



등록특허 10-2462177



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월04일

(11) 등록번호 10-2462177

(24) 등록일자 2022년10월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/402 (2006.01) A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01) A61K 31/4418

(2006.01)

A61K 31/4439 (2006.01) A61K 31/472 (2006.01)

A61K 31/4725 (2006.01) A61K 31/496 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/402 (2013.01)

A61K 31/404 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7035797

(22) 출원일자(국제) 2015년06월25일

심사청구일자 2020년06월24일

(85) 번역문제출일자 2016년12월21일

(65) 공개번호 10-2017-0017932

(43) 공개일자 2017년02월15일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/054792

(87) 국제공개번호 WO 2015/198266

국제공개일자 2015년12월30일

(30) 우선권주장

62/017,406 2014년06월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

(73) 특허권자

노파르티스 아게

스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

(72) 발명자

페레티, 스테판

스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 베르크 클라이

백 노파르티스 파마 아게 내

제이, 세바스티엔

스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 베르크 클라이

백 노파르티스 파마 아게 내

(74) 대리인

양영준, 이상영

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 8 항

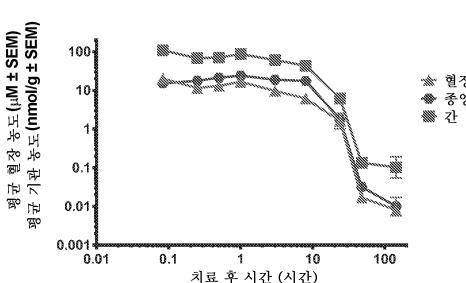
심사관 : 박희연

(54) 발명의 명칭 MDM2 억제제의 간헐적 투여

(57) 요 약

본 개시내용은 특정 투여 스케줄에 사용하기 위한 mdm2 억제제에 관한 것이다. 충분히 강력한, 또는 대안적으로, 충분히 높은 용량의 Mdm2 억제제가 사용되는 경우, 이는 세포에서 훨씬 오래 지속되는 항증식 메커니즘을 촉발함으로써 항신생물 효과를 유발할 수 있음이 밝혀졌다. 오래 지속되는 효과는 단일 용량 후 수 주 동안 지속될 수 있으며, 이는 매일 치료에 대한 필요를 제거하고, Mdm2i를 간헐적으로 투여하는 것을 허용한다. Mdm2 억제제의 간헐적 투여 스케줄로의 치료는 Mdm2i의 매일 치료와 또는 또 다른 제약학적으로 허용되는 성분과 조합될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/4178 (2013.01)

A61K 31/4418 (2013.01)

A61K 31/4439 (2013.01)

A61K 31/472 (2013.01)

A61K 31/4725 (2013.01)

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

J.-J. Qin et al. Natural Product MDM2 Inhibitors: Anticancer Activity and Mechanisms of Action. Current Medicinal Chemistry, v.19(33), pp.5705-5725 (2012.11.1.)*

Giampaolo Tortora al. A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer. Cancer Therapy, v.88(5), pp.8*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

MDM2i(mouse double minute 2 inhibitor)를 포함하는, TP53 야생형 암의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물이며, 여기서 MDM2i는 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온이고, 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 대상체에게 투여되며, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 3주인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, TP53 야생형 암이 방광암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 간암, 구강암, 담도암, 급성 및 만성 림프 구성 백혈병, 급성 및 만성 골수성 백혈병, 만성 골수단핵구성 백혈병, 결장직장암, 위암, 위장관 기질암, 간세포암, 신경교종, 림프종, 흑색종, 다발성 골수종, 골수증식성 질환, 신경내분비암, 폐암, 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 전립선암, 신장 세포암, 육종, 지방육종 및 갑상선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, TP53 야생형 암이 흑색종, 폐암 또는 신경모세포종인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, TP53 야생형 암이 흑색종인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, MDM2i가 인간에게 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 환자에게 투여되는 또 다른 제약 성분을 더 포함하는 제약 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 또 다른 제약 성분이 또 다른 항신생물제인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 1종 초과의 추가의 항신생물제가 투여되는 것인 제약 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 특정 투여 스케줄로 사용하기 위한 mdm2 억제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 p53은 모두 종양의 악성 성장을 상쇄시키는 중요한 현상인 DNA 손상 복구, 아폽토시스 및 세포 주기 정지에 관여하는 다수의 표적 유전자의 발현을 제어하는 전사 인자이다. 따라서, p53은 유전적 안정성을 유지하고, 종양 발생을 방지하는 데 중요하다. TP53 유전자는 인간 암에서 가장 빈번하게 돌연변이되는 유전자 중 하나이다. 전체 암의 대략 절반은 직접 돌연변이에 의해 유발된 불활성화된 p53을 갖는 것으로 보고되어 있다. p53 유전자가 돌연변이되지 않는 암에서는, 단백질 수준에서의 기능적 불활성화가 입증되었다. 설명된 p53 불활성화의 메커니즘 중 하나는 MDM2 (마우스 이중 미세염색체 (Mouse double minute) 2)의 인간 상동체와의 그의 상호작용을 통한 것이다. 따라서, Mdm2는 p53 종양 억제자의 중요한 음성 조절자이다. Mdm2 단백질은 p53의 프로테아솔 분해를 초래하는 E3 유비퀴틴 리가제, 및 p53 전사 활성화의 억제제 둘 다로서 기능한다. 종종 Mdm2는 p53 야생형 종양에서 증폭되어 발견된다.

[0003] p53-mdm2 상호작용을 억제하며, 항신생물 효과를 유발할 수 있는 Mdm2 억제제가 개발되었다.

[0004] US2013/0245089에는 환자에게 4-{[(2R,3S,4R,5S)-4-(4-클로로-2-플루오로-페닐)-3-(3-클로로-2-플루오로-페닐)-4-시아노-5-(2,2-디메틸-프로필)-파롤리딘-2-카르보닐]-아미노}-3-메톡시-벤조산을 약 800 내지 약 3000 mg/일의 양으로 약 7일 이하의 투여 기간 동안, 28일 치료 주기의 제1일 내지 제7일에 투여한 후, 약 21 내지 약 23일의 휴지 기간이 이어짐에 의한 암을 앓고 있는 환자의 치료 방법이 개시되었다.

[0005] 비. 히긴스 (B. Higgins) 등에 의한 임상 암 연구 (Clinical Cancer Research)의 논문 (May 2014)에는 RG7388이 매주 1회 3번 투여된 후, 13일의 휴지가 이어지거나 (28-일 주기 스케줄), 약물이 28-일 스케줄의 연속적인 5일 동안 투여되는, 28-일 주기 스케줄이 개시되었다.

[0006] Mdm2 억제제 및 이의 제조 방법은 예를 들어 WO2013111105 또는 WO2011076786에 개시되었다.

발명의 내용

개시내용의 요약

[0008] 예상외로, 약물 표적의 생물학 및 Mdm2i 농도가 어떻게 하류 경로의 신호전달을 변경시켜 항-종양 효능 및 내약성에 영향을 미치는지를 이해함으로써 Mdm2 억제제 (이하 "Mdm2i")에 대한 유리한 투여 요법이 설계될 수 있음을 밝혀내었다. 놀랍게도, 충분히 강력한 Mdm2i, 또는 대안적으로, 충분히 높은 용량의 Mdm2i가 사용되는 경우, 이는 세포에서 훨씬 오래 지속되는 항증식 메커니즘을 촉발함으로써 항신생물 효과를 유발할 수 있음을 밝혀졌다. 암 세포가 충분히 높은 농도의 각각의 Mdm2i에 8시간 동안만큼 짧게 (및 보다 낮은 농도가 사용되는 경우 비례적으로 보다 오래) 노출되는 경우, Mdm2i는 다음 48 내지 72시간 내에 급증하는 p21 및 Puma mRNA 발현을 유발하여, 카스파제 3/7 활성의 유의한 유도 및 따라서 실질적인 아폽토시스를 초래한다. 피하로 이식된 암 세포를 가진 동물에서, 충분히 높은 단일 용량으로 동물을 치료한 후 동일한 효과가 관찰되었다. 이는 실질적인 종양 수축을 초래하였다. Mdm2i 노출이 그 미만으로는 Mdm2i의 이러한 2차 방식이 활성화되지 않은 특정 역치 미만인 경우, 이 중 어느 것도 검출되지 않았다. Mdm2i의 2차 방식을 인지함으로써 약물의 온-타겟 효과로 인한 부작용을 감소시키는 방식으로 임상 시험을 계획하는 것을 도울 수 있다.

[0009] 흥미롭게도, 오래 지속되는 효과는 단일 용량 후 수 주 동안 지속될 수 있으며, 이는 매일 치료에 대한 필요를 제거하고, 약물을 간헐적으로 투여하는 것을 허용하는 것으로 관찰되었다. 약물의 투여가 없는 휴식 동안, 유기체는 잠재적인 온-타겟 효과 또는 부작용으로부터 회복될 수 있으며; 특히 백혈구 (WBC), 호중구 및 혈소판의 수가 회복될 수 있다. 오래 지속되는 효과를 촉발하는 용량으로 Mdm2i를 투여하는 것은 Mdm2i가 적어도 보다 낮은 용량으로 매일 투여되는 경우만큼 유효하도록 하며, 보다 내약성이 양호하게 될 수 있다. 보다 덜 빈번한 투여는 또한 보다 양호한 환자 친근감, 환자 순응도를 초래할 수 있으며, 특히 약물이 정맥내로 투여되는 경우, 유의한 환자 이익을 가질 수 있다. 예를 들어, 국소 주사 부위 자극은 다음 용량이 도래하기 전에 완전하게 치유될 수 있다.

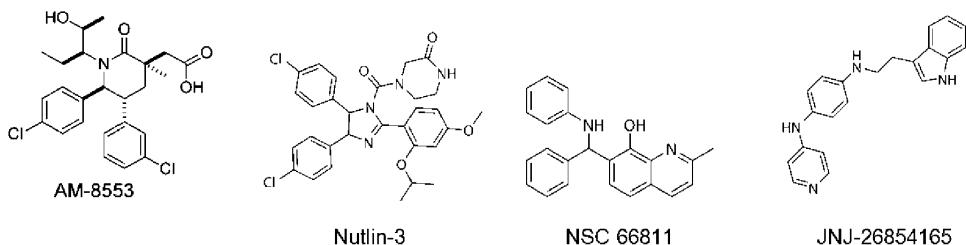
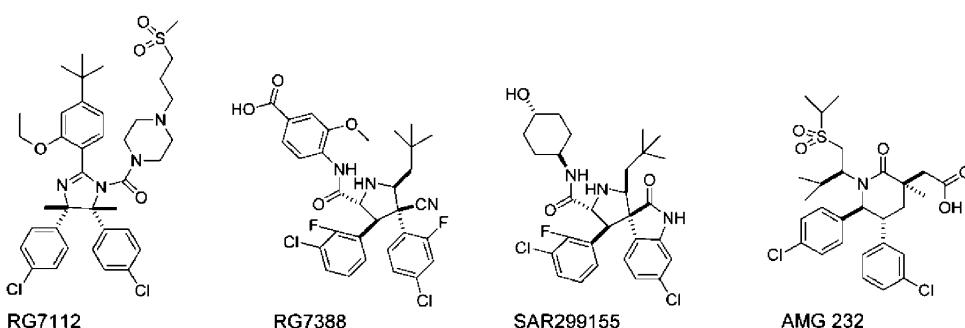
[0010] 지속된 효과를 갖는 Mdm2i의 간헐적 투여는 지속된 효과를 달성하는 데 사용되는 용량에 비해 보다 낮은 용량의 매일 투여를 포함하는 투여 요법과 조합될 수 있다. 제1 용량의 간헐적 투여 및 제2 용량의 매일 투여의 조합은 화합물 효능의 관점에서 상승작용적 효과를 생성하며, 이는 예를 들어 종양 수축 또는 종양 퇴행으로서 관찰

된다. 또한, 간헐적으로 투여되는 경우 Mdm2i의 보다 양호한 내약성으로 인해, 약물은 다른 항신생물제와 조합으로 사용될 수 있다. Mdm2i 및 다른 항신생물제의 조합은 이것이 간헐적으로 투여되는 경우, 제2 항신생물제와의 조합 요법의 전체적인 효능을 증가시키면서 Mdm2i의 개선된 내약성을 이를 수 있다.

- [0011] 구체적으로, 본 개시내용은 하기 항목에 열거된 바와 같이, 각각 단독으로 또는 조합으로 하기 측면, 유리한 특징 및 구체적인 실시양태를 제공한다:
- [0012] 1. MDM2i가 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 대상체에게 투여되고, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 2주인 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0013] 2. MDM2i가 간헐적으로 대상체에게 투여되고, 각각의 2회의 연속적 투여 사이의 기간이 적어도 3주이며, 60일 이하인 항목 1에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0014] 3. MDM2i가 간헐적으로 대상체에게 투여되고, 연속적 투여 사이의 기간이 3주인 항목 1 또는 2에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0015] 4. MDM2i가 정맥내로 투여되는 것인 항목 1 내지 3 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0016] 5. MDM2i가 제1 및 제2 용량으로 대상체에게 투여되고, 제1 용량이 제2 용량과 동일한 날, 제2 용량에 대해 연속적인 날 또는 상이한 날에 투여되고, 제1 용량의 2회의 연속적 투여가 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 6주 또는 60일마다, 및 60일마다 이하로 간헐적으로 투여되고, 제1 및 제2 용량이 동일하지 않은 것인 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0017] 6. 제2 용량이 매일, 임의로 휴식을 두고 투여되는 것인 항목 5에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0018] 7. 휴식이 적어도 1일 길이, 2일, 3일, 4일, 1주, 2주, 또는 3주 및 최대로 26일 길이인 항목 6에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0019] 8. 제2 용량이 제1 용량이 투여된 후 1 내지 14일에 투여되는 것인 항목 5 내지 7 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0020] 9. 제2 용량이 2주 동안 투여된 후, 치료가 없는 2주의 기간, 및 그 후 주기의 반복이 이어지는 것인 항목 5 내지 8 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0021] 10. 제1 용량이 제2 용량보다 높은 것인 항목 5 내지 9 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0022] 11. 제1 또는 제2 용량 중 적어도 하나가 정맥내로 투여되는 것인 항목 5 내지 10 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0023] 12. 제1 용량의 2회의 연속적 투여가 적어도 2주마다 간헐적으로 투여되는 것인 항목 5 내지 11 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0024] 13. 제1 용량의 2회의 연속적 투여가 적어도 3주마다 간헐적으로 투여되는 것인 항목 5 내지 11 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0025] 14. 암이 방광암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 간암, 구강암, 담도암, 급성 및 만성 림프구성 백혈병, 급성 및 만성 골수성 백혈병, 만성 골수단핵구성 백혈병, 결장직장암, 위암, 위장관 기질암, 간세포암, 신경교종, 림프종, 흑색종, 다발성 골수종, 골수증식성 질환, 신경내분비암, 폐암, 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 전립선암, 신장 세포암, 육종, 지방육종 및 갑상선암인 항목 1 내지 13 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0026] 15. 암이 흑색종, 폐암 또는 신경모세포종인 항목 1 내지 13 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0027] 16. 암이 흑색종인 항목 1 내지 13 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i.
 - [0028] 17. MDM2i가 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 투여되고, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 6주 또는 60일이며, 60일 이하인 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도.
 - [0029] 18. MDM2i가 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 이를 필요로 하는 대상체에게 투여되고, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 2주, 3주, 적어도 4주, 적어도 6주 또는 60일이며, 60일 이하인 암의 치료

방법.

- [0030] 19. MDM2i가 인간에게 투여되는 것인 항목 1 내지 16 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18에 따른 암의 치료 방법.
- [0031] 20. MDM2i가 (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0032] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0033] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(6-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페리딘-3-일)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0034] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(6-{메틸-[4-(3-메틸-4-옥소-이미다졸리딘-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페리딘-3-일)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0035] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(5-{메틸-[4-(3-메틸-4-옥소-이미다졸리딘-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페라진-2-일)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0036] 1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온,
- [0037] (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-페리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-페리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온
- [0038] 4-[(S)-5-(3-클로로-2-플루오로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-페리미딘-5-일)-3-이소프로필-6-옥소-3,4,5,6-테트라히드로-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-일]-벤조니트릴
- [0039] (S)-5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디히드로-페리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-페리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온
- [0040] (S)-5-(3-클로로-4-플루오로페닐)-6-(4-클로로페닐)-2-(2,4-디메톡시페리미딘-5-일)-1-((R)-1-메톡시프로판-2-일)-5,6-디히드로페롤로[3,4-d]이미다졸-4(1H)-온,



- [0041] 및 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-페리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-6-페리미딘-5-일)-1-((R)-1-메톡시프로판-2-일)-5,6-디히드로-페롤로[3,4-d]이미다졸-4(1H)-온
- [0042] 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항목 1 내지 16 및 19 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17 또는 19에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18 또는 19에 따

른 암의 치료 방법.

[0044] 21. MDM2i가 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온 또는

[0045] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온인 항목 1 내지 16 및 19 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17 또는 19에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18 또는 19에 따른 암의 치료 방법.

[0046] 22. MDM2i가 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온인 항목 1 내지 16 및 19 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17 또는 19에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18 또는 19에 따른 암의 치료 방법.

[0047] 23. 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도 또는 암의 치료 방법이 환자에게 투여되는 또 다른 제약 성분을 더 포함하는 것인 항목 1 내지 16 및 19 내지 22 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17 및 19 내지 22 중 어느 하나에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18 및 19 내지 22 중 어느 하나에 따른 암의 치료 방법.

[0048] 24. 또 다른 제약 성분이 또 다른 항신생물제인 항목 23에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 23에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 23에 따른 암의 치료 방법.

[0049] 25. 1종 초과의 추가의 항신생물제가 투여되는 것인 항목 24에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 24에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 24에 따른 암의 치료 방법.

[0050] 26. MDM2i가 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 투여되고, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 1주인 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료 방법.

[0051] 27. MDM2i가 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 투여되고, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 2주인 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료 방법.

[0052] 28. MDM2i가 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 투여되고, 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 3주인 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 23 내지 25 중 어느 하나에 따른 암의 치료 방법.

[0053] 29. MDM2i가 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온인 항목 1 내지 16 및 19 내지 28 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17 및 19 내지 28 중 어느 하나에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18 및 19 내지 28 중 어느 하나에 따른 암의 치료 방법.

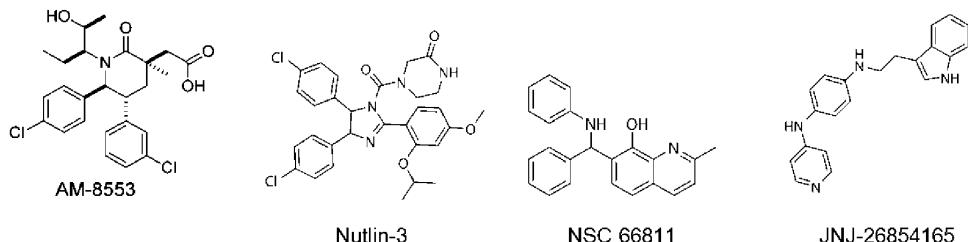
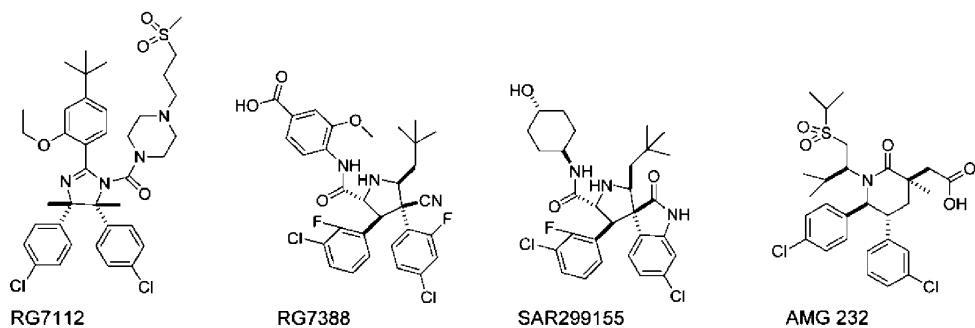
[0054] 30. MDM2i가 (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온인 항목 1 내지 16 및 19 내지 28 중 어느 하나에 따른 암의 치료에 사용하기 위한 MDM2i, 항목 17 및 19 내지 28 중 어느 하나에 따른 암의 치료용 의약의 제조를 위한 MDM2i의 용도, 또는 항목 18 및 19 내지 28 중 어느 하나에 따른 암의 치료 방법.

[0055] 용어 "Mdm2 억제제" 또는 "Mdm2i"는 본원에서 시간 분해 형광 에너지 전달 (TR-FRET) 검정 (Time Resolved Fluorescence Energy Transfer (TR-FRET) Assay)에 의해 측정된, 10 μM 미만, 바람직하게는 1 μM 미만, 바람직하게는 nM의 범위인 IC₅₀으로 HDM-2/p53 또는 HDM-4/p53 상호작용을 억제하는 임의의 화합물을 나타낸다.

p53-Hdm2 및 p53-Hdm4 상호작용의 억제는 시간 분해 형광 에너지 전달 (TR-FRET)에 의해 측정된다. 형광 에너지 전달 (또는 퍼르스터 (Foerster) 공명 에너지 전달은 공여체 및 수용체 5 형광 분자 사이의 에너지 전달을 기재한다. 이 검정을 위해, C-밀단 비오틴 (Biotin) 모이어티로 태그부착된 MDM2 단백질 (아미노산 2 내지

188) 및 MDM4 단백질 (아미노산 2 내지 185)이 공여체 형광단으로서 기능하는 유로퓸 (Europium) 표지된 스트렙타비딘 (퍼킨 엘머, 인코포레이티드 (Perkin Elmer, Inc.), 미국 메사추세츠주 월섬)과 조합으로 사용된다. p53 유래된, Cy5 표지된 웨티드 Cy5-TFSDLWKLL (p53 aa18-26)은 에너지 수용체이다. 340 nm에서의 공여체 10 분자의 여기 시, MDM2 또는 MDM4 및 p53 웨티드 사이의 결합 상호작용은 665 nm에서의 수용체 방출 광장에서 에너지 전달 및 향상된 반응을 유도한다. MDM2 또는 MDM4의 p53 결합 부위에 결합하는 억제제 분자로 인한 p53-MDM2 또는 p53-MDM4 복합체의 형성의 방해는 615 nm에서 증가된 공여체 방출을 유도한다. 비율계측 FRET 검정 판독은 시간 분해 모드 (계수율 665 nm/계수율 615 nm x 1000)로 측정된 2개의 별개의 형광 신호의 15개의 미가공 데이터로부터 계산된다. 검정은 하기 절차에 따라 수행될 수 있다: 이 시험은 백색 1536w 미세역가플레이트 (그라이너 바이오-원 게엠베하 (Greiner Bio-One GmbH), 독일 프리켄하우센)에서 3.1 μl의 총 부피로, 90% DMSO/10% H₂O (3.2% 최종 DMSO 농도)에 희석된 화합물 100 nM를 반응 완충제 (PBS, 125 mM NaCl, 0.001% 노백신 (Novexin) (탄수화물 중합체 (노백신 중합체)로 이루어짐), 단백질의 용해도 및 안정성을 증가시키도록 설계됨; 노백신 리미티드 (Novexin Ltd.), 영국 앰브리지사이언스), 젤라틴 (Gelatin) 0.01%, 0.2% 플루로닉 (Pluronic) (에틸렌옥시드 및 프로필렌옥시드로부터의 블록 공중합체, 바스프 (BASF), 독일 루드빅샤펜), 1 mM DTT) 중 2 μl 유로퓸 20 표지된 스트렙타비딘 (최종 농도 2.5 nM)과 배합한 후, 검정 완충제에 희석된 0.5 μl MDM2-바이오 또는 MDM4-바이오 (최종 농도 10 nM)를 첨가함으로써 수행한다. 용액을 실온에서 15분 동안 예비-인큐베이션한 후, 검정 완충제 중 0.5 μl Cy5-p53 웨티드 (최종 농도 20 nM)를 첨가한다. 실온에서 10분 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 판독한다. 샘플의 측정을 위해, 하기 설정 30을 갖는 아날리스트 (Analyst) GT 다중모드 마이크로플레이트 판독기 (몰리큘라 디바이시즈 (Molecular Devices))를 사용한다: 2색성 거울 380 nm, 여기 330 nm, 방출 공여체 615 nm 및 방출 수용체 665 nm. IC₅₀ 값을 XL핏 (XLfit)을 사용하여 곡선 핏팅 함으로써 계산한다. 특정되지 않는 경우, 시약은 미국 미주리주 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미컬 컴퍼니 (Sigma Chemical Co)로부터 구입한다.

- [0056] 한 실시양태에 따르면, Mdm2 억제제는 예를 들어 임의의 하기 화학식의 화합물일 수 있다:
- [0057] S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0058] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0059] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(6-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페리딘-3-일)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0060] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(6-{메틸-[4-(3-메틸-4-옥소-이미다졸리딘-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페리딘-3-일)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0061] (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(5-{메틸-[4-(3-메틸-4-옥소-이미다졸리딘-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페라진-2-일)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온
- [0062] 1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로폭시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온,
- [0063] (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-페리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-페리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온
- [0064] 4-[(S)-5-(3-클로로-2-플루오로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-페리미딘-5-일)-3-이소프로필-6-옥소-3,4,5,6-테트라히드로-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-일]-벤조니트릴
- [0065] (S)-5-(5-클로로-2-옥소-1,2-디히드로-페리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-페리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온
- [0066] (S)-5-(3-클로로-4-플루오로페닐)-6-(4-클로로페닐)-2-(2,4-디메톡시페리미딘-5-일)-1-((R)-1-메톡시프로판-2-일)-5,6-디히드로페롤로[3,4-d]이미다졸-4(1H)-온,



[0067]

또는 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)-6-(4-클로로페닐)-2-(2,4-디메톡시-d6-피리미딘-5-일)-1-((R)-1-메톡시프로판-2-일)-5,6-디히드로피롤로[3,4-d]이미다졸-4(1H)-온.

[0069]

특정 실시양태에서, MDM2i는 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-피롤로[3,4-d]이미다졸-4-온 (이하 화합물 A), 또는 그의 제약학적으로 허용되는 염이다.

[0070]

또 다른 실시양태에서, MDM2i는 (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온 (이하 화합물 B)이다.

[0071]

본원에 사용된 용어 "대상체" 또는 "환자"는 암 또는 직접적으로 또는 간접적으로 암을 포함하는 임의의 장애를 앓을 수 있거나 이로 고통받는 동물을 포함한다. 대상체의 예로는 포유동물, 예를 들어, 인간, 개, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 고양이, 마우스, 토끼, 래트 및 트랜스제닉 비-인간 동물을 들 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 대상체는 인간, 예를 들어, 암을 앓고 있거나, 앓을 위험성이 있거나, 잠재적으로 앓을 수 있는 인간이다. 특정 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 인간이다.

[0072]

본원에 사용된 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 발병을 정지, 치연 (즉, 질환의 임상적 증상 이전의 기간)시키고 /거나, 질환을 전개시키거나 악화시킬 위험성을 감소시키는 것을 나타내거나, 대상체에서의 적어도 하나의 증상의 완화, 감소 또는 경감 또는 질환의 진행의 지연의 실행을 포함한다. 예를 들어, 치료는 장애의 하나 또는 몇몇 증상의 감소 또는 장애, 예컨대 암의 완전한 균절일 수 있다.

[0073]

용어 "항신생물제"는 항증식 또는 항암 활성을 나타내는 제약 활성 성분이다. 조합 치료에 적합한 가능한 항신생물제로는 BRAF 억제제 (예를 들어 (S)-메틸-1-(4-(3-(5-클로로-2-플루오로-3-(메틸술폰아미도)페닐)-1-이소프로필-1H-피라졸-4-일)피리미딘-2-일아미노)프로판-2-일카르바메이트 또는 베무라페닙); 역형성 럼프종 키나제 (ALK) 억제제 (예를 들어 세리티닙, AE684, 알렉тинib, 크리조티닙 (Crizotinib), AP26113, ASP3026, ADZ3463); 아로마타제 억제제 (예를 들어 아타메스탄, 엑세메스탄 및 포르메스탄, 아미노글루테티미드, 로글레티미드, 피리도글루테티미드, 트릴로스탄, 테스토락톤, 케토코나졸, 보로졸, 파드로졸, 아나스트로졸 또는 레트로졸); 항에스트로겐제 (타목시펜, 플베스트란트, 랄록시펜 또는 랄록시펜 염산염); 항안드로겐제 (예를 들어 비칼루타미드); 토포이소머라제 I 억제제 (예를 들어 토포테칸, 지마테칸, 이리노테칸, 카프토테신 및 그의 유사체, 9-니트로카프토테신 및 거대분자 카프토테신 접합체 PNU-166148 (W099/ 17804에서의 화합물 A1); 토포이소머라제 II 억제제 (예를 들어 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신, 네모루비신, 미톡산트론, 로속산트론, 에토포시드 또는 테니포시드); 미세관 활성 화합물 (예를 들어 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 빈블라스틴 술페이트, 빙크리스틴, 빙크리스틴 술페이트, 비노렐빈, 디스코데르몰리드, 콜키신); 알킬화 화합물 (예를 들어 시클로포스파미드, 이포스파미드, 멜랄란 또는 니트로소우

레아); 히스톤 데아세틸라제 억제제; 세포 분화 과정을 유도하는 화합물; 시클로옥시게나제 억제제; MMP 억제제; mTOR 억제제; 항신생물성 항대사물; 플라틴 화합물; 단백질 또는 지질 키나제 활성을 표적화/감소시키는 화합물; 항-헬관신생 화합물; 단백질 또는 지질 포스파타제의 활성을 표적화하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물; 고나도렐린 효능제 (예를 들어 아바렐릭스, 고세렐린 및 고세렐린 아세테이트); 메티오닌 아미노펩ти다제 억제제; 비스포스포네이트; 생물학적 반응 조정제; 항증식성 항체; 혜파라나제 억제제; Ras 종양원성 이소형의 억제제; 텔로머라제 억제제; 프로테아솜 억제제; 혈액 악성종양의 치료에 사용되는 화합물; F1t-3의 활성을 표적화하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물; Hsp90 억제제; 키네신 스판들 단백질 억제제; MEK 억제제; 류코보린; EDG 결합제; 항백혈병 화합물; 리보뉴클레오티드 리덕타제 억제제; S-아데노실메티오닌 데카르복실라제 억제제; 혈관신생억제 스테로이드; 코르티코스테로이드; 다른 화학요법 화합물 (하기 정의된 바와 같음); 광증감화 화합물 (예를 들어 비수딘 (VISUDYNE) 및 포르피며 나트륨)을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

도면의 간단한 설명

[0074]

- 도 1 1회의 단일 정맥내 (i.v.) 치료 후의 SJSA-1 종양-함유 래트에 대한 화합물 A의 PK
- 도 2 1회의 단일 i.v. 치료 후의 SJSA-1 종양-함유 래트에 대한 화합물 A의 PK 및 PD
- 도 3 화합물 A로의 SJSA-1 종양-함유 누드 래트의 단일 i.v. 치료 후의 종양 성장
- 도 4 화합물 A로의 SJSA-1 종양-함유 누드 래트의 단일 i.v. 치료 후의 체중 (BW)의 변화
- 도 5 SJSA-1 종양-함유 누드 래트의 단일 i.v. 치료 후의 화합물 A의 효능 - 개별적 데이터
- 도 6 단일 i.v. 치료 후의 골수 회복
- 도 7 혈액 중 및 흉골로부터의 골수 섹션에 대한 백혈구 카운트 사이의 상관관계
- 도 8은 SJSA-1 종양-함유 누드 래트의 i.v. (q3w, 즉, 3주마다 1회) 치료 후 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다.
- 도 9 백혈구 (WBC), 호중구 및 혈소판 카운트에 대한 i.v. 치료 (q3w)의 효과
- 도 10은 13.7 및 18.2 mg/kg으로의 화합물 A로의 q3w i.v. 치료의 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다.
- 도 11 백혈구 (WBC), 호중구 및 혈소판 카운트에 대한 13.7 및 18.2 mg/kg으로의 화합물 A로의 i.v. 치료 (q3w)의 효과
- 도 12 경구로 화합물 A로의 1회의 단일 치료 후의 SJSA-1 종양 함유 래트에 대한 PK 연구
- 도 13은 경구로 화합물 A의 단일 투여 후의 약물 농도 및 종양에서의 PD 반응을 나타낸다.
- 도 14는 화합물 A로의 q3w p.o. 치료의 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다.
- 도 15는 화합물 A로의 q3w p.o. 치료의 42일에 걸친 백혈구 및 혈소판 카운트를 나타낸다.
- 도 16 Mdm2i의 낮은 용량은 높은 용량과 동일한 생화학적 효과를 촉발하지 않는다.
- 도 17 Mdm2i의 간헐적 투여 요법과 보다 빈번한 투여 요법의 조합은 효능에 대한 상승작용적 효과를 갖는다.
- 도 18 높은 용량으로 간헐적으로, 낮은 용량을 매일, 및 둘 다의 투여 스케줄의 조합으로 화합물 A를 투여한 후의 SJSA-1 종양 함유 래트에 대한 효능
- 도 19 높은 용량을 간헐적으로, 낮은 용량을 매일, 및 둘 다의 투여 스케줄의 조합으로 화합물 A를 투여한 후의 SJSA-1 종양 함유 래트에 대한 내약성
- 도 20 흑색종 PTX 함유 래트에서의 27 mg/kg q3w 경구로의 Mdm2i의 효능. "Cmp A"는 "화합물 A"에 대한 약어이다.
- 도 21 흑색종 PTX 함유 래트에서의 27 mg/kg q3w 경구로의 Mdm2i의 내약성
- 도 22 SHSY5Y 종양 함유 마우스에서의 세리티닙과 조합으로 간헐적으로 투여된 화합물 A의 효능. "Cmp A"는 "화합물 A"에 대한 약어이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075]

현재, Mdm2 억제제는 매일 투여되며, 임의로 휴약기를 갖는다. 일련의 매일 Mdm2i 치료 후의 휴식은 특정 경우에는 내약성 문제로 인해 연장되었을 수도 있다. 예외적으로, Mdm2 억제제가 매주 간격으로 투여된다. 이제, 정맥내로 또는 경구로 투여된 보다 높은 단일 용량으로의 (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온 (화합물 A)이 화합물 A 또는 (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온 (화합물 B)의 보다 낮은 경구 (p.o.) 용량으로 이전에는 결코 도달하지 않았던 강한 Puma mRNA 유도 ($E_{max} \geq 70$ 배수 유도)를 허용하였음을 처음으로 밝혀내었다. p53의 억제제인 Mdm2는 최저의 mRNA 유도를 가졌음을 주목하는 것은 흥미롭다. 종양에서의 이러한 높은 Puma mRNA 유도 후에 치료-후 24시간의 강한 카스파제-3 활성화가 이어졌으며, 이는 치료-후 48 및 72시간의 종양 세포 밀도의 극적인 감소로 해석되었다. 아폽토시스 경로의 강한 유도는 높은 용량으로의 단일 치료에 의해 유도된 놀랍고도 예상치 않은 종양 퇴행의 주요 동인으로 명백하게 확인되었다. 사실, 20 mg/kg으로의 화합물 A로의 단일 i.v. 치료는 42일 동안 치료된 래트의 82% (9/11)에서 완전한 SJSA-1 종양 반응 (100% 퇴행)을 유도하였다. 더욱이, 27 mg/kg으로의 화합물 A로의 3주마다 1회 (q3w) p.o. 치료는 1 및 2 주기 후 각각 88 및 27% SJSA-1 종양 퇴행을 유도하였다.

[0076]

본 발명자들은 강한 Puma 유도 (즉, 비-치료된 암 세포에서의 mRNA 발현에 비해 mRNA 발현의 적어도 20 배수 유도)로 연장된 아폽토시스 또는 지속된 항증식 효과를 촉발하기 위해서는, 화합물 A가 충분히 높은 용량으로 투여되어야 함을 밝혀내었다. 상기 용량은 약물이 효능을 유의하게 소실하지 않고, 잠재적으로 내약성을 개선시키면서, 간헐적으로 투여되는 것을 허용한다. 화합물 A의 단일 용량은 2주마다 투여될 수 있다. 또한, 3주, 4주, 6주의 휴식, 또는 심지어 60일의 간헐상태는 여전히 종양에 대한 유의한 효과를 나타낼 수 있다. 상기 높은 용량보다 아래에서는, 화합물 A는 단지 Puma mRNA 발현을 약 5 내지 6배 이하로 유도하며, 그 결과 계속적인 항증식 효과를 달성하기 위해, 연속적으로, 예를 들어 매일 투여되는 것을 요구한다. 약물이 충분히 오래 심지어 보다 낮은 용량으로 투여되었다면, 치료로부터 휴식이 이루어질 수 있지만, 치료 주기는 적어도 약 2주에서 반복되어야 하며, 그렇지 않다면 항증식 효과는 더이상 관찰되지 않는다.

[0077]

한 실시양태에서, 본 개시내용에 따르면, Mdm2i의 단일 용량이 적어도 2주마다, 및 60일마다 이하로 투여되는 것인 암의 치료에 사용되는 Mdm2i가 제공된다. 또 다른 실시양태에서, Mdm2i의 단일 용량은 적어도 3주마다, 및 60일마다 이하로 투여된다.

[0078]

화합물 A 이외의 Mdm2i는 또한 강한 Puma 유도를 달성할 수 있지만, 사용되는 용량은 화합물의 효능에 의존한다. 임의의 이론에 구애되기를 원하지는 않지만, 매우 현저한 Puma 유도를 통해 연장된 효과를 생성하는 Mdm2i의 용량은 Mdm2i가 보다 강력한 경우보다 낮을 필요가 있는 것으로 믿어진다. 그러나, 원칙적으로, 또한 낮은 강력한 Mdm2i는 단지 충분한 혈장 노출에 도달하는 용량으로 투여되는 경우에만, 오래 지속되는 효과를 초래하는 이 제2 수준 방식을 활성화할 수 있다. Mdm2i가 적어도 8시간 동안 GI80-농도 초과인 경우, 약 26% 종양 퇴행이 달성될 수 있으며, Mdm2i 노출이 적어도 17시간 동안 GI80 초과로 지속되는 경우, 90% 초과의 종양 퇴행이 달성될 수 있다. GI-80은 80%의 종양 세포 성장 억제를 유발하는 데 필요한 용량이다. 따라서, 일반적으로, Mdm2i의 높은 용량 또는 보다 높은 용량은 혈장에서 생체내에서 적어도 다르게는 종양 세포를 시험관내에서 Mdm2i에 8시간 동안 노출시킬 경우 GI-80을 유발하는 농도에서, 적어도 8시간, 바람직하게는 적어도 10시간 동안 Mdm2i가 지속하도록 하는 용량이다. GI-80 농도는 임의의 종식 시험에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 셀타이터-글로 (CellTiter-Glo)® 발광 세포 생존력 검정 (Luminescent Cell Viability Assay)이 사용된다. 예를 들어, 시험관내의 세포를 Mdm2i로 8시간 동안 처리한 후, 세포를 세척하여 배지 중의 화합물을 제거하고, 생존가능한 세포의 수의 측정을 72시간 후에 수행한다. 이를 다양한 농도에서 반복하여 GI-80 농도를 확인한다. 높은 용량은 적어도 8시간 동안 생체내에서 Mdm2i의 상기 GI-80 농도에 도달하거나 대체해야 한다. 낮은 용량은 최저의 높은 용량보다 낮다. 불행하게도, 보다 높은 용량의 Mdm2i의 투여는 특히 경구로 주어질 경우, 단순히 화합물의 특정 약동학으로 인해 항상 충분한 혈장 노출로 전환되지 않는데, 이는 예를 들어 낮은 생체이용률은 약물이 충분히 높은 혈장 수준을 달성하는 것을 막을 수 있기 때문이다. 이 경구 투여의 단점은 Mdm2i가 정맥내로 투여될 경우 극복된다.

[0079]

투여되는 용량의 맥락에서 본원에 언급된 "용량"은 또한 강도를 의미할 수 있다.

[0080]

따라서, 이 개시내용의 한 목적은 MDM2i가 간헐적으로 대상체에게 투여되고, 적어도 3개의 연속적 용량 사이의 기간이 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 6주 또는 60일이며, 60일 이하인 암의 치료에 사용하기 위

한 MDM2i를 제공하는 것이다. MDM2i는 적어도 3개의 연속적 용량으로 간헐적으로 대상체에게 투여되고, 3개의 용량의 각각의 2개의 연속적 용량 사이의 기간은 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 6주 또는 60일이다. 상한은 이용가능한 데이터에 기초하여 설정되지만, 본 발명자들은 훨씬 더 드문 투여가 임상적으로 허용되는 결과를 초래할 수 있으며, 유용할 수 있다는 가능성을 허용한다. 환자 순응도를 개선시키기 위해, Mdm2i에 대한 투여 쳐방은 3주 또는 4주마다 1회, 특히 3주마다 1회일 수 있다.

[0081] 본 발명자들은 신체에서의 Mdm2i의 준최적 노출의 문제가, 특히 이것이 $1 \mu\text{M}$ 초과의 세포 증식 IC50을 갖는 경우, 약물을 정맥내로 투여함으로써 해결될 수 있음을 밝혀내었다. 예로서, 본 발명자들은 화합물 A의 보다 낮은 용량 (20 mg/kg)이 정맥내로 투여될 수 있는 반면, 동일한 반응을 자극하기 위해 경구로는 27 mg/kg 이 필요하였음을 밝혀내었다. 따라서, Mdm2i를 정맥내로 투여하는 것은 상기언급된 연장된 항종양 효과를 갖는 반응성의 제2 단계를 달성하기 위해 보다 낮은 효능의 Mdm2i에 대한 기회를 연다. 이처럼, 단지 정맥내 투여만이 요구되는 노출을 초래할 것이기 때문에, 약물을 보다 널 빈번하게 투여하는 기회가 있다. 또한, Mdm2i를 경구 투여에 필요한 용량에 비해 보다 낮은 용량으로 정맥내로 투여하는 것은 적어도 일부 내약성 이점을 제공할 수 있다.

[0082] 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명자들은 MDM2i가 정맥내로 투여되는 것인 암의 치료에 사용하기 위한 Mdm2i를 제공한다.

[0083] 또 다른 실시양태에서, MDM2i의 간헐적 투여는 단일 용량의 간헐적 투여에 사용되는 용량과는 상이한 MDM2i의 제2 용량의 또 다른 투여 요법에 의해 보충될 수 있다. 간헐적 투여 스케줄을 또 다른 보다 빈번한 스케줄과 조합하는 것은 각각의 스케줄에 사용되는 Mdm2i의 용량을 감소시키는 것을 허용하며, 따라서 내약성을 추가로 개선시킨다. Mdm2i의 높은 용량을 간헐적으로 투여하면서, 또한 Mdm2i를 보다 빈번히, 예를 들어 보다 낮은 용량으로 매일 투여하는 것은, 둘 다의 스케줄에 대한 용량을, 상기 투여 스케줄이 단독으로 사용된 경우, 적어도 2가지 투여 스케줄 중 하나에서 그렇지 않다면 효과적이지 않았을 수준으로 감소시키는 것을 가능하게 한다. 상이한 스케줄로의 높은 및 낮은 용량으로의 치료를 조합하는 것은 또한 상승작용적으로 유효한 것으로 입증되었다. 한 실시양태에서, Mdm2i가 적어도 2주마다 투여되는 간헐적 투여, Mdm2i의 매일 치료는 중첩될 수 있다. 본 발명자들은 화합물 A의 2가지 투여 요법, 즉, 보다 높은 용량으로 3주마다 1회 치료, 및 28-일 주기마다 2-주 휴식으로 보다 낮은 용량으로 2주 매일 치료를 조합하는 것은 둘 다의 치료의 상승작용적 항종양 효과를 초래함을 밝혀내었다. 간헐적 치료에 첨가될 수 있는 제2 투여 요법은 동일한, 연속적인 또는 다른 날에 시작할 수 있다. 제2 투여 요법은 예를 들어 임의로 휴식을 두고 매일일 수 있다. 일련의 매일 치료 후의 휴식은 적어도 1일 길이, 2일, 3일, 4일, 1주, 2주, 또는 3주, 및 최대로 26일 길이일 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 투여 요법의 용량은 제1 용량이 투여된 후 1 내지 14일에 투여된다. 구체적인 실시양태에서, Mdm2i의 보다 낮은 용량으로의 제2 투여 스케줄은 단일 높은 용량이 투여된 후 다음날에 시작한다. 매일 투여되는 용량은 2주 동안 투여된 후, 치료가 없는 2주의 기간이 이어질 수 있으며, 그 후 치료 주기가 반복될 수 있다. 일반적으로, 간헐적 투여를 위해 사용되는 용량은 간헐적 투여에 첨가되는 보다 빈번한 투여에 사용되는 제2 용량보다 높을 것이다. Mdm2i는 경구로 또는 정맥내로 중 어느 하나로, 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 6주 또는 60일마다의 간헐적 용량은 정맥내로 투여될 수 있는 반면, 제2 매일 용량은 경구로 주어질 수 있다. 그러나, 둘 다의 용량은 정맥내로, 또는 둘 다 경구로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 간헐적으로 투여되는 제1 용량은 적어도 2주의 2회의 연속적 투여 사이의 기간으로 투여될 수 있다.

[0084] 한 측면에서, 간헐적 투여 스케줄에 첨가될 수 있는 제2 투여 스케줄은 Mdm2i를 적어도 5일의 기간, 그 후 1일 이상의 기간 동안 투여하고, 주기를 반복하면서 환자를 Mdm2i로 간헐적으로 상이한 용량으로 치료하는 것을 포함할 수 있다. 그러나, 추가의 제2 투여 스케줄은 예를 들어, 2주 온 (on), 1 또는 2주 오프 (off); 3주 온, 1, 2 또는 3주 오프; 4주 온, 1, 2, 3 또는 4주 오프; 1주 온, 3주 오프; 3주 온, 1주 오프; 4주 온, 1주 오프의 주기를 포함한다.

[0085] 제2 투여 스케줄을 간헐적 투여에 첨가하는 것 외에, 간헐적 투여으로의 MDM2i 치료의 임상적 결과는 추가의 제약 성분을 대상체에게 투여함으로써 개선될 수 있다. 추가의 제약 성분은 또 다른 Mdm2i일 수 있지만, 가장 흔히 이는 상이한 작용 메커니즘을 갖는 약물일 것이다. 본원에서, 간헐적으로 투여된 Mdm2i 외에 또 다른 항신생물제를 제공하는 것은 개선된 항종양 효과를 달성할 수 있음이 고려된다. 또한, 간헐적 투여는 Mdm2i 투여의 빈도를 감소시킴으로써 같이 Mdm2i를 또 다른 항신생물제와 조합하는 것에 대해 보다 많은 유연성을 열어 놓으며, 내약성을 개선될 수 있고, 따라서 또 다른 항암 약물을 첨가하는 보다 많은 선택안을 허용한다. 한 실시양태에서, Mdm2i는 BRAF 억제제 또는 ALK 억제제와 조합으로 본원에 기재된 바와 같이 간헐적으로 투여된다. 구체적으로, 또 다른 제약 성분은 (S)-메틸-1-(4-(3-(5-클로로-2-플루오로-3-(메틸술폰아미도)페닐)-1-이소프로

필-1H-피라졸-4-일)페리미딘-2-일아미노)프로판-2-일카르바메이트이다. 또 다른 실시양태에서, 조합은 세리티닙으로 수행된다. Mdm2i가 또 다른 제약 성분과 조합되는 경우, Mdm2i는 간헐적으로 투여될 수 있으며, 단일 용량 사이의 기간은 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 6주 또는 60일이며, 60일 이하이다.

[0086] 본 개시내용은 또한 치료에 사용하기 위한 화합물 A를 제공하며, 여기서, 화합물 A는 간헐적으로 투여되고, 예를 들어 적어도 3개의 용량 중 각각의 2개의 용량 사이의 기간은 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 6주 또는 60일이며, 60일 이하이고, (S)-메틸-1-(4-(3-(5-클로로-2-플루오로-3-(메틸술폰아미노)페닐)-1-이소프로필-1H-피라졸-4-일)페리미딘-2-일카르바메이트 또는 세리티닙이 또한 사용된다. 특히, 화합물 A는 단일 용량으로서 적어도 매주, 또는 적어도 3주마다 투여된다.

[0087] 조합된 사용을 위한 또는 조합 제품에 대한 지시서와 함께 또는 없이, 바람직하게는 함께 개별 파트너의 Mdm2i 및 추가의 제약 성분이 적용되거나 제제화될 수 있다. 따라서, 조합에서의 화합물은 전적으로 개별적으로 투여되거나, 전적으로 개별 제약 투여 형태일 수 있다. 조합 상대는 결합하여 활성이기 위한 동시 또는 순차적 사용을 위한, 서로 독립적으로 판매되며, 그의 조합된 사용을 위한 적절한 지시서가 패키지 장비, 예를 들어 리플렛 등에, 또는 예를 들어 의사 및 의료 스태프에게 제공되는 다른 정보 (예를 들어 구두 연락, 서면으로의 연락 등)에 제공된 제약 조성물일 수 있다. Mdm2i 및 또 다른 활성 제약 성분은 활성 성분의 고정된 또는 비-고정된 조합으로서 제공될 수 있다. 용어 "고정된 조합"은 활성 성분, 예를 들어 Mdm2 억제제 및 항신생물제가 둘 다 단일 실체 또는 투여량의 형태로 환자에게 동시에 투여되는 것을 의미한다. 다시 말해서: 활성 성분은 하나의 투여 형태에, 예를 들어 하나의 정제에 또는 하나의 캡슐에 존재한다. 용어 "비-고정된 조합"은 활성 성분이 둘 다 별개의 실체로서 동시에, 공동으로 또는 순차적으로 중 어느 하나로, 특정 시간 제한 없이 환자에게 투여되는 것을 의미하며, 여기서, 이러한 투여는 환자의 신체에서 2가지 화합물의 치료학적 유효 수준을 제공한다.

[0088] 본원에 기재된 바와 같은 Mdm2i의 사용에 의해 치료되는 암으로는 방광암, 유방암, 뇌암, 두경부암, 간암, 구강암, 담도암, 급성 및 만성 럼프구성 백혈병, 급성 및 만성 골수성 백혈병, 만성 골수단핵구성 백혈병, 결장직장암, 위암, 위장관 기질암, 간세포암, 신경교종, 림프종, 흑색종, 다발성 골수종, 골수증식성 질환, 신경내분비암, 폐암, 비-소세포 폐암, 췌장암, 난소암, 전립선암, 신장 세포암, 육종, 지방육종 및 갑상선암과 같은 암을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 구체적인 실시양태에서, 암은 흑색종이다. 또 다른 실시양태에서, 암은 신경모세포종이다. 더 또 다른 실시양태에서, 암은 백혈병이다.

[0089] 화합물 A로 얻어진 데이터, 및 또한 (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온 (화합물 B)의 생화학적 반응을 아는 것에 기초하여, 본 발명자들은 제안된 투여 요법이 적어도 상기 열거된 Mdm2i로 유리한 효능 또는 내약성을 제공하는 데 사용될 수 있었다고 예상할 수 있다.

[0090] Mdm2i는 제약 조성물로 대상체에게 전달될 수 있다. 사용되는 경구 투여 형태는 예를 들어 정제, 캡슐, 사세, 마이크로펠릿, 과립 등이다. 경구 투여 형태는 Mdm2i 외에 제약에 사용되는 추가의 통상적인 담체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 담체 또는 부형제의 예로는 봉해제, 결합제, 윤활제, 활택제, 안정화제, 및 충전제, 희석제, 착색제, 향미제 및 보존제를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 통상적인 실험에 의해 및 임의의 과도한 부담 없이 투여 형태의 특정 바람직한 특성에 관해 상기언급된 담체 중 1종 이상을 선택할 수 있다. 사용되는 각각의 담체의 양은 관련 기술분야에 통상적인 범위 내에서 다양할 수 있다. 하기 참고문헌에는 경구 투여 형태를 제제화하는 데 사용되는 기술 및 부형제가 개시되어 있다. 문헌 [The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, Rowe et al., Eds., American Pharmaceuticals Association (2003)]; 및 [Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 20th edition, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2003)]을 참조한다. 투여 형태는 예를 들어, 블렌딩, 과립화, 압축, 압밀, 충전, 체질, 혼합 및/또는 정제화에 의해 제조된다.

[0091] Mdm2i는 생체내에서 정맥내로, 예를 들어 용액으로서 적용될 수 있다. 일반적으로, 투여 형태는 투여 전에 다른 공정을 사용함으로써 오토클레이빙 또는 멸균될 것이다. 약물은 주사 또는 주입에 의해 정맥내로 투여될 수 있다. 바람직하게는, Mdm2i는 3시간 미만의 기간에 걸쳐, 보다 바람직하게는 2시간 이하에, 특히 약 1시간에 정맥내로 주입된다.

[0092] Mdm2i는 투여 형태가 제조되는 의약의 제조에 사용될 수 있다. 투여 형태는 추가로 패키징되고, 환자 정보 리

플렛으로 보충될 수 있다.

[0093] Mdm2i는 치료학적 유효량으로 투여된다. 용어 Mdm2i의 "치료학적 유효량"은 대상체의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발할 것인, 예를 들어, 증상을 개선시키거나, 상태를 경감시키거나, 질환 진행을 감속 또는 지연시키거나, 종양 성장을 감속시키거나, 종양 퇴행을 유발할 것인 등의 화합물의 양을 지칭한다. 한 실시양태에서, 생체내에서의 치료학적 유효량은 투여 경로에 따라, 약 0.1 내지 500 mg/kg, 또는 약 1 내지 100 mg/kg의 범위일 수 있다. 예를 들어, 화합물 A에 대해, 생체내에서의 유효량은 경구로 투여되는 경우, 3주마다 100 내지 1500 mg, 특히 3주마다 100 내지 800 mg, 또는 매일 50 내지 600 mg이다. 화합물 B에 대해, 유효량은 경구로 투여되는 경우, 500 내지 4000 mg, 특히 1500 내지 4000 mg이다. 정맥내 용량은 그에 따라 저하될 필요가 있을 것이다.

[0094] 하기 실시예는 본 개시내용을 예시한다.

실시예에 사용된 방법 및 물질

[0096] **화합물 A** - (S)-5-(5-클로로-1-메틸-2-옥소-1,2-디히드로-피리딘-3-일)-6-(4-클로로-페닐)-2-(2,4-디메톡시-피리미딘-5-일)-1-이소프로필-5,6-디히드로-1H-페롤로[3,4-d]이미다졸-4-온

[0097] **화합물 B** - (S)-1-(4-클로로-페닐)-7-이소프로포시-6-메톡시-2-(4-{메틸-[4-(4-메틸-3-옥소-피페라진-1-일)-트랜스-시클로헥실메틸]-아미노}-페닐)-1,4-디히드로-2H-이소퀴놀린-3-온

세포 배양

[0099] SJS-1 골육종 세포 (CRL-2098, ATCC)는 p53에 대한 야생형이며, Mdm2에서 증폭되지만 (16.9 카피, SNP 6.0), Mdm4에서는 그렇지 않다. 이를 10% FCS (#2-01F16-I, 아미메드 (AMIMED)), 2 mM L-글루타민 (#5-10K00-H, 아미메드)으로 보충된 RPMI 1640 (#1-41F01-I, 아미메드)에서 배양하였다. 세포를 먼저 Ca²⁺/Mg²⁺가 없는 둘베코 (Dulbecco) PBS (#3-05F29-I, 아미메드)로 세척하고, 세포를 EDTA를 갖는 PBS (#5-51F00-H, 아미메드) 중 트립신 (Trypsin) 0.05%로 트립신처리하고, 각각의 배양 배지에서 원심분리하고, 세포를 1:8의 비율로, 주 당 2회 신선한 배지로 분할함으로써 처리하였다.

동물

[0101] 모든 누드 래트 (Hsd:RH-Fox1^{nnu}, 할란 스프라그 돌리 (Harlan Sprague Dawley); SF480)를 4일 동안 적응시키고, 먹이 및 물에 무제한으로 접근하게 하여 병원체-제어된 환경에 수용하였다 (5마리 마우스/유형 III 우리). 동물을 트랜스폰더로 확인하였다. 이 보고에 기재된 연구는 바젤-슈타츠 주 수의청 (Kantonales Veterinaeramt Basel-Stadt)에 의해 발령되고, 연방 동물보호법 (Eidgenoessisches Tierschutzgesetz) 및 연방 동물보호령 (Eidgenoessische Tierschutzverordnung)에 엄격하게 준수되는 허용 번호 1975에 의해 커버되는 절차에 따라 수행되었다. 모든 실험은 4 내지 7마리 래트로 수행하였다. 마우스를 화합물의 조합으로 실험에 사용하였다.

종양 모델

[0103] 1.0×10^7 SJS-1 세포를 50% 마트리겔 (Matrigel)[®]에 놓축시키고, 할란 누드 래트의 우측 옆구리에 주사함으로써 피하 종양을 유도하였다. 효능 실험을 세포 주사 후 14일에 시작할 수 있었다. 화합물 A는 각각의 투여를 위해 신선하게 구성되었다. i.v. 주사 (4 ml/kg)를 위해, 화합물 A를 30% PEG300, 10% 솔루톨 (Solutol) HS 15, 6% 플루로닉 F68 및 54% 물에 용해시켰다. 경구 (p.o.) 주사 (5 ml/kg)를 위해, 화합물 A를 인산염 완충 제 pH 6.8 50 mM 중 메틸셀룰로스 0.5% w/V에 용해시켰다. 동물을 높은 용량 (20 mg/kg i.v. 또는 27 mg/kg p.o.)으로 3주마다 1회 (q3w), 또는 높은 용량 (15 mg/kg p.o.), 그 후 24시간 후에 매일 낮은 용량 치료 (3 mg/kg p.o., 2주 온/2주 오프) 중 어느 하나로 치료하였다.

[0104] 동물의 종양 부피 (TVol) 및 체중 (BW)을 주 당 3회 측정하여, 임의의 특정 시점에서 치료의 개시일 (제0일)에 대한 TVol의 퍼센트 변화 ($\Delta\%TVol$)를 계산하였다. 종양 반응을 T/C로서의 종양 부피의 변화 (종료점 빼기 출

발 값, mm^3), 즉, $\left(\frac{\Delta TVol_{\text{약물}}}{\Delta TVol_{\text{비허}}$ $\times 100 \right)$ 에 의해 정량화하였다. 종양 퇴행 또는 TVol의 변화의 퍼센트를 평가하는

경우, 종양 반응을 출발 TVol의 퇴행의 퍼센트, 즉, $\left(\frac{\Delta TVol_{\text{약물}}}{TVol_{\text{제0일}}} \times 100 \right)$ 에 의해 정량화하였다.

[0105] 유사하게, 동물의 체중 (BW)을 주 당 3회 측정하여, 임의의 특정 시점에서 치료의 개시일 (제0일)에 대한 BW의 퍼센트 변화 ($\Delta \%BW$)를 계산하였다.

[0106] 백혈구 (WBC), 호중구 및 혈소판을 시스멕스 (Sysmex) (XT-2000i)를 사용하여 카운팅하였다. 혈액을 상업적으로 제조된 EDTA 코팅된 마이크로튜브 (비디 마이크로테이너 (BD Microtainer), cat # 365975) 내로 수집하였다.

약동학 (PK) 및 약역학 (PD)

[0108] 지시된 시간에서, 동물을 의료용 산소 중 2 내지 3% v/v 이소플루오란에의 노출에 의해 마취시켰다:

[0109] 각각의 동물을 혈액 샘플링 후 마취로부터 회복시키지 않고 죽였다. 혈액을 상업적으로 제조된 EDTA 코팅된 튜브 (밀리안 ((Milian), cat # TOM-14C) 내로 수집하여 혈장을 추출하였다. 조직을 절제하고, 칭량하고, 액체 질소에서 급속 동결시켰다.

[0110] 또는 생검 건을 사용하고, 바늘을 바니 (Barney) 러블 튜브 (코바리스 (Covaris), cat # 520048)중에서 RLT 완충제로 플러싱함으로써 종양 생검을 수집하였다. 또한, 혈액 20 μ l를 꼬리 정맥으로부터 수집하고, 물 20 μ l에 희석하였을 수 있다. 마취의 회복 후, 동물을 그의 각각의 우리에 옮겼다.

[0111] 조직, 혈액 및 혈장 샘플을 분석할 때까지 -80°C에서 동결하여 저장하였다.

조직의 제조

[0113] 동결된 조직을 냉동 건조 분쇄하고, 생검을 코바리스로부터의 크리오프렙 (CryoPrep)TM 시스템 (모델 CP-02)을 사용하여 초음파처리하였다. 보다 구체적으로, 동결된 조직을 티슈튜브스 (TissueTubes)TM로 불리는 일회용 튜브로 옮기고, 크리오프렙TM 시스템에 정치한 후, 적절한 충격 셋팅을 사용하여 분쇄하였다. 생성된 분말을 추가의 프로세싱 (mRNA 정제 또는 조직 중의 화합물의 정량화)을 위해 주걱으로 수집하고, 칭량하였다. 생검을 바니 러블 유리 튜브에서 RLT 완충제 350 μ l로 플러싱하고, 초음파처리 (생검 당 1분)를 위해 코바리스에 정치하였다. 생성된 용해물을 RNA 추출을 위해 QIA쉬레더 (QIAshredder) (79654, 퀴아젠 (Qiagen)) 컬럼 내로 옮겼다.

약역학 (qRT-PCR)

[0115] QIA쉬레더 (79654, 퀴아젠) 및 RN이지 미니 키트 (RNeasy Mini Kit) (74106, 퀴아젠)를, DNA 소화를 수행하지 않은 것을 제외하고는 제조업체의 지시서에 따라 사용하여, 총 RNA를 세포 펠릿으로부터 정제하였다. 총 RNA를 RN아제-무함유수 50 μ L로 용리시켰다. 총 RNA를 분광광도계 ND-1000 나노드롭 (Nanodrop)[®]을 사용하여 정량화하였다. qRT-PCR (정량적 역전사효소 폴리머라제 연쇄 반응)은 샘플 당 삼중으로, 원-스텝 (One-Step) RT qPCR 마스터 믹스 플러스 (Master Mix Plus) (RT-QPRT-032X, 유로젠텍 (Eurogentec))를, 대조군 프라이머 및 표적용 프라이머, 즉, 표 1에 열거된 택맨 유전자 발현 (TaqMan Gene Expression) 검정 (20x 프로브 염료 FAMTM (또는 VIC)-TAMRA (또는 MGB); 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems)) 중 어느 하나와 함께 사용하여 설정하였다.

[0116] <표 1>

qRT-PCR 프라이머의 공급원

유전자	종	택맨 [®] 유전자 발현 키트
GUS 베타	인간	4310888E-1012026
Gapdh	인간	4310884E-0904043
Cdkn1 a (p21)	인간	Hs00355782_m1
BBC3 (puma)	인간	Hs00248075_m1
Mdm2	인간	Hs01066930_m1

[0118]

약동학

[0120] 샘플 제조 및 생물분석 방법

[0121] 혈장 및 조직 중의 화합물 A의 농도를 UPLC/MS-MS 검정에 의해 동시에 결정하였다. 조직을 패스트 프렙 (Fast Prep)[®]-24 시스템 (엠.피. 바이오메디컬즈 (M.P. Biomedicals), 미국 캘리포니아주 어바인)을 사용하여 동등 부피의 HPLC-물 (크로마토그래피용 물, 머크 (Merck))에 균질화하였다. 내부 표준 혼합물 (1 µg/ml) 25 µl를 혈장 또는 조직 균질화물의 분석용 분취액 (25 µl)에 첨가한 후, 단백질을 아세토니트릴 200 µl의 첨가에 의해 침전시켰다. 상청액을 새로운 바이알에 옮겼다. 증발 건조시킨 후, 샘플을 60 µl 아세토니트릴/물 (1/1 v/v)에 재-용해시켰다. 이 용액의 분취액 (5 µl)을 물 중 0.1% 포름산 (용매 A) 및 아세토니트릴 중 0.1% 포름산 (용매 B)의 혼합물로 이루어진 이동상을 갖는 액큐티 (ACQUITY) UPLC BEH C18 컬럼 (워터스 (Waters)TM 1.7 µm 입도, 2.1 x 50 mm) 상에서 분리하였다. 구배 프로그래밍은 600 µl/분의 유량으로 사용하였다. 95% 용매 A로 평형화한 후, 샘플 5 µl를 주사하였다. 0.25분의 잠복 기간 후, 샘플을 0.65분의 기간에 걸쳐 5 내지 100% 용매 B의 선형 구배로 용리시킨 후, 0.35분 유지하였다. 0.25분에 걸쳐 출발 조건에 대해 재-평형화 함으로써 다음 샘플을 위해 컬럼을 제조하였다. 컬럼 용리액을 매스링스 (Masslynx)TM 4.1 소프트웨어에 의해 제어되는 삼중 사중극자 질량 분광계 TQDTM (워터스 코포레이션 (Waters Corporation), 미국 메사추세츠주 밀포드)의 이온 공급원 내로 직접 도입하였다. 전기분무 양성 이온화 (ESI +) 다중 반응 모니터링을 분석물의 MS/MS 검출에 사용하였다. 화합물 A에 대해 m/z 555.3 -- m/z 329.2의 전구 이온에서 생성 이온 전이를 사용하였다. 화합물에 대한 정량 한계 (LOQ)는 0.7 ng/mL로 설정하였다 (CV 및 30% 미만의 전체 편향). 회귀 분석 및 추가의 계산을 콤링크스 (QuanLynx)TM 4.1 (マイクロマス (Micromass)) 및 엑셀 (Excel)TM 2007 (マイクロソフト (Microsoft))을 사용하여 수행하였다. 미지의 샘플의 농도를 비히클로 처리된 동물로부터 얻어진 블랭크 혈장 또는 조직에서 스파이킹된 보정 샘플을 사용하여 구축된 보정 곡선으로부터 분석물/IS의 피크 면적 비율에 기초하여 역-계산하였다.

[0122] 약동학 파라미터의 계산

[0123] 혈장 농도 대 시간 곡선 하 면적 (AUC)을 평균 값으로부터 선형 사다리꼴 규칙으로 계산하고, 추가의 관련 파라미터를 혈관외 투여를 위한 비-구획 모델 (윈논린 (WinNonlin)[®] 프로페셔널 버전 (Professional Version) 5.2, 파르사이트 코포레이션 (Pharsight corp.), 미국 캘리포니아주)을 사용하여 계산하였다.

면역-조직화학

[0125] 모든 조직을 통상적인 절차에 따라 FFPE로 프로세싱하고, 고정한 후, 래트 흉골을 시트레이트/EDTA 완충제에 5 일 동안, 24시간마다 완충제 교환을 하면서 석회질제거하였다. 섹션을 마이크로톱을 사용하여 3 µm로 커팅하였다. p21 및 절단된 카스파제-3 면역조직화학을 벤타나 디스커버리 (Ventana Discovery) XT 자동화 면역염색기 상에서 옴니맵 (OmniMap) 항 마우스 또는 토키 HRP 2차 시약 및 크로모맵 (ChromoMap) DAB 색소원 시스템 (벤타나/로슈 다이아그노스틱스 게엠베하 (Ventana/Roche Diagnostics GmbH), 독일 만하임)을 사용하여 수행하였다. 항원 복구를 셀 컨디셔닝 디스커버리 (Cell Conditioning Discovery) CC1 (벤타나/로슈 다이아그노스틱스)을 사용하여 온전 (95° 8분 + 100° 20분, 절단된 카스파제-3에 대해) 또는 표준 (95° 8분 + 100° 36분, p21에 대해) 조건에서 수행하였다. 1차 항체를 다코 (Dako) 항체 희석제에 바람직한 희석으로 수동으로 적용한 후, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 상응하는 음성 대조군을 AbD 단독과 함께 인큐베이션하였다. 섹션의 대조염색을 해마톡실린 (벤타나/로슈 다이아그노스틱스)을 사용하여 수행하였다. 자동화 염색 실행 후, 슬라이드를 단계적 에탄올 시리즈 중에서 탈수시키고, 크실렌 중에서 세정하고, 퍼텍스 (Pertex) 마운팅 배지를 마운팅하였다.

[0126] 면역조직화학에 사용된 1차 항체를 표 2에 기재한다.

[0127] <표 2>

[0128]

면역조직화학에 사용된 항체

항체	종	클론	참조물	희석 범위
Mdm2	마우스 mAb	SMP14	SC, cat. 965	1/200
p21	마우스 mAb	SX118	다코, cat. M7202	1/50
p21	마우스 mAb	F-5	SC, cat. 6246	1/50
절단된 카스파제-3	토끼 풀리클로날 Ab	-	CST, cat. 9661 (로트 #37)	1/2000
절단된 카스파제-3	토끼 mAb	5A1E	CST, cat. 9664	1/200

[0129]

[0130]

이 표는 면역조직화학에 사용된 항체의 공급원, 뿐만 아니라 그의 희석을 나타낸다.

[0131]

mRNA 계내 혼성화

[0132]

계내 혼성화를 판타진 브이RNA FFPE 검정 (Quant iGene ViewRNA FFPE Assay) 키트 (아피메트릭스 (Affymetrix)/파노믹스 (Pannomics))를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하여 수행하였다. 래트 Ubc (유비퀴틴 C) 및 Bbc3 (PUMA) mRNA에 대한 유전자-특이적 프로브 세트를 맞춤-설계하고, 아피메트릭스에 의해 합성하였다. Bbc3 프로브를 유형 1/페스트 래드 (Fast Red)에서 사용하고, Ubc 프로브를 유형 6/페스트 블루 (Fast Blue)에서 사용하였다. 슬라이드를 판타진 프로토콜에 따라 염색하게 프로세싱하였다. 예비-혼성화 조건은 예비-처리 용액 (아피메트릭스)에서 비등 10분 및 40°C에서 프로테아제 QF (아피메트릭스) 소화 10분으로 최적화되는 것으로 밝혀졌다. 간략하게, 5 마이크로미터 섹션을 커팅하고, 10% 포름알데히드에서 고정하고, 탈파라핀화하고, 재수화하였다. mRNA에 대한 접근성을 증가시키기 위해, 슬라이드를 그 후 최적 조건에서 예비-처리 용액 (아피메트릭스)에서 비등시키고, 프로테아제 QF (아피메트릭스)로 소화시켰다. 그 후, 섹션을 Bbc3 및 대조군 유전자 Ubc에 대해 맞춤-설계된 판타진 브이RNA 프로브로 40°C에서 3시간 동안 혼성화하였다. 프로브가 없는 샘플을 아피메트릭스 매뉴얼의 권고사항에 따라 음성 대조군으로서 이용하였다. 혼성화 후, 비결합된 프로브를 그 후 아피메트릭스로부터의 프로토콜 (분기된 DNA 증폭)에 따라 프리Amp (40°C에서 25분), 그 후 Amp 분자 (40°C에서 15분), 및 마지막으로 40°C에서 15분 동안 알칼리성 포스파타제에 접합된 다중 표지 프로브 (Label Probe) 올리고뉴클레오티드 (LP-AP)를 사용하여 증폭시켰다. 신호의 LP-AP 유형 6 프로브 검출을 페스트 블루 기질 (청색 도트, Cy5 형광)로 실온에서 30분 동안 암조간에서 수행한 후, 신호의 LP-AP 유형 1 프로브 검출을 페스트 래드 기질 (적색 도트, Cy3 형광)로 40°C에서 30분 동안 수행하였다. 신호 검출 후, 슬라이드를 그 후 마이어 (Mayer) 헤마톡실린으로 대조염색하고, 세정하고, 울트라마운트 (Ultramount) 수성 마운팅 배지 (다코)를 사용함으로써 마운팅/커버슬립하였다. 화상을 컬러뷰 (ColorView)III 컬러 카메라 (소프트 이미징 시스템 (Soft Imaging System))가 구비된 올림푸스 (Olympus) BX51 현미경으로 취하였다.

[0133]

mRNA ISH에 사용된 프로브를 표 3에 기재한다.

[0134]

<표 3>

[0135]

mRNA ISH에 사용된 프로브

프로브	참조물
래트 Ubc (유비퀴틴 C)	아피메트릭스, cat. VC6-10047-1
래트 Bbc3 (PUMA)	아피메트릭스, cat. VC1-13801-1

[0136]

[0137] 실시예 1

[0138] 20 mg/kg으로의 단일 i.v. 주사 후의 화합물 A의 약동학 (PK)

도 1은 1회의 단일 i.v. 주사 후 144시간에 걸친 혈장, 종양 및 간 중의 화합물 A 농도를 나타낸다. 화합물에 대한 Tmax는 혈장 및 간에서 5분 및 종양에서 1시간이었다. 화합물 A는 혈장 (AUC_{0-144h} $dn= 8.1$ h. μM)에 비해 종양 (AUC_{0-144h} $dn= 16.5$ h. nmol/g)에서 2배 더 높은 노출을 가졌다. 도 2는 종양 중의 화합물 A 농도 및 종양에서의 약역학 (PD) 반응을 나타낸다. Puma 및 p21은 치료 24시간 후 각각 180배 및 200배의 발현 최대에 도달하는 매우 유사한 mRNA 유도를 가졌다.

[0140] 실시예 2

[0141] SJSA-1 종양-함유 래트에 대한 화합물 A (i.v., 1회)의 PK, PD, 효능 및 내약성

도 3 및 4는 각각 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다. 20 mg/kg (보다 높은 용량)으로의 화합물 A로의 단일 i.v. 치료는 치료 후 14일에 92% 종양 퇴행을 유도하였다. 한 마리의 래트는 과도한 체중 (BW) 소실 때문에 치료 후 제9일에 희생시켜야 했다. 모든 다른 래트에 대해 치료 후 3일의 BW의 약간의 감소에도 불구하고, 이들은 빠르게 회복되었으며, 전체 실험 동안 BW가 증가하였다. 11개의 종양 중 단지 2개 만이 불완전 반응을 가졌으며, 재성장하였다 (도 5). 이를 2마리의 동물을 15 mg/kg으로 i.v. 재치료하였으며, 종양은 여전히 민감하였다. 그러나, 종양 퇴행은 약화되었으며, 이는 보다 큰 종양 크기로 인한 것일 수 있었다. 제1 치료 후, 종양에서의 p21 및 Puma mRNA 발현은 mRNA 발현의 50배 초과의 증가에 도달하였다. Mdm2는 훨씬 더 낮은 mRNA 유도 ($Emax=10$ 배)를 가졌다. 제1 치료 후 제59일에, 모든 래트를 20 mg/kg으로 i.v. 치료하여 숙주에 대한 약물의 효과를 평가하였다. 화합물 A의 노출은 심장, 공장, 비장, 간 및 골수에서 유사하였으나, 혈장에서는 2배만큼 높았다 ($Cmax$ 는 알려지지 않음). 공장 및 골수 (흉골)에서의 p21, Mdm2 및 절단된 카스파제-3의 최대 증가는 항상 치료 후 3시간에 관찰되었다. 모든 염색은 치료 후 7일에 기준선으로 복귀하였다. 공장 색션 상의 절단된 카스파제-3의 증가는 mRNA ISH에 의해 검출된 Puma (Bbc3) mRNA 유도와 강한 상관관계를 나타내었다. 사실, Puma의 최대 증가는 마지막 치료 후 3시간에 관찰되었으며, 치료 후 7일에 기준선으로 복귀하였다. RNA ISH는 명백하게 단지 움세포만이 공장 색션 상에 염색되었음을 나타내었다. 비장 및 심장에서도 동일하였다. 마지막으로, 중증 골수 고갈은 치료 후 14일에 관찰될 수 있었으며, 제22일에 부분적으로 회복되었다 (도 6). 백혈구 카운트는 이것이 골수 고갈과 유의하게 상관됨을 나타내었다 ($R^2=0.59$, $P=0.006$, 도 7). 이는 간헐적 투여가 골수의 회복을 허용함으로 인해 내약성을 개선시킬 수 있음을 시시한다.

[0143] 실시예 3

[0144] SJSA-1 종양-함유 래트에 대한 화합물 A (i.v., q3w)의 PK, PD, 효능 및 내약성

도 8은 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다. 20 mg/kg으로의 제1 치료 후 3주에, 화합물 A는 평균 6% 종양 퇴행을 유도하였다. 그러나, 개별적 데이터는 3마리의 래트는 완전한 반응 (100% 퇴행)을 가졌고, 2마리는 부분적 반응 (50% 초과의 퇴행)을 가졌고, 1마리는 안정한 질환을 가졌고, 1마리는 치료 후 1주에 초기 80% 퇴행에도 불구하고 진행성 질환을 가졌음을 나타낸다. 제2 치료 후, 화합물 A는 100% 종양 퇴행을 유도하였지만, 단지 2/7 동물만이 2개의 완전한 주기에 생존하였다. 사실, 5마리의 래트는 과도한 BW 소실 때문에 제2 치료 후에 희생시켜야 했다: 제2 치료 후 10일에 최초 1마리 및 8일 후에 다른 4마리. 도 9는 실험의 42일에 걸친 백혈구 (WBC), 호중구 및 혈소판 카운트를 나타낸다. 화합물 A는 제1 치료 후 WBC, 호중구 및 혈소판의 극적인 감소를 유도하였으며, 대부분의 래트는 치료 후 제21일에 단지 부분적으로 회복되었다. 그 결과, 제2 치료는 WBC, 호중구 및 혈소판을 0에 가까운 극도로 낮은 수준이 되게 하였다.

[0146] 실시예 4

[0147] SJSA-1 종양-함유 래트에 대한 화합물 A (i.v., q3w)의 PK, PD, 효능 및 내약성

도 10은 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다. 13.7 및 18.2 mg/kg으로의 화합물 A로의 치료는 치료 후 1주에 평균 66 및 88% 종양 퇴행을 유도할 수 있었다. 2주 후, 13.7 mg/kg으로 치료된 모든 종양은 재-성장하였으며, 본 발명자들은 이 치료 군을 중단하기로 결정하였다. 18.2 mg/kg으로의 치료 후 3주에, 종양은 여전히 36% 퇴행하고 있었으며, 2개는 완전한 반응이었다. 종양 성장에 대한 효과는 제2 치료 후 평균으로서 보다 적은 경향이 있었고, 종양은 118% 진행하고 있었으며 (표 4), 2개의 동일한 종양은 완전한 반응을 가졌다. 결과적으로, 제2 치료는 완전한 반응의 수를 증가시키지 않았다. 내약성의 관점에서, 래트는

치료 후 3일에 BW의 약간의 감소를 가졌지만, 이들은 빠르게 회복되었으며, 후속 치료에 의해 BW가 증가하였다. 사실상, 단지 1마리의 래트만이 실험의 마지막 날 동안 BW의 극적인 감소를 가졌으며, 이는 관련된 치료였을 경우 측정될 수 없다. 도 11은 실험의 42일에 걸친 백혈구, 호중구 및 혈소판 카운트를 나타낸다. 화합물 A는 제1 치료 후 WBC, 호중구 및 혈소판의 강한 감소를 유도하였지만, 모든 측정된 래트는 치료 후 제21일에 완전히 회복되었다. 제2 치료는 세포 카운트에 대해 유사한 효과를 가졌지만, 래트는 제2 치료 후 제21일에 단지 부분적으로 회복되었다.

[0149] <표 4>

[0150] SJS-1 종양-함유 누드 래트 (SF480)의 i.v. 치료 (q3w) 후의 화합물 A의 효능 및 내약성

치료 i.v., q3w	종양				숙주		
	13.7 mg/kg	18.2 mg/kg	13.7 mg/kg	18.2 mg/kg	생존	생존	
치료 후 주	ΔTvol (%)	CR	ΔTvol (%)	CR	ΔBW (%)	생존	ΔBW (%)
1	-66 ± 9	1/6	-80 ± 2	0/5	2.7 ± 0.9	6/6	2.5 ± 2.6
2	4 ± 37	0/6	-79 ± 11	2/5	7.5 ± 1.0	6/6	9.1 ± 1.9
3	-	-	-36 ± 37	2/5	-	-	11.9 ± 2.7
5	-	-	22 ± 63	2/5	-	-	10.6 ± 2.3
6	-	-	118 ± 104	2/5	-	-	5.9 ± 7.9

[0151]

[0152] 실시예 5

[0153] 단일 경구 투여 (27 mg/kg) 후의 SJS-1 종양 함유 래트에 대한 화합물 A로의 PK 및 PD

도 12는 화합물 A의 1회의 단일 경구 주사 후 144시간에 걸친 혈장, 종양 및 간 중의 약물 농도를 나타낸다. 화합물에 대한 Tmax은 모든 기질에서 3시간 (h)이었다. 화합물 A는 혈장 ($AUC_{0-144h} = 111.5 \text{ h. } \mu\text{M}$)에 비해 종양 ($AUC_{0-144h} = 277.7 \text{ h.nmol/g}$)에서 보다 높은 노출을 나타내었다. 도 13은 종양에서의 약물 농도 및 PD 반응을 나타낸다. Puma 및 p21은 치료 후 48시간에 162배 및 180배의 Emax에 도달하는 유사한 mRNA 유도를 가졌다. 이러한 p.o. 용량에서, Mdm2는 훨씬 더 낮은 Emax (34배)를 가졌다.

[0155] 실시예 6

[0156] 3qw 투여 요법 (p.o.)으로의 SJS-1 종양 함유 래트에 대한 효능

도 14는 화합물 A로 q3w p.o. 치료의 42일에 걸친 누드 래트의 종양 성장 및 체중 변화를 나타낸다. 제1 치료 후 3주에, 둘 다의 용량은 종양 퇴행을 유도하였다 (용량 20 및 27 mg/kg에 대해 각각 27 및 88%). 그러나, 종양 성장에 대한 효과는 제2 치료 후 완화되는 경향이 있었는데, 이는 단지 최고 용량만이 여전히 종양 퇴행을 유도할 수 있었기 때문이다 (27 mg/kg에서 27%). 제1 치료 후, 혈액 중의 화합물 A의 Cmax 및 AUC_{0-24h} 및 종양에서의 p21 및 Puma mRNA 발현은 양호하게 및 용량-의존적으로 증가하였다. 둘 다의 용량은 각각의 치료 후 3일에 체중 (BW)의 약간의 감소를 유도하였지만, 모든 동물은 빠르게 회복되었으며, 치료 후 3주에 BW의 증가를 가졌다. 도 15는 실험의 42일에 걸친 백혈구 및 혈소판 카운트를 나타낸다. 화합물 A는 WBC, 호중구 및 혈소판의 용량-의존적 감소를 유도하였다. WBC 및 혈소판은 20 mg/kg으로의 제2 치료 전에 완전히 회복되었다. 27 mg/kg으로의 치료에 대해, 혈소판은 또한 완전히 회복되었지만, WBC는 단지 부분적으로 회복되었다.

[0158] 실시예 7

[0159] 낮은 용량 대 높은 용량의 효과

[0160] 높은 용량 및 낮은 용량의 반응을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 동물을 5 mg/kg p.o.의 낮은 용량 또는 27 mg/kg p.o. 또는 20 mg/kg i.v.의 높은 용량으로 치료하였다. Mdm2i의 낮은 용량은 높은 용량과 동일한 생화학적 효과를 촉발하지 않는다 (도 16).

[0161] 실시예 8

[0162] 높은 및 낮은 용량 치료의 조합은 매우 상승작용적이다

[0163] 실험을 화합물 A의 2가지 투여 스케줄, 즉 하나의 간헐적 (15 mg/kg 1회) 및 매일 투여 (1.5 mg/kg)을 조합하여 SJSAs-1 종양 함유 래트에 대해 반복하였다. 본 발명자들은 도 17 상에서 2가지 투여 요법을 조합하는 것은 매우 상승작용적 효과를 가짐을 보인다. 이는 다중 실험의 개략적 표현이다. 추가의 명백한 상승작용을 또한 도 18 및 19 상에서 볼 수 있다. SJSAs-1 종양 함유 래트에 대한 효능 (도 18) 및 내약성 (도 19)을 다른 용량 및 상이한 투여 스케줄 (15 mg/kg q4w (제0일) + 3 mg/kg q24h 2w 온/2w 오프 (제1일); 21 mg/kg q4w (제0일) + 1.5mg/kg q24h 3w 온/1w 오프 (제1일))로 추가로 시험하였다. 투여 스케줄을 조합하는 것은 효능을 개선시키고, 내약성을 증가시킬 수 있는 것으로 나타났으며, 이는 특히 보다 낮은 용량이 여전히 보다 양호한 종양 수축을 달성하는 데 사용될 수 있기 때문이다.

[0164] 실시예 9

[0165] 흑색종 환자 유래된 이종이식편 (PDX) 함유 래트 (경구)의 효능 및 내약성

[0166] 동일한 실험을 흑색종 PTX 함유 래트로 반복하였다. 화합물 A의 효능 (도 20) 및 내약성 (도 21)을 27 mg/kg q3w에서 시험하였다. 간헐적 투여는 또한 흑색종 모델에서 효능을 나타내었다.

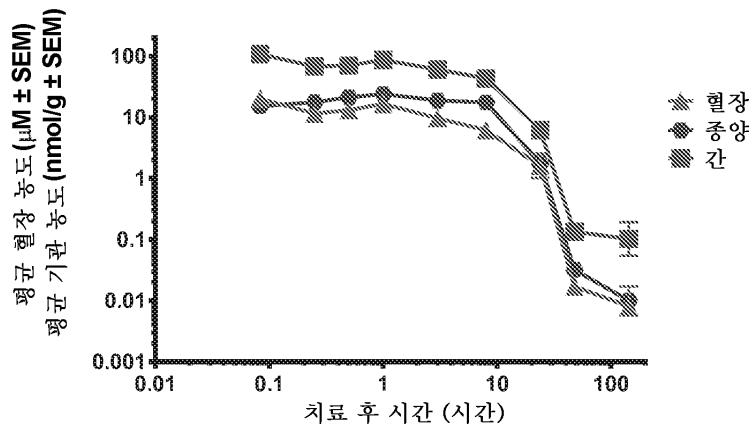
[0167] 실시예 10

[0168] SHSY5Y 종양 함유 마우스에서 세리티닙과 조합으로 간헐적으로 투여된 화합물 A의 효능

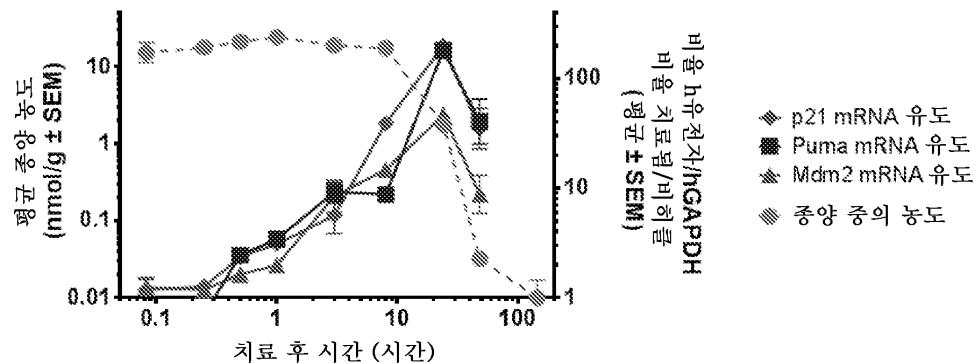
[0169] 유사한 실험을 세리티닙 및 화합물 A의 조합물을 마우스에게 투여하여 수행하였다. 실험은 화합물 A가 또 다른 화합물과 조합된 경우 매주 투여될 수 있음을 나타내었다 (도 22). 120 mg/kg으로 매주 (40 mg/kg x 3, 3시간마다) 화합물 A와 함께 세리티닙은 세리티닙 단독에 비해 또는 20 mg/kg으로 매일 세리티닙 + 화합물 A의 조합에 비해 보다 양호한 항-종양 효과를 초래하였다 (n=5). 마우스는 래트와는 상이한 약동학을 가졌다. 따라서, 용량은 요구되는 노출을 달성하기 위해 3시간마다 3회 투여되어야 했다. 마우스 모델의 이 특이성, 특히 훨씬 더 높은 청소율을 고려하여, 마우스에 대한 실험은 래트 및 다른 대상체로 추론될 수 있으며, 마우스 모델은, 심지어 화합물 A가 적어도 3주마다 투여된 경우에도, 적어도 동일한 효과가 래트 또는 다른 대상체, 특히 인간에서 달성될 수 있었음을 입증하는 것으로 믿어진다.

도면

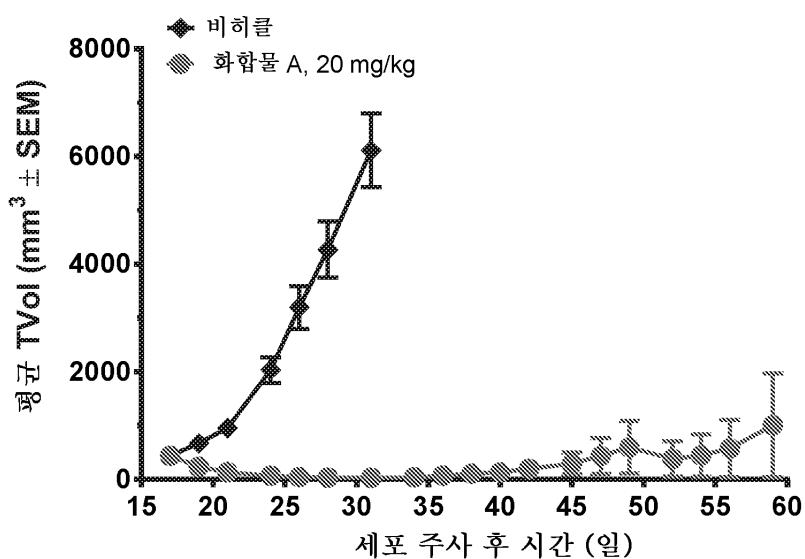
도면1



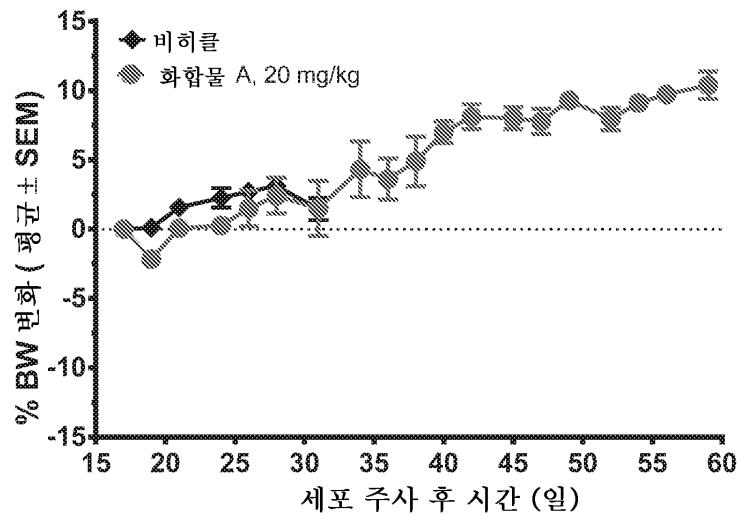
도면2



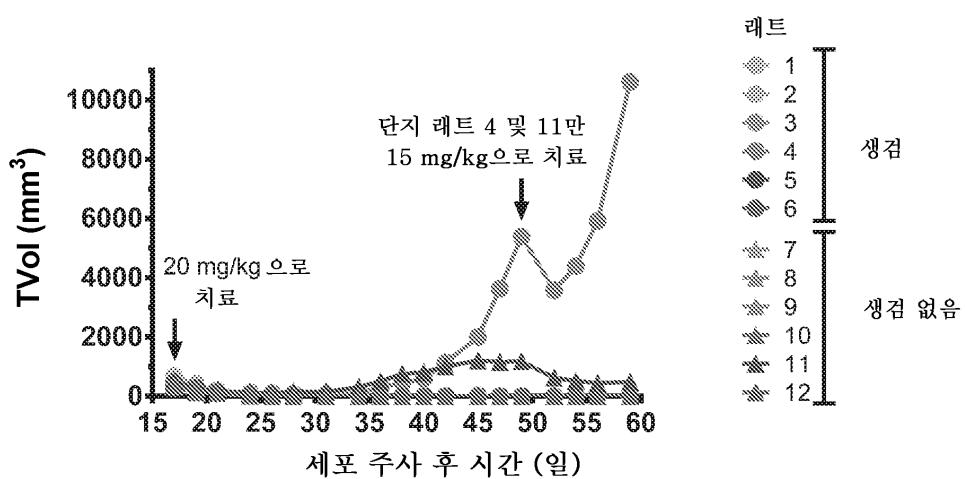
도면3



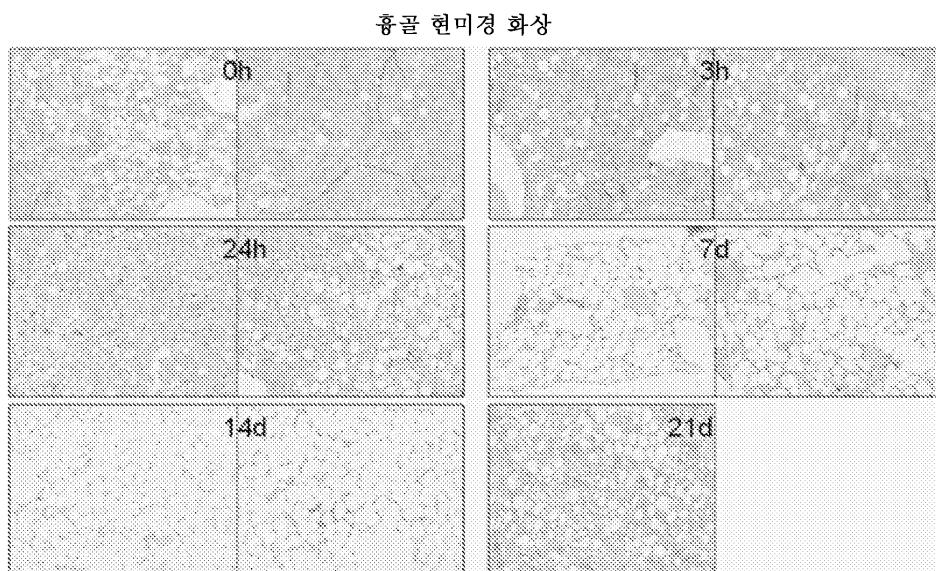
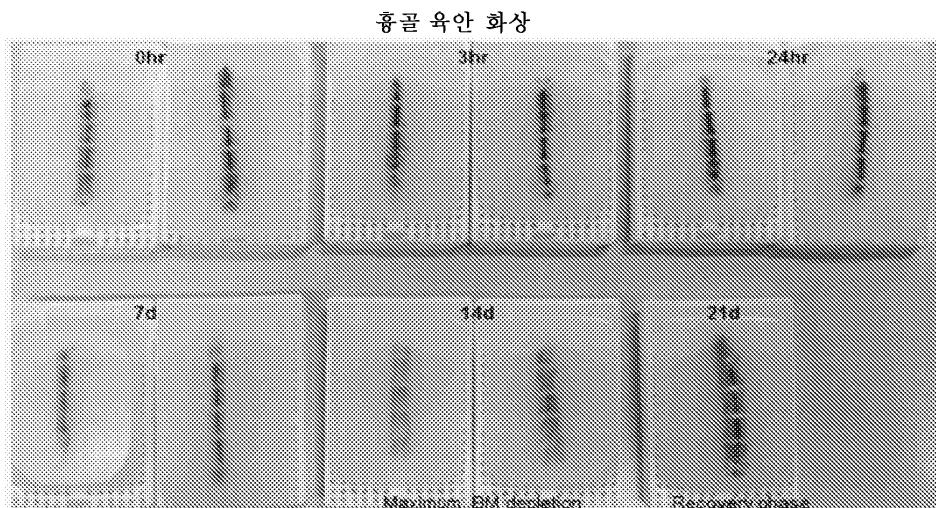
도면4



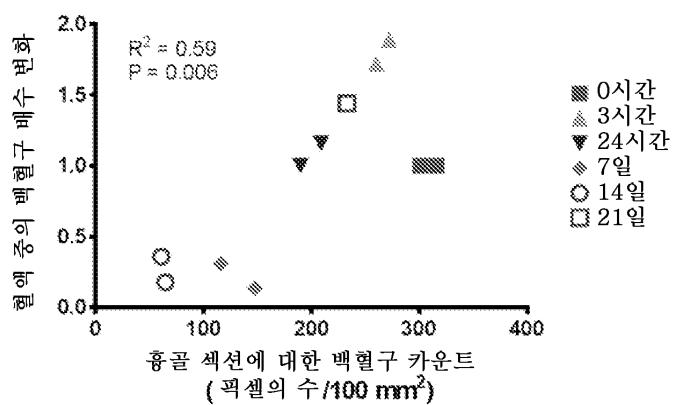
도면5



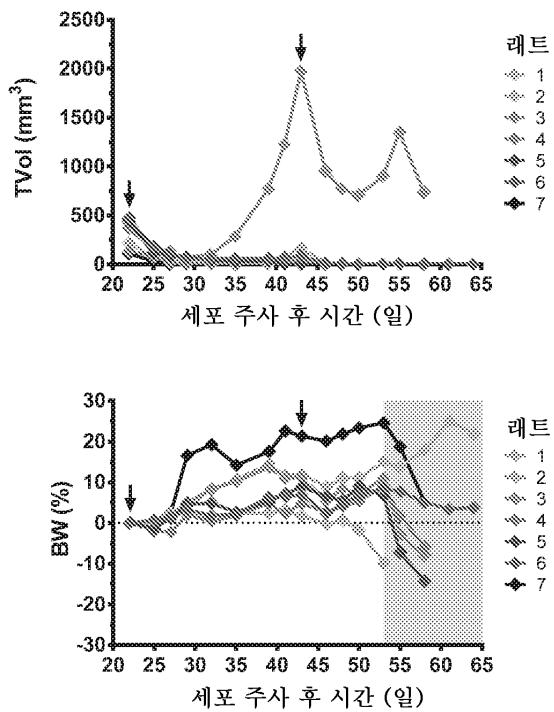
도면6



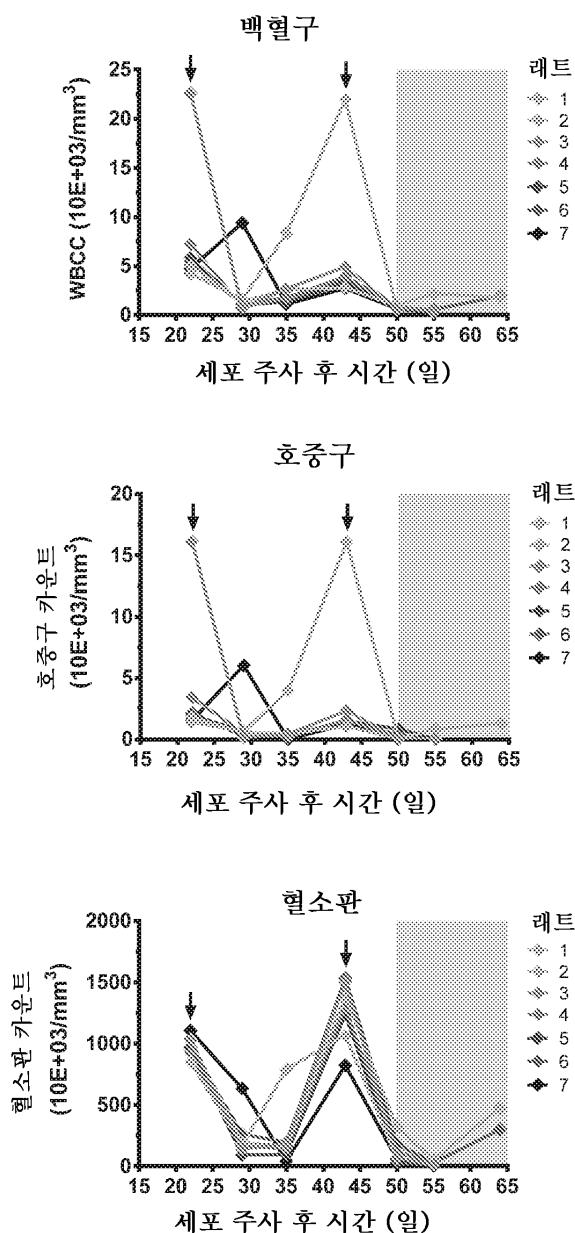
도면7



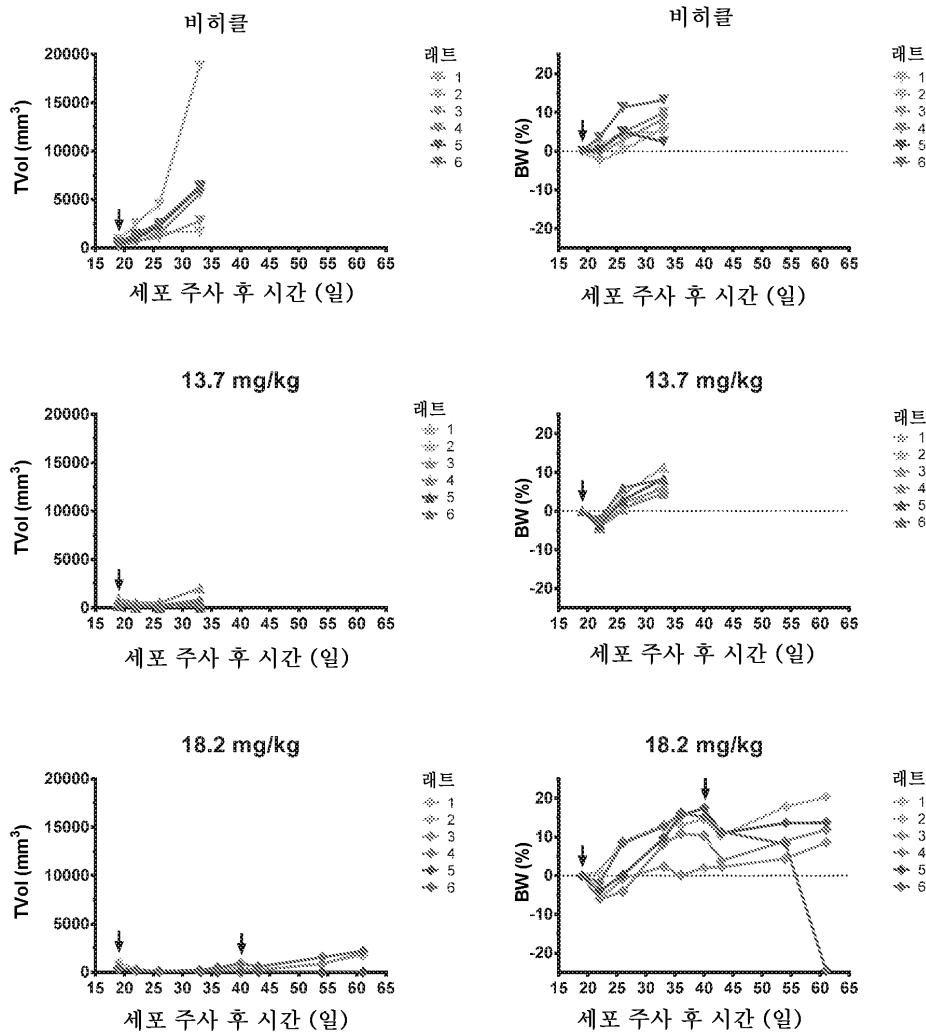
도면8



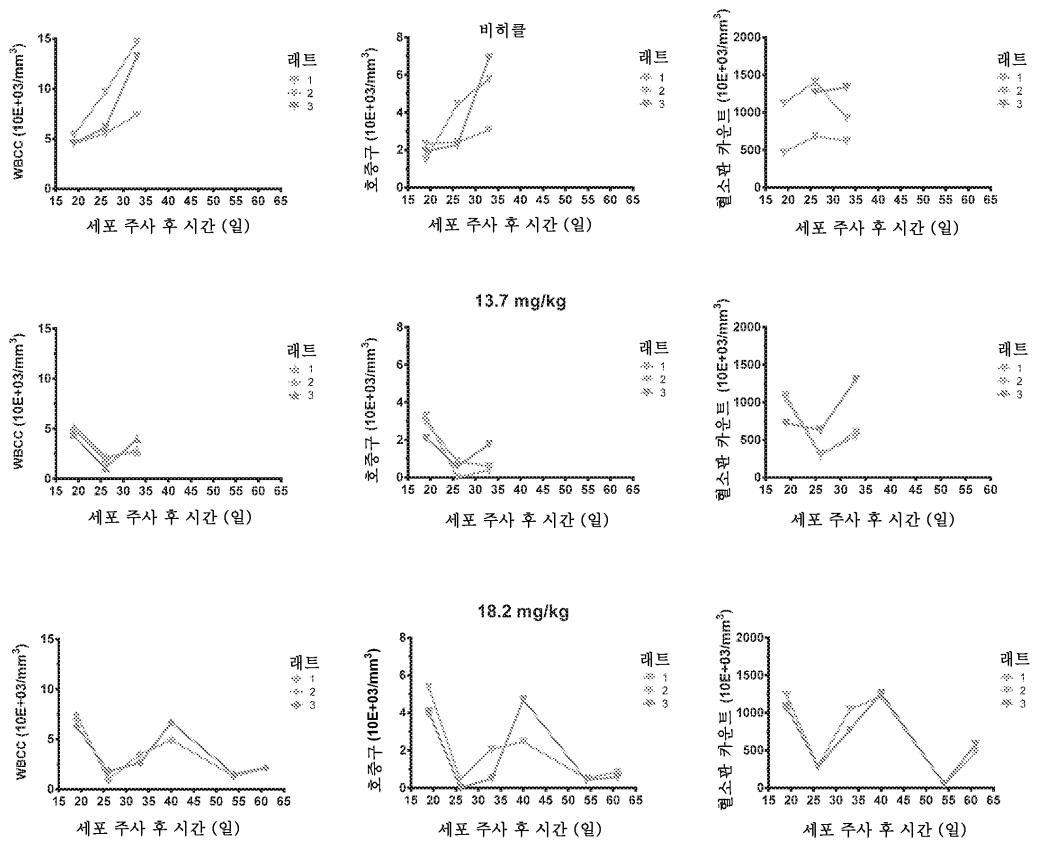
도면9



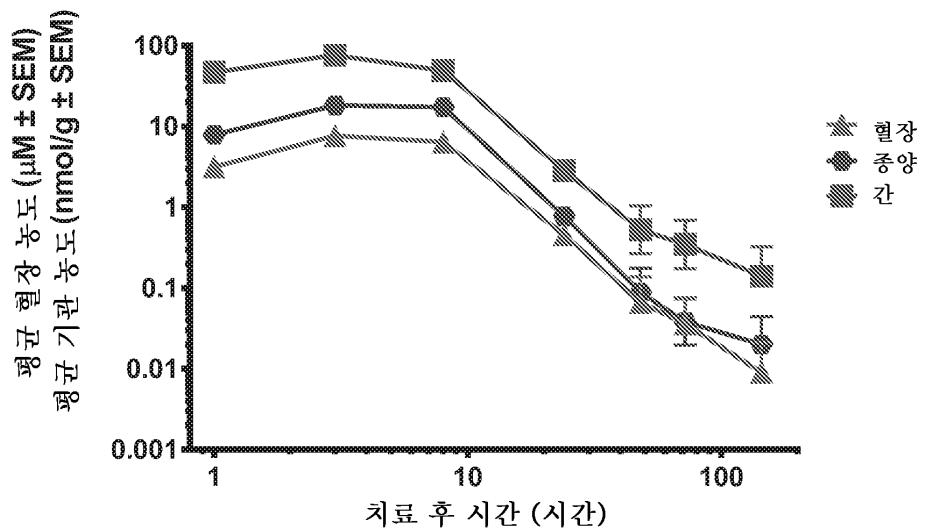
도면10



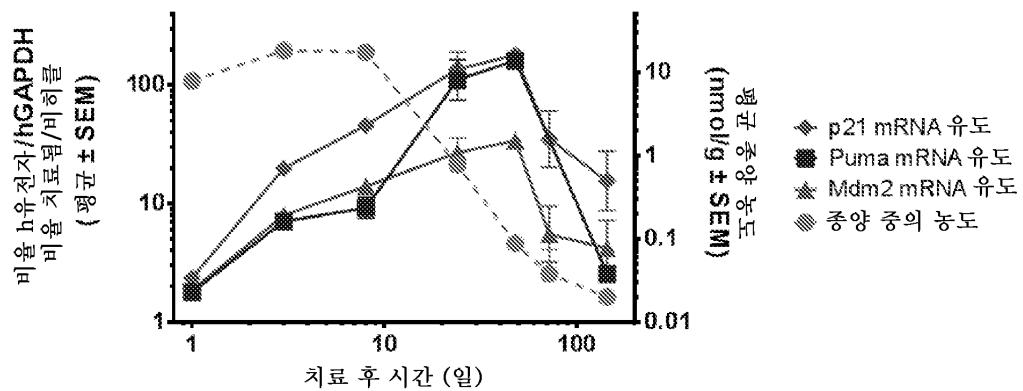
도면11



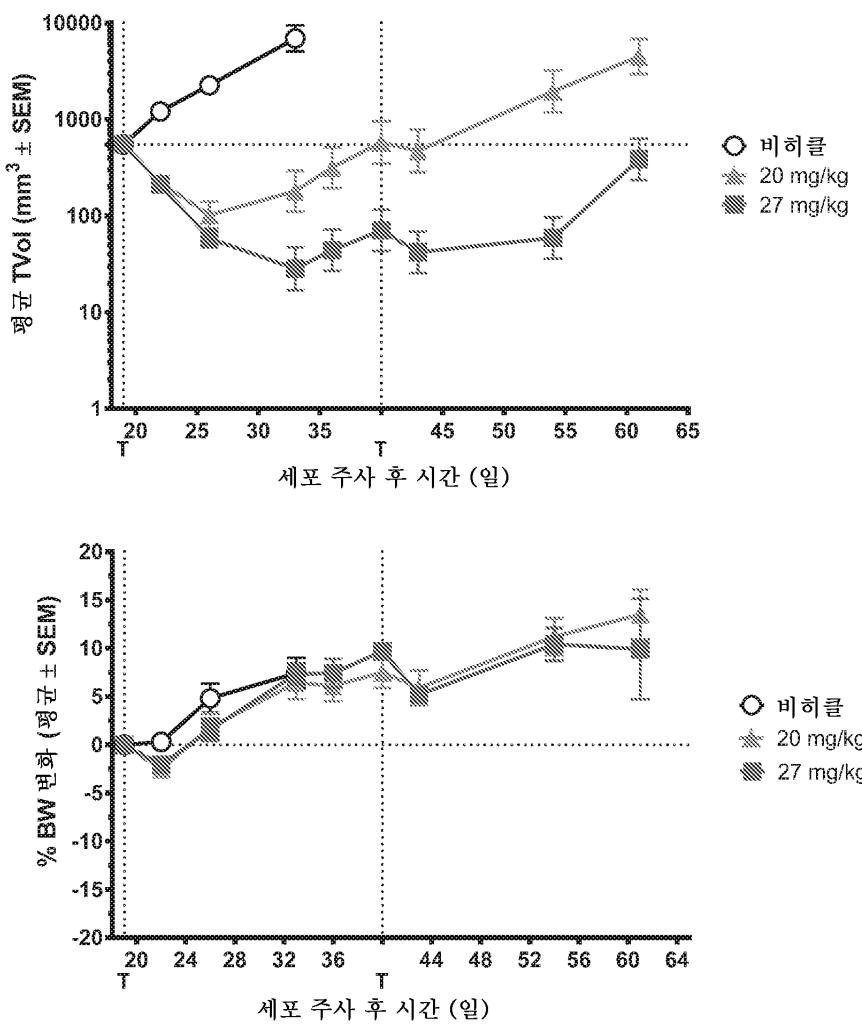
도면12



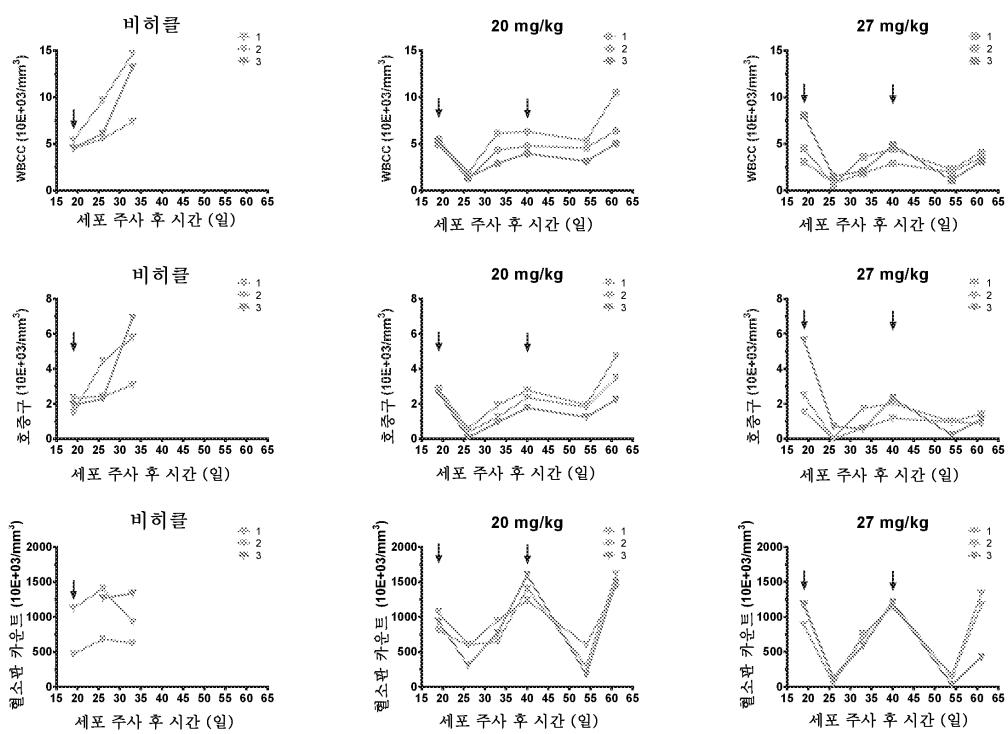
도면13



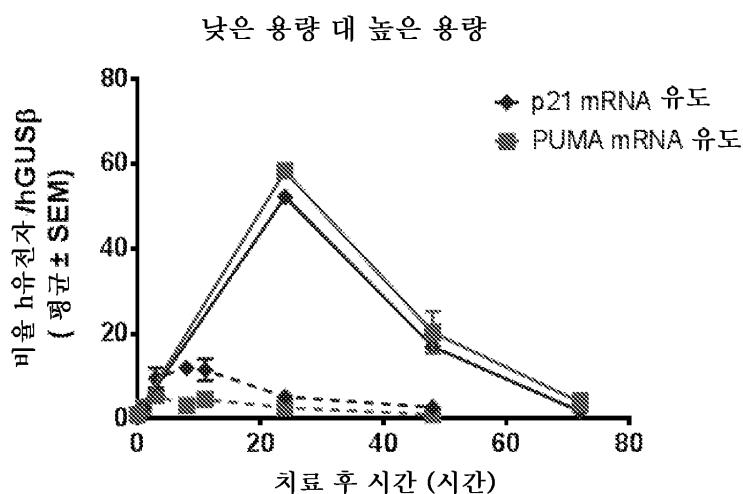
도면14



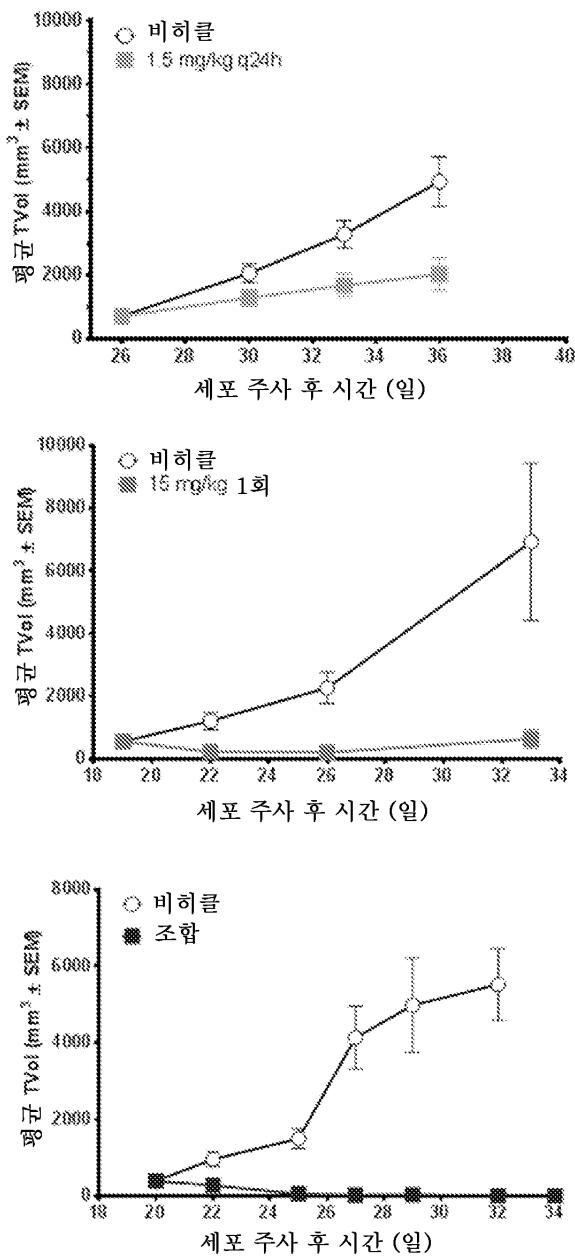
도면15



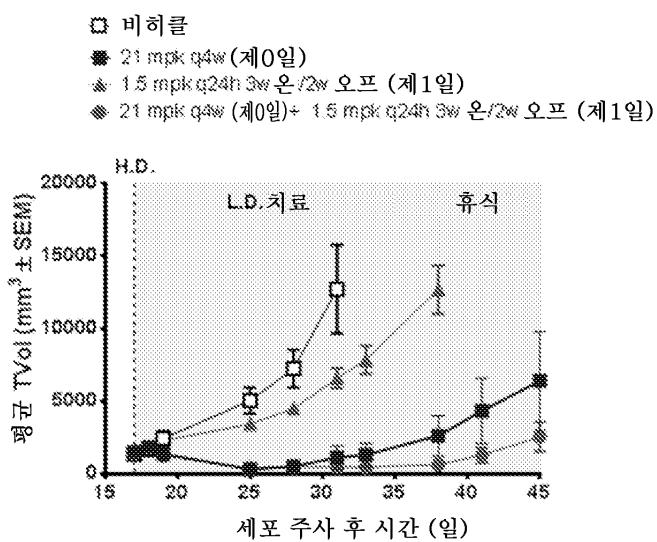
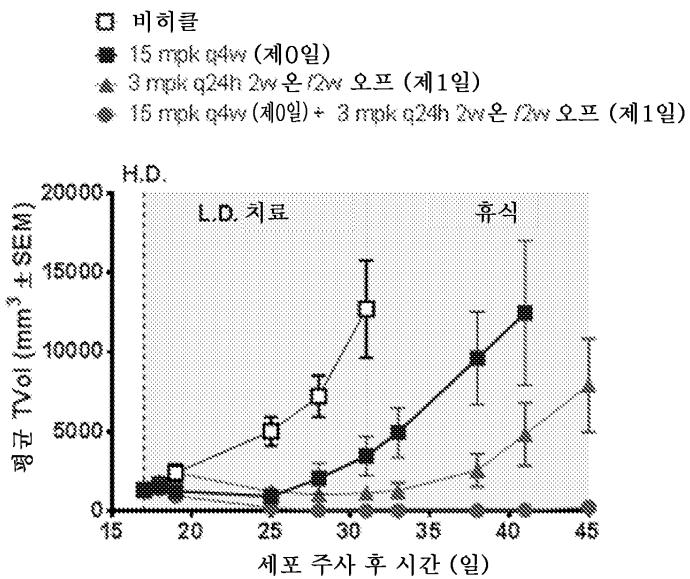
도면16



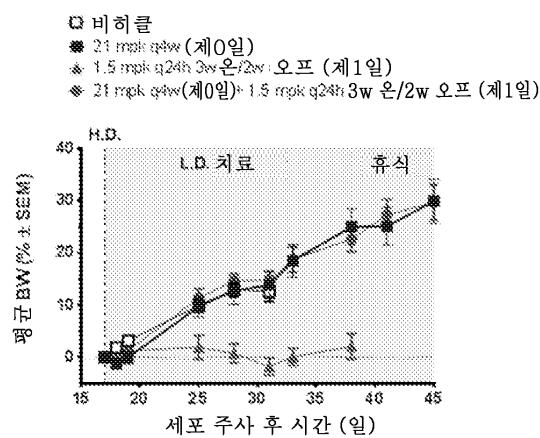
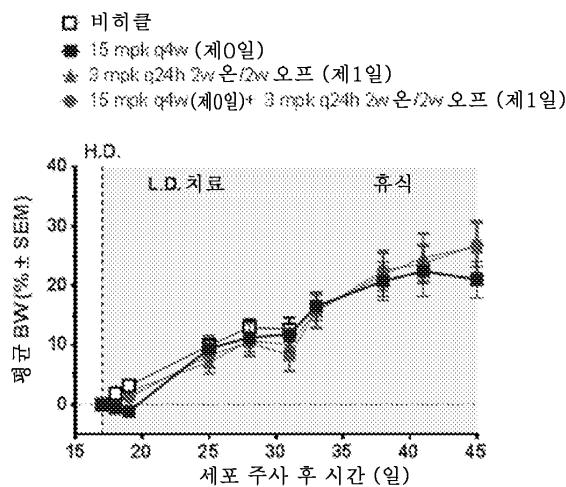
도면17



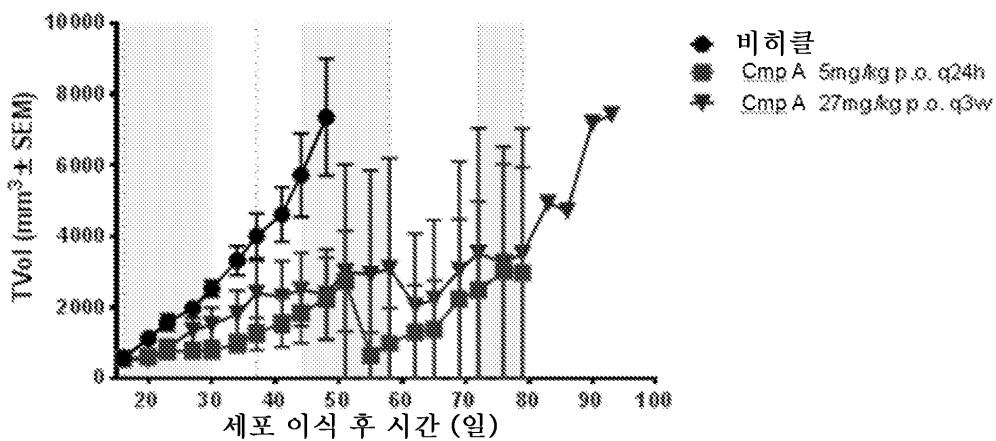
도면18



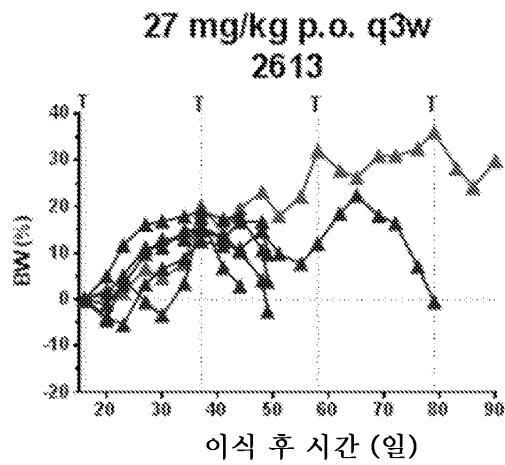
도면19



도면20



도면21



도면22

