으로 펌핑되는 100% 이동상 A로 시작되었다. 그 다음, 이동상 A는 10~11 분 70%로 감소되고, 이동상 A를 11~16 분간 70%에서 유지하여 다음 주입 전에 칼럼으로부터 천천히 용리되는 물질을 제거하였다. 이어서, 이동상 A가 16~17 분 100%로 증가되고 100% 이동상 A는 3 분간 유지하여 총 가동 시간은 20 분이었다. 파클리탁셀에 대한 혈장 농도는 파클리탁셀 피크의 면적 대 작은 사각형(least-squares) 직선 퇴보를 이용한 N-시클로헥실 벤즈아미드 피크의 면적의 비율로부터 계산하였고, 1/x를 곱하였다. 변동 계수에 의해 측정한 하루 이내 및 날들 사이 변화성은 <10%였다. 정상 래트 및 종양 보유 래트의 혈장 농도 프로파일을 비교하였다.

[0097] 액체 섬광 계측기 연구. 래트는 케타민(100 mg/kg) 및 자이라진(2 mg/kg)의 조합을 단일 i.p. 주사 하여 마취하였다. 목을 면도하고, 수술용 살균제 및 알코올로 씻어주었다. 우측 경동맥을 노출시키고, 멸균 PE-50 관을 사용하여 캐뉼러를 꽂았다. 목 부위 둘레를 중앙 절개하고, 좌측 경동맥을 혈액 샘플화를 위해 PE50 관을 사용하여 캐뉼러를 꽂았다. 도뇨관에 피하 터널을 만들고 목의 기저에서 적출한 후 수술용 가위를 이용하여 봉하였다. 문헌[Buehler *et al.*, Free Radic Biol Med 37:124 (2004)]. 열린 관을 낚싯줄로 막았다. 모든 수술은 마취 상태에서 수행하였다. 네오스포린 항생물질 크림(Pfizer, Morris Plains, NJ)을 상처에 발라 감염을 예방하였다. 약물 투여 전에 45 분 회복 기간을 주었다.

[0098] IRL1620을 종양 보유 동물에게 3 nmol/kg의 양으로 i.v. 투여하였다. [^{3}H]-파클리탁셀(160 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$)을 분류되지

않은 파클리탁셀과 혼합하였다. 비히를 또는 IRL1620 투여 15분 후에 파클리탁셀을 i.v. 투여하였다.

[0099] 혈장을 비히를 또는 IRL1620 투여 전에 수집하여 기준선 값을 제공하였다. 대략, 0.2 mL의 혈액을 기준선, 1 분, 5 분, 15 분 및 30 분과 1 시간, 2 시간, 4 시간, 6 시간, 8 시간, 12 시간 및 24 시간에 혼화 시린지로 래트로부터 채혈하였다. 이 샘플을 원심분리하고, 혈장을 분리하여 분석할 때까지 -80°C에서 저장하였다.

[0100] 혈장 샘플 중 [³H]-파클리탁셀의 농도는 베크만 코울터 액체 섭광 계측기(모델 LS 6500)를 이용하여 측정하였다. 즉, 혈장을 해동시키고 액체 섭광 카테일 20 mL와 혼합하였다. 이 샘플을 계수하고, 계산값을 "dpm" 단위에서 "fmol/mL"로 하기의 식을 이용하여 전환하였다:

$$\text{fmol/mL} = \text{dpm 값} \times \text{부식 인자} \times 2.2 \times 10^{-12} / 10^{-12} \times \text{샘플의 체적(mL)}$$

[0102] fmol/mL로 전환 후, 총 파클리탁셀의 약물동력학을 [³H]-파클리탁셀 대 분류되지 않은 파클리탁셀의 비를 이용하여 측정하였다. 혈장 파클리탁셀 약물동력학 추정치는 WinNonlin Pro 4.1(Pharsight Corp, Mt. View, CA)에서 실행된 바와 같은 통합적 분석 및 구획적 분석 둘 다를 이용하여 결정되었다.

[0103] 통합적 분석에 있어서, 곡선(AUC_{0-∞}) 아래 면적은 최종 측정가능한 농도(클라스트)에 대해 사다리꼴 공식을 이용하여 추정하고, 긴 직선형 혈장 농도 대 시간 곡선의 말단 기울기(λ)의 음의 값에 의해 클라스트를 나눔으로써 무한대로 추정하였다. 또한 하기의 파라미터들을 측정하였다: 평균 체류 시간(MRT_{IV})을 λ 의 역수로서 계산하였고, 전신 클리어런스(CL)는 용량 대 AUC_{0-∞}의 비로서 계산하였고, 명백한 체적 분포는 CL과 λ 의 비로서 계산하였다. 혈장 반감기는 0.693(자연 로그 2)과 MRT_{IV}의 곱으로서 계산하였다.

[0104] 구획적 분석에 있어서, 일련의 비선형 구분 모델을 혈장 농도 대 시간 곡선 데이터에 끼워맞췄다. 특히, 1 구획, 2 구획 및 3 구획 모델을 비교하였다. 가중치를 기반으로 한 일정하고 예상된 데이터를 검증하였다. 상기 모델의 최종 선택은 진단상 도식(관찰 대 예상 및 잔여물의 도식), Akaike 정보 기준(AIC) 및 Schwartz 기준(SC)을 기초로 하였다. 더 낮은 AIC 및 SC 기준을 가진 모델을 최종 모델로 하였다.

[0105] 데이터는 HPLC-UV 연구를 위한 던칸 검증법에 의해 행해진 One Way ANOVA 및 액체 섭광 연구를 위한 t-test에 의해 분석하였다. p<0.05를 유의적으로 간주하였다. 이러한 약물학적 반응 연구에서 측정된 주요 결과는 혈장의 파클리탁셀 농도 차이였다.

[0106] 파클리탁셀의 약물동력학 프로파일은 정상 래트 또는 종양 보유 래트에서 IRL1620 투여(도 6 및 7)에 의해 영향 받지 않았다. 혈장 약물동력학 프로파일의 HPLC 분석은 방사성 파클리탁셀 배치의 더욱 광범위한 프로파일과 유사하다. 도 7은 비히를 처리하고 IRL1620 처리한 종양 보유 래트에서 파클리탁셀 방사능의 약물동력학 프로파일을 묘사한다. 상기 약물동력학 프로파일은 통합적 및 구획적 방법으로 분석하였다.

[0107] 통합적 분석에 있어서, 비히를 + 파클리탁셀 그룹에 대해 계산된 AUC는 $9433.53 \pm 1465.00 \text{ ng h/mL}$ 였고, IRL1620 처리한 종양 래트의 것과 유사하였다($p > 0.05$). 제거 반감기를 0.14 ± 0.08 시간으로서 계산하였다. 용량/AUC로서 계산된 클리어런스는 $0.56 \pm 0.07 \text{ L/h/kg}$ 로 추정되었다. 클리어런스/Ke1로서 계산된 분포의 체적은 $10.11 \pm 4.17 \text{ L/kg}$ 로 관찰되었다. 전반적으로, 하기의 표에서 알 수 있는 바와 같이, IRL1620은 파클리탁셀의 약물동력학 프로파일에 영향을 미치지 않는다.

그룹	비히를 + 파클리탁셀	IRL1620
λ (h)	0.14 ± 0.08	0.10 ± 0.05
C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	6.73 ± 0.54	5.85 ± 0.77
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	9.43 ± 1.47	8.63 ± 0.79
CL (L/h/Kg)	0.56 ± 0.07	0.60 ± 0.06
Vd (L/Kg)	10.11 ± 4.18	9.56 ± 2.90
Vss (L/Kg)	8.14 ± 2.95	8.15 ± 2.20
MRT _{inf} (h)	17.43 ± 8.13	14.48 ± 4.70

[0109] 파클리탁셀의 혈장 농도를 혈장 샘플에서 dpm 계수로부터 측정하였다. 3구획 모델이 파클리탁셀의 약물동력학을 가장 잘 기술하였다. 도 8은 비히를 처리한 래트 및 IRL1620 처리한 래트 둘 다에 대한 관찰 대 예상 약물동력

학 도식을 도시한다. 비히클 처리한 래트에 있어서 파클리탁셀의 AUC는 $9.42 \pm 3.18 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 였다. 분포의 안정된 상태 체적(V_{ss})은 $10.31 \pm 4.54 \text{ L/Kg}$ 였다. 클리어런스는 $0.69 \pm 0.17 \text{ L/h/Kg}$ 로 추정되었다. $\alpha t_{1/2}$, $\beta t_{1/2}$, $Yt_{1/2}$ 은 각각 0.03 ± 0.01 시간, 1.0 ± 0.32 시간 및 25.87 ± 17.81 시간이었다. 평균 체류 시간은 27.92 ± 19.84 시간이었다. 하기의 표에서 알 수 있는 바와 같이, IRL1620 처리한 그룹에서 추정된 이들 파라미터는 비히클 처리한 그룹에서의 것들과 유의적으로 다르지 않다.

[0110] IRL1620은 파클리탁셀의 약물동력학 프로파일에 영향을 미치지 않는다.

[0111]

그룹	비히클 + 파클리탁셀	IRL1620
$AUC_{0-\infty} (\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL})$	9.42 ± 3.18	7.25 ± 0.75
$C_1 (\text{L/h/Kg})$	0.69 ± 0.17	0.72 ± 0.09
$MRT (\text{h})$	27.92 ± 19.84	10.58 ± 3.20
$V_{ss} (\text{L/Kg})$	10.31 ± 4.54	7.28 ± 1.79
$\alpha t_{1/2}$	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01
$\beta t_{1/2}$	1.0 ± 0.32	0.84 ± 0.32
$Yt_{1/2}$	25.87 ± 17.81	9.42 ± 2.59
K_{10}	3.14 ± 1.34	1.72 ± 0.57
K_{12}	56.47 ± 27.69	34.93 ± 23.26
K_{13}	5.71 ± 3.37	3.92 ± 1.88

[0112] 이 연구에 있어서, 3구획 모델이 파클리탁셀의 혈장 약물동력학을 가장 잘 기재하였다. 이 모델은 기관에서의 혈액 관류가 고, 중 또는 저인 다양한 기관에 분포되어 있음을 제시한다. IRL1620 투여는 파클리탁셀의 분포를 변화시키지 않았다. 3구획 모델에 의해 발생된 혈장 약물동력학 파라미터는 비교할만한 클리어런스, 분포 및 흡수의 체적, 비히클과 IRL1620으로 처리한 그룹에 대한 분포 및 제거 반감기를 나타내었다. 하지만, IRL1620은 종양 혈액 관류 및 종양 파클리탁셀 농도를 증가시킨다. 문헌[Rai *et al.*, American Association of Pharmaceutical Scientists, Pharmaceutics and Drug Delivery Conference. Philadelphia, PA (2004); Rai & Gulati, Cancer Chemother Pharmacol, 51:21 (2003)]. 그러므로, IRL1620은 파클리탁셀의 약물동력학 프로파일을 유의적으로 변경하지 않고 종양 관류를 선택적으로 증가시킨다.

[0113] 이러한 연구들은 IRL1620의 사용이 파클리탁셀의 약물동력학에 영향을 미치지 않음을 증명하였다. 종종 약물동력학은 화합물의 안정성을 위한 대리로서 간주될 수 있다. 그러므로 이것들은 또한 파클리탁셀 용량의 안정성이 IRL1620의 투여로 인해 변화하지 않음을 제시한다. 그 결과로서, IRL1620은 파클리탁셀 효능을 향상시키기 위해 사용될 수 있고, 그것의 심각한 독성을 최소화하기 위한 적당한 투여량 적정을 고려한다.

[0114] 실시예 4. IRL1620의 용량 반응 효과, 주요 기관 및 종양 조직에서 [^3H] 파클리탁셀의 생체내 분포에 대한 IRL1620의 효과 및 종양 상태에 대한 파클리탁셀 효능에 대한 IRL1620의 효과

[0115] 본 실시예에서 기술한 실험들은 (a) 정상 래트 및 종양 보유 래트의 유방 관류에 대한 ET_B 수용체 효능제, IRL1620의 용량 반응 효과, (b) 주요 기관 및 종양 조직에서 [^3H] 파클리탁셀의 생체내 분포에 대한 IRL1620의 효과 및 (3) MNU 유발된 유방 종양 보유 래트에서 종양 상태에 대한 파클리탁셀의 효능에 대한 IRL1620의 효과를 자세히 평가하고자 하는 것이다.

[0116] 40일된 동정 암컷 Sprague Dawley 래트(Harlan Company, Madison, WI)를 구입하여, $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 온도 조절된 방에서 우리 당 2마리씩 키우고, 12 시간 빛/12 시간 어둠의 스케줄 하에 유지하였다. 그들에게 물과 표준 설치류식이를 임의로 주었다.

[0117] IRL1620은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 얻었다. [^3H] 파클리탁셀은 Moravek Biochemicals(Brea, CA)로부터 구입하였다. 파클리탁셀(6 mg/ml 용액)은 Ben Venue Laboratories Inc.(Bedford, OH)로부터 구입하였다. 케타민 및 자이라진은 Phoenix Scientific, Inc.(St. Joseph, MO)로부터 구입하였다. 조직 가용화제(TS-

2)는 RPI Corp.(Chicago, IL)로부터 구입하였다.

[0118] 48일된 각각의 동물에게 50 mg/kg의 양의 N-메틸 니트로소우레아(MNU, Ash Stevens, Detroit, MI)를 단일 i.p. 주사하였다. MNU를 3% 아세트산에 용해시키고, 0.9% NaCl(최종 농도 12.5 mg/ml) 중에 희석시키고, 조제 30 분 내에 투여하였다. 이 처리는 대략 100 일간 발암 물질 처리로 래트에서 거의 100% 유방 선암 발병률을 유도한다. 문헌[Mehta, Eur J Cancer, 36:1275 (2000)]. 종양 출현 및 위치를 손으로 하는 유방선 측진에 의해 모니터하고, 종양 표면을 디지털 캘리퍼를 사용하여 측정하였다. 연구를 위해 종양 체적이 500~800 mm³인 래트를 선별하였다.

[0119] 관류 연구. 래트 유방의 조직으로의 관류 및 종양은 이미 기술한 바와 같이 Periflux PF2b 4000 레이저 도플러 유속측정기(Perimed, Stockholm, Sweden)를 이용하여 측정하였다. 즉, 래트를 케타민(100 mg/kg) 및 자이라진(2 mg/kg)을 혼합한 단일 i.p 주사로서 사용하여 마취하였다. 젖꼭지 주변의 털을 면도하고, 동물들을 가열 패드(37°C) 위에 놓고 온도 변동을 최소화하였다. 유방선 주변의 피부를 약 6 mm 너비 및 약 4 mm 길이로 절개하였다. 표준 모델 섬유 광학 프로브(MP3 flow probe, Moors Instruments, Devon, England)를 노출된 조직의 표면에 적용하였다. 그 다음 Periflux PF2b 4000 레이저 도플러 유속측정기에 연결하였다. 시간 상수를 1.5 초로 설정하고, 밴드너비는 4 kHz로 설정하였다. 이 방법은 적혈구 수 및 속도에 의해 결정된 레이저 광(플럭스)에서 Doppler 이동을 측정하고, 조직의 주어진 체적에서와 같이 전체 혈류에 비례한다. 플럭스 값은 Polyview 소프트웨어를 사용하여 얻어졌다. 안정한 기록의 15 분 기준선은 염수 또는 IRL1620의 투여 전에 얻어졌다. 동물들에게 1, 3 또는 9 nmol/kg의 IRL1620을 투여하고, 관류를 3시간 동안 기록하였다. 각각의 용량을 적어도 4마리 동물에게 투여하였다.

[0120] 종양 관류에 대한 IRL1620 투여의 효과는 일시적이고 용량 관련된 것을 관찰하였다(도 9A). 종양 관류에서 기준선으로부터 244.0%(p<0.001)의 최대 증가는 3 nmol/kg IRL1620의 투여 후 30 분에 관찰되었다. 기준선뿐 아니라 염수 처리한 래트에 비할 때 관류 증가는 15, 30 및 60 분에서 유의적인 것으로 관찰하였다(도 9A 및 9B). 1 및 9 nmol/kg의 IRL1620의 투여는 기준선 관류 및 염수 처리한 래트의 것에 비해 유방 종양 관류에서 단지 최저 증가를 산출하였다. 관류(60.9 및 63.3%)의 최대 증가는 1 및 9 nmol/kg의 IRL1620 후에 각각 120 분 및 30 분에 기록하였다. 하지만, 9 nmol/kg의 IRL1620을 사용하여 처리한 동물에서 관류 증가는 염수 처리한 래트(도 9A)에 비할 때 15, 30 및 60 분에서 유의적으로 관찰되었다. 종양 보유 래트로의 염수 투여는 기준선에 비해 혈액 관류의 임의의 유의적인 변화를 산출하지 않았다(도 9A). 염수 또는 1, 3 또는 9 nmol/kg IRL1620의 투여는 정상 암컷 래트에서 유방 관류의 임의의 유의적인 변화를 산출하지 않았다(데이터 나타내지 않음).

[0121] 이러한 결과들은 3 nmol/kg 또는 9 nmol/kg IRL1620의 투여가 기준선 및 비히를 처리한 래트에 비해 종양 관류 증가를 산출하는 것을 보여준다. 1, 3 및 9 nmol/kg IRL1620 모두가 종양 관류를 다소 증가시키지만, 3 nmol/kg 용량이 최대 효과를 산출한다.

[0122] 생체내 분포 연구. 이미 기술한 바와 같은 종양 형성에 이어, 케타민(100 mg/kg) 및 자이라진(2 mg/kg)을 혼합 i.p 주사로서 래트를 마취하였다. 체중, 종양 위치 및 래트의 종양 체적을 기록하였다. 그 다음 동물을 무작위 그룹으로 나누고, 최종 체적 0.2 ml로 꼬리 정맥을 통해 염수 또는 IRL1620(3 nmol/kg)을 주었다. 그 다음 각각의 그룹으로부터의 래트에게 최종 체적 1.0 ml의 [³H] 파클리탁셀(크레모퍼 EL 및 에탄올(50:50) 중 40 μ Ci/래트) IRL1620 후 15, 120 및 240 분에 주었다. 각각의 시간 지점에 대해 6 마리의 래트를 연구하여, 총 36 마리의 래트를 이용하였다. 동물들을 [³H] 파클리탁셀의 투여 3 시간 후에 희생시켰다. [³H] 파클리탁셀의 농도는 종양 조직, 신장, 간, 폐 및 비장에서 측정하였다. 특히, 상기 종양 및 기관을 작은 조각으로 얇게 잘랐다. 조직 또는 종양 중 약 500 mg을 조직 가용화제(6 ml)를 함유하는 분리 바이알에 놓고, 50°C에서 수조에서 배양하였다. 조직 또는 종양이 용해된 후 이 바이알을 수조로부터 제거하고, 10% 빙초산 1.2 ml를 넣었다. 이 바이알의 내용물을 3개의 바이알로 똑같이 나누고, 액체 섬광 칵테일(Safety Solve, RPI Corp, Chicago, IL) 15 ml를 각각의 바이알에 넣고, 평형을 위해 밤새 유지하였다. 튜브 내 방사능을 액체 섬광 계수기(Beckman Coulter, LS 6500)를 이용하여 계수하였다.

[0123] 종양에서 [³H] 파클리탁셀의 농도는 염수 처리한 래트에 비해 IRL1620(3 nmol/kg) 처리한 래트에서 유의적으로 증가하였다. 최대 효과는 IRL1620 투여 15 분 후 파클리탁셀을 투여한 동물의 그룹에서 관찰되었다. IRL1620 투여 후 각각 15, 120 및 240 분에 투여했을 때 종양 파클리탁셀 농도에 있어서 277.1, 151.9 및 34.7% 증가를 관찰하였다(도 10). 대조구 동물과 비교하였을 때, IRL1620 투여는 간, 폐, 신장 및 비장에서 파클리탁셀의 축적을 유의적으로 변경하지는 않았다(도 10).

[0124] **효능 연구.** 종양 보유(MNU 처리한) 동물을 무작위로 7개의 그룹으로 나누었다(12 래트/그룹):

[0125] 그룹 I - 염수;

[0126] 그룹 II - IRL1620(3 nmol/kg);

[0127] 그룹 III - 크레모포 EL:에탄올;

[0128] 그룹 IV - 비히클(염수) + 파클리탁셀(1 mg/kg);

[0129] 그룹 V - 비히클(염수) + 파클리탁셀(5 mg/kg);

[0130] 그룹 VI - IRL1620(3 nmol/kg) + 파클리탁셀(1 mg/kg); 및

[0131] 그룹 VII - IRL1620(3 nmol/kg) + 파클리탁셀(5 mg/kg).

[0132] 투여 스케줄은 3 일에 1번씩 총 5번 투여였다. 체중, 종양 크기 및 위치는 최종 투여 후에 3 일마다 총 30 일간 모니터하였다. 점수화를 위해 하기의 카테고리를 이용하였다: 진행: 처리 개시에 비해 종양이 40 면적%보다 많이 자랐다; 정체: 처리 과정 내내 종양은 그것의 초기 면적으로부터 40%보다 크게 변동하지는 않았다; 부분적 퇴보: 종양은 초기 면적으로부터 40%보다 많이 회귀하였다; 완전한 단축: 종양이 더이상 축진되거나 측정되지 않는다; 종양 다양화: 처리 및 30 일 관찰 기간 동안 새로운 종양의 출현. 최종(5 번째) 투여 후 30 일에 동물들을 희생시켰다. 데이터는 분산분석 후 던칸 검증법을 이용하여 분석하였다. P<0.05의 정도를 유의적으로 간주하였다.

[0133] **체중.** 기준선(치료 시작 전)에서 최종 투여 후 30 일까지의 동물 체중 차이%는 도 11에 주어진다. 염수 처리한 대조구 래트에서 실험의 마지막에 체중 증가%는 $7.2 \pm 1.7\%$ 였다. 비히클 + 파클리탁셀(1 mg/kg), 비히클 + 파클리탁셀(5 mg/kg), IRL1620 + 파클리탁셀 1 mg/kg 및 IRL1620 + 파클리탁셀 5 mg/kg을 처리한 동물들의 그룹에서 각각 5.1 ± 3.6 , 9.4 ± 2.4 , 14.3 ± 3.1 및 $13.1 \pm 1.8\%$ 의 체중 증가가 있었다(도 11). 기준선에 비한 크레모포 EL:에탄올 및 IRL1620을 투여한 동물의 체중 증가%는 <10%로 관찰되었다(데이터는 나타내지 않음).

[0134] **종양 체적.** 다양한 그룹에서 종양 크기는 비교할만하고, 처리 초기에 서로 유의적으로 상이하지는 않다(도 12). 대조구 래트의 종양 체적은 빠르고 변하기 쉬운 속도로 증가하였다. 종양 성장의 큰 변화성은 자생적으로 자라는 종양의 무작위 성장 패턴 탓일 수 있다. 30일 관찰 기간의 마지막에, 대조구 종양의 종양 체적은 $2693.4 \pm 790.9 \text{ mm}^3$ 였다. IRL1620 처리한 래트는 유사한 성장 패턴을 보였고, 최종 종양 체적이 $2560.5 \pm 844.4 \text{ mm}^3$ 였다. 크레모포 EL:에탄올 처리는 또한 유사한 성장 패턴을 보였고, 최종 종양 체적이 $2338 \pm 1329 \text{ mm}^3$ 였다. 따라서, IRL1620 및 크레모포 EL:에탄올은 그것들 자체가 MNU 유도된 유방 종양의 성장에 유의적인 영향을 미치지는 않았다(데이터는 나타내지 않음). 비히클 + 파클리탁셀(1 mg/kg) 처리한 래트는 종양 크기 성장의 약한 감소를 나타내었다($1960.8 \pm 611.9 \text{ mm}^3$). 비히클 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 그룹은 대조구 래트와 비교했을 때 종양 체적에서 더 큰 감소를 나타내었다($1682.7 \pm 497.3 \text{ mm}^3$). IRL1620 + 파클리탁셀(1 mg/kg) 처리한 래트는 또한 종양 크기 감소를 나타내었다($1707.2 \pm 621.1 \text{ mm}^3$). 하지만, 최저의 평균 종양 크기($730.1 \pm 219.4 \text{ mm}^3$)는 IRL1620 + 파클리탁셀(5 mg/kg)로 처리한 동물의 그룹에서 관찰되었다. IRL1620에 이어 5 mg/kg의 파클리탁셀을 3 일마다 총 5번 투여하는 것은 염수 + 파클리탁셀(5 mg/kg)을 투여한 래트에 비해 종양 체적을 유의적으로($p<0.05$) 감소시켰다(도 12). 또한 IRL1620 또는 크레모포 EL:에탄올(데이터를 나타내지 않음)로 처리한 래트에 비교할 때 IRL1620 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 그룹에서 종양 체적이 더 낮게 관찰되었다.

[0135] **종양 다양성.** 모든 처리 그룹의 동물들은 30 일 관찰 기간의 마지막에 추가적인 종양이 자랐다. 염수, 크레모포 EL:에탄올 및 IRL1620으로 처리한 동물들에게서 추가의 종양은 각각 58.4, 57.1 및 60.8% 증가한다. 비히클 + 파클리탁셀(각각 1 및 5 mg/kg)을 투여한 동물들에 있어서 새로운 종양 발생은 78.3 및 41%로 관찰되었다. 하지만, IRL1620 + 파클리탁셀(각각 1 및 5 mg/kg)에서 추가 종양의 퍼센트는 69.2 및 44.8%로 관찰되었다(데이터를 나타내지 않음).

[0136] **종양 진행.** 진행되고, 정체 시 잔존하고, 복귀되거나 사라지는 종양의 퍼센트는 앞서 언급한 바와 같이 계산하였다. 염수 처리한 그룹에서 종양의 73.5%가 초기 종양 크기의 40% 넘게 진행했다. IRL1620(82.7%) 및 크레모포 EL:에탄올(80.4%) 처리한 그룹은 초기 종양 크기의 40% 이상 종양 진행 퍼센트와 유사하였다. 더 낮은 퍼센트의 종양이 비히클 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 그룹(71.4%), 비히클 + 파클리탁셀(1 mg/kg) 그룹(61.1%) 및 IRL1620 + 파클리탁셀(1 mg/kg) 그룹(69%)에서 진행하였다. 그러나, 최저 퍼센트(40%)는 IRL1620 + 파클리탁

셀(5 mg/kg) 그룹에서 보여졌다(도 13).

[0137] **종양 정체.** 염수 처리한 래트에서 종양의 16.9%는 30 일 종말점에 40% 범위를 넘게 자라지는 않는 정제된 상태였다. 다른 대조구 그룹은 정체된 상태인 종양의 퍼센트가 약간 낮게 나타났다: IRL1620(13.7%), 크레모포 EL:에탄올(15.2%). 비히클 + 파클리탁셀(1 mg/kg)(22.2%) 및 비히클 + 파클리탁셀(5 mg/kg)(19.5%) 처리한 래트는 정체 상태인 종양의 더 높은 퍼센트를 나타내었다. IRL1620 + 파클리탁셀(1 mg/kg)(23.8%) 처리한 래트 및 IRL1620 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 처리한 래트는 정체 상태인 종양의 가장 큰 퍼센트를 나타내었다(26.6%)(도 13).

[0138] **종양 퇴보.** 5 mg/kg 파클리탁셀 처리에 앞서 IRL1620의 투여는 대조구 동물에 비해 종양의 진행이 유의적으로 감소되는 것을 나타내었다. 염수 처리한 래트는 종양의 9.2%가 초기 종양 체적으로부터 퇴보하는 것을 나타내었다. 크레모포 EL:에탄올(4.3%), IRL1620(3.4%) 및 비히클 + 파클리탁셀 (1 mg/kg)(9.5%) 처리한 래트는 종양 크기 퇴보의 퍼센트에 있어서 대조구 그룹과 유의적으로 상이하지는 않았다. 5번째 투여 중 마지막에, 종양은 대조구 래트에 비해 IRL1620 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 처리한 래트 및 비히클 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 처리한 래트에서 각각 76.1 ± 10.5 및 $45.9 \pm 11.5\%$ 퇴보하였다. IRL1620 + 파클리탁셀(5 mg/kg) 및 비히클 + 파클리탁셀(5 mg/kg)으로 처리한 동물 그룹에서 각각 $80.2 \pm 6.9\%$ ($p < 0.05$) 및 $33.8 \pm 19.4\%$ 퇴보가 있었다(도 13). IRL1620 + 파클리탁셀(1 mg/kg) 및 비히클 + 파클리탁셀(1 mg/kg) 그룹에서 종양 퇴보율은 각각 47.1 ± 15.4 및 $37.7 \pm 16.2\%$ 이었다. IRL1620 15 분 후 파클리탁셀(5 mg/kg)의 투여는 염수 15 분 후 파클리탁셀(5 mg/kg)의 투여에 비해 유의적으로 더 큰 종양 퇴보를 산출했다. 크레모포 EL:에탄올 및 IRL1620 처리한 그룹은 임의 시점에서 대조구 래트에 비해 그들의 종양 퇴보가 유의적으로 상이하지 않았다(데이터를 나타내지 않음).

[0139] **종양 경감.** 종양이 완전하게 사라지는 완전한 퇴보는 단지 2개의 그룹에서 관찰되었다. IRL1620 + 파클리탁셀(1 mg/kg)(2.3%) 및 IRL1620 + 파클리탁셀(5 mg/kg)(15%) 처리한 래트(도 13).

[0140] 이러한 효능 연구의 결과는 IRL1620의 투여가 파클리탁셀을 투여한 염수 처리 래트에 비해 파클리탁셀 유도된 종양 체적 감소를 유의적으로 증가시킨다. 5 mg/kg 용량의 파클리탁셀로 알려진 향상된 치료상 이점은 최종 투여 후 30 일까지 유지되었다. 이는 종양 체적의 재발이 없이, 잔존하는 파클리탁셀의 효능을 증진시키는 데 있어서 IRL1620의 효과는 연구의 마지막까지 일정하게 유지되는 것을 가리킨다. 하지만, 염수 처리에 이은 파클리탁셀(1 및 5 mg/kg)의 처리는 종양 성장에 있어서 유의적인 변화를 산출하지는 않았다. 또한, 종양 다양성은 IRL1620에 이어 파클리탁셀(5 mg/kg)로 처리한 래트의 그룹에서 감소되었다. 따라서, 파클리탁셀(5 mg/kg) 이전에 IRL1620 투여는 파클리탁셀 효능에 유의적인 효과를 가진다. 이는 종양 적재, 종양 퇴보의 퍼센트, 영향없는 체중 및 다양성의 감소에 의해 설명된다. 또한, 임의의 다른 그룹에 비해 IRL1620에 이어 파클리탁셀 1 및 5 mg/kg을 처리한 동물의 그룹에서 각각 초기 종양의 2.3 및 15% 완전한 경감이 있었다.

[0141] 유방 종양 모델로부터 이 실시예들에 기재한 실험들은 ET_B 수용체 효능제, IRL1620이 종양 혈류를 유의적으로 증가시킨다는 것을 명확하게 보여준다. IRL1620의 투여가 종양 혈류의 증가를 산출하는 한편, 대조구 건강한 조직에서 관류는 변경되지 않았다. 종양 관류의 증가는 3 시간동안 지속되었다. 증가된 관류의 원도우 동안 [³H]파클리탁셀의 투여는 종양 조직에서 [³H]파클리탁셀의 농도를 유의적으로 증가시켰으나 단지 다른 기관에서는 그렇지 않았다. 게다가, 이 실시예에 기술한 실험들의 결과는 IRL1620의 투여가 파클리탁셀의 항종양 효능을 자극할 수 있다는 증거를 제공한다. 대조구 래트에 비해 3 일마다 총 5차례 파클리탁셀(5 mg/kg)로 처리한 래트의 종양 체적에 있어서 60.0% 감소가 있었다. 하지만, IRL1620 투여 15 분 후 파클리탁셀 투여는, 파클리탁셀의 마지막 투여 후 1 달에 기록했을 때 대조구 래트에 비해 종양 체적을 268.9%로 감소시켰다. 파클리탁셀만 처리한 래트에 비해 IRL1620을 투여한 래트의 종양 체적은 130.4% 감소하였다. 증가된 종양 관류는 영양분의 입수성을 증가시켜 종양 성장을 촉진시킬 수도 있다. 이러한 결과는 염수 처리한 래트에 비해 IRL1620 처리한 래트의 종양 체적 및 종양 다양성에서 유의적인 증가가 없었음을 나타내고, IRL1620만으로 종양 체적 및 다양성에 임의의 영향을 산출하지 않았음을 가리킨다.

전립선 종양 모델

[0142] **실시예 5. 전립선 종양 관류에 대한 IRL1620의 효과, 독소루비신 및 5-플루오로우라실의 생체내 분포 및 효능**

[0143] IRL1620이 유방 종양 모델에서 파클리탁셀의 효능을 증진시킬 수 있는지를 증명한 후, 또한 전립선 종양 모델에 있어서 그것의 효과를 조사하였다. 특히, 전립선 암 종양 모델에서 독소루비신(DOX) 및 5-플루오로우라실(5-FU)의 항암 효과를 증진시킬 수 있는지 없는지를 조사하였다.

[0145]

100-120 그램 체중의 5주령 코펜하겐 전립선 종양 보유 래트(Harlan, Indianapolis, IN)를 전술한 전립선 종양 모델 연구를 위해 선택하였다. 동물 설비를 조절된 온도(23±1°C), 습도(50±10 %) 및 12 시간 빛/어둠 인공 조명 스케줄(L0600~1800 h)에서 유지하였다. 래트를 우리당 3 마리씩 키우고, 음식과 물을 임의로 주었다. 수의학 실험 전 및 실험 초기에 1주 이상 래트를 환경에 순응시켰다. 모든 절차 및 동물 보호는 시카고 소재 일리노이 대학의 동물 보호 위원회에서 설립한 기준에 따랐다. 동물 설비들은 실험 동물 보호의 인가를 위한 미국 연합에 의해 공인된 연방 기준에 따라 유지하였다.

[0146]

IRL1620은 American Peptide(Sunnyvale, CA)로부터 구입하였다. [¹⁴C]독소루비신 히드로클로라이드([¹⁴C]아드리아마이신)는 GE Healthcare(Buckinghamshire, UK)로부터 구입하였다. 케타민 및 자이라진은 Phoenix Scientific, Inc.(St. Joseph, MO)로부터 구입하였다. 조직 가용화제(TS-2)는 RPI Corp.(Chicago, IL)로부터 얻었다.

[0147]

전립선 종양은 ATCC(Manassas, VA)로부터 얻은 JHU-4(MAT-LyLu) 세포를 이용하여 수컷 코펜하겐 래트에서 유발되었다. 본원에 참고로 포함된 문헌[Gaddipati *et al.*, J Exp Ther Oncol, 4(3): 203-12 (2004)] 참조. 상기 세포를 37°C에서 5% CO₂를 함유하는 적셔진 배양기에서 태아 소 혈청(10%)을 보충한 RPMI 1640 배지에서 유지하였다. 목의 등 쪽으로부터 텔을 면도하고, 동물들에게 100 μl 인산염 완충 염수 중 10,000 JHU-4(MAT-LyLu) 세포를 피하(s.c.) 주사에 의해 접종하였다. 종양 출현 및 위치는 손으로 하는 측진에 의해 모니터하고, 종양 직경을 디지털 캘리퍼를 사용하여 측정하였다. 실험 절차는 종양 크기가 약 200 mm³에 도달하면 시작했다.

[0148]

관류 연구. 래트를 혼합한 복강내(i.p.) 주사로서 케타민(100 mg/kg) 및 자이라진(2 mg/kg)을 사용하여 마취하였다. 종양 부분 둘레에 텔을 면도하고, 동물들을 가열 패드(37°C) 위에 놓고, 온도 변동을 최소화하였다. 종양 조직을 둘러싸는 피부를 약 3 mm 너비 및 약 3 mm 길이로 분리해내어 종양을 노출시켰다. Periflux PF2b 4000 레이저 도플러 유속측정기(MP3 flow probe, Moors Instruments, Devon, England)에 연결된 표준 모델 섬유 광학 프로브를 노출된 종양의 표면에 적용하였다. 시간 상수를 1.5 초로 설정하고, 밴드너비를 4 kHz로 설정하였다. 이 방법은 레이저 빛(플럭스)에서 Doppler 이동을 측정하고, 이는 적혈구 수 및 속도에 의해 측정하고, 조직의 주어진 체적 내의 총 혈류에 비례한다. 플럭스 값을 Polyview 소프트웨어를 이용하여 달성하였다. 염수 또는 IRL1620의 투여 전에 안정한 기록의 15 분 기준선을 얻었다. 동물들에게 꼬리 정맥을 통해 최종 체적 0.2 ml로 IRL1620(1, 3 또는 6 nmol/kg)를 투여하고, 관류를 3 시간동안 기록하였다.

[0149]

도 14A 및 14B에 나타낸 바와 같이, 염수 또는 1 nmol/kg IRL1620의 투여는 종양 보유 래트에서 종양 혈액 관류의 임의의 유의적인 변화를 산출하지 않았다. 3 nmol/kg 또는 6 nmol/kg의 투여는 종양 혈액 관류에서 기준선으로부터 각각 102.8% 및 79.12%의 최대 증가를 야기하였다. 이 관류 증가는 기준선 및 염수 처리 래트에 비해 15, 30 및 60 분에서 유의적이었다(*p*<0.005). 따라서, 적당한 용량의 IRL1620은 전립선 암의 동물 모델에서 종양 혈액 관류를 일시적으로 증가시킨다.

[0150]

생체내 분포 연구. 종양 보유 래트를 무작위로 그룹화하고(N=6/그룹), 최종 체적 0.2 ml로 꼬리 정맥을 통해 염수 또는 IRL1620(1, 3 또는 6 nmol/kg)을 주었다. 그 다음, 각각의 그룹으로부터의 래트에게 염수 또는 IRL1620 투여 15 분 후 최종 체적 1.0 ml로 [¹⁴C]독소루비신(1 μCi/래트)을 i.v.로 주었다. 그 다음, [¹⁴C]독소루비신 투여 3 시간 후 동물을 희생시켰다. 종양, 심장, 뇌, 신장, 간, 폐, 골수, 전립선, 골격근 및 비장에서 [¹⁴C]독소루비신의 농도를 조사하였다. 특히, 종양 및 기관을 작은 조각으로 얇게 잘랐다. 양쪽 다리로부터 대퇴골을 분리하고, 조직 가용화제를 함유하는 시린지를 사용하여 쟁아져 나온 골수의 무게를 달았다. 약 500 mg의 조직 또는 종양을 조직 가용화제(6 ml)를 함유하는 분리 바이알에 놓고, 약 50°C에서 수조에서 배양하였다. 상기 조직 또는 종양을 용해시킨 후 이 바이알을 수조로부터 제거하고, 10% 빙초산 1.2 ml를 넣었다. 그 다음 이 바이알의 함유물을 3개의 바이알로 나누고, 각각의 바이알에 15 ml의 액체 섬광 칵테일(Safety Solve, RPI Corp, Chicago, IL)을 넣고, 밤새 평형을 유지하였다. 튜브 중 방사능은 액체 섬광 계측기(Beckman Coulter, LS 6500)를 이용하여 계수하였다.

[0151]

도 15에서 알 수 있는 바와 같이, 1 nmol/kg IRL1620의 투여는 종양 또는 다른 조직에서 [¹⁴C]독소루비신 수용에 대한 임의의 유의적인 변화를 산출하지 않았다. 하지만, 염수 처리한 래트에 비해 3 nmol/kg IRL1620(115.85% 증가; *p*<0.01) 또는 6 nmol/kg IRL1620(80.02% 증가; *p*<0.05)을 받은 래트에서 종양에 있는 [¹⁴C]독소루비신의 농도는 유의적으로 증가하였다. 대조구 동물과 비교했을 때, IRL1620의 용량은 심장, 뇌, 신

장, 간, 폐, 골수, 전립선, 골격근 또는 비장에서 [¹⁴C]독소루비신의 축적의 유의적인 증가를 산출하지 않았다. 따라서, IRL1620은 종양 조직으로의 화학요법제의 전달을 선택적으로 증가시킨다.

[0152] 효능 연구: 독소루비신(DOX)의 효능에 대한 IRL1620의 효과

이 연구에서, IRL1620(N-숙시닐-[Glu⁹,Ala^{11,15}] 엔도셀린 단편 8-21)은 American Peptides(Sunnyvale, CA)로부터 얻었다. 독소루비신 히드로클로라이드(아드리아마이신, 2 mg/ml 용액)를 Ben Venue Laboratories Inc.(Bedford, OH)로부터 구입하였다. 5-플루오로우라실(50 mg/ml)은 Cadlia Pharmaceuticals(Ahmedabad, India)로부터 구입하였다. 케타민 및 자이라진은 Phoenix Scientific, Inc.(St. Joseph, MO)로부터 구입하였다.

전립선 종양은 이미 기술한 바와 같이 5주령 수컷 코펜하겐 래트(Harlan, Indianapolis, IN)에서 유발시켰다. 실험 절차는 종양 크기가 약 200mm³가 되면 시작했다. 종양 보유 동물을 무작위로 6개 그룹(8 래트/그룹)으로 나누었다:

그룹 I - 염수;

그룹 II - IRL1620(3 nmol/kg);

그룹 III - 비히클(염수) + DOX(2.5 mg/kg);

그룹 IV - 비히클(염수) + DOX(5 mg/kg);

그룹 V - IRL1620(3 nmol/kg) + DOX(2.5 mg/kg); 및

그룹 VI - IRL1620(3 nmol/kg) + DOX(5 mg/kg).

DOX를 최종 체적 1.0 ml의 염수에서 희석시키고, 염수 또는 IRL1620 투여 15 분 후 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 투여 스케줄은 3일에 한번씩 총 4 차례였다. 체중 및 종양 크기는 최종 투여 후 12일까지 3일마다 모니터하였다. 최종(4번째) 투여 12일 후 동물을 희생시켰다. 종양을 분리하고 무게를 측정하고, 조직에서 육안적 전이를 관찰하였다. 조직병리학적 분석을 위해 조직 및 종양을 10% 완충 포르말린에서 보존하였다.

체중. 염수 또는 IRL1620만으로 처리한 래트의 그룹에서 체중 증가가 있었다. 실험 초기에 염수 또는 IRL1620만 처리한 동물의 체중은 152±6.97 및 148.8±2.52 g이었고, 연구 19일에 각각 178.8±4.7 및 175.72±2.35 g으로 증가하였다. 염수와 DOX, 또는 IRL1620과 DOX를 투여한 래트는 체중 감소를 나타내었다. 체중의 최대 증가는 염수 + DOX(5 mg/kg) 및 IRL1620 + DOX(5 mg/kg)로 처리한 래트의 그룹에서 13일에 각각 -8.46±3.88 및 -10.03±2.12였다. 하지만, 체중 감소는 처리 초기로부터 DOX를 투여한 임의의 그룹 사이에 임의의 시점에서 유의적으로 관찰되지는 않았다(도 16A).

종양 체적. 염수 또는 IRL1620 처리한 래트의 종양 체적은 빠른 속도로 증가하였고, 이러한 그룹에서 모든 래트는 더 큰 종양 적재로 인해 19일에 희생되었다. 모든 다른 그룹은 22일에 희생되었다. 염수 또는 IRL1620 처리한 래트는 희생 시 종양 체적이 각각 10166±957 및 11033±873 mm³였다. 염수 + DOX(2.5 mg/kg) 및 염수 + DOX(5 mg/kg) 처리한 래트의 종양 체적은 각각 9102±1442 및 4204±299 mm³로 관찰되었다. IRL1620 + DOX(2.5 mg/kg) 처리한 래트는 5544±845 mm³의 종양 체적을 기록하였다. IRL1620 + DOX(5 mg/kg)로 처리한 래트의 그룹에서 최저 종양 체적(1965±332 mm³)이 관찰되었다. IRL1620 + DOX(5 mg/kg)로 처리한 래트에서 종양 체적 감소는 염수 + DOX(5 mg/kg) 처리한 래트에 비해 10, 13, 16, 19 및 22일에 유의적으로 관찰되었다(도 16B).

종양 중량. 염수, IRL1620 및 염수 + DOX(2.5 mg/kg) 처리한 래트는 희생 시 비교할만한 종양 중량을 가졌다(각각 19.14±1.8, 20.77±1.64 및 17.14±2.42 g). 염수 + DOX(5 mg/kg); IRL1620 + DOX(2.5 mg/kg) 및 IRL1620 + DOX(5 mg/kg)로 처리한 래트의 종양 중량은 22일에 희생 시 각각 7.19±0.56, 10.44±1.42 및 3.31±1.64 g으로 감소하였다. 염수 + DOX(5 mg/kg) 및 IRL1620 + DOX(5 mg/kg) 처리한 래트 사이에 종양 중량의 유의적인 차이가 존재하였다($p<0.005$). 이러한 연구는 IRL1620이 DOX의 항암 효능을 유의적으로 증가시키는 것을 증명하였다(도 16C).

[0165] 효능 연구: 5-플루오로우라실(5-FU)의 효능에 대한 IRL1620에 대한 효과

다음 연구에 있어서, 5-FU의 효능에 대한 IRL1620의 효과를 조사하기 위해 종양 보유 래트를 하기의 6 개의 그

룹으로 무작위 나누는 것을 제외하고는 동일한 절차를 따랐다:

[0167] 그룹 I - 염수;

[0168] 그룹 II - IRL1620(3 nmol/kg);

[0169] 그룹 III - 비히클(염수) + 5-FU(25 mg/kg);

[0170] 그룹 IV - 비히클(염수) + 5-FU(50 mg/kg);

[0171] 그룹 V - IRL1620(3 nmol/kg) + 5-FU(25 mg/kg); 및

[0172] 그룹 VI - IRL1620(3 nmol/kg) + 5-FU(50 mg/kg).

[0173] 5-FU를 최종 체적 1.0 ml의 염수에 희석시키고, 염수 또는 IRL1620 투여 15 분 후 꼬리 정맥을 통해 주사하였다. 투여 스케줄 및 절차는 앞서 언급한 DOX 연구의 절차와 동일하였다.

[0174] **체중.** 실험 초기에 염수 또는 IRL1620 동물의 체중은 각각 172 ± 4.87 및 176.9 ± 6.19 g으로 관찰되었고, 16 일째 각각 200.3 ± 2.57 및 202.2 ± 7.28 g으로 증가하였다. 실험 초기로부터 16 일째 염수 또는 IRL1620 동물의 체중 증가 차이(%)는 각각 16.17 ± 1.64 및 14.19 ± 1.66 으로 관찰되었다. 다른 그룹에서 래트의 체중은 치료 착수 시 비교할만하였고, 염수 + 5-FU(25 mg/kg), 염수 + 5-FU(50 mg/kg), IRL1620 + 5-FU(25 mg/kg) 및 IRL1620 + 5-FU(50 mg/kg)에 대해 각각 170.38 ± 2.61 , 174.6 ± 3.45 , 174.7 ± 5.78 및 179.45 ± 2.53 g으로 관찰되었다. 하지만, 체중은 다음의 양만큼 감소하였다: 염수 + 5-FU (25 mg/kg): -5.46 ± 3.39 ; 염수 + 5-FU(50 mg/kg): -10.97 ± 2.18 ; IRL1620 + 5-FU(25 mg/kg): -8.27 ± 2.31 ; 및 IRL1620 + 50 mg/kg: -11.20 ± 2.41 (도 17A).

[0175] **종양 체적.** 염수 또는 IRL1620 처리한 래트는 종양 크기가 빠른 진행성 증가를 보였고, 이러한 그룹의 모든 래트들은 큰 종양 적재로 인해 16일에 희생되었다. 염수 + 5-FU(25 mg/kg) 및 IRL1620 + 5-FU(25 mg/kg)를 투여 한 래트의 종양 크기에서 유의적인 차이점은 없었다. 하지만, 염수 + FU(50 mg/kg) 처리한 래트와 비교 시, IRL1620 + 5-FU(50 mg/kg)로 처리한 래트의 종양 체적이 13, 16, 19 및 22 일에 일정한 유의적인 감소가 있었다(도 17B).

[0176] **종양 중량.** 16 일에 희생 시 염수 또는 IRL1620으로 투여한 래트의 종양 중량에 유의적인 차이가 없었다(중량은 각각 17.92 ± 2.01 및 19.50 ± 2.37 g). 염수 + 5-FU(25 mg/kg) 처리한 동물에 비교할 때, IRL1620 + 5-FU(25 mg/kg)로 처리한 래트의 종양 중량에서 38.18% 감소가 있었다. 더욱이, IRL1620 + 5-FU(50 mg/kg) 처리한 래트 와 염수 + 5-FU(50 mg/kg) 처리한 래트 사이의 종양 중량 차이가 167.19%였다($p < 0.01$)(도 17C). 이러한 결과들은 IRL1620이 종양 체적 및 종양 중량을 감소시키는 데 있어서 5-FU의 효능을 유의적으로 증가시킴을 증명한다.

[0177] 이러한 연구들은 IRL1620이 전립선 암의 동물 모델에서 종양 혈액 관류를 증진시키고, 종양으로의 화학요법제의 전달을 증가시키며, 화학요법제의 효능을 증진시키는 데 효과적임을 집합적으로 증명한다.

흑색종 모델

실시예 6. 파클리탁셀의 종양 관류 및 생체내 분포에 대한 IRL1620의 효과

[0180] 전술한 흑색종 모델 연구에서 수컷 누드 마우스를 사용하였다. 모든 절차 및 동물 보호는 시카고 소재 일리노이 대학의 동물 보호 위원회에서 설립한 기준에 따랐다. 동물 설비들은 조절된 온도($23 \pm 1^\circ\text{C}$) 습도($50 \pm 10\%$) 및 인공 조명(L0600-1800 h)에서 유지하였다. 동물 설비들은 실험 동물 보호의 인가를 위한 미국 연합에 의해 공인된 연방 기준에 따라 유지하였다.

[0181] IRL1620(N-숙시닐-[Glu⁹,Ala^{11,15}] 엔도셀린 단편 8-21)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)로부터 얻어졌다. [3H]파클리탁셀은 Moravek Biochemicals(Brea, CA)로부터 구입하였다. 파클리탁셀(6 mg/ml 용액)은 Ben Venue Laboratories Inc.(Bedford, OH)로부터 구입하였다. 케타민 및 자이라진은 Phoenix Scientific, Inc.(St. Joseph, MO)로부터 구입하였다. 조직 가용화제(TS-2)는 RPI Corp.(Chicago, IL)로부터 얻었다.

[0182] 연구를 위해 세포주 접종시킨 이식 흑색종 모델을 사용하였다. 마우스에 100만 인간 흑색종 세포(UISO-MEL-2)를 피하 접종하였다. 연구를 위해 종양 체적이 약 $200-400\text{mm}^3$ ³인 마우스를 선별하였다.

[0183] **관류 연구.** 마우스(N=4/그룹)는 케타민(150 mg/kg) 및 자이라진(2 mg/kg)을 혼합한 i.p 주사로서 사용하여 마취 하였다. 동물들을 가열 폐드(37°C)에 놓고, 온도 변동을 최소화하였다. 종양 주변의 피부를 10 mm 길이로 절개 하였다. Periflux PF2b 4000 레이저 도플러 유속측정기(MP3 flow probe, Moors Instruments, Devon, England)

에 연결된 표준 모델 섬유 광학 프로브를 노출된 종양의 표면에 적용하였다. 시간 상수를 1.5 초로 설정하고, 밴드너비를 4 kHz로 설정하였다. Polyview 소프트웨어를 이용하여 플러스 값을 얻었다. 꼬리 정맥을 통한 염수 또는 IRL1620(3 nmol/kg)의 투여 전에 안정한 측정의 15 분 기준선을 얻었고, 관류를 3 시간 동안 기록하였다.

[0184] 염수의 투여는 흑색종 마우스의 종양 혈액 관류에서 임의의 유의적인 차이를 산출하지 않았다. IRL1620 투여 후 30, 60, 90, 120 및 150 분에 기준선으로부터 종양 관류에 있어서 각각 154.4%, 189.0%, 198.1%, 172.8% 및 94.07.12%가 관찰되었다. 따라서, IRL1620은 염수 처리한 대조구에 비교했을 때 흑색종 마우스에서 종양 혈액 관류를 유의적으로 증가시켰다. 이 효과는 일정하였고, 약 2 시간 동안 지속되었다(도 18A 및 18B).

[0185] 생체내 분포 연구. 종양 보유 마우스는 캐타민(150 mg/kg) 및 자이라진(2 mg/kg)을 혼합한 i.p 주사로서 사용하여 마취하였다. 동물들을 무작위로 그룹화하고(N=4/그룹) 최종 체적 0.1 ml로 꼬리 정맥을 통해 염수 또는 IRL1620(3 nmol/kg)을 주었다. 또한 각각의 그룹에서 얻은 마우스에게 염수 또는 IRL1620 투여 15 분 후 최종 체적 1.0 ml(i.v)에서 20:80 [³H]파클리탁셀:염수의 농도로 회석한 [³H]파클리탁셀(크레모포 EL 및 에탄올(50:50) 중 10 µCi/마우스)을 주었다. [³H]파클리탁셀의 투여 3 시간 후 동물을 회생시켰다. [³H]파클리탁셀의 농도를 종양, 심장, 신장, 간, 폐 및 비장에서 측정하였다. 종양 및 기관을 작은 조각으로 얇게 잘랐다. 500 mg의 조직 또는 종양을 조직 가용화제(6 ml)를 함유하는 분리 바이알에 놓고 50°C에서 수조에서 배양하였다. 조직 또는 종양이 용해된 후 수조로부터 바이알을 제거하고, 10% 빙초산 1.2 ml를 넣었다. 바이알의 함유물을 3개의 바이알에 똑같이 나누고, 15 ml의 액체 설팡 치테일(Safety Solve, RPI Corp, Chicago, IL)을 각각의 바이알에 넣고, 밤새 평형을 유지하였다. 튜브에서의 방사능을 액체 설팡 계측기(Beckman Coulter, LS 6500)를 이용하여 계수하였다.

[0186] 도 19에 나타낸 바와 같이, 종양 [³H]파클리탁셀 농도가 염수 처리한 마우스에 비해 IRL1620 처리한 마우스에서 유의적으로 증가하였다. 종양 [³H]파클리탁셀 농도는 [³H]파클리탁셀 투여 15분 전 염수 또는 IRL1620을 주사한 동물의 조직에서 각각 40.77 및 274.28 nmol/g으로 관찰되었다. 비히를 처리한 마우스에 비해 IRL1620을 처리한 동물의 종양 [³H]파클리탁셀의 572.99% 증가가 있었다. 하지만, 염수 처리한 동물과 비교할 때 IRL1620 투여는 심장, 신장, 간, 폐 또는 비장에서 [³H]파클리탁셀의 축적률을 유의적으로 증가시키지는 않았다. 따라서, IRL1620은 다른 기관으로의 전달에 영향을 미치지 않고 종양 조직으로의 파클리탁셀의 유입 및 전달을 유의적으로 증진 시킬 수 있다.

[0187] 끝으로, IRL1620은 종양 선택적 혈관 확장제로서 사용될 수 있고, 화학요법제의 전달 및 효능을 선택적으로 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 현재 연구는 이 치료 전략을 선택함으로써 종양 조직에서 몇 배 더 높은 약물 농도를 달성할 수 있음을 명백하게 증명한다. 마지막으로, ET_A 수용체 길항제는 또한 종양 혈류(Sonveaux *et al.*, Cancer Res, 64:3209 (2004))를 증가시키는 것으로 제안되었고, 본 발명에 따라 종양으로의 항암 약물의 전달을 증진시키기 위해 사용될 수 있다.

[0188] 기재한 활성 성분을 함유하는 약학 조성물은 인간 또는 다른 포유동물에게 투여하기에 적절하다. 전형적으로, 상기 약학 조성물은 멸균성이고, 투여 시 반대의 반응을 일으킬 수 있는 독성, 발암성 또는 돌연변이성 화합물이다. 약학 조성물의 투여는 고령 종양 성장의 착수 전, 착수 동안 또는 착수 후에 수행할 수 있다.

[0189] 본 발명의 방법은 전술한 바와 같은, 또는 생리학적 허용 염, 유도체, 프로드러그 또는 이의 용매화물로서 활성 성분을 사용하여 수행할 수 있다. 상기 활성 성분은 순수한 화합물로서 투여될 수 있거나, 또는 하나 또는 둘 다의 실재물을 함유하는 약학 조성물로서 투여될 수 있다.

[0190] 약학 조성물은 상기 활성 성분이 그들의 의도된 목적을 달성하기 위해 유효량 투여되는 것들을 포함한다. 보다 구체적으로, "치료상 유효량"은 고령 종양의 성장의 예방, 제거, 진행의 지연 또는 크기의 감소에 효과적인 양을 의미한다. 치료상 유효량은 당업자의 재량 내에서, 특히 본원에 제공된 상세한 설명의 측면에서 결정된다.

[0191] "치료상 효과적인 용량"은 목적하는 효과를 달성하는 결과를 낳는 활성 성분의 양을 가리킨다. 상기 활성 성분의 독성 및 치료상 효능은 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약학적 절차에 의해 결정될 수 있으며, 예컨대 LD₅₀(개체의 50%에 치명적인 용량) 및 ED₅₀(개체의 50%에 치료상 효과적인 용량)이 결정될 수 있다. 독성 효과 및 치료상 효과 사이의 용량 비는 치료상 지표이며, LD₅₀ 및 ED₅₀ 사이의 비율로서 표현된다. 높은 치료상 지표가 바람직하다. 얻어진 데이터는 인간에게서 사용하기 위한 범위의 용량을 조제하는 데 사용될 수 있다. 활성 성분

의 용량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 일정 범위의 순환 농도 내에 놓인다. 용량은 사용한 투여 형태 및 이용한 투여 경로에 따른 이 범위 내에서 다양화될 수 있다.

[0192] 정확한 조제 및 투여량은 환자 상태의 측면에서 주치의에 의해 결정된다. 투여량 및 간격은 개별적으로 조정될 수 있어 치료상 또는 예방상 효과를 달성하기에 충분한 수준의 활성 성분을 제공할 수 있다.

[0193] 투여한 약학 조성물의 양은 치료 대상, 대상의 체중, 고통의 심각성, 투여 방식 및 처방 의사의 판단에 따라 달라질 수 있다.

[0194] 상기 활성 성분은 단독으로, 또는 의도된 투여 경로 및 표준 약학적 시행에 관련하여 선택된 약학적 운반체와 혼합물로서 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 약학 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 제제 안으로의 활성 성분 가공을 촉진하는 부형제 및 보조제를 포함하는 생리적 허용 운반체 1종 이상을 이용하여 통상적인 방식으로 조제될 수 있다.

[0195] 치료상 유효량의 활성 성분을 투여할 때, 조성물은 발열 물질이 없는 비경구 허용 수용액의 형태일 수 있다. pH, 등장성, 안정성 등과 관련된 그러한 비경구 허용 용액의 조제는 당업계 내에 있다. 정맥내 주사에 대한 바람직한 조성물은 전형적으로 이 특징이 요구되지 않더라도 등장성 비허클을 함유할 것이다.

[0196] 수의학적 이용에 있어서, 활성 성분은 정상 수의학 실행과 관련하여 적절한 허용 조제물로서 투여된다. 수의사는 특정 동물에게 가장 적당한 투여 계획을 결정한다.

[0197] 본 발명의 범주 및 사상을 벗어나지 않는 한, 본원에 구체적으로 기술한 것 외에 실시될 수 있는 본 발명의 구체예의 다양한 개조 및 변경이 있을 수 있다. 상기 기술은 예를 들어 설명하는 것일 뿐, 이에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 범주는 단지 청구범위에 의해 결정되는 것이다.

[0198] 본원에서 사용된 용어 및 어구는 설명으로서 사용하는 것으로 제한이 없으며, 그러한 용어 및 표현의 사용에 있어서 나타내고 설명하는 특성의 동등물을 제외하고자 하는 의도는 없으며, 청구한 본 발명의 범주 내에서 여러 가지 변형이 가능한 것으로 인지되어야 한다. 더욱이, 본 발명의 범주를 벗어나지 않는 한, 본 발명의 임의의 구체예의 임의의 1 이상의 특성은 본 발명의 임의의 다른 구체예의 임의의 1 이상의 다른 특성과 혼합될 수 있다.

[0199] 달리 지시하지 않는 한, 명세서 및 청구항에서 사용된 성분의 양, 문자량과 같은 특성, 반응 조건 등을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 변형될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 이에 따라, 반대의 지시가 없는 한, 후술하는 명세서 및 첨부된 청구항에서 설명되는 수적인 파라미터는 본 발명에 의해 얻으려고 하는 목적하는 특성들에 따라 달라질 수 있는 근사치이다. 최소한, 그리고 청구항의 범주에 동등물의 원칙의 적용을 제한하고자 하는 시도로서가 아니라, 각각의 수적 파라미터는 적어도 다수의 보고된 유의적인 숫자를 고려하고 평범한 기술을 적용함으로써 간주될 수 있다. 본 발명의 넓은 범주를 설명하는 수적 범위 및 파라미터들이 근사치임에도 불구하고, 특정예에서 설명되는 상기 수적 값들은 가능한 정확하게 보고된다. 하지만, 임의의 수적 값은 본래 그들의 각자 시험 측정치에서 발견되는 표준 편차에서 반드시 기인되는 소정의 오차를 포함한다.

[0200] 본 발명을 기술하는 문맥에서(특히 후술하는 청구항에서) 사용된 용어 "하나의" 및 유사한 언급은, 본원에 달리 지시되지 않거나 또는 문맥에 의해 명확하게 부인되지 않는 한, 단수 및 복수 둘 다를 포함하는 것으로 간주된다. 본원에서 값의 범위에 대한 언급은 상기 범위 내에 떨어지는 각각의 구별된 값은 개별적으로 언급하는 속기 방법으로서 제공하고자 하는 것이다. 본원에서 달리 지시하지 않는 한, 각각의 개별적인 값은 그것이 본원에서 개별적으로 언급한 것처럼 명세서에 포함된다. 본원에서 기술한 모든 방법은 본원에서 달리 지시되지 않거나 문맥에 의해 명확하게 반대되지 않는 한, 임의의 적절한 순서로 수행될 수 있다. 임의의 그리고 모든 예, 또는 본원에서 제공된 예가되는 언어(예, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 명백하게 하고자 하는 것일 뿐, 달리 청구되지 않은 본 발명의 범주에 한계를 두는 것이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 본 발명의 수행에 근본적인 임의의 청구되지 않은 요소를 가리키는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0201] 본원에서 개시된 본 발명의 구체예 또는 대체 요소들의 그룹화는 제한사항으로 간주되어서는 안된다. 각각의 그룹 구성원은 개별적으로 언급 및 청구될 수 있거나, 또는 본원에서 관찰된 다른 요소 또는 그룹의 구성원과 임의로 혼합될 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원은 편의성 및/또는 발명의 요건의 이유를 위한 그룹에 포함되거나 또는 제외될 수 있는 것으로 예상된다. 임의의 포함 또는 삭제가 발생하는 경우, 본원에서 세부사항은 변경된 바와 같은 그룹을 포함하는 것으로 간주되어 첨부된 청구항에서 사용된 모든 마크시 그룹의 기재된 설명을

만족시킨다.

[0202]

본 발명을 수행하는 데 있어서 발명자들에게 알려진 최선의 방식을 비롯한 본 발명의 소정의 구체예가 본원에 기재되어 있다. 물론, 이러한 소정의 구체예에서의 변동은 전술한 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 것이다. 본 발명자들은 적당한 변동을 이용하는 것을 기재하고, 본 발명자들은 본 발명이 본원에 특별히 기술한 것 보다는 다르게 수행되기를 의도한다. 이에 따라, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용된 바와 같은 본원에 첨부된 청구항에서 언급된 대상의 동등물 및 모든 변경사항을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변동사항에서 전술한 요소들의 임의의 조합은 본원에서 달리 지시되지 않거나 또는 문맥에 의해 명확하게 반대되지 않는 한 본 명에 포함된다.

[0203]

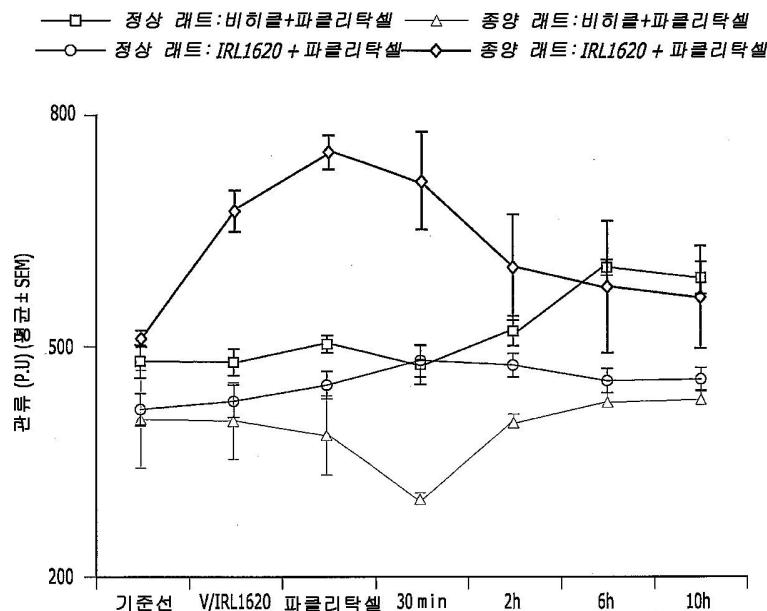
또한, 본 명세서 전반에 걸쳐 특허 및 출판 간행물을 다수 참고하였다. 상기 인용된 참고문헌 및 출판 간행물은 그 전체가 참고로서 본원에 개별적으로 포함된다.

[0204]

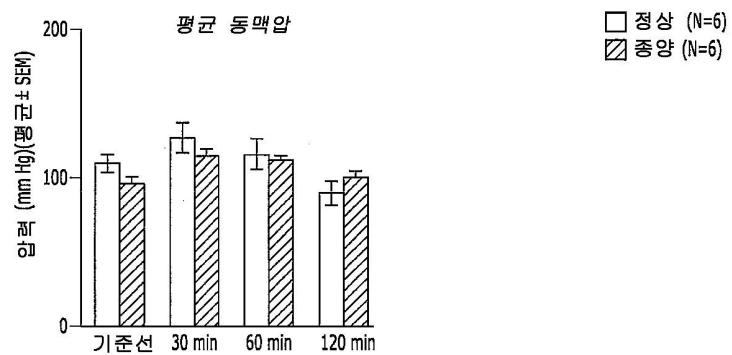
마지막으로, 본원에 기술한 본 발명의 구체예는 본 발명의 원리를 예시하는 것으로 이해되어야 한다. 사용될 수 있는 다른 변형들은 본 발명의 범주 내에 있다. 따라서, 실시예에 의해, 이에 국한되는 것은 아니지만, 본 발명의 대체적인 구성은 본원에서 기술에 따라 이용될 수 있다. 이에 따라, 본 발명은 앞서 나타내고 기재한 것에 국한되는 것은 아니다.

도면

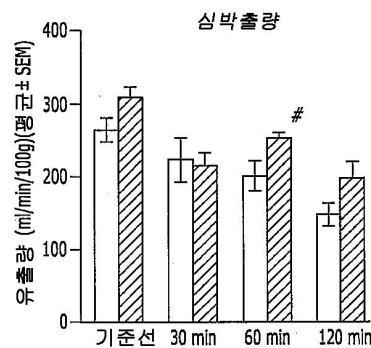
도면1



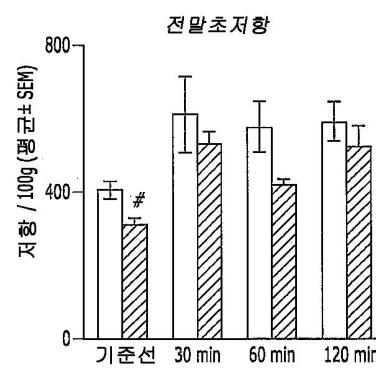
도면2a



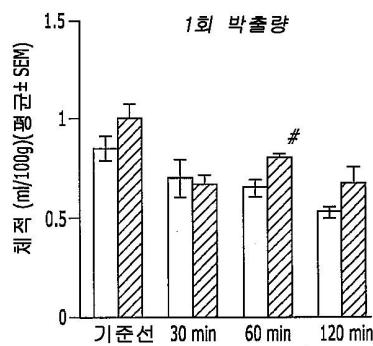
도면2b



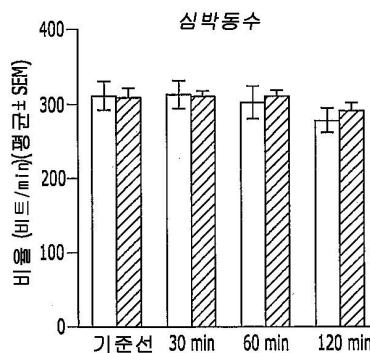
도면2c



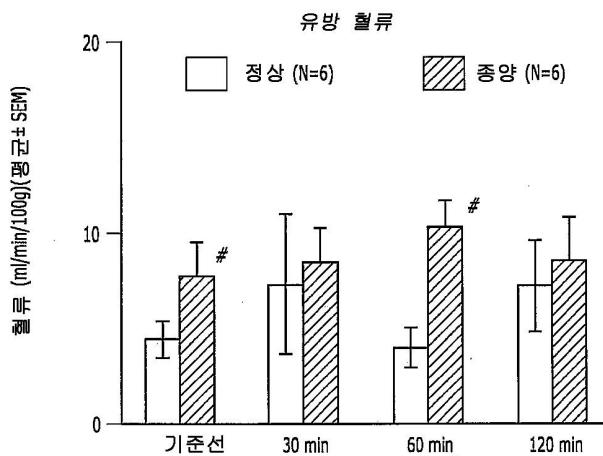
도면2d



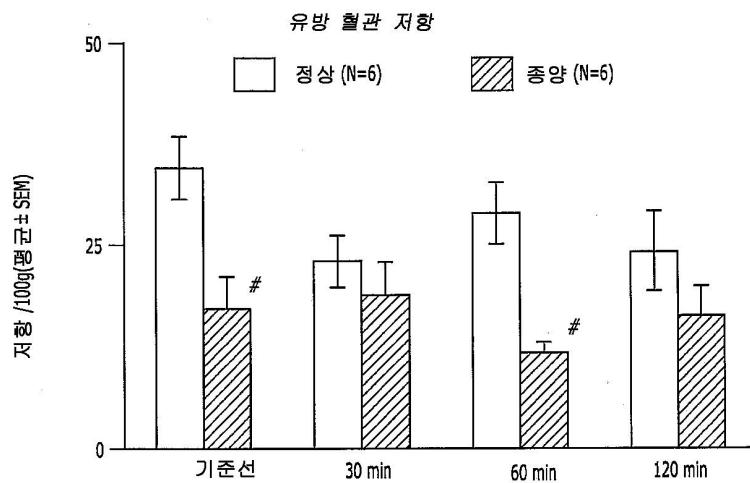
도면2e



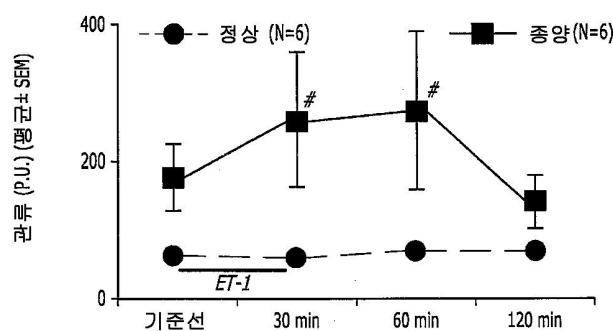
도면3a



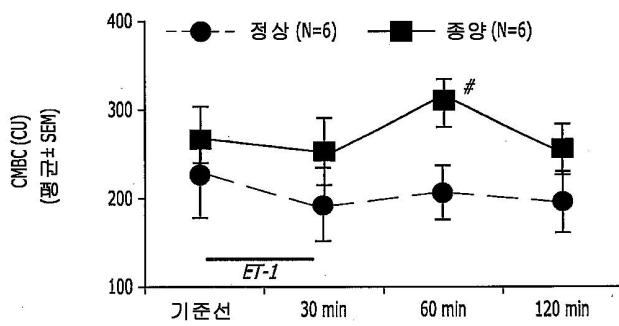
도면3b



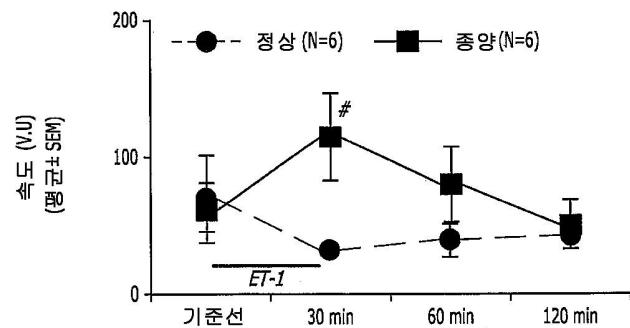
도면4a



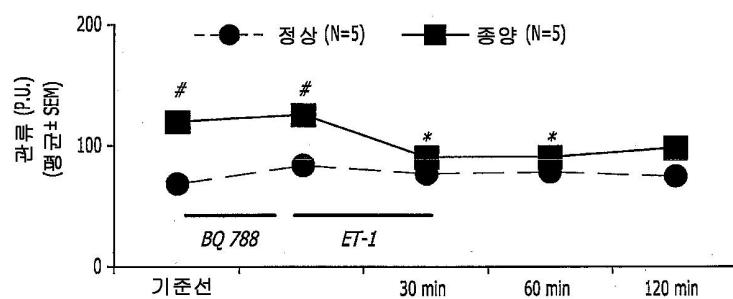
도면4b



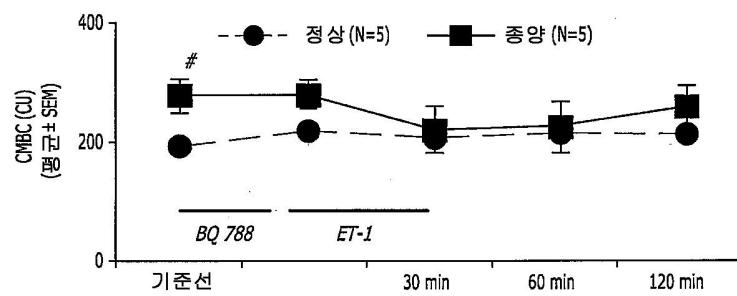
도면4c



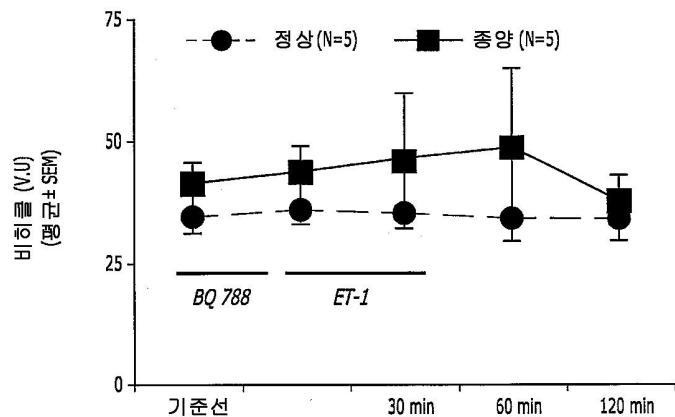
도면5a



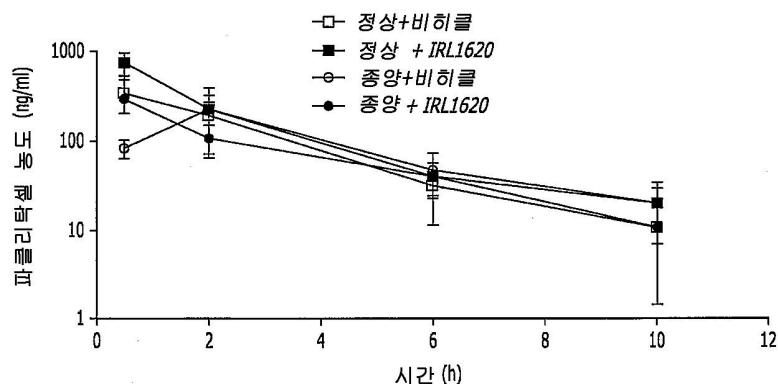
도면5b



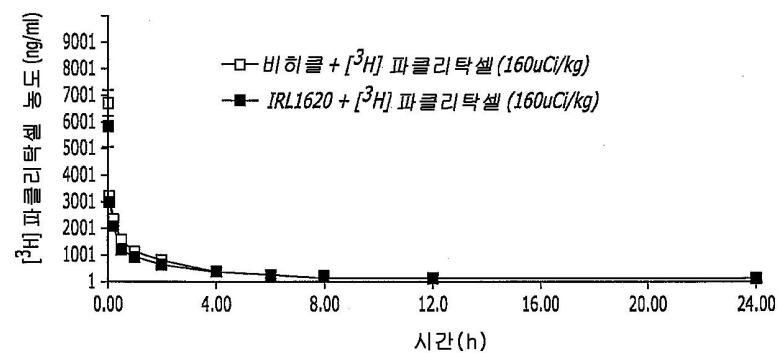
도면5c



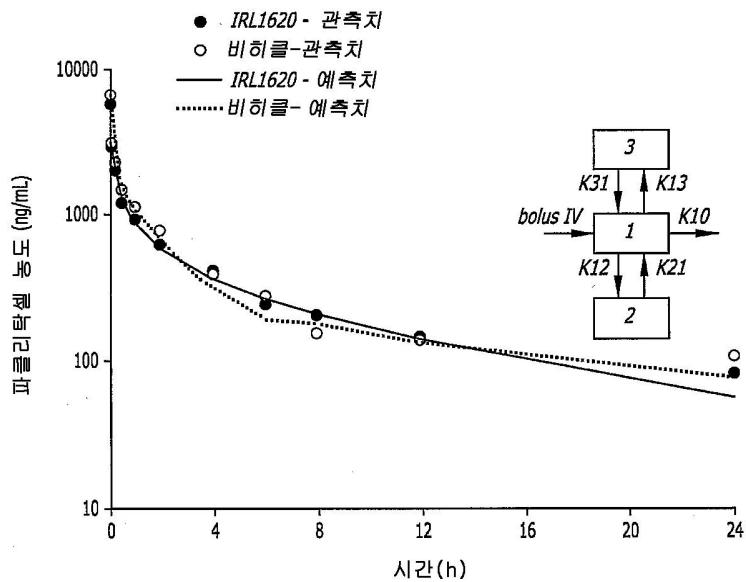
도면6



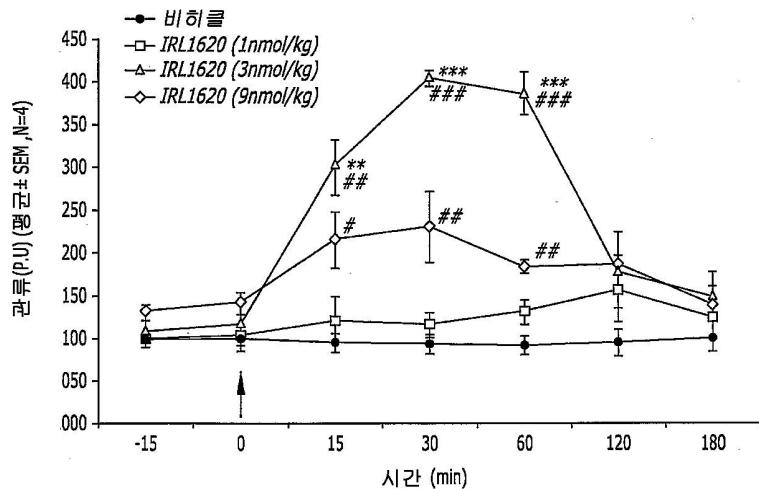
도면7



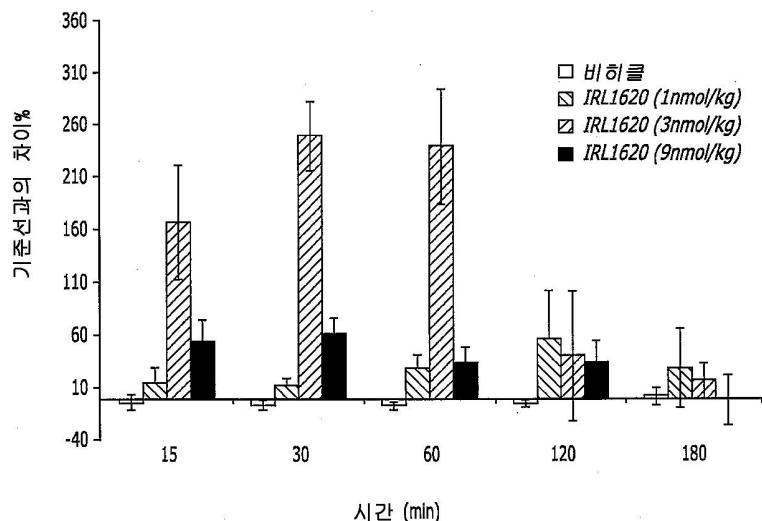
도면8



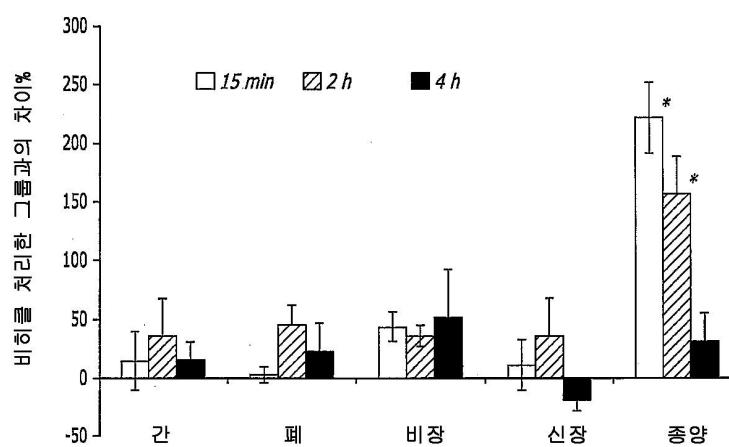
도면9a



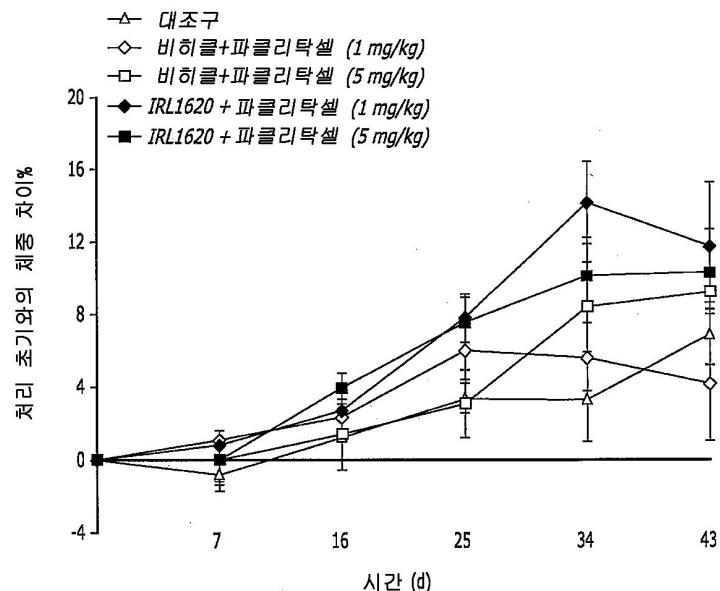
도면9b



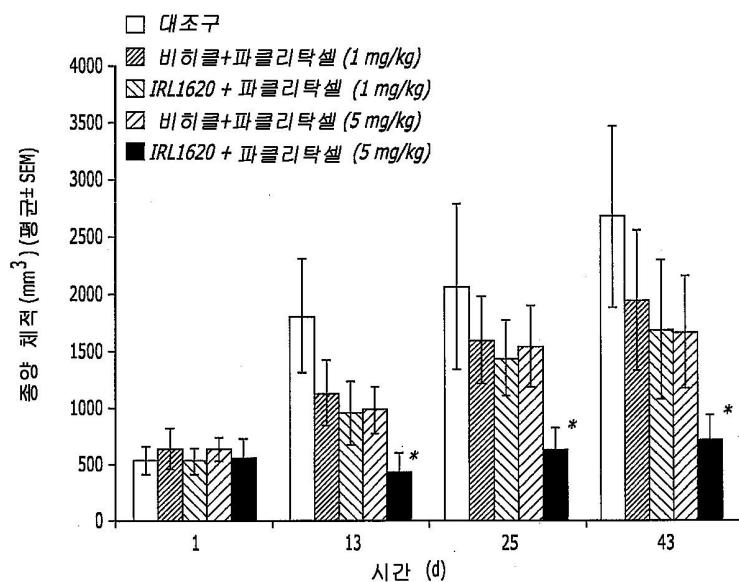
도면10



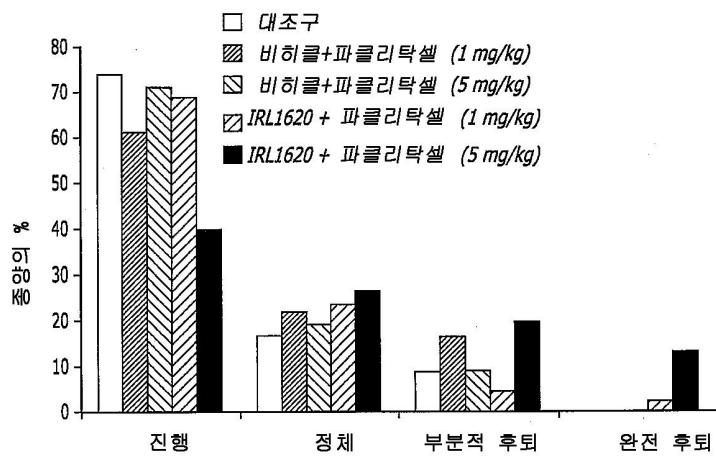
도면11



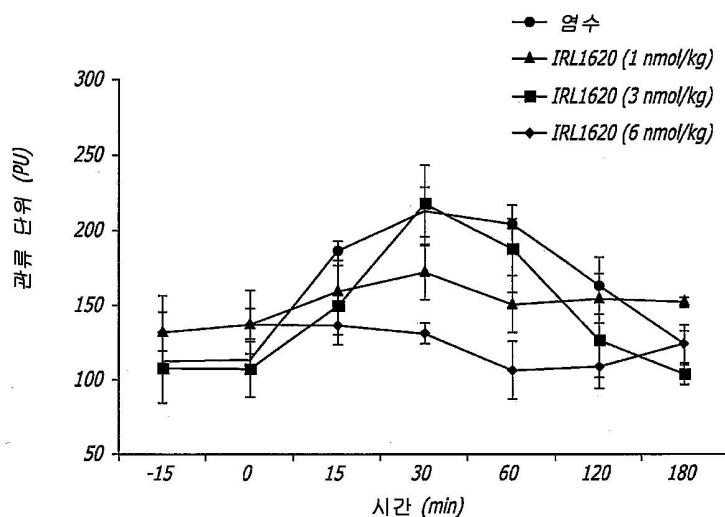
도면12



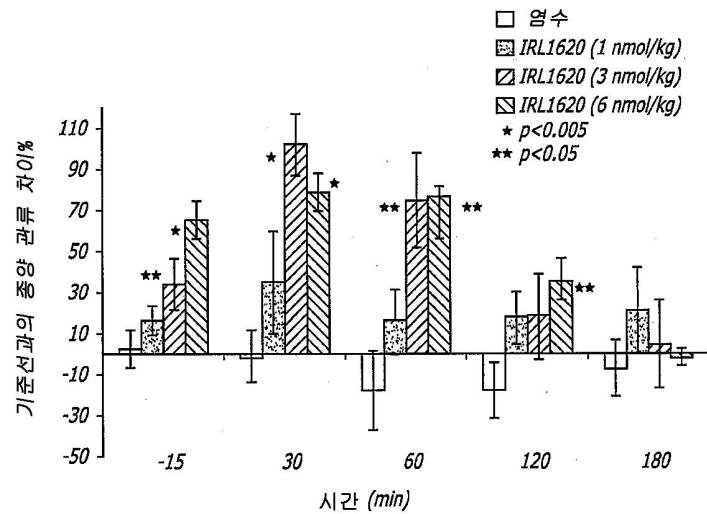
도면13



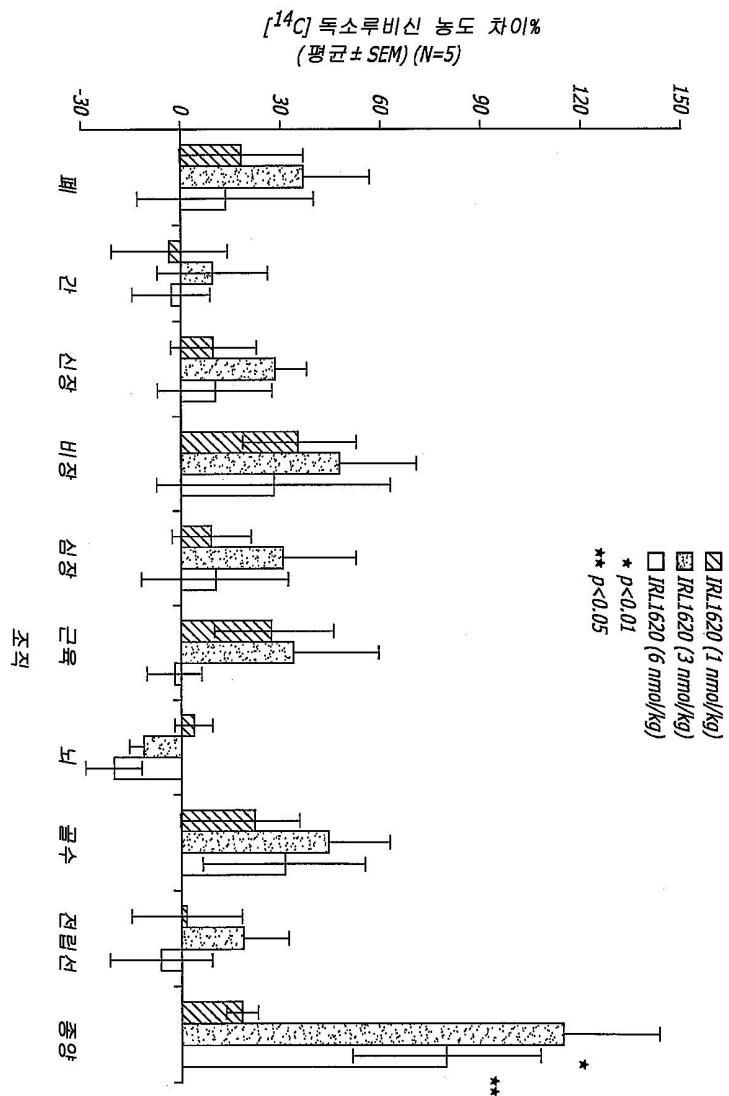
도면14a



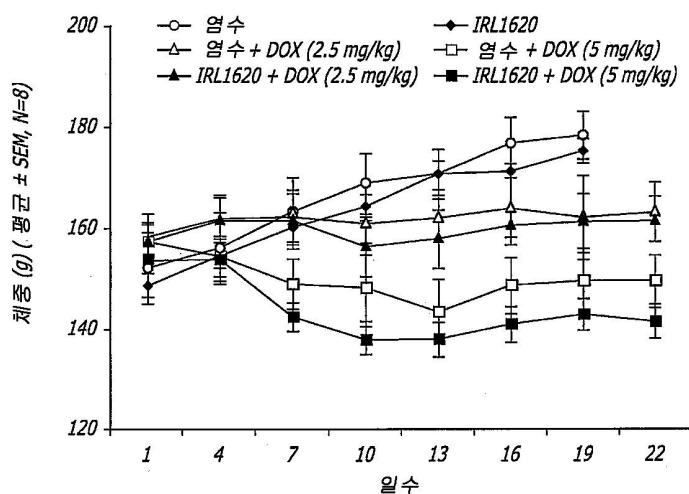
도면14b



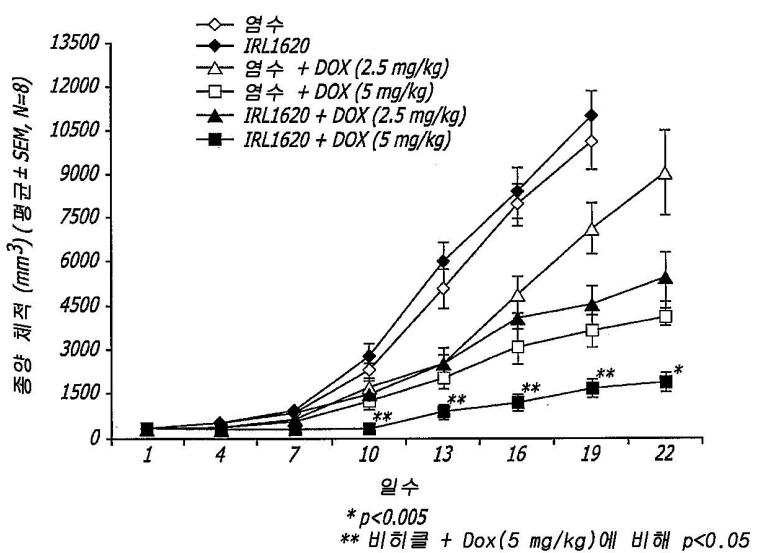
도면15



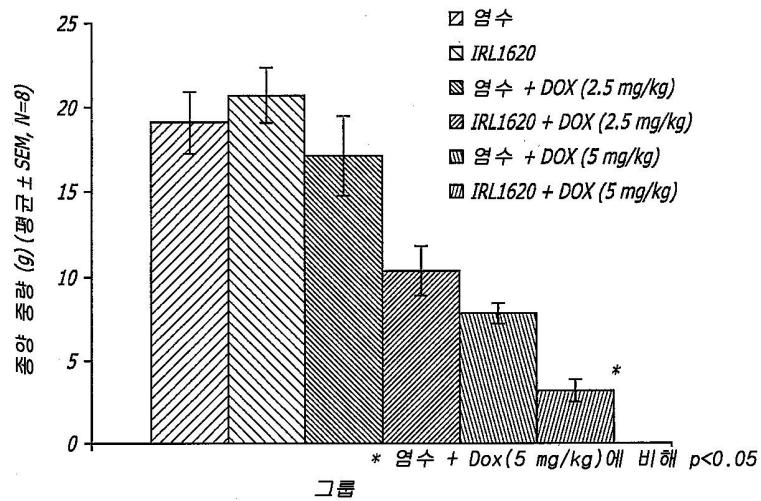
도면16a



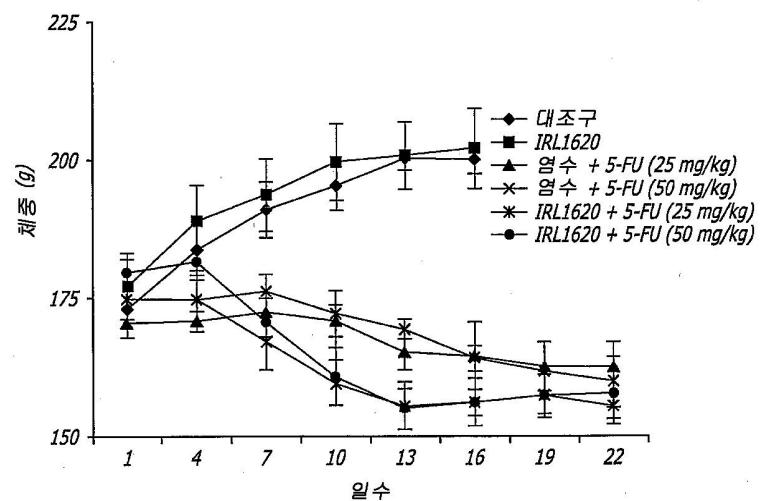
도면16b



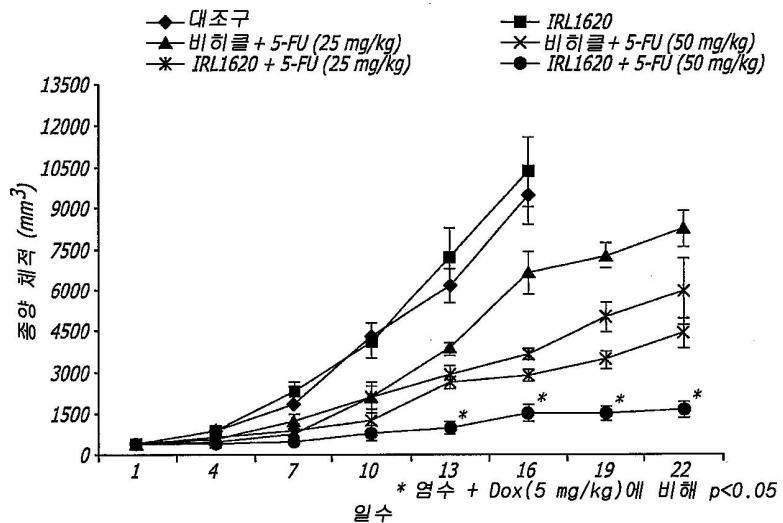
도면16c



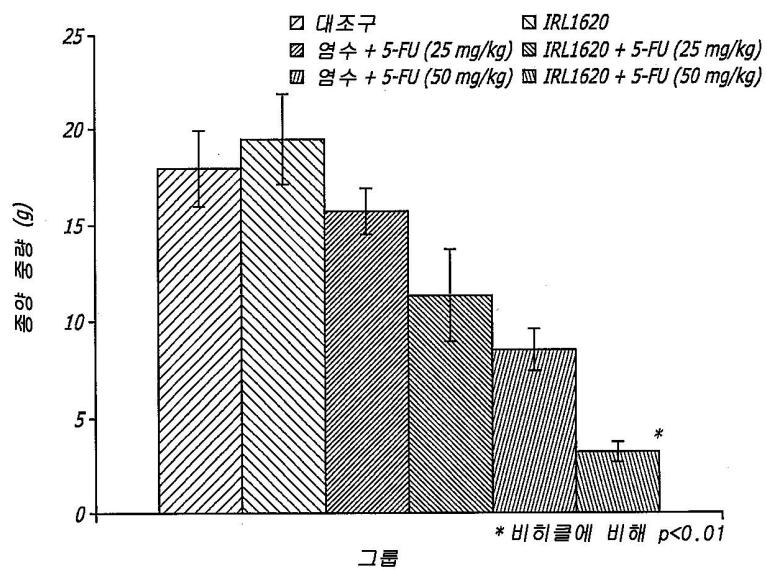
도면17a



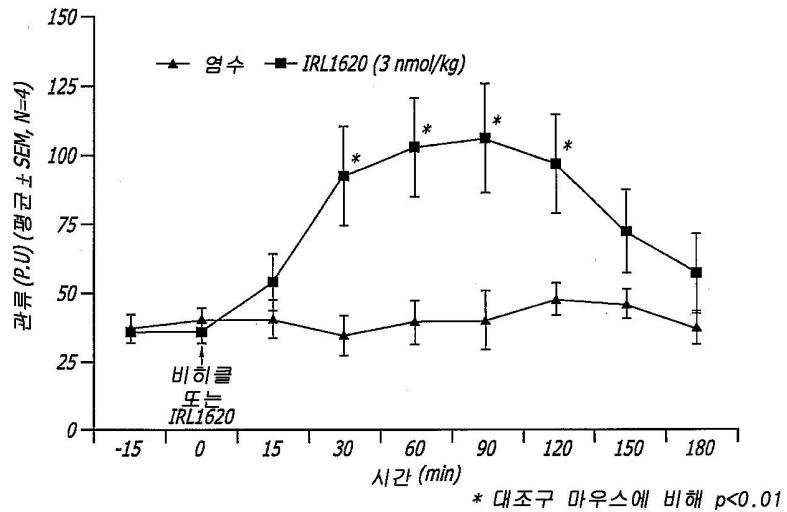
도면17b



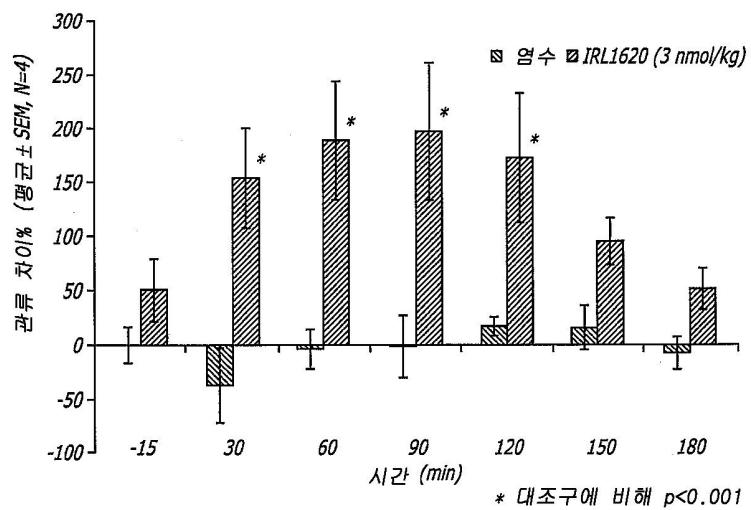
도면17c



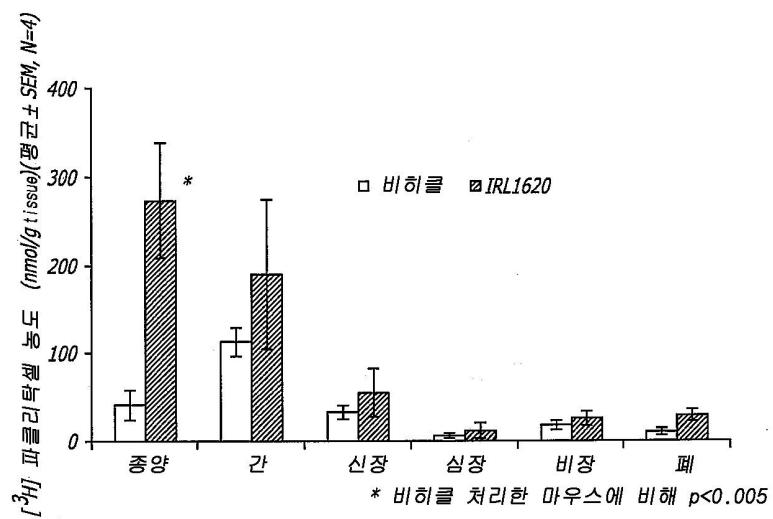
도면18a



도면18b



도면19



도면20

