



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0045423
(43) 공개일자 2015년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/5517 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/5517 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7000782

(22) 출원일자(국제) 2013년06월25일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2015년01월13일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2013/063313

(87) 국제공개번호 WO 2014/001356
국제공개일자 2014년01월03일

(30) 우선권주장
61/663,885 2012년06월25일 미국(US)
61/670,918 2012년07월12일 미국(US)

(71) 출원인
온코에텍스 에스에이
스위스 체하-1006 로잔 아브니 드 엘리제 32

(72) 발명자
베르토니, 프란체스코
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 벨라 6 인스티튜트 오브 온콜로지 리서치
보네티, 파올라
스위스 체하-6500 벨린초나 비아 벨라 6 인스티튜트 오브 온콜로지 리서치

(74) 대리인
양영준, 서정애

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 사용하여 림프종을 치료하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 환자에게 (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드를 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. B-세포 악성 암은 미만성 거대 B-세포 림프종 및 비장 변연부 림프종을 포함한다. T-세포 악성 암은 역형성 거대 T-세포 림프종을 포함한다.

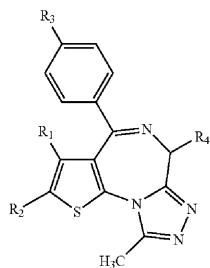
명세서

청구범위

청구항 1

환자에게 하기 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 수화물 또는 용매화물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여하는 것을 포함하는, B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법.

<화학식 1>



상기 식에서, R₁은 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, R₂는 수소 원자; 할로겐 원자; 또는 할로겐 원자 또는 히드록실 기에 의해 임의로 치환된 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, R₃은 할로겐 원자; 할로겐 원자, 1-4의 탄소수를 갖는 알킬, 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시 또는 시아노에 의해 임의로 치환된 페닐; --NR₅--(CH₂)_m--R₆ (여기서, R₅는 수소 원자 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, m은 0-4의 정수이고, R₆은 할로겐 원자에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임); 또는 --NR₇--CO--(CH₂)_n--R₈ (여기서, R₇은 수소 원자 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, n은 0-2의 정수이고, R₈은 할로겐 원자에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임)이고, R₄는 --(CH₂)_a--CO--NH--R₉ (여기서, a는 1-4의 정수이고, R₉는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬; 1-4의 탄소수를 갖는 히드록시알킬; 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시; 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬, 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시, 아미노 또는 히드록실 기에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임) 또는 --(CH₂)_b--COOR₁₀ (여기서, b는 1-4의 정수이고, R₁₀은 1-4의 탄소수를 갖는 알킬임)이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 환자가 인간인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, B-세포 악성종양이 미만성 거대 B-세포 림프종인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, B-세포 악성 암이 비장 변연부 림프종인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, T-세포 악성 암이 역형성 거대 T-세포 림프종인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물이 독립적으로

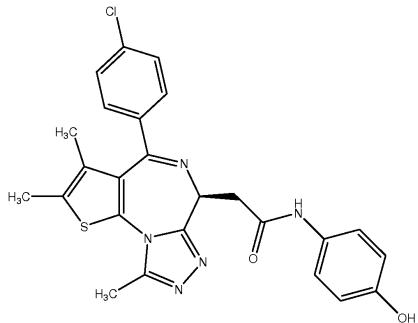
(i) (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드 또는 그의 2수화물, (ii) 메틸 (S)-{4-(3'-시아노비페닐-4-일)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트, (iii) 메틸 (S)-{2,3,9-트리

메틸-4-(4-페닐아미노페닐)-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트; 및
(iv) 메틸 (S)-{2,3,9-트리메틸-4-[4-(3-페닐프로파오닐아미노)페닐]-6H-티에노[3,2-f-][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 티에노트리아졸로디아제핀 화합물이 하기 화학식 2에 의해 나타내어진 (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드인 방법.

<화학식 2>



청구항 8

제7항에 있어서, 환자가 인간인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, B-세포 악성종양이 미만성 거대 B-세포 림프종인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, B-세포 악성 암이 비장 변연부 림프종인 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, T-세포 악성 암이 역형성 거대 T-세포 림프종인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 사용하여 B-세포 악성 암 및 T-세포 악성 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

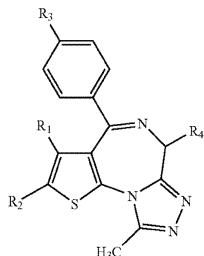
배경 기술

[0002] 브로모도메인-함유 단백질은 염색질 구조 재형성을 통해 유전자 발현 조절에서 중요한 역할을 한다. 브로모도메인 및 엑스트라터미널 (BET) 패밀리의 구성원인 BRD2/3/4의 억제제를 사용한 항종양 활성이 B-세포 및 T-세포 악성종양을 비롯한 급성 및 만성 혈액 악성종양에서 보고된 바 있다. B-세포 악성종양 (또한 B-세포 신생물 또는 B-세포 림프종으로 공지됨)은 B-세포가 과다생산되거나 악성인 경우에 발생하는 암이다. B-세포 악성종양은 예를 들어 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 외투 세포 림프종 (MCL), 비장 변연부 림프종 (SMZL) 및 다발성 골수종 (MM)을 포함한다. T-세포 악성종양, 예컨대 역형성 거대 T-세포 림프종은 T 림프구의 악성 형질전환을 나타내는 림프성 신생물의 이종 군이다. 본 개시내용은 특정 B-세포 악성 암 및 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제시한다.

발명의 내용

한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 하기 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 수화물 또는 용매화물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다.

<화학식 1>

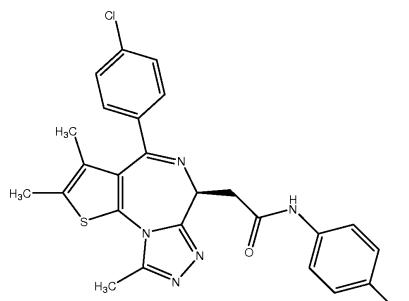


상기 식에서, R_1 은 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, R_2 는 수소 원자; 할로겐 원자; 또는 할로겐 원자 또는 히드록실 기에 의해 임의로 치환된 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, R_3 은 할로겐 원자; 할로겐 원자, 1-4의 탄소수를 갖는 알킬, 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시 또는 시아노에 의해 임의로 치환된 페닐; $-NR_5-(CH_2)_m-R_6$ (여기서, R_5 는 수소 원자 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, m 은 0-4의 정수이고, R_6 은 할로겐 원자에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임); 또는 $--NR_7--CO--(CH_2)_n--R_8$ (여기서, R_7 은 수소 원자 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, n 은 0-2의 정수이고, R_8 은 할로겐 원자에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임)이고, R_4 는 $-(CH_2)_a--CO--NH--R_9$ (여기서, a 는 1-4의 정수이고, R_9 는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬; 1-4의 탄소수를 갖는 히드록시알킬; 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시; 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬, 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시, 아미노 또는 히드록실 기에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임) 또는 $--(CH_2)_b--COOR_{10}$ (여기서, b 는 1-4의 정수이고, R_{10} 은 1-4의 탄소수를 갖는 알킬임)이다.

한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 (i) (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드 또는 그의 2수화물; (ii) 메틸 (S)-{4-(3'-시아노비페닐-4-일)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트; (iii) 메틸 (S)-{2,3,9-트리메틸-4-(4-페닐아미노페닐)-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트; 및 (iv) 메틸 (S)-{2,3,9-트리메틸-4-[4-(3-페닐프로피오닐아미노)페닐]-6H-티에노[3,2-f-][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트의 군으로부터 독립적으로 선택된 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다.

한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 하기 화학식 2의 구조를 갖는 (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드를 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다.

<화학식 2>

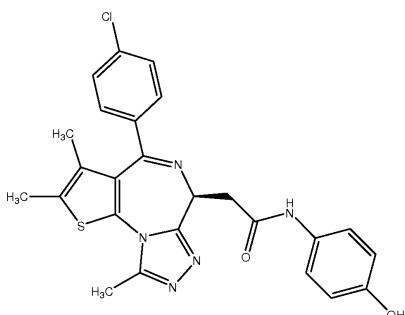


[0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간인 환자에게 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0012] 화학식 1의 제약상 허용되는 양을 사용하여 B-세포 악성 암을 치료하기 위한 한 실시양태에서, B-세포 악성 암은 미만성 거대 B-세포 림프종 및 비장 변연부 림프종을 포함한다. 화학식 1의 제약상 허용되는 양을 사용하여 T-세포 악성 암을 치료하는 또 다른 실시양태에서, T-세포 악성 암은 역형성 거대 T-세포 림프종을 포함한다.

[0013] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 하기 화학식 2의 구조를 갖는 (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드를 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0014] <화학식 2>



[0015]

[0016] 한 실시양태에서, 본 발명은 인간인 환자에게 화학식 2에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 환자에서 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0017] 화학식 2의 제약상 허용되는 양을 사용하여 B-세포 악성 암을 치료하기 위한 한 실시양태에서, B-세포 악성 암은 미만성 거대 B-세포 림프종 및 비장 변연부 림프종을 포함한다. 화학식 2의 제약상 허용되는 양을 사용하여 T-세포 악성 암을 치료하기 위한 또 다른 실시양태에서, T-세포 악성 암은 역형성 거대 T-세포 림프종을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 상기 발명의 내용, 뿐만 아니라 하기 발명의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께 독해하는 경우에 보다 잘 이해될 것이다.

도 1은 DLBCL 세포주, DoHH₂, U-2932, Karpas 422, SU-DHL-6 및 Val에서 다양한 농도의 화학식 2에 의해 유도된 세포 주기 변경을 도시한다. X-축, 세포주. Y-축, 각각의 세포 주기 단계에서의 세포의 백분율.

도 2A-2C는 화학식 2에 대한 노출 48시간 후의 DoHH₂ DLBCL 세포주 및 L-82 ALCL 세포주에서의 세포 노쇠의 유도를 도시한다. Y-축은 β -갈اكتоз이다제에 대해 양성인 세포의 백분율이다.

도 3A 및 3B는 DLBCL 세포주, SU-DHL-2, SU-DHL-4, SU-DHL-5, SU-DHL-6, SU-DHL-7, Val, OCI-Ly7, U-2932, DoHH₂ 및 Karpas 422에서의 BRD2, BRD3 및 BRD4의 발현 수준을 도시한다. X-축, 세포주. Y-축, GAPDH에 대해 상대적인 mRNA 양.

도 4A 및 4B는 ALCL 세포주, MAC1, FE-PD, Karpas 299, SU-DHL-1, SUPM-2, L82, JB6 및 TS에서의 BRD2, BRD3 및 BRD4의 발현 수준을 도시한다. X-축, 세포주. Y-축, GAPDH에 대해 상대적인 mRNA 양.

도 5A-5F는 DLBCL 세포주, SU-DHL-2, OCI-Ly3, U-2932, DoHH₂, Karpas 422 및 SU-DHL-6에서의 증가하는 용량의 화학식 2 후의 MYC mRNA 수준을 도시한다. X-축, 세포주. Y-축, 비처리 샘플에 대해 상대적인 mRNA 양.

도 6A-6D는 ALCL 세포주, L82, Karpas 299, FE-PD 및 SU-DHL-1에서의 증가하는 용량의 화학식 2 후의 MYC mRNA

수준을 도시한다. X-축, 세포주. Y-축, 비처리 샘플에 대해 상대적인 mRNA 양.

도 7A-7C는 1 μ M 화학식 2의 2시간 노출, 후속의 세척 후의 DLBCL 세포주, DoHH₂, Karpas 422 및 SU-DHL-2에 대한 MYC mRNA 수준을 도시한다.

도 8A-8C는 IC50 용량의 화학식 2로의 24시간 처리, 후속의 세척 후의 시간에 따른 DLBCL 세포주, DoHH₂, U-2932 및 SU-DHL-6의 증식에 대한 화학식 2의 효과를 도시한다.

도 9A-9B는 증가하는 용량의 화학식 2 후의 ABC-DLBCL 세포주, SU-DHL-2 및 U-2932에서의 NF κ B 표적 mRNA 수준 (IRF4, A20, BIRC3)을 도시한다. X-축, 세포주. Y-축, 비처리 샘플에 대해 상대적인 배수 변화.

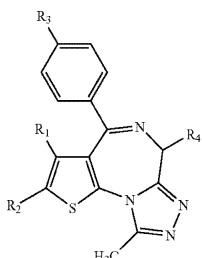
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

한 실시양태에서, 본 발명은 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 사용하여 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 티에노트리아졸로디아제핀 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 그의 수화물 또는 용매화물은 하기 화학식 1에 의해 나타내어진다.

[0020]

<화학식 1>



[0021]

상기 식에서, R₁은 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, R₂는 수소 원자; 할로겐 원자; 또는 할로겐 원자 또는 히드록실 기에 의해 임의로 치환된 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, R₃은 할로겐 원자; 할로겐 원자, 1-4의 탄소수를 갖는 알킬, 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시 또는 시아노에 의해 임의로 치환된 페닐; --NR₅--(CH₂)_m--R₆ (여기서, R₅는 수소 원자 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, m은 0-4의 정수이고, R₆은 할로겐 원자에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임); 또는 --NR₇--CO--(CH₂)_n--R₈ (여기서, R₇은 수소 원자 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬이고, n은 0-2의 정수이고, R₈은 할로겐 원자에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임)이고, R₄는 --(CH₂)_a--CO--NH--R₉ (여기서, a는 1-4의 정수이고, R₉는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬; 1-4의 탄소수를 갖는 히드록시알킬; 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시; 또는 1-4의 탄소수를 갖는 알킬, 1-4의 탄소수를 갖는 알콕시, 아미노 또는 히드록실 기에 의해 임의로 치환된 페닐 또는 피리딜임) 또는 --(CH₂)_b--COOR₁₀ (여기서, b는 1-4의 정수이고, R₁₀은 1-4의 탄소수를 갖는 알킬임)이다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0023]

한 실시양태에서, 본 발명은 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 사용하여 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종으로부터 독립적으로 선택된 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0024]

한 이러한 실시양태에서, 호지킨 림프종은 독립적으로 결절성 경화성 전형적 호지킨 림프종 (CHL), 혼합 세포종 실성 CHL, 림프구-고갈성 CHL, 림프구-충만성 CHL 및 결절성 림프구 우세성 호지킨 림프종으로부터 선택된다.

[0025]

또 다른 이러한 실시양태에서, 비-호지킨 림프종은 독립적으로 AIDS-관련 림프종, 역형성 대세포 림프종, 혈관면역모세포성 림프종, 모구성 NK-세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종, 피부 T-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 장병증-유형 T-세포 림프종, 여포성 림프종, 간비장 감마-델타 T-세포 림프종, 림프모구성 림프종, 변연부 림프종, 비강 T-세포 림프종, 소아 림프종, 말초 T-세포 림프종, 원발성 중추 신경계 림프종, T-세포 백혈병, 변형된 림프종, 치료-관련 T-세포 림프종 및 발덴스트롬 마크로글로불린혈증으로부터 선택된다.

[0026]

한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하

는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 미만성 거대 B-세포 림프종을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

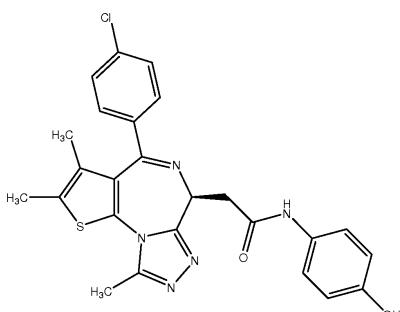
[0027] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 환자에서 비장 변연부 림프종을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0028] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 역형성 거대 T-세포 림프종을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0029] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 (i) (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드 또는 그의 2수화물, (ii) 메틸 (S)-{4-(3'-시아노비페닐-4-일)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트, (iii) 메틸 (S)-{2,3,9-트리메틸-4-(4-페닐아미노페닐)-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트; 및 (iv) 메틸 (S)-{2,3,9-트리메틸-4-[4-(3-페닐프로피오닐아미노)페닐]-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일}아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된 화학식 1에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 포함한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0030] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 (S)-2-[4-(4-클로로페닐)-2,3,9-트리메틸-6H-티에노[3,2-f][1,2,4]트리아졸로-[4,3-a][1,4]디아제핀-6-일]-N-(4-히드록시페닐)아세트아미드 (화학식 2) (또한 Y-803 및 OXT-015로 공지됨)를 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 포함한다.

[0031] <화학식 2>



[0032]

한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0034] 한 실시양태에서, 본 발명은 화학식 2에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 사용하여 호지킨 림프종 또는 비-호지킨 림프종으로부터 독립적으로 선택된 B-세포 악성 암 또는 T-세포 악성 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0035] 한 이러한 실시양태에서, 호지킨 림프종은 독립적으로 결절성 경화성 전형적 호지킨 림프종 (CHL), 혼합 세포종 실성 CHL, 림프구-고갈성 CHL, 림프구-충만성 CHL 및 결절성 림프구 우세성 호지킨 림프종으로부터 선택된다.

[0036] 또 다른 이러한 실시양태에서, 비-호지킨 림프종은 독립적으로 AIDS-관련 림프종, 역형성 대세포 림프종, 혈관 면역모세포성 림프종, 모구성 NK-세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병/소림프구성 림프종, 피부 T-세포 림프종, 미만성 거대 B-세포 림프종, 장병증-유형 T-세포 림프종, 여포성 림프종, 간비장 감마-델타 T-세포 림프종, 림프모구성 림프종, 변연부 림프종, 비강 T-세포 림프종, 소아 림프종, 말초 T-세포 림프종, 원발성 중추 신경계 림프종, T-세포 백혈병, 변형된 림프종, 치료-관련 T-세포 림프종 및 발렌스트롬 마크로글로불린혈증으로부터 선택된다.

[0037] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 화학식 2에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 미만성 거대 B-세포 림프종을 치료하는 방법을 포함한다.

한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0038] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 화학식 2에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 비장 변연부 림프종을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0039] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자에게 화학식 2에 의해 나타내어진 티에노트리아졸로디아제핀 화합물을 포함하는 조성물의 제약상 허용되는 양을 투여함으로써 역형성 거대 T-세포 림프종을 치료하는 방법을 제공한다. 한 이러한 실시양태에서, 환자는 인간이다.

[0040] 화학식 1 및 화학식 2에 의해 나타내어진 화합물의 제조는 미국 특허 번호 5,712,274 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것들을 비롯하여 이전에 관련 분야에서 기재된 방법에 따른 통상의 기술자에 의한 화학적 합성에 의해 달성될 수 있다.

[0041] 화학식 1 또는 화학식 2에 의해 나타내어진 화합물은 경구 전달을 위한 제약상 허용되는 담체와 혼합될 수 있다. 담체는 결합제, 윤활제, 봉해제 및 다른 기능적 및 비-기능적 부형제를 포함할 수 있다.

[0042] 화학식 1 또는 화학식 2에 의해 나타내어진 화합물의 용량은 체질량, 연령, 건강 상태, 식이, 및 환자에 의해 나타나는 다른 관련 요인 뿐만 아니라 화학식 1 또는 화학식 2의 생체이용률 및 화학식 1 또는 화학식 2 생성물 제제를 고려하여 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물의 경구 용량은 40 내지 100 mg 범위일 수 있다.

[0043] 본 발명은 치료 방법의 예상치 못한 결과를 설명하는 하기 비제한적 실시예에 의해 추가로 기재된다.

[0044] 실시예

[0045] 실시예 1: 림프종 세포 증식에 대한 화학식 2의 효과

[0046] 화학식 2의 항증식성 활성을 22개의 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 8개의 역형성 거대 T-세포 림프종 (ALCL), 4개의 외투 세포 림프종 (MCL), 및 3개의 비장 변연부 림프종 (SMZL) 확립된 인간 세포주에서 평가하였다. 세포주를 10% 소 태아 혈청, 1% L-글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신-네오마이신 (~5,000 단위 페니실린, 5 mg/mL 스트렙토마이신, 10 mg/mL 네오마이신)으로 보충된 RPMI-1640 (깁코 인비트로젠(GIBCO Invitrogen), 스위스 바젤) 또는 DMEM (깁코 인비트로젠, 스위스 바젤) 배지 중에서 배양하였다.

[0047] 증식 검정을 위해, 세포를 웨일 10⁴개 세포의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하였다. 화학식 2 (온코에틱스 에스에이(OncoEthix SA), 스위스 로잔)를 10 mM의 원액으로서 DMSO 중에 용해시키고, 이어서 분취액으로 나누고, -80°C에서 보관하였다. 각각의 실험을 위해, 원액의 분취액을 해동시키고, 배양 배지로 연속 희석하고, 2 내지 3일 내에 사용하였다. 세포를 37°C에서 72시간 동안 DMSO (대조군) 또는 증가하는 용량의 화학식 2 (5회 반복)로 처리하였다. 세포 증식을 검출하기 위해, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) (시그마(Sigma), 스위스 부호스)를 포스페이트-완충 염수 (PBS) 중 5 mg/mL의 원액으로서 제조하고, 필터-멸균하였다. 이어서, 0.5 mg/mL과 동일한 양의 MTT 용액을 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 4시간 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 25% 소듐 도데실술페이트 (SDS) 용해 완충제로 용해시키고, 흡광도를 베크만-콜터(Beckman-Coulter) AD340 기기 상에서 570 nm에서 판독하였다. 50% 성장 억제 (GI₅₀)를 일으킨 농도에 상응하는 용량을 R 통계적 패키지 (R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)를 사용하여 용량 반응 곡선을 통해 S자형 모델을 팅팅함으로써 추정하였다.

[0048] 표 1에 요약된 결과는 DLBCL 세포주의 68% (15/22), SMZL 세포주의 100% (3/3), ALCL 세포주의 62% (5/8)가 화학식 2에 의한 성장 억제에 감수성이었으나, 어떠한 (0/3) MCL 세포주도 그에 감수성이 아니었음을 제시하며, 여기서 감수성은 GI₅₀ < 500 nM로 정의하였다. 관심대상 중, 배 중심 유형의 DLBCL (GBC-DLBCL)로부터 유도된 세포주 및 활성화 B-세포 유사 유형의 DLBCL (ABC-DLBCL)로부터 유도된 세포주 사이의 감수성에 있어서 어떠한 명백한 차이도 없었다.

[0049]

<표 1> 인간 림프종 세포주의 증식에 대한 화합물 2의 효과

림프종 하위유형	세포주	GI ₅₀ (nM)	세포 사멸, 기저/처리 (%)	림프종 하위유형	세포주	GI ₅₀ (nM)
미만성 거대 B-세포 림프종, 활성화 B-세포 유사 하위유형 (ABC- DLBCL)	SU-DHL-2	69	23 / 87	역형성 거대 T-세포 림프종 (ALCL)	L82	36
	TMD8	131	51 / 75		FE-PD	158
	OCI-Ly3	179	7 / 49		MAC1	311
	U2932	202	7 / 5		Karpas 299	411
	OCI-Ly10	380	7 / 4		SUPM2	546
	HBL1	704	2 / 2		T5	1173
	RIVA	2280	6 / 11		JB6	1944
	RCK8	>10,000	12 / 10		SU-DHL-1	9109
	SU-DHL-10	77	26 / 32			
미만성 거대 B-세포 림프종, 배 중심 하위유형 (GBC- DLBCL)	DoHH2	90	16 / 11	외두 세포 림프종 (MCL)	Rec-1	1224
	OCI-Ly2	92	6 / 6		MAVER-1	1224
	SU-DHL-6	110	9 / 10		Jeko-1	2787
	SU-DHL-7	132	5 / 9		Granta 519	>10,000
	OCI-Ly19	170	14 / 14	비장 범연부 림프종 (SMZL)	V151	105
	SU-DHL-5	189	1 / 6		K1718	165
	Karpas 422	277	13 / 5		SSK41	240
	OCI-Ly8	527	15 / 13			
	WSU-DLCL2	552	2 / 1			
	SU-DHL-4	607	5 / 9			
	OCI-Ly7	1387	14 / 27			
	OCI-Ly1	1550	1 / 1			
	VAL	>10,000	7 / 17			

GI₅₀: 세포의 50%의 증식을 억제한 농도

[0050]

[0051]

DLBCL 세포주에 대한 화학식 2의 가능한 세포독성 효과를 검사하기 위해, 세포 사멸의 정도를 100 내지 1500 nM 범위 (GI₅₀ 값의 범위를 포함함)의 용량에서 72시간 동안 화합물에 노출시킨 후에 평가하였다. 세포 사멸을 평가하기 위해, 세포를 DMSO 또는 다양한 용량의 화학식 2로 72시간 동안 처리하고, 수화하고, PBS로 1회 세척하고, 이어서 PBS 중 아이오딘화프로피듐 (1 μ g/mL, 시그마)으로 염색하였다. 흡광도를 베크만-쿨터 AD340 기기 상에서 535 nm에서 관찰하였다. 세포 사멸의 백분율의 분석을 셀퀘스트 프로(CellQuest Pro) 소프트웨어 (베톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 수행하였다. 결과 (표 1)는 화학식 2가 단지 적은 백분율의 DLBCL 세포 주 (SU-DHL-2, TMD8, OCI-Ly3)에서만 낮은 GI₅₀ 값으로 세포 사멸을 유도하였음을 제시하였다.

[0052]

추가로, 아폽토시스의 유도에 대한 화학식 2의 효과를 4개의 DLBCL 세포주 (Karpas 422, SU-DHL-2, SU-DHL-6, U2932) 및 4개의 ALCL 세포주 (FE-PD, K299, L82, SU-DHL-1)에서 평가하였다. 세포를 DMSO (대조군) 또는 다양한 용량의 화학식 2로 72시간 동안 처리하고, 이어서 Click-iT EdU 유동 세포측정법 검정 키트 (인비트로젠) 및 7-ADD (BD 파밍겐(BD Pharmingen))로 염색하고, FACScan 유동 세포측정기를 사용하여 DNA 함량을 분석하였다. 백분율 아폽토시스의 분석을 플루우조(FlowJo) 7.6.3 소프트웨어 (사이텍 디벨롭먼트(Cytek Development), 미국 캘리포니아주 프리몬트)를 사용하여 수행하였다. 결과는 DLBCL 또는 ALCL 세포주에서 어떠한 아폽토시스의 유도도 없었음을 제시하였다.

[0053]

화학식 2가 세포 생존율을 현저하게 감소켰음에도 불구하고 대량 세포 사멸 또는 아폽토시스를 유도하지 않았기 때문에, 세포 주기에 대한 화학식 2의 효과를 5개의 DLBCL 세포주 (DohH2, Karpas 422, SU-DHL-6, VAL, U-2932)에서 평가하였다. 세포를 DMSO (대조군) 또는 다양한 용량 화학식 2로 24시간 동안 처리하고, 이어서 수화하고, PBS 중에서 1회 세척하고, 4°C에서 1시간 이상 동안 80% 에탄올 중에서 고정시켰다. 고정된 세포를 RNase-A (75 kU/mL, 시그마)를 함유하는 PBS 중 아이오딘화프로피듐 (50 μ g/mL, 시그마)으로 염색하고,

FACScan 유동 세포측정기 (벡톤 디킨슨)를 사용하여 DNA 함량을 분석하였다. 세포 주기 분석을 ModFit LT 소프트웨어 패키지 (베리티 소프트웨어 하우스, 인크.(Verity Software House, Inc.), 미국 메인주 탐스햄)를 사용하여 수행하였다. 도 1에 도시된 바와 같이, 결과는 화학식 2가 용량-의존성 방식으로 G1-정지를 유도하였음을 제시하였다.

[0054] 화학식 2가 아폽토시스의 유도 없이 세포 생존율 및 G1-정지에서 뚜렷한 감소를 유도하였기 때문에, 세포 노쇠의 유도를 대표적인 DLBCL 및 ALCL 세포주에서 평가하였다. 세포를 화학식 2로 48시간 동안 처리하고, 이어서 갈락토시다제로 염색하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 결과는 DLBLC 및 ALCL 세포주 둘 다에서 노쇠 세포의 뚜렷한 증가를 제시하였고, 이는 화학식 2가 주로 림프종 세포에 대한 세포증식억제 효과를 갖는다는 것을 시사한다.

[0055] 실시예 2: c-MYC 종양유전자의 하향-조절에 대한 화학식 2의 효과

[0056] 화학식 2는 앞서 미국 특허 출원 공개 번호 20100286127 (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 바와 같이 BET 브로모도메인 단백질 2, 3 및 4 (BRD2, BRD3, BRD4)의 경쟁적 억제제인 것으로 제시된 바 있다. BRD4의 억제는 c-MYC 종양유전자의 하향-조절을 일으키는 것으로 제시된 바 있다 [Delmore JE, Issa GC, LemieuxME, et al.: BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 2011; 146:1-14]. 따라서, BRD2, BRD3, 및 BRD4 mRNA 및 단백질의 기저 수준 및 c-MYC mRNA 및 단백질 수준에 대한 화학식 2의 효과를 선택된 DLBCL 및 ALCL 세포주에서 평가하였다.

[0057] 단백질 수준을 평가하기 위해, 웨스턴 블로팅 분석을 하기와 같이 수행하였다. 세포를 뜨거운 SDS 용해 완충제 (pH 7.4 트리스-HCl 중 2.5% SDS) 중에 가용화시키고, 15초 동안 초음파처리하였다. 다양한 샘플 내의 단백질 함량을 비신코닌산 (BCA) 단백질 검정 (피어스 케미칼 캠파니(Pierce Chemical Co.), 미국 일리노이주 록포드)을 사용하여 결정하였다. 용해물 (40 μ g)을 예상 분자량을 기초로 8% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 분획화하였다. 분해된 단백질을 전기 전달에 의해 니트로셀룰로스 막 상에 블로팅하였다. 막을 TBS-T 완충제 (137 mM NaCl, 0.1% 트윈(Tween) 20 및 5% 소 혈청 알부민을 함유하는 20 mM 트리스-HCl, pH 7.6) 중에서 1시간 동안 침투하였다. 이어서, 막을 TBS-T 중에 회색된 일차 항체와 함께 밤새 인큐베이션하였다. 하기 항체를 사용하였다: 항-BRD2 (ab37633, 암캡(AbCam), 영국 캠브리지), 항-BRD3 (ab56342, 암캡), 항-BRD4 (ab75898, 암캡) 및 항-GAPDH (MAB374, 밀리포어(Millipore), 미국 매사추세츠주 빌러리카). 막을 TBS-T 중에서 3회 (각각 10분 동안) 세척하고, 이어서 적절한 양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 항-마우스 또는 항-토끼 이차 항체 (아머샴 라이프 사이언시스(Amersham Life Sciences), 미국 매사추세츠주 알링턴 하이츠)를 함유하는 TBS-T 중에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 막을 TBS-T 중에서 3회 (각각 10분 동안) 세척하고, 이어서 증진된 화학발광 검출을 위해 제조업체의 지침 (아머샴 라이프 사이언스)에 따라 처리하였다. 동일한 부하의 샘플을 GAPDH에 대해 프로빙함으로써 확인하였다.

[0058] mRNA 분석을 하기와 같이 수행하였다. RNA를 RNA 이지 키트 (퀘이agen 아게(Qiagen AG), 스위스 홈브레흐티콘)를 사용하여 세포로부터 추출하였다. 총 RNA의 농도를 나노드롭(NanoDrop) 분광광도계 (나노드롭 테크놀로지스 (NanoDrop Technologies), 미국 텔라웨어주 월밍턴)를 사용하여 260 nm에서 분광광도측정에 의해 결정하였다. 총 RNA 중 1 마이크로그램을 제조업체의 지침에 따라 실시간 PCR 키트용 슈퍼스크립트 제1-가닥 합성 시스템 (Superscript First-Strand Synthesis System) (인비트로젠, 독일 카를스루에)을 사용하여 역전사시켰다. PCR 증폭을 스텝원플러스(StepOnePlus) 실시간 PCR 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티) 상에서 패스트 SYBR 그린 마스터 믹스(Fast SYBR Green Master Mix)를 사용하여 수행하였다. BRD2, BRD3 및 BRD4에 대한 프라이머 세트 (표 2)는 프라이머3(Primer3) 소프트웨어 패키지를 사용하여 설계하였고 (Rozen S, Skaletsky H: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA (Eds) *Methods in Molecular Biology*, Vol 132: Bioinformatics Methods and Protocols. Towata, New Jersey, USA; Humana Press, Inc., 2000, pp 365-386), c-MYC에 대한 프라이머 세트는 공개된 연구로부터 얻었다. 모든 샘플은 삼중으로 분석하였다. 각각의 샘플에 대한 특이적 mRNA의 상대적인 양을 텔타-텔타 Ct를 사용한 평균 주기 역치 (Ct) 값을 기초로, 하우스키핑 유전자 GAPDH에 대한 정규화에 의해 실험적 변형에 대해 보정하여 계산하였다.

[0059]

<표 2> 사용된 프라이머의 서열

BRD2-F	5'-ACTTGGCCTGCATGACTACC-3'
BRD2-R	5'-CTCTAGCTTCCGTGCCATTG-3'
BRD3-F	5'-CAACCATCACTGCAAACCGTC-3'
BRD3-R	5'-GGGAGTGGTTGTGTCTGCTT-3'
BRD4-F	5'-AGTCATCCAGCACCAACCATT-3'
BRD4-R	5'-TCTTAGGCTGGACGTTTGCG-3'
MYC-F	5'-GGTGCTCCATGAGGAGACA-3'
MYC-R	5'-CCTGCCTCTTCCACAGAA-3'

[0060]

[0061]

결과는, 각각 도 3 및 4에 도시된 바와 같이 BRD2 mRNA 및 단백질의 기저 수준이 DLBCL 세포주 및 ALCL 세포주 사이에서 광범위하게 달랐던 반면에 시험된 모든 세포주가 낮은 수준의 BRD4 mRNA 및 단백질, 및 극미한 수준의 BRD3 mRNA 및 단백질을 가졌음을 제시하였다. 흥미롭게도, BRD2 mRNA 및 단백질의 기저 수준은 화학식 2에 의한 성장 억제에 대한 감수성과 상호관련되지 않았다. 시험된 DLBCL 세포주 중, 최고 BRD2 mRNA 수준 (SU-DHL-6 $GI_{50} = 110$ nM) 및 최저 BRD2 mRNA 수준 (DoHH2 $GI_{50} = 90$ nM)을 갖는 세포주에 대해 유사한 GI_{50} 값이 수득되었다. 유사하게, 시험된 ALCL 세포주 중, 최고 BRD2 mRNA 수준 (L82 $GI_{50} = 36$ nM) 및 최저 BRD2 mRNA 수준 (FE-PD $GI_{50} = 158$ nM)을 갖는 세포주에 대해 유사한 GI_{50} 값이 수득되었다.

[0062]

mRNA 분석의 결과는, 각각 도 5 및 6에 도시된 바와 같이 화학식 2에 대한 24시간 노출이 시험된 6개 중 5개의 DLBCL 세포주 및 시험된 4개 중 4개의 ALCL 세포주에서 c-MYC mRNA의 뚜렷한 하향-조절을 일으켰음을 제시하였다. 흥미롭게도, c-MYC의 최소 하향-조절을 보여준 DLBCL 세포주는 화학식 2에 의한 성장 억제에 매우 감수성이었다 (SU-DHL-6 $GI_{50} = 110$ nM).

[0063]

c-MYC의 화학식 2-유도된 하향-조절이 가역적인지의 여부를 평가하기 위해, 3개의 DLBCL 세포주 (DoHH2, Karpas 422, SU-DHL-2)를 화학식 2로 2시간 동안 처리하고, 이어서 화학식 2를 함유하는 배지를 화학식 2를 함유하지 않는 배지로 변화시켰다 ("세척"). 세척 후, c-MYC mRNA 발현의 시간-의존성 복구를 도 7에 도시된 바와 같이 상이한 동역학을 갖는 3개의 모든 세포주에서 관찰하였다. 관련된 실험에서, GI_{50} 농도의 화학식 2로 24시간 동안 처리한 DLBCL 세포는 도 8에 도시된 바와 같이 "세척" 후에 재성장하기 시작하였다.

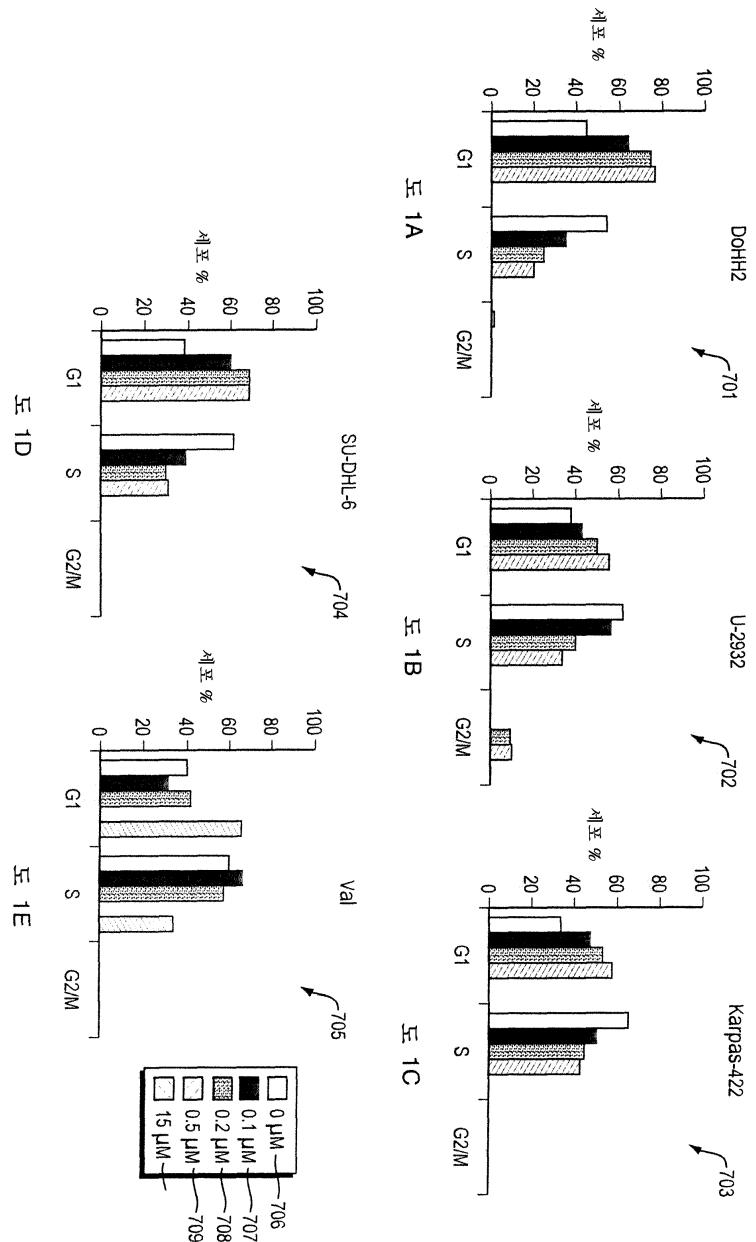
실시예 3: NF κ B의 하향-조절에 대한 화학식 2의 효과

화학식 2는 앞서 미국 특허 출원 공개 번호 20100286127에 개시된 바와 같이 BET 브로모도메인 단백질 2, 3 및 4 (BRD2, BRD3, BRD4)의 경쟁적 억제제인 것으로 제시된 바 있고, BRD4는 전사 인자 NF κ B의 조절에 관여하는 것으로 보고된 바 있으며, 이는 특정 환경에서 종양 억제제로서 작용할 수 있다 [Huang B, Yang XD, Zhou MM, Ozato K, Chen LF: Brd4 coactivates transcriptional activation of NF- κ B via specific binding to acetylated RelA. Mol Cell Biol 2009; 29:1375-1387]. 따라서, NF κ B 표적 (IRF4, A20, BIRC3)의 mRNA 발현에 대한 화학식 2의 효과를 5개의 DLBCL (DoHH₂, Karpas 422, SU-DHL-2, SU-DHL-6, U2932) 세포주에서 평가하였다. 결과는, 화학식 2가 NF κ B 표적의 하향-조절을 유도하였음을 제시하였으며; 대표적인 결과가 도 9에 제시되어 있다.

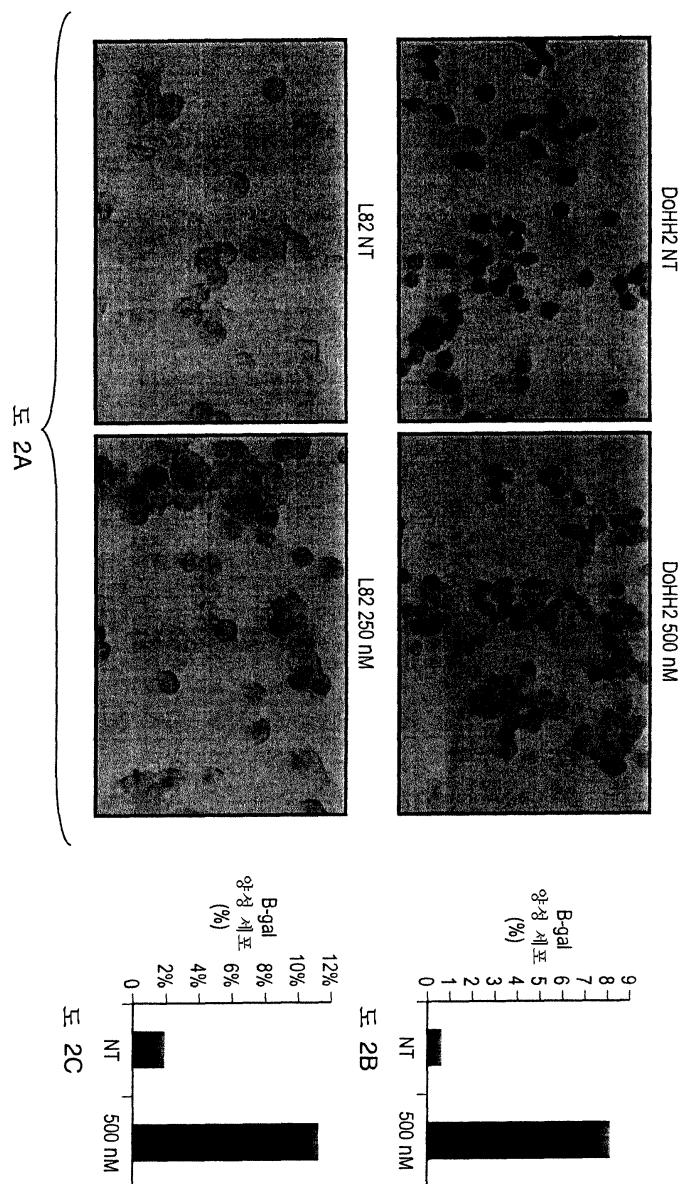
본 개시내용은 본 개시내용의 취지 또는 필수 속성을 벗어나지 않으면서 다른 구체적 형태로 구현될 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 범주를 나타내는 것으로서 상기 명세서보다는 첨부된 특허청구범위를 참조해야 한다. 상기 기재는 본 개시내용의 바람직한 실시양태에 관한 것이지만, 다른 변화 및 변형이 통상의 기술자에게 명백할 것이며 본 개시내용의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 실시될 수 있음을 유의한다.

도면

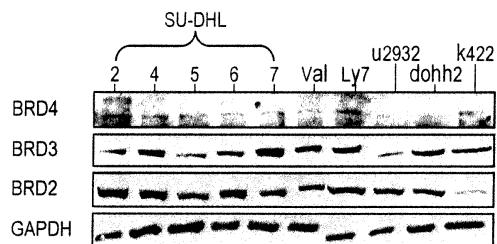
도면1



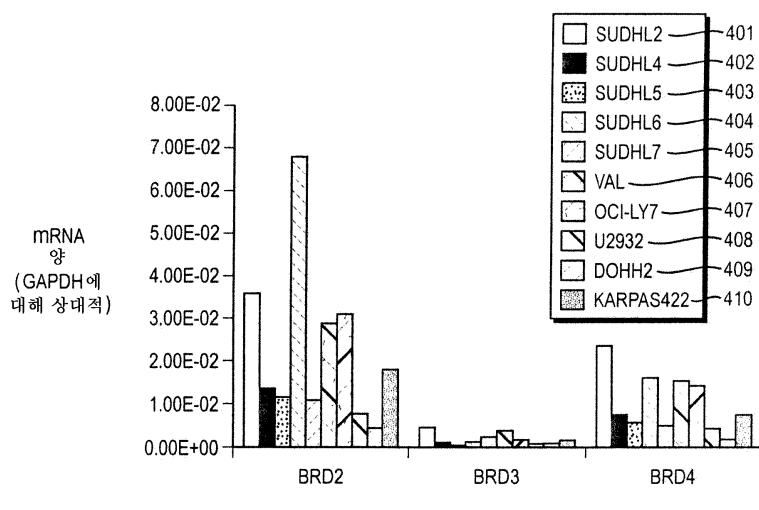
도면2



도면3

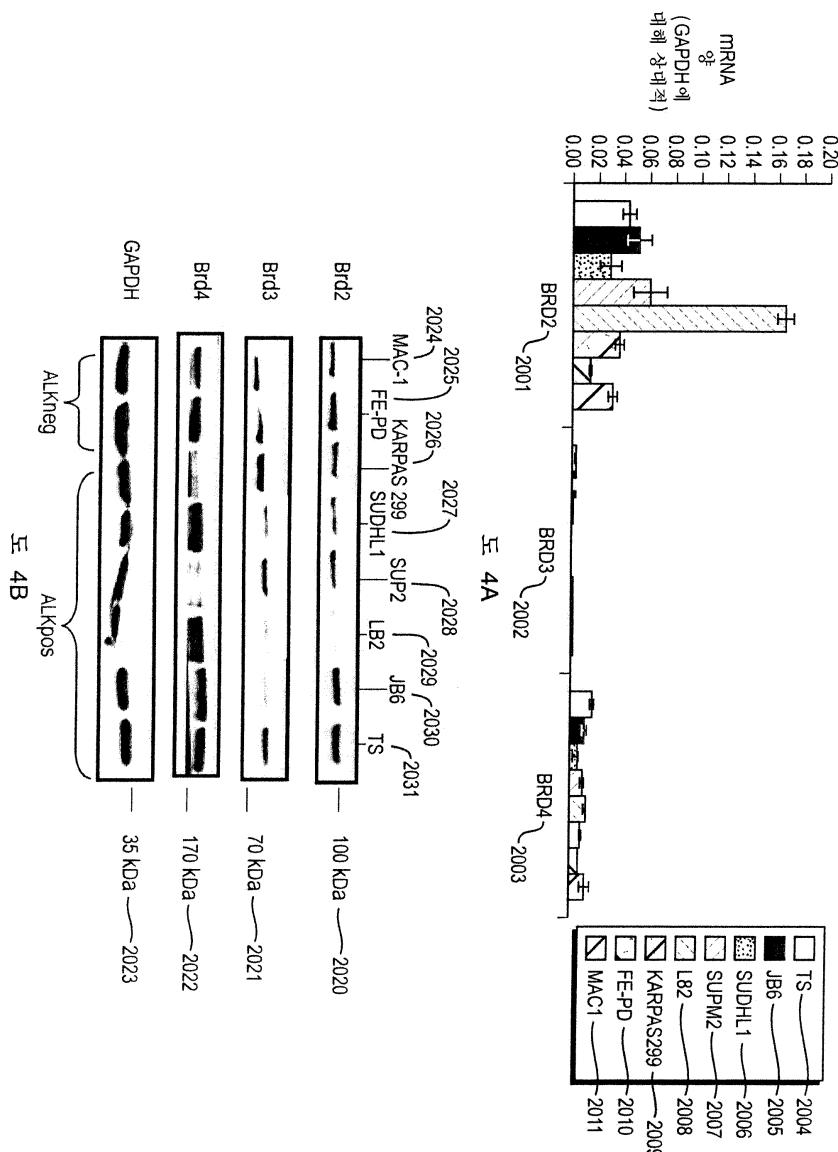


도 3A

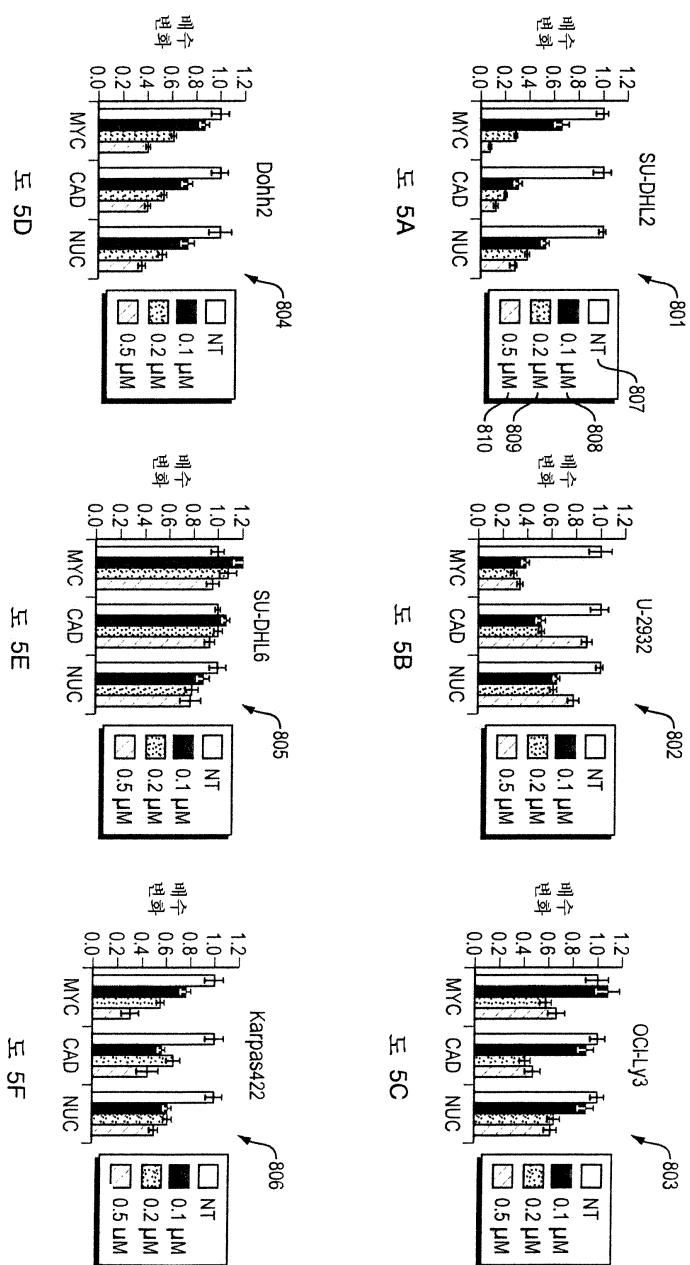


도 3B

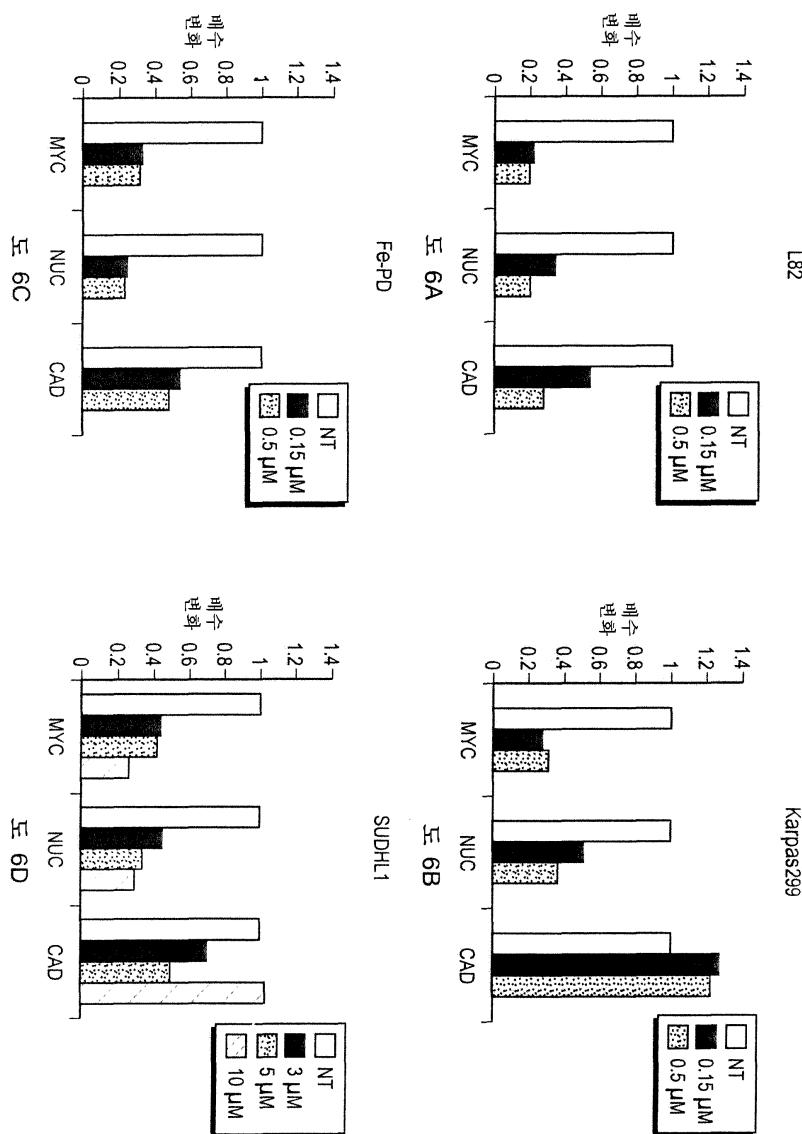
도면4



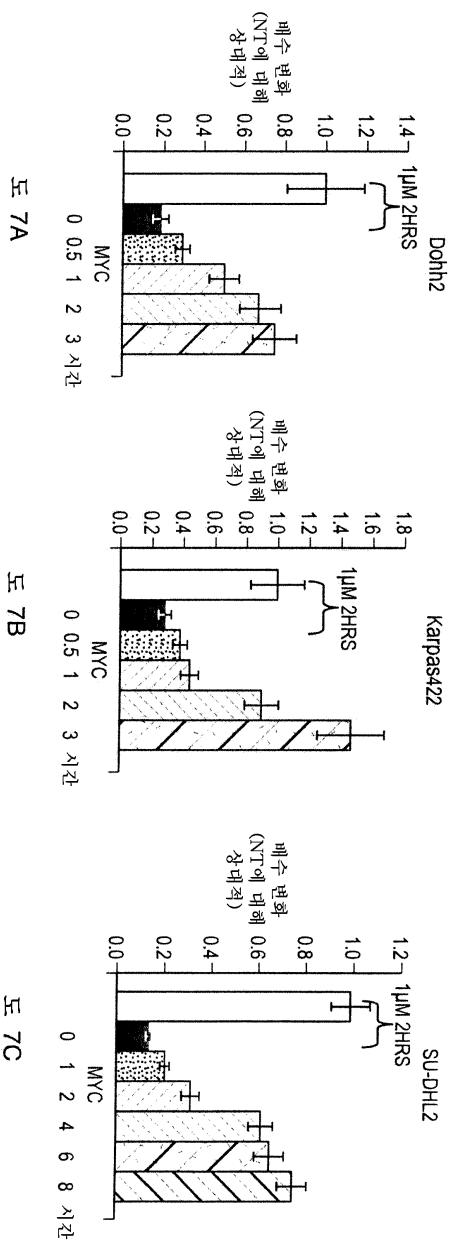
도면5



도면6



도면7

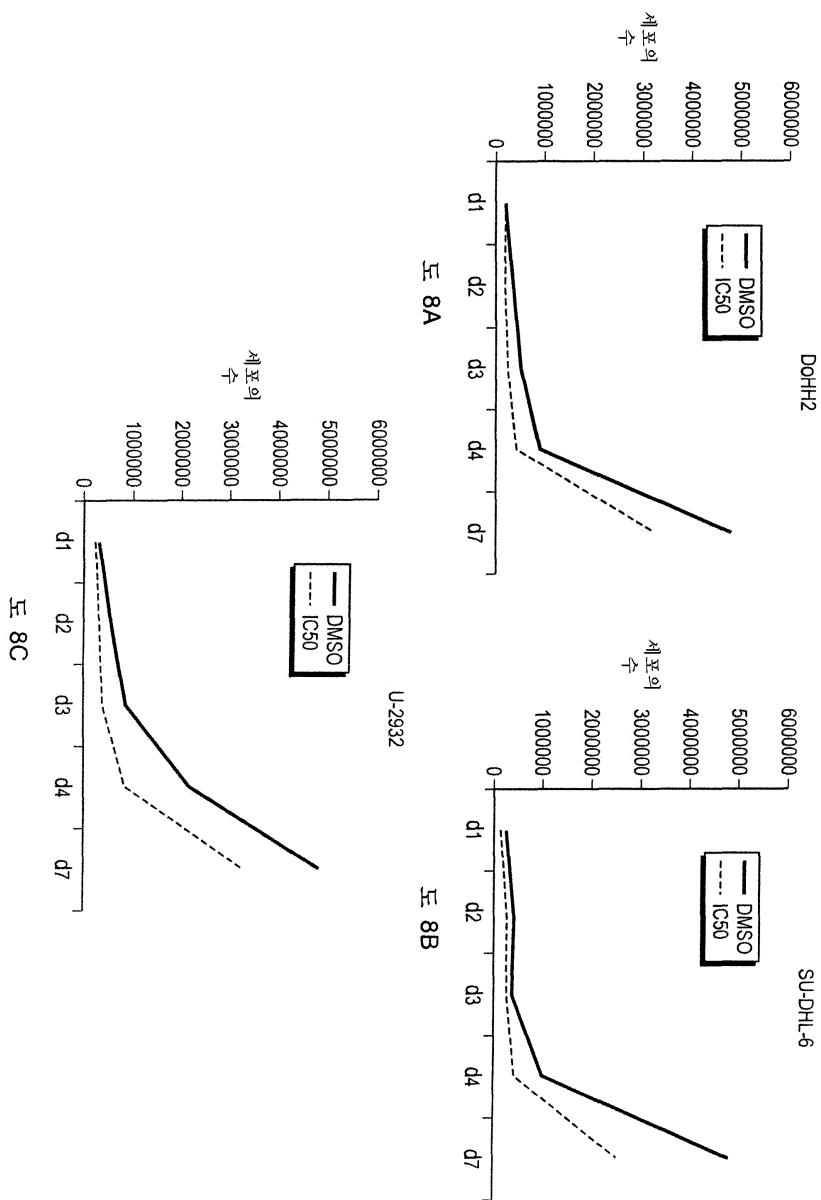


도 7A

도 7B

도 7C

도면8



도면9

