



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0134605

(43) 공개일자

2012년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/7028 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/05 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0053644

(22) 출원일자

2011년06월03일

심사청구일자

2011년06월03일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

김성훈

서울특별시 강남구 도곡동 타워팰리스 E동 2405호

정수진

서울특별시 동대문구 이문로38길 9 (이문동)

권태린

서울특별시 구로구 경인로 382, 101동 2301호 (개봉동, 한마을아파트)

(74) 대리인

안소영

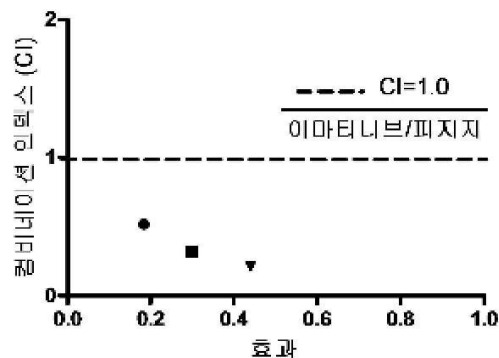
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 1, 2, 3, 4, 6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물에 관한 것으로, 만성 골수성 백혈병 치료 시 화학요법제인 이마티니브에 대한 내성 발생의 부작용을 감소시키고 항암효과를 증가시켜 만성 골수성 백혈병 치료에 사용될 수 있으며, 특히, 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0006220

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 암세포 사멸 유도 및 항암제 독성완화/내성 억제 효능 한방소재개발

주관기관 경희대학교

연구기간 2007.05.01 ~ 2016.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucose) 및 이마티니브(Imatinib)를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포로 인한 만성 골수성 백혈병인 것을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포는 K562/ImaR-1 세포주임을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 약제 내성 마커의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 약제 내성 마커는 P-글리코프로테인(Permeability glycoprotein; P-gp)인 것을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물에 포함된 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브의 몰 비가 1:80 내지 1:320인 것을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포 내에서 아포토시스성 서브-G1(apoptotic sub-G1) DNA 함량을 증가시키고, 폴리(ADP-리보스)중합효소[poly(ADP-ribose)polymerase; PARP] 분열을 증가시키고, B-세포 림프종 2(B-cell lymphoma 2; Bcl-2)의 발현을 감소시켜, 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 세포 독성 및 아포토시스를 증가시킴을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포 내에서, p-글리코프로테인의 발현을 감소시켜, 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 이마티니브의 감수성을 증가시킴을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] Novartis사에서 GleevecTM 상품명으로 판매 중인 이마티니브(Imatinib)는 만성 골수성 백혈병의 치료를 위한 암 화학요법제로 사용되고 있으나 고가이며, 구역, 구토, 체액정체, 설사, 근육경련과 같은 경미한 부작용과 폐렴,

우울증, 경련, 심부전, 혈전증, 색전, 출혈, 빈혈, 혈소판 감소증을 동반한 골수억제의 심각한 부작용을 유발한다.

[0003] 또한, 이마티니브 치료를 받은 만성 골수성 백혈병 환자의 약 90%에서 내성을 보이게 되는데 대부분의 혈액종양 세포가 이마티니브에 의해 제거되어도 변이를 가진 소수의 세포들은 이마티니브 치료에도 불구하고 생존하여 결국 골수암의 재발을 일으키게 된다. 실제 임상에서 이마티니브 내성을 보이는 환자에서 관찰되는 내성발생 원인으로서는 추가적인 염색체이상, BCR/ABL 유전자의 점 돌연변이(point mutation) 및 BCR/ABL 유전자 증폭(gene amplification) 등의 순서로 그 비율은 각각 52.8%, 48.5% 및 6.2%이다(Leukemia 2002, 16:2190-96).

[0004] 즉, 이마티니브는 만성 골수성 백혈병의 치료에 중요 화학요법제이나, 고가이며, 고농도로 투여 시, 부작용이 크며, 만성 골수성 백혈병에 사용함에 따라 내성이 생겨 이마티니브 감수성이 떨어지는 문제점이 있었다.

[0005] 따라서, 이미 내성이 예측되는 환자들이나 처음에는 이마티니브 감수성 양성이지만 내성이 생기는 것으로 예측되는 시점에는 고농도의 이마티니브 사용이 요구되어 부작용이 크므로, 이마티니브 내성 문제의 해결이 요구되고 있다.

[0006] 한편, 대한민국공개특허 제2005-0095287호에는 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스가 사이클로옥시게나제-2(COX-2) 저해효과, 아포토시스 유도효과 및 암종 증식 억제효과가 있음이 개시되어 있다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 BCR/ABL 단백질의 작용기전과 관련된 다른 저해약제를 병행하여 투여함으로써 이마티니브 내성을 극복할 수 있다는 점에 착안하여 예의 연구를 거듭한 결과, 본 발명의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스와 이마티니브의 병용 투여가 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포주(K562/ImaR-1)의 이마티니브에 대한 감수성을 증가시켜 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포주(K562/ImaR-1)에 대한 항암효과를 증가시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

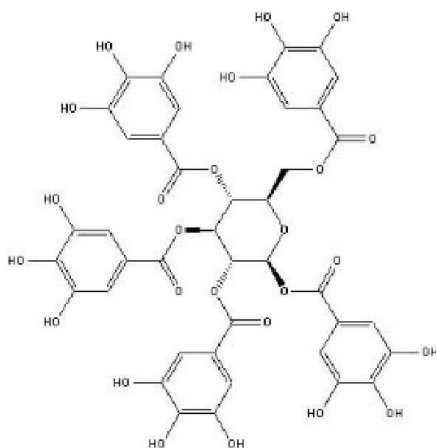
해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 이마티니브에 대한 내성 발생의 부작용을 감소시키고 항암효과를 증가시킨 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

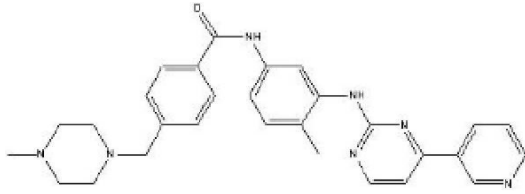
[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스(1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose; PGG; 피지지) 및 하기 화학식 2의 이마티니브(Imatinib)를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물을 제공한다:

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] [화학식 2]



[0013]

[0014] 상기 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스는 오배자(*Galla Rhois*)로부터 분리될 수 있다. 오배자는 매미목 진딧물과의 오배자면충이 옻나무과의 붉나무(오배자나무, *Rhus javanica*)의 잎에 기생하여 만든 벌레혹이다.

[0015] 상기 이마티니브는 4-[(4-메틸피페라진-1-일)메틸]-N-[4-메틸-3-[(4-피리딘-3-일피리딘-2-일)아미노]페닐]벤즈아미드
 $\{4-[(4\text{-methylpiperazin-1-yl)methyl}]\text{-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl]benzamide\}$ 이다.

[0016] 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 병용 처리할 때, 컴비네이션 인덱스 값이 1 이하로, 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 각각 처리할 때 보다 상승효과가 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 만성 골수성 백혈병은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포로 인한 만성 골수성 백혈병일 수 있다.

[0018] 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포는 만성 골수성 백혈병 세포주에 이마티니브를 지속적으로 처리하면서 살아남은 세포를 수득함으로써 제작할 수 있다. 예를 들어, 이마티니브에 감수성인 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포(Lozzio, C.B. and Lozzio, B. B. Blood 45:321-334(1975))에 이마티니브를 지속적으로 하면서 살아남은 세포를 수득함으로써 제작할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포는 K562/ImaR-1 세포주일 수 있다.

[0020] 이마티니브에 대한 세포독성 검사에서 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포 K562/ImaR-1는 이마티니브 감수성인 K562와 비교하여, 세포 생존율에 영향을 주지 않아 이마티니브에 대한 내성이 생겼음을 알 수 있다(도 1 참조).

[0021] 이마티니브는 만성 골수성 백혈병 환자의 원인인 bcr-abl이라는 융합단백질의 과발현 억제에 목적이다. 따라서 이마티니브 내성 세포는 상대적으로 bcr-abl 단백질의 발현 증가로 확인할 수 있다(도 2 참조).

[0022] 항암 화학요법제 내성군은 약제 내성 마커의 발현을 확인함으로써 확인할 수 있다. 약제 내성 마커의 발현의 감소는 약제 감수성이 증가함을 의미한다. 항암 화학요법제 내성군 약제 내성 마커의 일 예로는 MDR1 유전자(Multi-Drug Resistance 1)와 P-글리코프로테인(Permeability glycoprotein; P-gp)을 들 수 있다. MDR1 유전자는 다발성 약제 내성을 유발하며, 항암약물제제들의 유출 펌프(efflux pump)로 작용하는 P-글리코프로테인을 생산하며, 고농도의 MDR1 유전자는 다발성 약제 내성과 관계가 깊어서 P-글리코프로테인은 항암화학요법의 반응도와 병의 진행에 중요한 예후인자로 보여지며, Pacos와 Ioannidis는 P-글리코프로테인 양성도와 약물에 대한 조직학적 괴사 반응도는 무관하지만 병의 진행과 관계있다고 보고하였다(Pakos EE, Ioannidis JP. The association of Pglycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis. Cancer 2003; 98: 581 - 9).

[0023] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 약제 내성 마커의 발현을 감소시킬 수 있다. 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물이 약제 내성 마커의 발현을 감소시킬 수 있다는 것은 약제 감수성이 증가시킬 수 있음을 의미한다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 약제 내성 마커는 P-글리코프로테인일 수 있다. P-글리코프로테인은 다약제 내성 유전자이다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물에 포함된 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브의 몰 비가 1:80 내지 1:320일 수 있다. 예를 들어, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물에서 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브의 농도는 이마티니브 250 nM, 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 20 μ M 내지 이마티니브 125 nM, 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-

-디-글루코오스 40 μ M일 수 있다. 시험관 내 실험(In vitro)에서는 상기 농도 범위에서 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포(K562/ImaR-1 세포주)에 선택적인 세포 독성 및 아폽토시스 증가를 확인할 수 있다.

- [0026] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포 내에서 아폽토시스성 서브-G1(apoptotic sub-G1) DNA 함량을 증가시키고, 폴리(ADP-리보스)중합효소[poly(ADP-ribose)polymerase; PARP] 분열을 증가시키고, B-세포 림프종 2(B-cell lymphoma 2; Bcl-2)의 발현을 감소시켜, 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 세포 독성 및 아폽토시스를 증가시킬 수 있다.
- [0027] 카스파제-3 (caspase-3)는 암세포의 아폽토시스에서 중요한 효소이며, 폴리(ADP-리보스)중합효소[poly(ADP-ribose)polymerase; PARP]는 카스파제-3의 기질이다. 암세포의 아폽토시스가 유도되면, 카스파제-3의 활성이 증가하고, 그 기질인 폴리(ADP-리보스)중합효소의 단편화가 나타난다. 따라서 카스파제-3의 활성증가 및 폴리(ADP-리보스)중합효소의 단편화의 유도는 암치료제의 효과 (세포 독성 및 아폽토시스)를 증가시킬 수 있다.
- [0028] Bcl-2는 세포사멸(apoptosis)을 방해 또는 지연시켜 세포의 생존을 연장시키는 항-아폽토시스 단백질(anti-apoptotic protein)이다. 따라서, Bcl-2의 발현을 감소는 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 아폽토시스를 증가시킬 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포 내에서, p-글리코프로테인의 발현을 감소시켜, 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포에 대한 이마티니브의 감수성을 증가시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명의 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 본 발명의 효과를 해치지 않는 범위 안에서 약학적으로 허용 가능한 희석제, 결합제, 붕해제, 윤활제, pH 조절제, 산화방지제, 용해보조제 등의 첨가제를 포함할 수 있다.
- [0031] 희석제는 슈가, 전분, 미결정셀룰로오스, 유당(유당수화물), 포도당, 디-만니톨, 알기네이트, 알칼리토금속류염, 클레이, 폴리에틸렌글리콜, 무수인산수소칼슘, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있으며; 결합제는 전분, 미결정셀룰로오스, 고분산성 실리카, 만니톨, 디-만니톨, 자당, 유당수화물, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈(포비돈), 폴리비닐피롤리돈 공중합체(코포비돈), 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 천연검, 합성검, 코포비돈, 젤라틴, 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 붕해제는 전분글리콘산나트륨, 옥수수전분, 감자전분 또는 전호화전분 등의 전분 또는 변성전분; 벤토나이트, 몬모릴로나이트, 또는 비검(veegum) 등의 클레이; 미결정셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류; 알긴산나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류; 크로스카멜로스(croscarmellose)나트륨 등의 가교 셀룰로오스류; 구아검, 잔탄검 등의 검류; 가교 폴리비닐피롤리돈(crospovidone) 등의 가교 중합체; 중탄산나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제, 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0033] 윤활제는 탈크, 스테아린산, 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 라우릴설페이트나트륨, 수소화식물성오일, 나트륨벤조에이트, 나트륨스테아릴푸마레이트, 글리세릴 베헤네이트, 글리세릴 모노레이트, 글리세릴모노스테아레이트, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 콜로이드성 이산화규소 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있다.
- [0034] pH 조절제는 초산, 아디프산, 아스코르빈산, 아스코르빈산 나트륨, 에테르산 나트륨, 사과산, 숙신산, 주석산, 푸마르산, 구연산(시트르산)과 같은 산성화제와 침강 탄산 칼슘, 암모니아수, 메글루민, 탄산 나트륨, 산화 마그네슘, 탄산 마그네슘, 구연산 나트륨, 삼염기칼슘인산염과 같은 염기성화제 등을 사용할 수 있다.
- [0035] 산화방지제는 디부틸 히드록시 톨루엔, 부틸레이티드 히드록시아니솔, 초산 토크페롤, 토크페롤, 프로필 갈레이트, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 선방출성 구획에서, 용해보조제는 라우릴황산나트륨, 폴리소르베이트 등의 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 도큐세이트 나트륨, 폴록사머(poloxamer) 등을 사용할 수 있다.
- [0036] 또한, 지연방출성 제제를 만들기 위해 장용성 고분자, 수불용성 중합체, 소수성 화합물, 및 친수성 고분자를 포함할 수 있다.
- [0037] 상기 장용성 고분자는 pH 5 미만의 산성 조건하에서 불용성이거나 또는 안정한 것으로, pH 5 이상인 특정 pH 조건하에서 용해되거나 또는 분해되는 고분자를 말하며, 예를 들어, 히프로멜로오스아세테이트숙시네이트, 히프로멜로오스프탈레이트(히드록시프로필메틸셀룰로오스 프탈레이트), 히드록시메틸에틸셀룰로오스프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 셀룰로오스아세테이트숙시네이트, 셀룰로오스아세테이트말레이트, 셀룰로오스벤조에이트프탈레이트, 셀룰로오스프로피오네이트프탈레이트, 메틸셀룰로오스프탈레이트, 카르복시메틸에틸셀룰로오스 및 에틸히드록시에틸셀룰로오스프탈레이트, 메틸히드록시에틸셀룰로오스와 같은 장용성 셀룰로오스 유도체; 스

티렌-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸-아크릴산 공중합체, 아크릴산메틸메타크릴산 공중합체(예컨대, 아크릴-이즈), 아크릴산부틸-스티렌-아크릴산 공중합체, 및 아크릴산메틸-메타크릴산-아크릴산옥틸공중합체와 같은 상기 장용성 아크릴산계 공중합체; 폴리(메타크릴산 메틸 메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 L, 유드라짓 S, 에보닉, 독일), 폴리(메타크릴산 에틸아크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 L100-55)와 같은 장용성 폴리메타크릴레이트 공중합체; 아세트산비닐-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산 무수물 공중합체, 스티렌-말레인산모노에스테르 공중합체, 비닐메틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 에틸렌-말레인산 무수물 공중합체, 비닐부틸에테르-말레인산 무수물 공중합체, 아크릴로니트릴-크릴산메틸·말레인산 무수물 공중합체, 및 아크릴산부틸-스티렌-말레인산 무수물 공중합체와 같은 장용성 말레인산계 공중합체; 및 폴리비닐알콜프탈레이트, 폴리비닐아세탈프탈레이트, 폴리비닐부틸레이트프탈레이트 및 폴리비닐아세트아세탈프탈레이트와 같은 장용성 폴리비닐 유도체가 있다.

[0038] 상기 수불용성 중합체는 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되지 않는 고분자를 말한다. 예를 들어, 수불용성 중합체는 폴리비닐아세테이트(예컨대, 콜리코트 SR30D), 수불용성 폴리메타크릴레이트 공중합체(예컨대, 폴리(에틸아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓 NE30D, 폴리(에틸아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트-트리메틸아미노에틸메타크릴레이트)공중합체(예컨대, 유드라짓RSP 0)등], 에틸셀룰로오스, 셀룰로오스 에스테르, 셀룰로오스 에테르, 셀룰로오스 아실레이트, 셀룰로오스 디아실레이트, 셀룰로오스 트리아실레이트, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 디아세테이트 및 셀룰로오스 트리아세테이트 등이 있다.

[0039] 상기 소수성 화합물은 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되지 않는 물질을 말한다. 예를 들어, 글리세릴 팔미토스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 글리세릴 비헤네이트, 세틸 팔미테이트, 글리세릴 모노 올레이트 및 스테아린산과 같은 지방산 및 지방산 에스테르류; 세토스테아릴 알코올, 세틸알코올 및 스테아릴알코올과 같은 지방산 알코올류; 카르나우바왁스, 밀납, 및 미결정왁스와 같은 왁스류; 탈크, 침강탄산 칼슘, 인산일수소칼슘, 산화아연, 산화티탄, 카올린, 벤토나이트, 몬토릴로나이트 및 비검과 같은 무기질 물질 등이 있다.

[0040] 상기 친수성 고분자는 약물의 방출을 제어하는 약제학적으로 허용가능한 물에 용해되는 고분자 물질을 말한다. 예를 들어, 텍스트린, 폴리텍스트린, 텍스트란, 펙틴 및 펙틴 유도체, 알긴산염, 폴리갈락투론산, 자일란, 아라비노자일란, 아라비노갈락탄, 전분, 히드록시프로필스타치, 아밀로오스, 및 아밀로펙틴과 같은 당류; 히프로멜로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스 및 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨과 같은 셀룰로오스 유도체; 구아검, 로커스트 콩 검, 트라가칸타, 카라기난, 아카시아검, 아라비아검, 젤란검, 및 잔탄검과 같은 검류; 젤라틴, 카제인, 및 제인과 같은 단백질; 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 및 폴리비닐아세탈디에틸아미노아세테이트와 같은 폴리비닐유도체; 폴리(부틸 메타크릴레이트-(2-디메틸아미노에틸)메타크릴레이트-메틸메타크릴레이트) 공중합체(예컨대, 유드라짓E100, 에보닉, 독일), 폴리(에틸 아크릴레이트-메틸 메타크릴레이트-트리에틸아미노에틸- 메타크릴레이트 클로라이드) 공중합체(예컨대, 유드라짓 RL, RS, 에보닉, 독일)과 같은 친수성 폴리메타크릴레이트 공중합체; 폴리에틸렌 글리콜, 및 폴리에틸렌 옥사이드와 같은 폴리에틸렌 유도체; 카보머 등이 있다.

[0041] 이외에도 착색제, 향료 중에서 선택된 다양한 첨가제로서 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 선택 사용하여 본 발명의 제제를 제제화할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 첨가제의 범위가 상기 첨가제를 사용하는 것으로 한정되는 것은 아니며, 상기한 첨가제를 선택에 의하여 통상 범위의 용량을 함유하여 제제화할 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명은 또한 본 발명의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물을 포유류를 포함하는 대상체에 투여하여 만성 골수성 백혈병 치료 방법을 제공한다. 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 경구 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 내피 투여, 비내 투여, 폐내투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [0045] 본 발명에 따른 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 일일 1회 또는 일정한 시간 간격을 두고 일일 2회 이상 투여될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설을 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0047] 본 발명의 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물의 투여량은 본 발명의 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물의 활성, 성별, 투여 시간, 투여 경로, 치료 기간 및 횟수 등에 따라 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

발명의 효과

- [0048] 본 발명에 따른 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 및 이마티니브를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물은 만성 골수성 백혈병 치료 시 화학요법제인 이마티니브에 대한 내성 발생의 부작용을 감소시키고 항암효과를 증가시켜 만성 골수성 백혈병 치료에 사용될 수 있으며, 특히, 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 이마티니브 감수성 세포주 K562와 이마티니브 내성 세포주 K562/ImaR-1에 대한 이마티니브 처리 농도에 대한 세포 독성을 나타내는 그래프들이다.
- 도 2는 이마티니브 감수성 세포주 K562에 이마티니브를 처리한 후, bcr-abl의 발현의 증가를 확인한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸다.
- 도 3은 이마티니브 내성 세포주 K562/ImaR-1에서 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 각각 또는 병용처리에 대한 세포 독성 결과를 나타내는 히스토그램이다.
- 도 4는 이마티니브 내성 세포주 K562/ImaR-1에 대한 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스의 콤비네이션 인덱스를 나타낸다.
- 도 5는 이마티니브 내성 세포주 K562/ImaR-1에 250 nM 이마티니브와 20 μ M의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 24 시간 동안 각각 또는 병용 처리한 후, 유세포 분석기를 이용하여, 서브-G1 DNA 함량을 보여주는 히스토그램이다.
- 도 6은 이마티니브 내성 세포주 K562/ImaR-1에 250 nM 이마티니브와 20 μ M의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 24 시간 동안 각각 또는 병용 처리한 후, 유세포 분석기를 이용하여 측정된 아포토시스 세포의 비율, 즉, 서브-G1 DNA 함량을 보여주는 그래프이다.
- 도 7은 이마티니브 내성 세포주 K562/ImaR-1에 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 각각 또는 병용 처리한 후, p-글리코프로테인의 발현량 변화, 폴리(ADP-리보스)중합효소(PARP) 분열 정도 변화 및 bcl-2의 발현량 변화를 확인한 웨스턴 블로팅 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하, 하기 실시 예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시 예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 설명일 뿐 실시 예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 실시예 1. 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포주 제작
- [0052] 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포(Lozzio, C.B. and Lozzio, B. B. Blood 45:321-334(1975))에 이마티니브(Imatinib)로 Novartis사의 GleevecTM을 0.05 μ M부터 시작하여, 매 2주마다 0.05 μ M 씩 증가된 농도를 처리하여 1 μ M까지 처리하였다. 이마티니브는 DMSO(dimethylsulfoxide) 용매에 용해시켜 사용하였다. 이 후 1 μ M의 이마티니브를 지속적으로 처리하면서, 시작한 시점으로부터 4 개월까지 세포를 유지시켜 살아남는 세포를 K562/ImaR-1 세포주로 명명하였다.
- [0053] K562/ImaR-1 세포주의 이마티니브에 대한 내성은 세포 독성검사(도 1 참조) 및 bcr-abl 항체(c-Abl (24-11), sc-23, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용한 웨스턴 블로팅(도 2 참조)을 이용하여 확인하였다.

- [0054] 상기 세포 독성 검사는 XTT 분석법으로 세포생존율을 측정함으로써 수행하였다. 이마티니브 감수성인 만성 골수성 백혈병 세포주 K562와 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포주 K562/ImaR-1에 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 또는 2 μ M의 이마티니브가 24 또는 48 시간 동안 처리되었다. 소듐 2,3-비스(2-메톡시-4-니트로-5-설포페닐)-2H-테트라졸리움-5-카르복사닐리드 내염(Sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt; XTT)와 PMS(phenazine methosulfate)함께 섞은 용액을 37℃에서 2시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 ELISA reader기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로써 측정하여 하기식에 따라 계산한 후 생존율을 비교 분석하였다.
- [0055] 세포생존율 (%) = [흡광도 (약물처리군)-흡광도 (배지)]-[OD (약물처리하지 않은 군)-OD (배지)] $\times$ 100 상기 OD는 흡광도(Optical density)를 나타냄.
- [0056] 이마티니브 감수성 세포주인 K562에 이마티니브를 0.05 μ M부터 시작하여, 매 2주마다 0.05 μ M 씩 증가된 농도를 처리하여 1 μ M 까지 처리하였다. 이 후 1 μ M의 이마티니브를 지속적으로 처리하면서, bcr-abl의 발현의 증가를 웨스턴 블로팅(western blotting)을 통하여 확인하였다.
- [0057] 상기 웨스턴 블로팅은 다음과 같이 수행하였다. 모든 세포를 수거하여 프로테아제 저해제 및 50 mM TrisHCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% 데옥시콜린산(deoxycholate acid)을 포함한 용균액을 처리한 후 상층액을 취하였다. 상층액에서 단백질을 정량을 시행한 후 그 단백질을 20 μ g을 취하여 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였다. 폴리아크릴아마이드 겔에 영동된 단백질을 니트로셀룰로스 막에 전기이동시킨 후, 5% 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)에 실온에서 한 시간 블로킹(blocking) 반응을 실시하였다. 이를 Bcr-abl (c-Abl (24-11), sc-23, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 베타-액틴 (Sigma, St.Louis, MO, USA)에 대한 단클론성 항체로 4 ℃에서 12시간 반응시키고, Tween 20이 포함된 Tris buffered saline (TBS)-T 용액으로 3 회 세척하였다. 이차항체(horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or rabbit secondary antibodies, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 반응시킨 후 ECL system (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)으로 발색시킨 후 밴드를 확인하였다. 베타-액틴(β -actin)은 모든 세포에서 동일한 수준으로 발현되는 유전자(house keeping gene)로 동량의 단백질에 대해 분석되었는지를 보여주는 기준으로 사용되었다. bcr-abl 발현 증가를 웨스턴 블로팅을 통해 확인하였다. 기존의 세포주인 K562 세포와 이마티니브 내성세포주에 대한 Bcr-abl의 단백질 발현량을 비교확인해 본 결과, 이마티니브 내성세포주에서 기존 세포주에 비해 Bcr-abl 발현량이 눈에 띄게 증가했음으로 보아 이마티니브에 대한 내성이 생겼음을 확인할 수 있다.
- [0058] 실시예 2. 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스의 분리
- [0059] 음건한 오배자(355 g)를 추출용기에 넣고 메탄올(730 mL)에 3회 환류 추출하여 얻어지는 용액을 농축하여 오배자 메탄올 엑스(252g)를 얻었다. 물층과 부탄올 용액이 1:1(vol/vol) 이 되도록 물을 가한 후 분배시켜 얻어지는 부탄올용액과 물층을 농축하여 부탄올 엑스 (35g)와 물 엑스 (45g)를 각각 얻었다. 오배자 부탄올 엑스 (10g)를 실리카겔 흡착시킨 후 CHCl_3 : 메탄올(MeOH) : H_2O = 65 : 35 : 10과 에틸아세테이트(ethyl acetate; EtOAc) : 메탄올(MeOH) : H_2O = 100 : 15.6 : 13.5의 전개용매를 순차적으로 사용하여 1차 분리한 후 메탄올(MeOH)을 용매로 하여 역상 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하였다. 역상 컬럼 크로마토그래피는 세파텍스-RH20을 사용하였고, NMR, 질량분석기(mass spectrometer) 등의 분광분석을 통해 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스(피지지, 분자량 940.67g/mol)를 확인하였다.
- [0060] 실시예 3. 세포 독성 검사 및 병용투여 효과 검사
- [0061] K562/ImaR-1 세포주에 250 nM의 이마티니브와 10, 20 또는 40 μ M의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 24 시간 동안 각각 또는 병용 처리하였다. 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스는 DMSO 용매에 용해시켜 사용하였다.
- [0062] 세포 생존율은 XTT 분석에 의해 측정되었다. 소듐 2,3-비스(2-메톡시-4-니트로-5-설포페닐)-2H-테트라졸리움-5-카르복사닐리드 내염(Sodium 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt; XTT)와 PMS(phenazine methosulfate)함께 섞은 용액을 37℃에서 2시간 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도를 ELISA reader기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로써 측정하여 생존율을 비교 분석하였다.
- [0063] 이마티니브 (250 nM)는 K562/ImaR-1 세포에 독성을 나타내지 않았으며, 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스(10, 20 또는 40 μ M)의 처리는 농도 의존적으로 미약한 독성을 나타내었다. 이마티니브 (250 nM)과 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스(10, 20 또는 40 μ M)의 병용 처리는 세포 독성을 유의하게 증가

시켰다(도 3 참조).

- [0064] K562/ImaR-1 세포에 대한 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스의 병용 투여로 인한 항암 상승효과를 컴비네이션 인덱스(combination index; CI)를 계산하여 입증하였다. 컴비네이션 인덱스는 두 가지 약물을 각각 단독 처리한 군과 병용처리한 군 간의 세포생존을 저해 효과를 비교하여 나타낸 값이며, CalcuSyn 소프트웨어(Biosoft, Ferhuson, MO, USA)를 이용하여 측정하였다.
- [0065] Chou와 Talalay의 방법(Chou TC, Talalay P: Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul 1984, 22:27-55)에 따라 분석하였다. 도 4는 K562/ImaR-1 세포에 대한 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스의 항암 상승효과를 컴비네이션 인덱스를 계산하여 나타낸 것이다. 도 4에서, x 축의 효과는 세포독성검사 (XTT 분석법)에서 두 약물을 동시 처리 시 흡광도 (OD)값을 의미한다(원; 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 10/이마티니브0.125, 네모; 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스20/이마티니브0.25, 세모; 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스40/이마티니브0.5의 농도비율로 병용처리시의 조합을 나타냄).
- [0066] 좀 더 상세하게 설명하면, D는 약물 농도이며 Dm은 중간 효과를 나타내는 약물의 농도로 정하고, 이를 이용하여 $\log [D/D_m]$ 에 대한 $\log [(1-f)/f]$ 를 작성하였으며 중간 효과 곡선(Median Effect Curve)에서 각각의 약물과 약물조합에 대한 X절편($\log IC_{50}$)과 기울기 m을 최소자승법(least squares법)으로 계산하였다. 이 값은 하기식에 따라 단계별 세포 독성을 나타내는 각각 약물의 농도와 약물조합의 농도를 계산하는데 사용되었다. f는 분획 생존율(fractional survival)을 의미하며 약물 처리 플레이트의 생존율을 대조군 플레이트의 생존율로 나눈 값이며, IC_{50} 은 50% 저해농도를 의미한다.
- [0067] $D(\text{the dose of drug}) = D_m[(1-f/f)^{1/m}]$ 생존율(f)값의 약물조합 농도는 약물 1과 약물 2에 대하여 $(D)_1$ 과 $(D)_2$ 로 표시하였고 단계별 세포 독성을 나타내는 지표 컴비네이션 인덱스(CI)는 하기식을 이용하여 계산하였다.
- [0068] $CI = (D_{comb})_1 / (D_{alone})_1 + (D_{comb})_2 / (D_{alone})_2 + \alpha [(D_{comb})_1 \times (D_{comb})_2] / [(D_{alone})_1 \times (D_{alone})_2]$
- [0069] $(D_{alone})_1$ 과 $(D_{alone})_2$ 는 약제 1과 2의 단독 처리 시 주어진 효과 (생존율 (fa))를 나타내는 약물의 농도를 의미하며 $(D_{alone})_1$ 과 $(D_{alone})_2$ 는 약물을 조합 처리하였을 때 주어진 효과(fa)를 얻기 위한 농도이다. 그리고 약물의 작용이 상호간에 유사성이 있는 경우(mutually exclusive)는 $\alpha = 0$ 그리고 없는 경우(mutually exclusive) $\alpha = 1$ 이다.
- [0070] $CI < 1$, 두 약물 간의 상승효과(synergistic effect)가 있는 경우, $CI=1$, 두 약물 간의 병합효과(additive effect)가 있는 경우, 그리고 $CI > 1$, 두 약물 간 저항효과(antagonistic effect)가 있는 경우이다.
- [0071] 도 4를 참조하면, 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 병용 처리할 때, CI 값이 1 이하로, 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 각각 처리할 때 보다 상승효과가 있음을 확인하였다.
- [0072] 실시예 4. 아포토시스성 서브-G1(apoptotic sub-G1) DNA 함량 측정
- [0073] K562/ImaR-1 세포주에 250 nM 이마티니브와 20 μ M의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 24 시간 동안 각각 또는 병용 처리하였다. 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스는 DMSO 용매에 용해시켜 사용하였다. 프로피디움 아이오다이드(Propidium iodide; PI) 용액(Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)으로 염색 후 유세포 분석기(FACSCalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 세포 주기를 분석하고, 아포토시스성 세포(apoptotic cell)를 나타내는 아포토시스성 서브-G1 DNA 함량을 측정하였다(도 5 및 도 6 참조).
- [0074] 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스의 병용 처리는 각각의 단독 처리 시 보다 K562/ImaR-1 세포 내에서 아포토시스성 서브-G1 DNA 함량을 증가시킴을 확인하였다.
- [0075] 실시예 5. 폴리(ADP-리보스)중합효소(PARP) 분열 및 bcl-2의 발현 측정
- [0076] 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스 농도를 20 μ M로 고정하고, 250 또는 500 nM의 이마티니브를 단독 또는 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스와 병용하여 24시간 동안 처리하였다. 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스는 DMSO 용매에 용해시켜 사용하였다. p-글리코프로테인의 발현량

변화, 폴리(ADP-리보스)중합효소(PARP) 분열 정도 변화 및 bcl-2의 발현량 변화를 웨스턴 블로팅을 통하여 확인하였다(도 7 참조).

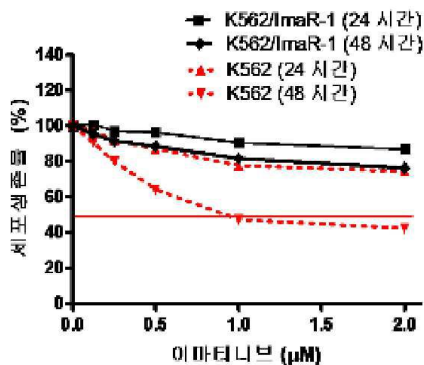
[0077] 이마티니브 농도를 125 nM로 고정하고, 10, 20 또는 40 μ M의 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 단독 또는 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스와 병용하여 24시간 동안 처리하였다. 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스는 DMSO 용매에 용해시켜 사용하였다. p-글리코프로테인의 발현량 변화, 폴리(ADP-리보스)중합효소(PARP) 분열 정도 변화 및 bcl-2의 발현량 변화를 웨스턴 블로팅을 통하여 확인하였다(도 7 참조).

[0078] 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오의 병용투여는 폴리(ADP-리보스)중합효소(PARP) 분열을 증가시키고, 항-아포토시스 단백질 bcl-2의 발현을 감소시켰으며, 동시에 암세포의 약제내성 마커인 p-글리코프로테인의 발현을 각각의 농도 의존적으로 감소시켰다(각각의 농도를 병용처리에 농도의존적으로 감소효과). 특히, 각각의 농도 처리시보다 병용처리 시 상승효과가 나타났으며 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스와 이마티니브의 농도 의존적으로 감소효과가 나타났다. 따라서, 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스의 병용 투여함으로써, 기존에 사용되는 용량의 이마티니브에 의해 나타나는 저항성을 줄일 수 있고, 사멸유도(항암) 효과가 더 상승됨을 확인할 수 있다.

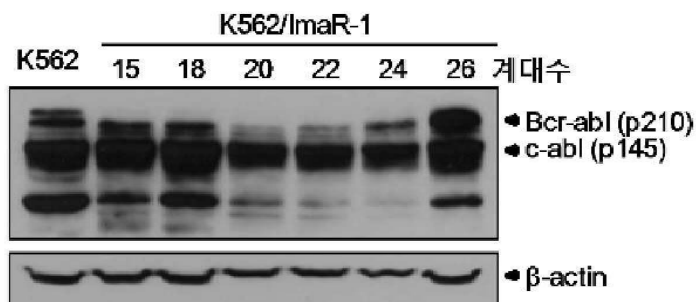
[0079] 본 발명의 실시예들에 따르면, 이마티니브와 1,2,3,4,6-펜타-오-갈로일-베타-디-글루코오스를 병용투여가 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포주(K562/ImaR-1)의 이마티니브에 대한 감수성을 증가시켜 이마티니브 내성 만성 골수성 백혈병 세포주(K562/ImaR-1)에 대한 항암 효과를 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있다.

도면

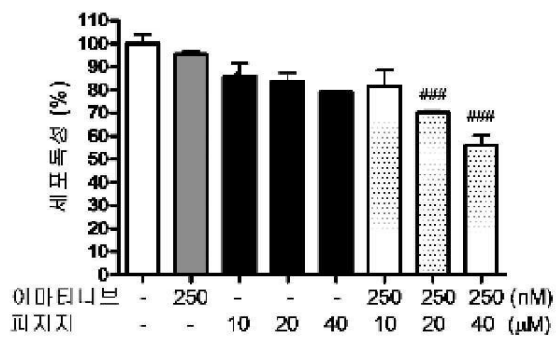
도면1



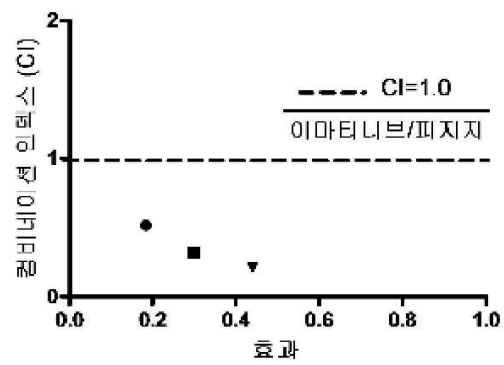
도면2



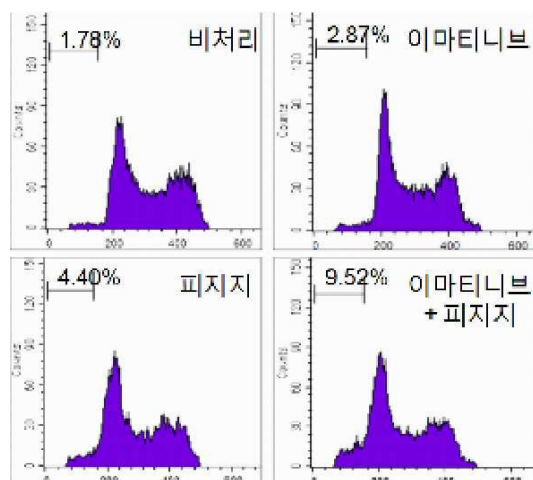
도면3



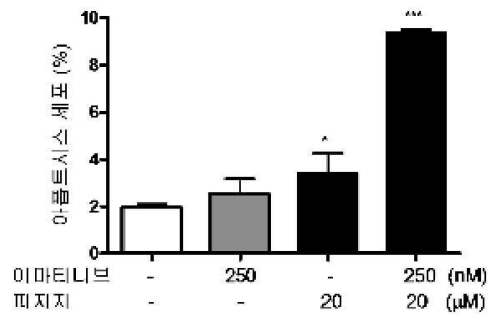
도면4



도면5



도면6



도면7

