



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월24일

(11) 등록번호 10-2126092

(24) 등록일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/506 (2006.01) A61K 31/497 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7026889

(22) 출원일자(국제) 2013년03월29일

심사청구일자 2018년03월26일

(85) 번역문제출일자 2014년09월25일

(65) 공개번호 10-2014-0145133

(43) 공개일자 2014년12월22일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/056811

(87) 국제공개번호 WO 2013/144339

국제공개일자 2013년10월03일

(30) 우선권주장

61/617,889 2012년03월30일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2011051425 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

노파르티스 아게

스위스 4002 바젤

(72) 발명자

나이젤, 미카엘라

스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파
마 아게 내

구아그나노, 비토

스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 베르크 클라이
백 노파르티스 파마 아게 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 13 항

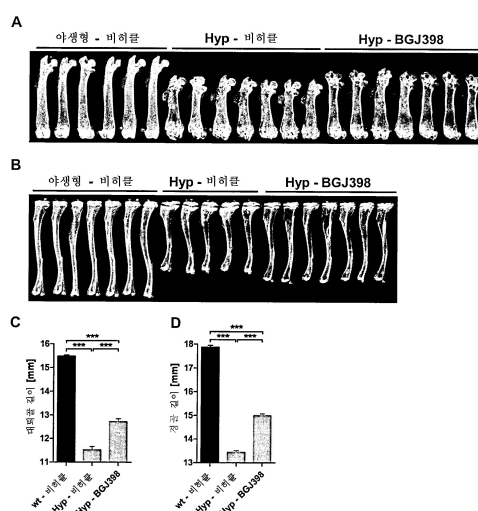
심사관 : 홍성제

(54) 발명의 명칭 저인산혈증성 장애의 치료에 사용하기 위한 FGFR 억제제

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH), 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR), 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR), 중앙-유발 골연화증, 신장 이식후 저인산혈증, 표피 모반 증후군, 골공동성 이형성증 또는 맥쿤-올브라이트 증후군의 치료에 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-(6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일)-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-(6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일)-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(72) 발명자

그라우스 포르타, 다이아나

스위스 체하-4002 바젤 포스트파흐 베르크 클라이
벡 노파르티스 파마 아게 내

뵘레, 사이몬

독일 79106 프라이부르크 클라라스트라쎄 81

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 신장 이식후 저인산혈증, 표피 모반 증후군, 골공동성 이형성증 또는 맥쿤-올브라이트 증후군의 치료에 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아가 모노인산 염 형태인 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아가 그의 유리 염기 형태인 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 치료가 8주 이상 동안 지속되는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 화합물의 용량이 0.5-100mg인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 용량이 1-50mg인 제약 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 대상체가 인간인 제약 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 또 다른 FGFR 억제제, 포스페이트, 칼슘, 오스테오폰틴 (OPN), 부갑상선 호르몬 (PTH) 또는 비타민 D와 조합하여 사용되는 제약 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 경구 투여, 비경구 투여 또는 국소 투여를 위한 제약 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서, 용량이 1-25mg인 제약 조성물.

청구항 11

제5항에 있어서, 용량이 1-10mg인 제약 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 포스페이트, 칼슘 또는 비타민 D와 조합하여 사용되는 제약 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 비타민 D와 조합하여 사용되는 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 일반적으로 섬유모세포 성장 인자 수용체 매개 장애의 치료에 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

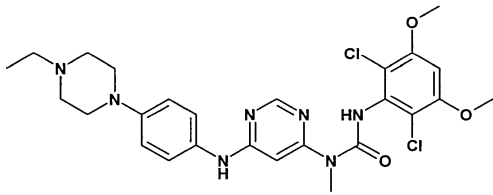
배경 기술

- [0002] 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 패밀리 및 그의 신호전달 수용체는 별레로부터 인간에 이르는 유기체의 성장 및 유지를 위한 주요 과정 (발달, 혈관신생 및 대사)을 지배하는 다수의 생물학적 활성 (증식, 생존, 아포토시스, 분화, 운동성)과 연관되어 있다. 22종의 별개의 FGF가 확인되었으며, 이들 모두는 15-65% 서열 동일성을 갖는 보존된 120개-아미노산 코어 도메인을 공유한다. FGF23은 포스페이트 항상성의 증대한 골-유래 매개자이며, 신장 내 비타민 D 생합성 및 포스페이트의 신흡수를 조절하는 기능을 한다. 신장 근위 세관 상피 세포에서, FGF23 신호전달은 비타민 D 대사 효소 CYP27B1 및 CYP24A1의 발현을 제어하여, 활성 비타민 D 대사물 1,25-디하이드록시 비타민 D3 (1,25[OH]2D3)의 감소된 생합성 및 상승된 전환을 유발한다. 또한, FGF23은 요 포스페이트의 재흡수를 매개하는, 근위 세관 세포의 솔가장자리 막에서의 나트륨-포스페이트 공동-수송체 NPT2A 및 NPT2C의 발현을 손상시킨다.
- [0003] FGF23의 과도한 수준 또는 증대한 기능은 1,25(OH)2D3 (비타민 D)의 손상된 생합성과 함께 저인산혈증을 유발하며, 손상된 골 무기질화의 결과로서 골격 이상을 갖는 여러 유전성 저인산혈증 장애, 예컨대 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH), 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR) 및 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR)과 연관되어 있다. 또한, 드문 경우에 종양 세포에 의한 FGF23의 분비는 저인산혈증을 초래하여 종양-유발 골연화증 (TIO)을 유발하는 것으로 확인되었다. FGF23의 상승된 수준은 또한 중증의 저인산혈증으로 이어지는 신장 이식후 환자에서 흔히 관찰된다. FGF23은 증가된 FGF23 수준과 연관된 여러 다른 저인산혈증성 증후군, 예컨대 표피 모반 증후군, 골공동성 이형성증 및 맥쿤-올브라이트 증후군에서 역할을 한다. XLH 및 다른 FGF23-매개 저인산혈증 질환, 예컨대 ADHR 및 ARHR은 임상적으로 단신 및 하지의 휜 기형을 가진 유아에서 흔히 나타난다.
- [0004] 이들 질환에 대한 현재의 치료 접근법은 주로 식이 비타민 D 및 포스페이트 보충에 제한되어 있다. 요법이 환자에서 성장 및 구루병을 개선하더라도, 교정이 종종 제한되어 있고, 사춘기후 키 장애가 초래된다. 질환의 중증도에 따라, 그러나 FGF23 신호전달의 지속성 - 연속적인 상쇄력을 구성함 -으로 인해, 포스페이트 및 비타민 D의 고용량 투여가 종종 XLH 및 다른 FGF23-관련 저인산혈증 질환의 의료 요법에 요망되며, 이는 독성 위험, 예컨대 복통 및 설사 또는 속발성 부갑상선기능항진증, 고칼슘혈증 및 이소성 석회화를 회피하기 위해 면밀한 모니터링 및 용량 조절을 필요로 한다.
- [0005] 따라서, 상기 언급된 기형 질병의 치료를 위한 신뢰할만하고 효과적인 의약에 대한 필요성이 존재하며, FGFR 신호 전달을 차단함으로써 병리학적 FGF23 신호전달을 직접적으로 표적화하는 것은 현재의 치료 표준보다 유리한 치료 접근법을 제공할 것이다.

발명의 내용

- [0006] 본 발명에 이르러 놀랍게도, BGJ389로도 공지된 고도로 선택적인 FGFR 억제제인 하기 화학식 I에 도시된 바와 같은 화합물 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미딘-4-일}-1-메틸-우레아 (WO2006/000420의 실시예 145에 기재됨)는 임상적으로 특히 활성이며, 다른 섬유모세포 성장 인자 수용체 매개 장애의 치료에 사용될 수 있는 것으로 밝혀졌다.

[0007] <화학식 I>



[0008]

[0009] 제1 측면에서, 본 발명은 따라서 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH), 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR), 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR), 종양-유발 골연화증, 신장 이식후 저인산혈증, 표피 모반 증후군, 골공동성 이형성증 또는 맥쿤-올브라이트 증후군의 치료에 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물을 제공한다. 특히 화합물, 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물은 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH), 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR), 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR) 또는 종양-유발 골연화증, 신장 이식후 저인산혈증의 치료에 사용될 수 있다.

[0010] 바람직하게는, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 제약상 허용되는 염 또는 용매화물은 하나 초과의 용량으로 환자에게 투여된다.

[0011] 화합물 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이 상기 정의된 바와 같이 사용되는 경우에, 치료는 임의로 중단과 함께, 바람직하게는 8주 이상 동안 지속되어야 한다. 화합물의 두 연속적 용량 사이의 시간은 24시간, 임의로 48시간 초과일 수 있다.

[0012] 화학식 I의 화합물은 추가로 또 다른 FGFR 억제제, 포스페이트, 칼슘, 오스테오폰틴 (OPN), 부갑상선 호르몬 또는 그의 유사체 (PTH) 및/또는 비타민 D 또는 비타민 D 유사체와 조합되어, 바람직하게는 포스페이트, 칼슘 및/또는 비타민 D 또는 비타민 D 유사체, 특히 비타민 D 또는 비타민 D 유사체와 조합되어 치료에 사용될 수 있다.

[0013] 제2 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같이 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 측면은 대조군 또는 치료 시작 전의 피질 골 부피 또는 두께와 비교시에 피질 골 부피 또는 두께를 증가시키는데 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 측면은 대조군에 비해 FGF23의 증가된 활성을 나타내는 환자에서 체중을 증가시키는데 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이다.

[0016] 본 발명의 추가 측면은 골에서의 FGF23 발현을 억제하거나 또는 골에서의 FGF23 활성을 억제하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 FGFR 억제제 치료가 Hyp 마우스에서 1,25(OH)2D3 생합성을 유발하고, 저칼슘혈증 및 저인산혈증을 완화하는 것을 제시한다. 생체내 7시간 동안 FGFR 억제제의 신장 FGF23 표적 유전자 Cyp27b1 (A) 및 Cyp24a1 (B)의 조절을 제시한다. 데이터를 야생형 비히클 대조군 (상대적 발현 100)에 대한 상대적 수준으로서 제시한다. A 및 B에 기재된 바와 같이 치료된 (C) 야생형 및 Hyp 마우스의 혈청 1,25(OH)2D3 수준을 방사성 수용체 검정에 의해 결정하였다. 단일 경구 용량의 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 치료된 야생형 및 Hyp 마우스에서 투여 후 24시간의 칼슘 (E) 및 포스페이트 (F) 수준. 포스페이트 및 칼슘 수준을 혈청으로부터 결정하였다. 데이터를 평균과 SEM으로서 제공한다 (n≥6). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; n. s.: 유의하지 않음.

도 2는 FGFR 억제제 치료가 Dmp1-넬 마우스에서 신장 FGF23 표적 유전자 발현을 조절하고, 저칼슘혈증 및 저인

산혈증을 완화하는 것을 제시한다. 생체내 FGFR 억제제의 신장 FGF23 표적 유전자 Cyp27b1 (A) 및 Cyp24a1 (B)의 조절. 데이터를 야생형 비히클 대조군 (상대적 발현 100)에 대한 상대적 수준으로서 제시하고, 평균과 평균의 표준 오차 (SEM)로서 제공한다 ($n \geq 6$). 야생형 및 Dmp1-넬 마우스에서의 혈청 칼슘 (C) 및 포스페이트 (D) 수준에 대한 약리학적 FGFR 억제의 효과. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

도 3은 FGFR-의존성 신호전달이 골에서의 FGF23 발현을 조절하는 것을 제시한다. BGJ398로 7시간 동안 치료된 야생형 및 Hyp 마우스에서의 FGF23 골 mRNA (A) 및 혈청 (B) 수준.

도 4는 FGFR 억제제 치료가 칼슘 및 포스페이트 혈청 수준의 지속적 증가로 이어지는 것을 제시한다. 화학식 I의 화합물의 투여 48시간 후의 야생형 또는 Hyp 마우스에서의 혈청으로부터의 칼슘 (A) 및 포스페이트 (B) 수준의 결정. (C) 치료 7시간 및 24시간 후의 신장 내 화합물 농도.

도 5는 장기간 FGFR 억제제가 Hyp 마우스에서 체중 및 꼬리 길이 발달을 증진시키고, 무기 이온 항상성을 복원시키는 것을 제시한다. 야생형 또는 Hyp 마우스를 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료하고, 체중 (A) 및 꼬리 길이 (C) 발달을 모니터링하였다. 치료 과정에 걸친 전체 체중 (B) 및 꼬리 길이 증가 (D). 칼슘 (E) 및 포스페이트 (F) 및 8주 치료의 말기의 수준을 마지막 투여 24시간 후의 혈청으로부터 결정하였다. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

도 6은 BGJ398로의 장기간 FGFR 억제 후의 FGF23, 부갑상선 호르몬 (PTH) 및 1,25(OH)2D3의 혈청 수준을 제시한다. 야생형 또는 Hyp 마우스를 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료하고, FGF23 (A), PTH (B) 및 1,25(OH)2D3 (C) 수준을 마지막 투여 24시간 후의 혈청으로부터 결정하였다. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 4$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

도 7은 장기간 FGFR 억제제가 Hyp 마우스에서 장골의 성장을 증진시키는 것을 제시한다. FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스로부터의 대퇴골 (A) 및 경골 (B)의 방사선 사진. 대퇴골 (C) 및 경골 (D) 길이의 정량화. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

도 8은 장기간 FGFR 억제제가 Hyp 마우스의 대퇴 골의 피질 완전성을 개선하는 것을 제시한다. (A) FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스로부터의 대퇴 피질 (성장판 아래 영역)의 마이크로-CT 스캔. 상대적 피질 골 부피 (B) 및 평균 피질 두께 (C)의 정량화. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

도 9는 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스로부터의 경골 절편의 골드너 염색 (A)을 제시한다. 무기질화 조직을 백색 화살표에 의해 표시하고, 비무기질화 유골은 흑색 화살표에 의해 표시한다. BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스의 경골 골단에서 조직형태측정법에 의해 결정된 (B) 유골 표면/골 표면 및 (C) 유골 폭. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018]

섬유모세포 성장 인자 23 (FGF23)은 공지되어 있다. 이는 광범위한 생물학적 활성을 갖는 섬유모세포 성장 인자 패밀리의 구성원으로 여겨진다. 단백질의 서열 및/또는 단백질의 코딩 서열은 당업계에 공지된 대중적으로 이용가능한 데이터베이스로부터 검색될 수 있다. 인간 FGF23은 또한 ADHR; HYPF; HPDR2; PHPTC로서 당업계에 공지되어 있다. FGF23은 여러 저인산혈증 상태의 질환-유발 인자이다. 예상외로, FGFR 억제제 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-[6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일]-1-메틸-우레아 (BGJ398)를 사용한 FGFR의 약리학적 억제는 병리학적 FGF23 신호전달을 상쇄하여, FGF23-관련 저인산혈증 장애의 치료에 대한 잠재적 신규 치료 접근법을 제시하는 것으로 관찰되었다. 본 발명자들은 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-[6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일]-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH), 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR), 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR), 중앙-유발 골연화증, 신장 이식후 저인산혈증, 표피 모반 증후군,

골공동성 이형성증 또는 맥쿤-올브라이트 증후군의 치료에 사용시에 매우 효과적일 수 있다는 것을 발견하였다. 화합물은 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH), 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR) 또는 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR), 신장 이식후 저인산혈증, 특히 X-연관 저인산혈증성 구루병 (XLH) 및 상염색체 우성 저인산혈증성 구루병 (ADHR) 또는 상염색체 열성 저인산혈증성 구루병 (ARHR)의 치료에 특히 유용할 수 있다.

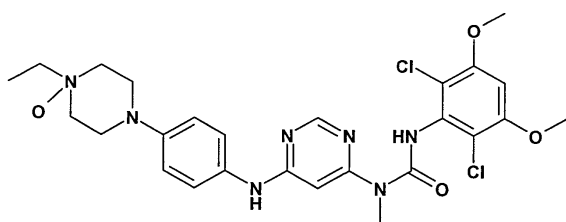
[0019] 본원에 사용된 임의의 질환 또는 장애에 대한 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 한 실시양태에서, 질환 또는 장애를 개선하는 것 (즉, 질환 또는 그의 임상적 증상 중 하나 이상의 발생의 둔화 또는 정지 또는 감소)을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 환자에 의해 인식가능하지 않을 수 있는 것들을 비롯한, 하나 이상의 물리적 파라미터를 완화 또는 개선하는 것을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애를 물리적으로 (예를 들어, 인식가능한 증상의 안정화), 생리학적으로 (예를 들어, 물리적 파라미터의 안정화) 또는 이들 둘 다로 조절하는 것을 지칭한다. 또 다른 실시양태에서, "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애의 발병 또는 발생 또는 진행의 예방 또는 지연을 지칭한다.

[0020] 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 발명에 따라 사용시에 화합물의 생물학적 유효성 및 특성을 유지하며, 전형적으로 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 염을 지칭한다. 제약상 허용되는 산 부가염은 무기산 및 유기산, 예를 들어 아세트이트, 아스파르테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 브로마이드/히드로브로마이드, 비카르보네이트/카르보네이트, 비술피이트/술피이트, 캄포르술포네이트, 클로라이드/히드로클로라이드, 클로르테오피로네이트, 시트레이트, 에탄디술포네이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 올레이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/히드로겐 포스페이트/디히드로겐 포스페이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 술포살리실레이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세트이트 염 등으로 형성될 수 있다. 염이 유도될 수 있는 무기 산은, 예를 들어 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 한 실시양태에서, 제약상 허용되는 염은 화합물 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아의 모노인산 염 (또는 포스페이트)이며, 이는 임의로 무수 결정질 형태일 수 있다. 구체적 실시양태에서, 화합물의 염은 W02011/071821에 개시된 임의의 염 또는 형태이다. 한 실시양태에서, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아는 그의 유리 염기 형태로 존재한다.

[0021] 용어 "용매화물"은 화합물과 하나 이상의 용매 분자의 분자 복합체를 지칭한다. 이러한 용매 분자는 화합물, 예를 들어 물, 에탄올 등에 무해한 것으로 공지된, 제약 업계에서 흔히 사용되는 것들이다.

[0022] 화합물 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아의 N-옥시드 중 하나는 하기 화학식 II를 갖는다.

[0023] <화학식 II>



[0024]

[0025] 이미 단일 유효 용량의 BGJ398은 BGJ398의 투여후 7시간의 야생형 및 Hyp 마우스 둘 다에서 1,25(OH)2D3 혈청 수준의 강한 증가를 유발하였다. 또한, 칼슘 및 포스페이트 수준이 또한 증가하였다. 이들 결과는 FGFR의 약리학적 억제제가 포유동물에서 이상 FGF23 신호전달을 상쇄하기에 충분한 것을 나타낸다. 본 발명자들은 단일 용량 FGFR 억제제가 이미 FGF23 활성을 상쇄하고 신체 내 칼슘 및 포스페이트 수준을 균형화시키는 관점에서의 그의 효과를 도출하는 것을 발견하였다. 또한, BGJ398로의 장기간 치료는 Hyp 마우스에서 칼슘 및 포스페이트 수준 둘 다의 완전 정상화로 이어졌다. 따라서, 바람직한 실시양태에서, BGJ398 또는 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물은 하나 초과 치료 유효 용량으로 그를 필요로 하는 환자에게 투여된다. 화합물에 대한 용어 "치료 유효 용량"은 대상체의 생물학적 또는 의학적 반응, 예를 들어 키나제 활성의 감소 또는 억제를 도출하거나, 또는 증상을 개선하거나, 상태를 완화하거나, 질환 진행을 둔화 또는 지연시키거나, 또는 질환을 예

방하는 등을 할 BGJ398의 양을 지칭한다. 대상체는 인간을 비롯한 임의의 포유동물일 수 있다. 치료 유효 용량은 약 50-70 kg의 대상체에 대해 약 1-250 mg, 또는 약 1-150 mg의 BGJ398, 예를 들어 125mg, 또는 약 0.5-100 mg, 또는 약 1-50 mg, 또는 약 1-25mg, 또는 약 1-10mg 용량의 BGJ398일 수 있다. 화합물의 치료 유효 투여량은 단독이든지 또는 제약 조성물 중이든지 또는 하기 설명된 바와 같이 다른 활성 성분과의 조합물 중이든지 간에, 대상체의 종, 체중, 연령 및 개별 상태, 치료할 장애 또는 질환 또는 그의 중증도에 따라 달라진다.

[0026] 본 발명의 또 다른 측면에서, 대조군 또는 치료 시작 전의 피질 골 부피 또는 두께와 비교시에 피질 골 부피 또는 두께를 증가시키는데 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이다. 수행된 실험은 대상체가 BGJ398로 치료된 경우에 피질 골 부피가 병리학적 값으로부터 정상치와 구별불가능한 값으로 증가하는 것을 명백하게 제시한다. 또한, 피질 두께는 현저하게 증가하였다.

[0027] 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아의 투여는 환자의 증가된 체중 증가로 이어지는 것으로 관찰되었으며, 이는 대조군에 비해 FGF23의 증가된 활성을 나타낸다. "대조군"은 각 질환이 없는 개체, 다수의 대상체 또는 집단에서의 FGF23 활성 또는 발현의 값을 지칭한다.

[0028] 보다 넓은 관점에서, 본 발명의 한 실시양태는 골에서의 FGF23 발현을 억제하거나 또는 골에서의 FGF23 활성을 억제하는데 사용하기 위한, 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물이다. "발현"은 유전자가 전사 및 번역되는 경우에 생성되는 핵산 또는 아미노산을 지칭한다. 예로서, 전사 활성은, 예를 들어 FGF23 유전자로부터 전사된 mRNA의 수량 또는 유전자로부터 전사된 mRNA의 역전사로부터 생산된 cDNA의 수량 또는 유전자에 의해 코딩된 폴리펩티드 또는 단백질의 수량을 검출하는 것을 비롯한 임의의 적절한 방법에 의해 평가될 수 있다. 대안적으로 유전자 카피수, 전사 또는 번역 중 어느 하나는 공지된 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 증폭 방법, 예컨대 PCR이 유용할 수 있다. 골에서의 FGF23의 발현 또는 활성에 영향을 미침으로써 그의 구조 및 성장을 조절할 수 있으며, 이는 불규칙하거나 비효율적인 성장으로 질환 자체를 나타내고, 예를 들어 비제한적으로 구루병에서와 같은 이상을 유발하는 질환에 특히 유용할 수 있다.

[0029] 전신 FGFR 억제제의 가능한 부작용의 발생률을 감소시키기 위해, 용량은 대상체에게 유해할 수 있는 바람직하지 않은 이차 효과를 최소화하기 위해 간헐적으로 투여될 수 있다. 용량은 중단 없이 연속적으로 투여되거나, 또는 먼저 그를 필요로 하는 환자에서 정상 상태 농도를 달성하도록 다수의 용량으로 시작한 다음, 용량 사이의 시간을 변형할 수 있다. 대안적으로, 투여는 제1 용량 직후에 적합화될 수 있다. 화합물의 두 연속적 용량 사이의 시간은 24시간, 임의로 48시간 또는 심지어 1주 초과일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 용량은 임의로 두 연속적 용량 사이에 1, 2 또는 3일이 있도록 다시, 또는 재발후에만 반복적으로 제공된다.

[0030] 바람직한 실시양태에서, 화합물 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아는 또 다른 FGFR 억제제, 포스페이트, 칼슘, 오스테오폰틴 (OPN), 부갑상선 호르몬 또는 그의 유사체 (PTH) 및/또는 비타민 D 또는 비타민 D 유사체와 조합되어, 바람직하게는 포스페이트, 칼슘 및/또는 비타민 D 또는 비타민 D 유사체, 특히 비타민 D 또는 비타민 D 유사체와 조합되어 치료에 사용될 수 있다. BGJ389는 상가 효과 또는 심지어 상승작용 효과를 유발할 뿐만 아니라 보다 고용량의 BGJ389를 사용할 필요성을 감소시키고, 연속적으로 부작용의 위험을 제한하는 이점과 조합되어 사용될 수 있다.

[0031] 포스페이트는 경구로 또는 비경구로 복용되는 경우에, 예를 들어 랜독스 래보러토리즈 리미티드(RANDOX Laboratories LTD, 영국)로부터의 키트 및 임상 화학 분석기, 예컨대 히타치(HITACHI) 717 분석기 (로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics))를 사용한 자외선 방법에 의해 예를 들어 혈청에서 측정될 수 있는 무기 인 (P)의 혈액 수준을 증가시키는 임의의 형태로 사용될 수 있다. 칼슘은 또한 복용되는 경우에, 최종적으로 예를 들어 랜독스 래보러토리즈 리미티드로부터의 키트 및 임상 화학 분석기, 예컨대 히타치 717 분석기를 사용한 자외선 방법에 의해 예를 들어 혈청에서 측정될 수 있는 증가된 전체 칼슘의 혈액 수준으로 이어지는 임의의 형태일 수 있다. 오스테오폰틴 (OPN)은 분비 인단백질 1, 골 시알로단백질 I 또는 조기 T-림프구 활성화 1로 지칭되었으며, 공지되어 있다. 이는 골 재형성에 관여하는 세포의 구조 단백질로 여겨진다. 인간 오스테오폰틴은 SPP1로서 업계에 공지되어 있다. 부갑상선 호르몬 (PTH) 또는 파라토르몬은 공지되어 있다. 이는 혈액 내 칼슘 수준의 조절에 관여하는 호르몬으로 여겨진다. PTH 유사체는 PTH의 활성을 적어도 부분적으로 유지하며, 단지 보다 짧은 것으로 완전 PTH와 구조적으로 유사하거나, 또는 PTH 백본 구조에 연결되어 있는 개질된 또는 추가의 치환기를 갖는 분자이다. 비타민 D는 칼슘 항상성을 담당하며 건강한 골 표현형을 위해 중요한 공지된 호

르몬이다. 그의 유사체는 비타민 D의 화학 구조를 모방하며 유사한 약리학적 효과를 도출한다는 점에서 구조적으로 유사한 화합물이다. 비타민 D 유사체의 예는 칼시포트리올이다.

[0032] 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물은 상기 설명된 바와 같은 임의의 치료에 또한 사용될 수 있는 제약 조성물로 제제화된다. 제약 조성물은 통상적으로 3-(2,6-디클로로-3,5-디메톡시-페닐)-1-{6-[4-(4-에틸-피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미드-4-일}-1-메틸-우레아 또는 그의 제약상 허용되는 염, N-옥시드 또는 용매화물, 및 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함할 것이다. 제약 조성물 중 화합물의 양은 바람직하게는 치료상 유효하다. 임의로, 또 다른 FGFR 억제제, 포스페이트, 칼슘, 오스테오폰틴 (OPN), 부갑상선 호르몬 또는 그의 유사체 (PTH) 및/또는 비타민 D 또는 비타민 D 유사체, 바람직하게는 포스페이트, 칼슘 및/또는 비타민 D 또는 비타민 D 유사체, 특히 비타민 D 또는 비타민 D 유사체가 본 발명에 따른 제약 조성물에 첨가된다. 제약 조성물은 특정한 투여 경로, 예컨대 경구 투여, 비경구 투여 및 국소 투여 등을 위해 제제화될 수 있다. 또한, 본 발명의 제약 조성물은 고체 형태 (예컨대 비제한적으로 캡슐, 정제, 환제, 과립, 분말 또는 좌제) 또는 액체 형태 (예컨대 비제한적으로 용액, 현탁액 또는 에멀전)로 제조될 수 있다. 제약 조성물은 통상의 제약 작업, 예컨대 압축, 정제화, 여과, 동결건조, 멸균 등으로 처리될 수 있다. 부형제는 임의의 통상의 불활성 희석제, 윤활제, 완충제, 결합제, 붕해제, 감미제, 향미제, 뿐만 아니라 아주반트, 예컨대 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용매, 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 향산화제, 보존제 (예를 들어, 항박테리아제, 항진균제), 등장화제, 흡수 지연제, 염, 보존제, 약물 안정화제, 염료 등 및 그의 조합일 수 있다.

[0033] 실시예 1

[0034] FGFR 억제제 치료는 Hyp 마우스에서 1,25(OH)2D3 생합성을 유발하고, 저칼슘혈증 및 저인산혈증을 완화한다. 야생형 C57BL/6 및 Hyp (B6.Cg-PheHyp/J) 마우스를 더 잭슨 래보러토리(The Jackson Laboratory)로부터 입수하였다. Dmp1-널 마우스를 문헌 [Feng et al. (J.Dent.Res. 2003; 82:776-780.)]에 의해 생성하였다. 모든 마우스를 표준 실험실 조건 하에 케이지에 유지시켰다. 마우스에게 표준 설치류 식이와 물을 자유로이 공급하였다.

[0035] 야생형 또는 Hyp 마우스에게 단일 경구 용량의 유리 염기 형태의 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클을 제공하고, 화합물의 투여 후 7시간에 연구하였다. BGJ398 또는 비히클만 (PEG-300/글루코스 5%, 2:1 혼합물)을 경구 위관영양에 의해 투여하였다. 단일 용량 투여의 경우에 5-7주령의 마우스를 사용하였다. 마우스를 이소플루란 흡입에 의해 마취시키고, 혈액을 대정맥으로부터 수집하였다. 마우스를 방혈에 의해 희생시키고, 신장 및 경골 및 대퇴 골을 수득하였다. 7시간에 신장 내 BGJ398의 농도를 또한 결정하였다.

[0036] 신장을 샘플링하고, 전체 RNA를 단리하였다. 마우스 경골 및 대퇴 골로부터의 RNA 단리를 위해, 골단을 절단하고, 골수를 4℃에서 원심분리에 의해 제거하였다. 프리셀리스(Precellys) 24 비드 균질화기를 사용하여 조직을 균질화하고, RNA를 트리졸(TRIZol) 시약으로 추출하였다. 후속적으로, RNA를 클로로포름 추출, 이소프로판올 침전 및 RNeasy 미니 키트에 의해 정제하였다. 신장 RNA에 대해, 대략 60 mg의 조직을 1.5 ml RTL 완충제 (퀴아젠(Qiagen)) 중에서 로터-스테이터 균질화기로 균질화하고, RNA를 RNeasy 미니 키트에 의해 정제하였다. 0.5-2 µg RNA 및 멀티스크라이브(MultiScribe) MuLV 역전사효소를 사용하여 랜덤 육량체 프라이밍된 cDNA를 합성하였다.

[0037] 유전자 발현을 정량적 실시간 PCR (qPCR)에 의해 분석하였다. 택맨(TaqMan) 프로브-기반 유전자 발현 검정을 마우스 Cyp27b1 (Mm01165919), Cyp24a1 (Mm00487244) 및 Gapdh (4352339E)의 발현 분석에 사용하였다. 마우스 Fgf23의 검출을 위한 프라이머 및 FAM/TAMRA-표지된 프로브 (마이크로신스(Microsynth))의 서열은 5'-TTTGGATCGCTTCACTTCAG (정방향), 5'-GTGATGCTTCTGCACAAGT (역방향) 및 5'-CGCCAGTGGACGCTGGAGAA (프로브)였다. 정량적 실시간 PCR을 프로브 검정을 위한 qPCR 코어 키트를 사용한 iQ5 실시간 PCR 검출 시스템 및 각 샘플의 40 또는 80 ng RNA의 등가물 중에서 수행하였다. 데이터를 Gapdh 발현에 대해 정규화하였다.

[0038] 고-해상도 방사선촬영 시스템 (팩시트론(Faxitron) MX-20)을 사용하여 대퇴골 및 경골의 방사선사진을 생체외에서 찍었다. 스칸코 비바CT(Scanco vivaCT) 40 시스템 (복셀 크기 6 µm; 고해상도)을 사용하여 µCT 측정을 생체외에서 수행하였다. 해면 및 피질 골 분석을 위해, 200의 고정된 역치를 사용하여 50개의 슬라이스로부터의 무기질화 골 분획을 결정하였다. 가우시안(Gaussian) 필터를 적용하여 잡음을 제거하였다 ($\sigma=0.7$; 서포트=1).

[0039] 응고 활성화제 원심분리 튜브를 사용하여 혈청을 전혈로부터 분리하였다. 베티스캔(VetScan) 진단 프로파일링 시스템을 사용한 포스페이트 및 칼슘 수준의 결정을 위해 100 µl의 혈청을 사용하였다. 방사성 수용체 검정

키트를 사용하여 1,25(OH)2D3의 혈청 농도를 결정하였다. FGF23 혈청 수준을 ELISA 검출 무손상 FGF23 (카이노스(Kainos))에 의해 분석하였다.

[0040] FGF23은 신장 내 1,25(OH)2D3-대사 효소 CYP27B1 및 CYP24A1의 전사 조절에 의해 부분적으로 그의 저인산혈증성 기능을 표출한다. 본 발명자들은 따라서 Hyp 마우스 및 야생형 한배새끼에서 BGJ398로 단일 용량 치료시의 신장 Cyp27b1 및 Cyp24a1 발현을 모니터링하였다. Hyp 마우스에 존재하는 상승된 FGF23 수준에도 불구하고, Hyp 마우스에서의 Cyp27b1 및 Cyp24a1 발현 및 1,25(OH)2D3 혈청 수준은 잠재적으로 적응 과정으로 인해 이전 보고에 일치하게, 야생형 마우스에 비해 유의한 차이가 없었다 (도 1A, B 및 C). 야생형 및 Hyp 마우스 둘 다에서, BGJ398로의 7시간 동안의 치료는 증가된 Cyp27b1 수준 및 Cyp24a1 발현의 거의 완전 손실로 이어졌다 (도 1A 및 B). 따라서, FGF23 표적 유전자의 이러한 탈조절은 BGJ398의 투여후 7시간의 야생형 및 Hyp 마우스 둘 다에서의 1,25(OH)2D3 혈청 수준의 강한 증가를 유발하였다 (도 1C).

[0041] 투여후 24시간에, BGJ398로의 단일 용량 치료는 야생형 및 Hyp 마우스에서 상승된 혈청 칼슘 및 포스페이트 수준을 유발하여, 대조군 Hyp 마우스에서 관찰된 중증의 저칼슘혈증 및 저인산혈증을 완화한다. 칼슘에 대해, BGJ398-치료된 Hyp 마우스의 혈청 수준은 비히클-치료된 야생형 마우스 (도 1D)와 구별불가능한 반면에, FGFR 억제제로 치료된 Hyp 마우스에서의 혈청 포스페이트 농도는 야생형 마우스의 혈청 수준 (도 1E)에 비해 여전히 현저하게 하락하였다. 도 1A 및 B의 데이터를 야생형 대조군 (상대적 발현 100)에 대한 상대적 수준으로서 제시하고, 평균과 평균의 표준 오차 (SEM)로서 제공한다 ($n \geq 6$).

[0042] 설명된 바와 같이, 도 1에 생체내 FGFR 억제제의 신장 FGF23 표적 유전자 Cyp27b1 (A) 및 Cyp24a1 (도 1B)의 조절을 도시한다. 또한, A 및 B에 기재된 바와 같이 치료된 (C) 야생형 및 Hyp 마우스의 혈청 1,25(OH)2D3 수준을 방사성 수용체 검정에 의해 결정하였다. 또한, 단일 경구 용량의 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 치료된 야생형 및 Hyp 마우스에서의 투여후 24시간의 칼슘 (도 1E) 및 (도 1F) 포스페이트 수준을 제시한다. 모두 종합하면, 상기는 FGFR 억제제 치료가 Hyp 마우스에서 1,25(OH)2D3 생합성을 유발하고, 저칼슘혈증 및 저인산혈증을 완화하는 것을 나타낸다. 상기 결과는 추가로 FGFR의 약리학적 억제제가 Hyp 마우스에서의 이상 FGF23 신호 전달을 상쇄하기에 충분한 것을 나타낸다.

[0043] 실시예 2

[0044] FGFR 억제제 치료는 Dmp1-널 마우스에서 신장 FGF23 표적 유전자 발현을 조절하고, 저칼슘혈증 및 저인산혈증을 완화한다. 생체내 FGFR 억제제의 신장 FGF23 표적 유전자 Cyp27b1 (도 2A) 및 Cyp24a1 (도 2B)의 조절을 도 2에 제시한다. Phex-결핍 Hyp 모델에서의 본 발명자들의 발견 이외에도, 본 발명자들은 또 다른 FGF23-관련 저인산혈증 모델인 Dmp1-널 마우스에서 신장 Cyp27b1 및 Cyp24a1 발현의 유사한 조절을 관찰하였다 (도 2A 및 B). 야생형 또는 Dmp1-널 마우스에게 단일 경구 용량의 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클을 제공하고, 화합물의 투여 후 7시간에 다시 연구하였다. 상기와 같이, 신장을 샘플링하고, 전체 RNA를 단리하고, 유전자 발현을 qPCR에 의해 분석하였다. 발현치를 Gapdh mRNA 카피에 대해 정규화하였다. A 및 B의 데이터를 야생형 비히클 대조군에 대한 상대적 수준으로서 제시하고, 평균과 평균의 표준 오차 (SEM)로서 제공한다 ($n \geq 6$).

[0045] 칼슘 및 포스페이트 수준의 분석을 위해 마우스에게 단일 경구 용량의 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클을 제공하고, 투여후 24시간에 연구하였다. 포스페이트 및 칼슘 수준을 혈청으로부터 결정하였다. Hyp 마우스의 경우와 같이, 약리학적 FGFR 억제는 Dmp1-널 마우스에서의 증가된 혈청 칼슘 및 포스페이트 수준 (각각 도 2C 및 D)으로 이어졌다. 도 2의 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

[0046] 실시예 3

[0047] 도 3은 FGFR-의존성 신호전달이 골에서의 FGF23 발현을 조절하는 것을 제시한다. FGF23-관련 저인산혈증성 구루병에 대한 2종의 마우스 모델의 무기 이온 결핍의 완화 이외에도, 본 발명자들은 또한 BGJ398-치료된 Hyp 마우스에서 FGF23 수준에 대한 FGFR 억제제 치료의 억제 효과를 확인하였다. 마우스에게 단일 경구 용량의 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클을 제공하고, 투여후 7시간에 연구하였다. BGJ398로 치료된 야생형 및 Hyp 마우스에서 FGF23 골 mRNA (도 3A) 및 혈청 (도 3B) 수준을 결정하였다. BGJ398의 투여후 7시간에, Hyp 및 야생형 마우스 둘 다의 골에서의 FGF23 발현은 거의 파괴되었다 (도 2A). FGF23의 전사 억제는 야생형 마우스에서의 검출불가능한 혈청 FGF23 수준을 유발한 반면에, Hyp 마우스에서의 병리학적인 높은 FGF23 수준을 대략 50%만큼 감소시켰다 (도 3B). mRNA 발현을 야생형 비히클 대조군 (상대적 수준 100)에 대한 상대적 수준으로서 도면에 제시하고, 평균과 SEM으로서 제공한다 ($n \geq 7$). FGF23 mRNA 발현치를 Gapdh mRNA 카피에 대해 정규

화하였다. 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

[0048] 실시예 4

[0049] 도 4는 FGFR 억제제 치료가 칼슘 및 포스페이트 혈청 수준의 지속적 증가로 이어지는 것을 명백하게 제시한다. 실시예 1과 유사하게, 야생형 또는 Hyp 마우스에게 단일 경구 용량의 FGFR 억제제 BGJ398 또는 비히클을 제공하고, 화합물의 투여 후 48시간에 연구하였다. 칼슘 (도 4A) 및 포스페이트 (도 4B) 수준을 혈청으로부터 결정하였다. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 3$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음. (C) 투여후 7시간 및 24시간의 신장 내 BGJ398 농도. 값을 평균과 SEM으로서 제공한다 ($n \geq 5$).

[0050] 실시예 5

[0051] 장기간 FGFR 억제는 Hyp 마우스에서 체중 및 꼬리 길이 발달을 개선하고, 무기 이온 항상성을 복원시킨다. 장기간 연구를 수행하여 Hyp 마우스 모델의 구루병-유사 골 표현형의 잠재적 개선을 모니터링하였다. 치료를 8주의 과정에 걸쳐 수행하였다. 상승된 칼슘 및 포스페이트 수준의 지속성 - 신장으로부터의 BGJ398의 클리어런스를 넘어 연장되어 있음 (도 4) -으로 인해, 마우스를 BGJ398 (50 mg/kg 체중) 또는 비히클로 56일 동안 1주에 3회 (3qw) 치료하고, 상기 설명된 바와 유사하게 분석하였다. 도 5는 모니터링된 바와 같은 체중 (도 5A) 및 꼬리 길이 (도 5C) 발달을 제시한다. 치료 과정에 걸친 전체 체중 (도 5B) 및 꼬리 길이 증가 (도 5D)를 도 5에 또한 도시한다. 8주 치료의 말기의 칼슘 (도 5E) 및 포스페이트 (도 5F) 수준을 마지막 투여 후 24시간에 혈청으로부터 결정하고, 도 5에 제시한다. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

[0052] 야생형 한배새끼에 비해, Hyp 마우스는 치료의 시작시에 5주령에서 감소된 체중을 나타내었다. 치료 과정 동안, Hyp 마우스에서의 약리학적 FGFR 억제는 비히클 대조군에 비해 보다 강한 체중의 증가로 이어졌다 (도 5A). 전체적으로, BGJ398-치료된 Hyp 마우스에서의 전체 체중 증가는 비히클-치료된 야생형 마우스와 유사하였다 (도 5B). 보다 짧은 꼬리는 Hyp 마우스의 저인산혈증성 구루병 표현형의 명백한 특징이며, 이는 골 형성 장애를 반영한다. 따라서, 본 발명자들은 8주의 치료 동안 꼬리 길이 발달을 모니터링하였으며, BGJ398-치료된 Hyp 마우스가 대조군 Hyp 마우스에 비해 훨씬 더 강한 꼬리 길이 증가를 나타낸 것을 발견하였다 (도 5C). 더욱이, FGFR 억제제로 치료된 Hyp 마우스에서의 꼬리 길이 증가는 또한 비히클-치료된 야생형 한배새끼에 비해 현저하게 더 높았다 (도 5D). Hyp 마우스에서 포스페이트 및 칼슘 항상성에 대한 연속적 FGFR 억제의 효과를 조사하기 위해, 본 발명자들은 8주 연구의 말기에 혈청 칼슘 및 포스페이트 농도를 분석하였다. 본 발명자들은 단일 용량 FGFR 억제제 투여 (도 1D 및 E)와 대조적으로, BGJ398로의 장기간 치료가 Hyp 마우스에서 칼슘 및 포스페이트 수준 둘 다의 완전 정상화로 이어진 것을 발견하였다 (도 5E 및 F).

[0053] 실시예 6

[0054] 도 6은 BGJ398로 장기간 FGFR 억제 후의 FGF23, 부갑상선 호르몬 (PTH) 및 1,25(OH)2D3의 혈청 수준을 제시한다. 야생형 또는 Hyp 마우스를 다시 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료하고, FGF23 (도 6A), 부갑상선 호르몬 (PTH) (도 6B) 및 1,25(OH)2D3 (도 6C) 수준을 마지막 투여 후 24시간에 혈청으로부터 결정하였다. 응고 활성화제 원심분리 튜브 (사르스테트(Sarstedt))를 사용하여 혈청을 전혈로부터 분리함으로써 PTH 값을 결정하였다. 마우스 PTH ELISA (이뮤토픽스(Immupics))를 사용한 PTH 수준 결정을 위해 20 μ l의 혈청을 사용하였다. 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

[0055] FGF23 발현에 대한 FGFR 억제의 일시적 억제 효과 (도 3 참조)에도 불구하고, BGJ398로의 장기간 치료는 PTH 수준의 정상화 (도 6B)를 동반한 Hyp 마우스에서의 FGF23 혈청 농도의 추가 증가 (도 6A)로 이어진 반면에, 1,25(OH)2D3은 치료군 중에서 유의한 차이가 없었다 (도 6C).

[0056] 실시예 7

[0057] 도 7에 제시된 바와 같이, 장기간 FGFR 억제는 Hyp 마우스에서 장골의 성장을 증진시킨다. 종합하면, 이들 상기 결과는 이상 FGF23 신호전달의 맥락에서의 약리학적 FGFR 억제의 유익한 효과를 예증하고, Hyp 마우스의 골 형성 결핍의 잠재적 완화를 나타낸다. 본 발명자들은 따라서 방사선촬영에 의해 대퇴골 및 경골의 길이 성장에 대한 장기간 (8주) FGFR 억제의 효과를 분석하였으며, BGJ398-치료된 Hyp 마우스가 비히클 치료된 대조군에 비해 대퇴골 (도 7A 및 C) 및 경골 (도 7B 및 D)의 현저한 신장을 나타낸 것을 발견하였다. FGFR 억제는 구루병에서 전형적으로 관찰되는, 대퇴골 및 경골 성장판 영역 둘 다의 광폭화를 부분적으로 완화하였다 (도 7A 및

B). 도 7: FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스로부터의 대퇴골 (도 7A) 및 경골 (도 7B)의 방사선사진. 대퇴골 (도 7C) 및 경골 (도 7D) 길이의 정량화. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; n. s.: 유의하지 않음.

[0058] 실시예 8

[0059] 장기간 FGFR 억제는 Hyp 마우스의 대퇴 골의 피질 완전성을 개선한다.

[0060] 골 구조에 대한 FGFR 억제제 치료의 효과를 보다 상세하게 결정하기 위해, 본 발명자들은 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스로부터의 대퇴 피질 (성장판 아래 영역)의 마이크로컴퓨터 단층촬영 (μ CT) 분석을 수행하였다 (도 8A). 추가로 상대적 피질 골 부피를 정량화하고 (도 8B), 평균 피질 두께를 결정하였다 (도 8C). 이러한 분석은 Hyp 대퇴 피질 구조 내의 갭 및 홀에 의해 명백한, Hyp 마우스에서의 피질 골 영역의 손상된 무기질화를 밝혔다 (도 8A, 화살촉에 의해 표시함). 야생형 마우스에 비해, 비히클-치료된 Hyp 마우스는 피질 골 영역에서 감소된 상대적 골 부피 (도 8B) 및 감소된 평균 피질 두께 (도 8C)를 나타내었다. 대조적으로, BGJ398-치료된 Hyp 마우스의 피질은 무손상으로 보였으며 (도 8A), 상대적 피질 골 부피는 야생형 마우스와 구별불가능하였고 (도 8B), 피질 두께는 비히클-치료된 Hyp 마우스에 비해 현저하게 증가하였다 (도 8C).

[0061] 따라서, 상기 분석은 Hyp 마우스에서의 길이 성장 및 골의 구조적 완전성에 대한 FGFR 억제제의 유의한 효과를 밝혔다.

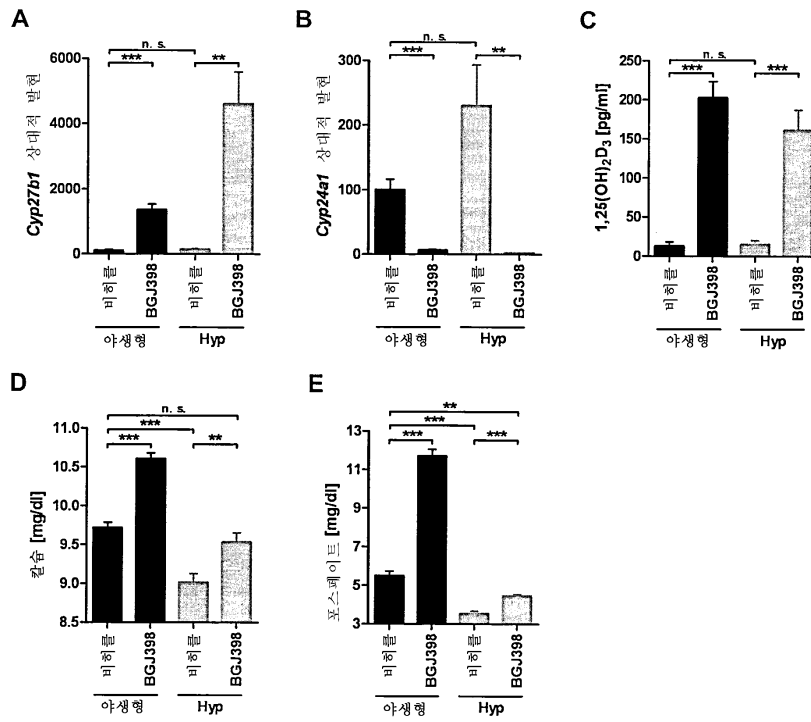
[0062] 실시예 9

[0063] BGJ398로의 장기간 치료는 Hyp 마우스에서의 성장판 조직화를 복원시킨다. 본 발명자들은 또한 경골 조직학적 절편에서 Hyp 마우스에서의 성장판 조직화에 대한 BGJ398-치료의 개선적 효과를 발견하였다 (도 9A). 도 9는 FGFR 억제제 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw로 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스로부터의 경골 절편의 골드너 염색을 제시한다 (도 9A). 무기질화 조직을 백색 화살표에 의해 표시하고, 비무기질화 유골을 암회색에 의해 가시화하였다 (흑색 화살표에 의해 표시함). 성장판 구조는 절편의 중심부에서의 명회색 염색에 의해 나타내어진다 (도 9B). 유골 표면/골 표면 및 유골 폭 (도 9C)을 BGJ398 (50 mg/kg) 또는 비히클로 56일 동안 3qw 치료된 야생형 또는 Hyp 마우스의 경골 골단에서 조직형태측정법에 의해 결정하였다. 데이터를 평균과 SEM으로서 제시한다 ($n \geq 6$). 데이터를 비대응 스튜던트 t 검정에 의해 비교하였다; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. 비히클-치료된 Hyp 마우스에서의 연골세포의 원주형 조직화 및 방향적 성장은 야생형 마우스에서의 고도로 규칙적인 구조와는 대조적으로 분포되었다. 또한, 무기질화는 비무기질화 유골의 발생물에 의해 나타난 바와 같이, 대조군 Hyp 마우스에서 손상되었다. 그러나 BGJ398-치료된 Hyp 마우스에서, 본 발명자들은 증식성 구역의 증가된 높이와 함께 성장판 영역의 현저한 재조직화 (도 9A, 좌측 패널) 및 연골세포의 원주형 적층의 재형성을 관찰하였다 (도 9B, 우측 패널). 추가로, 본 발명자들은 성장판에 인접한 골단 골 영역에서의 증진된 무기질화 뿐만 아니라 골간단 성장판-아래 영역에서의 일차 해면질의 형성을 확인하였으며, 이는 비히클-치료된 Hyp 마우스에서는 거의 부재하였다. 마찬가지로, 조직형태측정 분석은 FGFR 억제제의 Hyp 마우스에서의 증가된 OS/BS 비의 감소 (도 9B) 및 골단, 골간단 및 피질 골 구획 내의 유골 폭의 강한 감소 (도 9C)를 밝혔다.

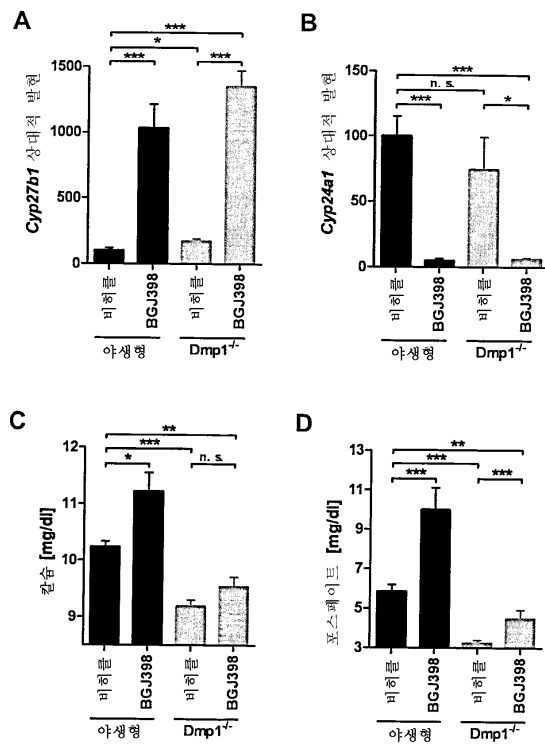
[0064] 요약하면, 본 발명자들의 데이터는 FGFR의 약리학적 억제제가 이상 FGF23-신호전달을 억제하고, XLH의 저인산혈증성 구루병 표현형 및 잠재적으로 다른 FGF23-관련 저인산혈증 질환, 예컨대 ARHR을 완화하기에 충분한 것을 나타낸다. 특히, FGFR 억제제 BGJ398의 연속 투여시의 Hyp 마우스에서의 포스포이트 및 칼슘 수준의 완전 정상화 및 구루병-유사 골에서의 성장판 영역의 재조직화는 저인산혈증성 구루병 표현형의 잠재적 역전을 위한 전제조건을 구성하기 때문에, 이는 유망하다.

도면

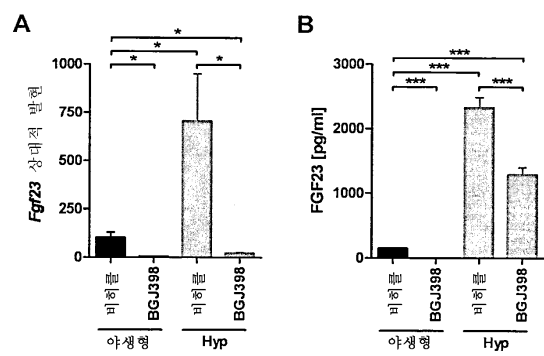
도면1



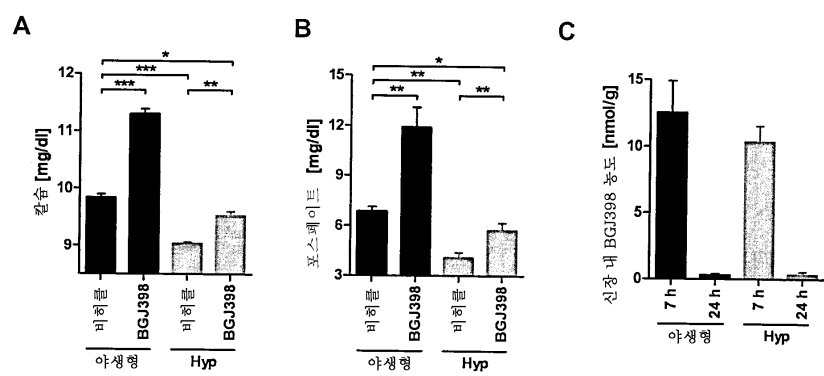
도면2



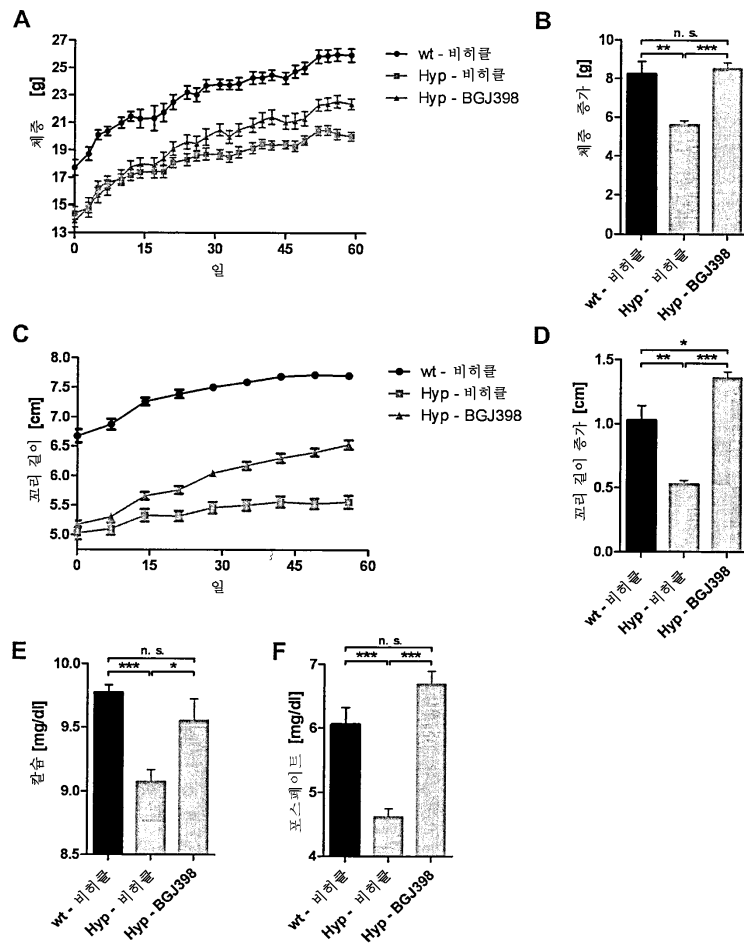
도면3



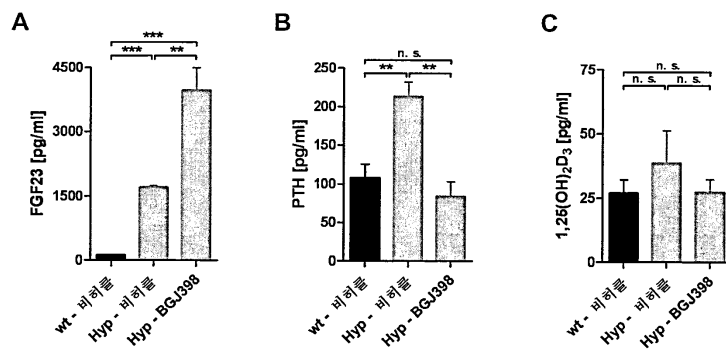
도면4



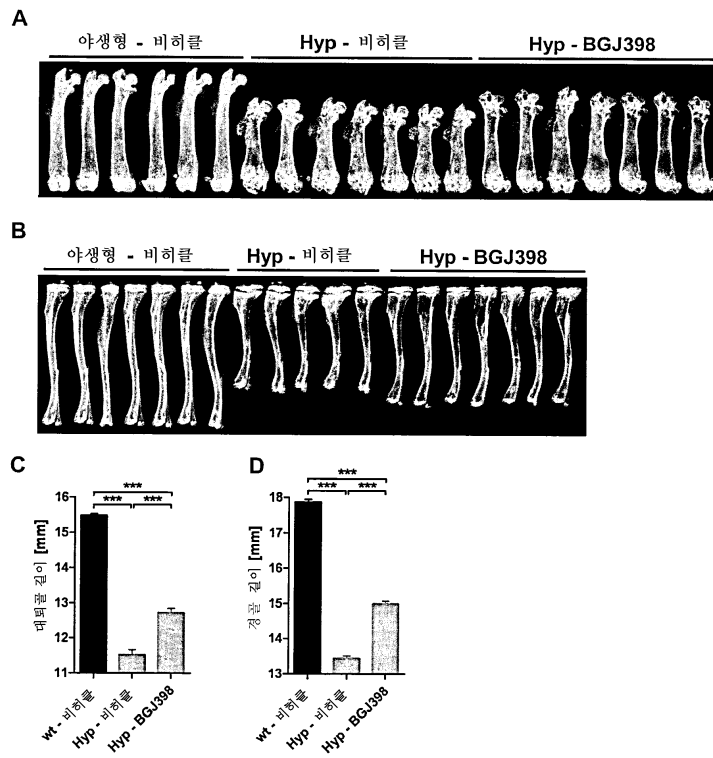
도면5



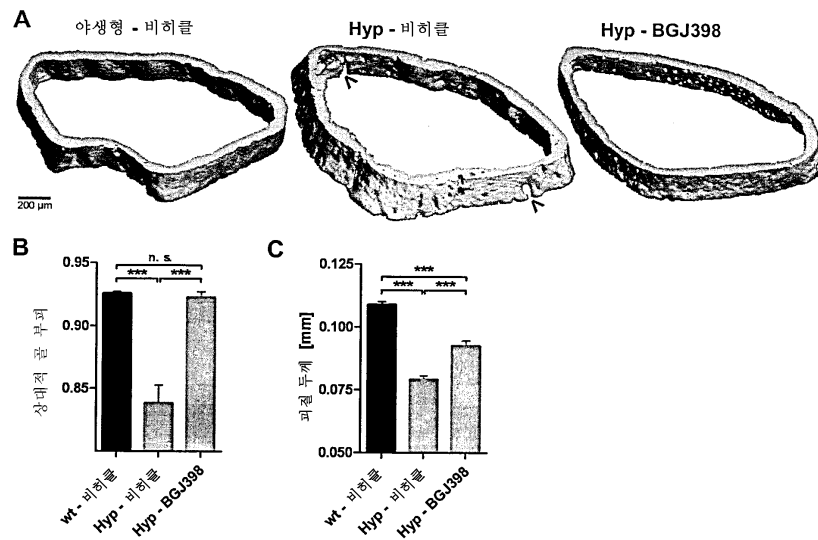
도면6



도면7



도면8



도면9

