



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.

A61K 31/505 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0125810

A61K 31/44 (2006.01)

(43) 공개일자 2006년12월06일

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-7012061

(22) 출원일자 2006년06월16일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년06월16일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2004/014439

(87) 국제공개번호 WO 2005/058320

국제출원일자 2004년12월17일

국제공개일자 2005년06월30일

(30) 우선권주장 60/531,563 2003년12월19일 미국(US)

(71) 출원인 노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

(72) 발명자
브루에멘도르프, 팀, 에이치.
독일 72076 튀빙엔 키르크네르베크 11/1
발라바노프, 스테판
독일 72070 튀빙엔 슈미트토르스트라쎄 6/1
하르트만, 울리케
독일 72070 튀빙엔 카펠렌베크 20
카머, 빈프리트
독일 72108 로텐부르크-키빙엔 넥카르스트라쎄 4
노르트하임, 알프레드
독일 72135 데텐하우젠 임 브레노펜 14

(74) 대리인
장수길
김영

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) (a) 엔- [5- [4- (4-메틸-피페라지노-메틸) -벤조일아미도] -2메틸페닐] -4- (3-피리딜) -2-피리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이пу지네이션 억제제의 조합물 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은, (a) N-{5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐}-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이пу지네이션(hypusination) 억제제를 포함하는 조합물을 증식성 질환을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 증식성 질환을 앓는 온혈 동물, 특히 인간의 치료 방법; 상기 정의된 바와 같은 성분 (a) 및 (b), 및 임의로 1

종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 특히 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료를 위해 동시, 별도 또는 연속 사용하기 위한 조합물; 및 마지막으로 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병의 진행 지연 또는 치료를 위한 약물의 제조에 있어서 1종 이상의 하이пу지네이션 억제제의 용도에 관한 것이다.

특허청구의 범위

청구항 1.

(a) N-{5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐}-4-(3-파리딜)-2-파리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이пу지네이션(hypusination) 억제제를 포함하는 조합물을 증식성 질환에 대해 공동 치료상 효과적인 양으로 증식성 질환을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물들은 이들의 제약상 허용가능한 염 형태로 존재할 수도 있는 것인, 증식성 질환을 앓는 온혈 동물의 치료 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 증식성 질환이 백혈병 또는 이마티니브(Imatinib)-내성 백혈병인 방법.

청구항 3.

1종 이상의 하이пу지네이션 억제제를 백혈병에 대해 치료상 효과적인 양으로 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물은 그의 제약상 허용가능한 염 형태로 존재할 수도 있는 것인, 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물의 치료 방법.

청구항 4.

(a) N-{5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐}-4-(3-파리딜)-2-파리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이пу지네이션 억제제, 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하며, 상기 활성 성분들은 각 경우에서 유리 형태 또는 제약상 허용가능한 염 형태로 존재하는 것인, 동시, 별도 또는 연속 사용하기 위한 조합물.

청구항 5.

제4항에 있어서, 화합물 (a)가 그의 모노메탄술포네이트 염 형태로 사용되는 것인 조합물.

청구항 6.

제4항 또는 제5항에 있어서, 조합 제제 또는 제약 조성물인 조합물.

청구항 7.

증식성 질환에 대해 공동 치료상 효과적인 양의 제4항 또는 제5항에 따른 조합물 및 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물.

청구항 8.

증식성 질환의 진행 지연 또는 치료에 있어서 제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 조합물의 용도.

청구항 9.

증식성 질환의 진행 지연 또는 치료를 위한 약물의 제조에 있어서 제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 조합물의 용도.

청구항 10.

제8항 또는 제9항에 있어서, 증식성 질환이 백혈병 또는 이마티니브-내성 백혈병인 용도.

청구항 11.

백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병의 진행 지연 또는 치료를 위한 약물의 제조에 있어서 1종 이상의 하이пу지네이션 억제제의 용도.

청구항 12.

백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병의 진행 지연 또는 치료에 있어서 1종 이상의 하이пу지네이션 억제제의 용도.

청구항 13.

조합물 파트너 (a) 및 (b)가 상승작용성 유효량으로 투여되는 것인, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 방법, 조합물, 조성물 또는 용도.

청구항 14.

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 조합물을, 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료에서 상기 조합물을 동시, 별도 또는 연속 사용하기 위한 지침과 함께 포함하는 시판 패키지.

청구항 15.

하이пу지네이션 억제제가 데페록사민, 시클로피록스, 데옥시스페르구알린, 데페리프론 및 GC-7로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법, 조합물, 조성물, 용도 또는 시판 패키지.

청구항 16.

하이пу지네이션 억제제가 4-[3,5-비스(2-히드록시페닐)-[1,2,4]트리아졸-1-일]벤조산인, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법, 조합물, 조성물, 용도 또는 시판 패키지.

청구항 17.

하이퓨지네이션 억제제가 시클로피록스인, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 방법, 조합물, 조성물, 용도 또는 시판 패키지.

명세서

기술분야

본 발명은, (a) N-{5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐}-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이퓨지네이션(hypusination) 억제제, 특히 본원에 정의된 바와 같은 것들을 포함하는 조합물을 증식성 질환을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 증식성 질환을 앓는 온혈 동물, 특히 인간을 치료하는 방법; 상기 정의된 바와 같은 성분 (a) 및 (b), 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하는, 특별하게는 증식성 질환, 특히 종양 질환 또는 백혈병의 진행 지연 또는 치료를 위해 동시, 별도 또는 연속 사용하기 위한 조합물; 그러한 조합물을 포함하는 제약 조성물; 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료를 위한 약물의 제조에 있어서 상기 조합물의 용도; 이마티니브(Imatinib)-내성 백혈병의 진행 지연 또는 치료를 위한 약물의 제조에 있어서 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제의 용도; 및 마지막으로 상기 조합물을 포함하는 시판 패키지 또는 제품에 관한 것이다.

5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐}-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민의 제조, 및 특히 항증식제로서 상기 화합물의 용도는 1993년 10월 6일 공개된 EP-A-0 564 409 및 수많은 다른 국가들에서의 그의 대응 간행물, 예를 들어 미국 특허 제5,521,184호에 기재되어 있다. 또한, 이 화합물은 공지되어 있으며, 이하에서는 이마티니브[국제 일반명 (International Non-proprietary Name)]라고 칭한다.

선택적 티로신 키나제 억제제인 이마티니브(종래에는 STI571, 글리벡(Gleevec; 등록상표)이라고 함)는 혈소판-유래의 성장 인자 수용체(PDGF) 알파 및 베타 및 인간 줄기 세포 인자(SCF) c-키트에 대한 수용체뿐만 아니라 Abl 티로신 키나제 Bcr-Abl, c-Abl, v-Abl 및 Abl-관련된 유전자(ARG)의 ATP 결합 부위를 점유함으로써 티로신 잔기의 인산화를 차단하는 것으로 알려져 왔다. 초기 만성 단계(CP), 진행 단계(AP) 및 골수 모구성 발증(BC)의 환자에 대한 연구를 비롯하여 만성 골수성 백혈병(CML)에 대한 수많은 연구를 토대로, 이마티니브는 만성 골수성 백혈병에 대한 새로운 신뢰할만한 치료 표준으로서 고려된다. 추가로, 이마티니브는 c-키트의 구성적 활성화를 나타내는 종양 실재인 위장 간질 종양(GIST)을 앓는 개체, 및 골수증식성 질환을 앓으며 염색체 5q33 상의 PDGF-R-베타 유전자가 재배열된 환자에서 지속된 반응을 유도한다.

특히 CP에서의 이러한 유망한 결과에도 불구하고, 이마티니브에 대한 내성은 흔히 AP 및 BC에서 발생하며, 소강 상태(remission)는 일반적으로 단지 6 내지 12 개월 동안만 지속된다. 따라서, 특히 말기 단계의 질환의 경우, 상승작용성(synergistic) 치료 전략에 대한 보장이 긴급하게 요구된다.

치료적 성공을 보다 강화하기 위해, 상승작용성 치료 접근법에 대한 신규 스크리닝 전략을 확립할 필요가 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 비처리 Bcr-Abl 양성 세포주와 대비되는 것으로서 이마티니브-처리된 세포주의 차별적인 단백질 발현 분석은, Bcr-Abl 발현에 의해 조절되며 잠재적으로 상승작용성 치료적 개입을 위한 신규 표적으로서의 역할을 하는 단백질을 검출할 목적으로 사용된다.

놀랍게도 본 발명에 따라, Bcr-Abl 세포주에서 (a) 이마티니브 또는 그의 제약상 허용가능한 염 및 (b) 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제를 포함하는 조합물 존재하의 세포의 세포독성 및 아폽토시스는, 조합물 파트너 단독의 각 유형에 의해 달성될 수 있는 효과보다 훨씬 더 큰 효과, 즉 상승적(supra-additive) 또는 상승작용성 효과를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본원 발명에서는 본 발명의 조합물을 사용하여 증식성 질환, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 포함하지만 이에 한정되지 않는 백혈병을 치료할 수 있는 것으로 고려된다. 또한, 하이퓨지네이션 억제제는 백혈병, 특히 이마티니브 또는 그의 제약상 허용가능한 염에 대해 내성인 백혈병을 치료하는데 특히 유용한 것으로 고려된다.

따라서, 제1 실시양태에서, 본 발명은 백혈병에 대해 치료상 효과적인 양의 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제를 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물은 그의 제약상 허용가능한 염 형태로 존재할 수도 있는 것인, 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물의 치료 방법에 관한 것이다.

제2 실시양태에서, 본 발명은 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물의 치료에 유용한 약물에 제조에 있어서 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제의 용도에 관한 것이다.

제3 실시양태에서, 본 발명은 백혈병에 대해 치료상 효과적인 양의 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제를 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물은 그의 제약상 허용가능한 염 형태로 존재할 수도 있는 것인, 백혈병, 특히 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 온혈 동물의 치료 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 (a) N-[5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐]-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제, 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하며, 상기 활성 성분들은 각 경우에서 유리 형태 또는 제약상 허용가능한 염 형태로 존재하는 것인, 동시, 별도 또는 연속 사용하기 위한 조합물, 예를 들어 조합 제제 또는 제약 조성물에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 (a) N-[5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐]-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이퓨지네이션 억제제를 포함하는 조합물을 증식성 질환에 대해 공동 치료상 효과적인 양으로 증식성 질환을 앓는 온혈 동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물들은 이들의 제약상 허용가능한 염 형태로 존재할 수도 있는 것인, 증식성 질환을 앓는 온혈 동물의 치료 방법에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 증식성 질환에 대해 공동 치료상 효과적인, 본원에 정의된 바와 같은 일정량의 조합물 및 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

본원에 개시된 방법, 조합물, 조성물 또는 용도에서, 조합물 파트너 (a) 및 (b)는 바람직하게는 상승작용성 유효량으로 투여된다.

용어 "증식성 질환"은 악성 및 비-악성 증식성 질환, 예를 들어 아테롬성경화증, 암종 및 백혈병, 종양, 혈전증, 건선, 재협착증, 경피성피부염 및 섬유증을 포함한다.

용어 "종양"은 본원에 사용된 바와 같이 유방암, 흑색종, 편평세포암, 결장 및 일반적으로 GI 관, GIST의 암, 폐암, 특히 소세포 폐암, 및 비-소세포 폐암, 두부 및 경부 암, 비뇨생식계암, 예를 들어 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 고환암, 전립선암 또는 방광암; 호지킨(Hodgkin's) 질환 또는 카포시(Kaposi's) 육종을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 조합물은 액상 종양, 및 특히 고상 종양의 성장을 억제하는데 유용한 것으로 고려된다. 또한, 종양 유형 및 사용된 특정 조합물에 따라, 종양 부피의 감소를 달성할 수 있다. 또한, 본원에 개시된 조합물은 종양의 전이성 확산 및 미세전이의 성장 또는 별생을 방지하는데 적합하다. 본원에 개시된 조합물은 불량한 예후의 환자, 예를 들어 비-소세포 폐암 또는 이마티니브-내성 백혈병을 앓는 불량한 예후의 환자를 치료하는데 특히 적합하다.

용어 "백혈병"은 본원에 사용된 바와 같이 만성골수 백혈병 (CML) 및 급성 림프구 백혈병 (ALL), 특히 필라델피아-염색체 양성 급성 림프구 백혈병 (Ph+ ALL) 및 이마티니브-내성 백혈병을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 본원에 개시된 방법에 의해 치료될 변형된 형태의 백혈병은 CML이다.

용어 "이마티니브-내성 백혈병"은 본원에 사용된 바와 같이 특히, 이마티니브가 치료적으로 더 이상 효과적이지 않거나 또는 감소된 치료적 효과를 갖는 백혈병을 정의한다.

용어 "조합 제제"는 본원에 사용된 바와 같이, 상기 정의된 바와 같은 조합물 파트너 (a) 및 (b)가 독립적으로 또는 구별되는 양의 조합물 파트너 (a) 및 (b)를 갖는 상이한 고정된 조합물들의 사용에 의해, 즉 동시에 또는 상이한 시점에서 투여될 수 있다는 의미에서, 특히 "구성 성분들의 키트"를 정의한다. 이어서, 구성 성분들의 키트의 구성 성분들은 동시에 투여될 수 있거나, 또는 시간상 엇갈리게, 즉 구성 성분들의 키트의 임의의 구성 성분에 대하여 상이한 시점에서 동일 또는 상이한 시간 간격으로 투여될 수 있다. 매우 바람직하게는, 구성 성분들의 조합 사용시 치료된 질환에 대한 효과가 조합물 파트너 (a) 및 (b) 중 어느 하나만의 사용에 의해 얻어지는 효과보다 더 크도록, 시간 간격을 선택한다. 조합 제제로 투여될 조합물 파트너 (a) 대 조합물 파트너 (b)의 총량의 비율은, 예를 들어 치료될 환자 부문집단의 필요 또는 단일 환자의 필요에 따라 달라질 수 있는데, 이러한 여러 가지 필요는 환자의 특정 질환, 연령, 성별, 체중 등으로 인한 것일 수 있다. 바람직하게는, 한가지 이상의 유익한 효과, 예를 들어 조합물 파트너 (a) 및 (b)의 효과의 상호증대, 특히 상승작용, 예를 들면 누가적 (additive) 효과를 넘어서는 효과, 추가의 유리한 효과, 적은 부작용, 조합물 파트너 (a) 및 (b) 중 어느 하나 또는 이들 양자의 비-효과적인 투여량에서의 연합된 치료 효과, 및 매우 바람직하게는 조합물 파트너 (a) 및 (b)의 강한 상승작용이 존재한다.

용어 "진행 지연"은 본원에 사용된 바와 같이 치료 대상 질환의 예비 단계 또는 초기 단계에 있는 환자에게 조합물을 투여하는 것을 의미하는데, 이 환자에서 예를 들어 상응하는 질환의 예비 증상이 진단되거나 또는 상기 환자가 예를 들어 의학적 치료 동안의 증상 또는 사고로 인해 발생하는 증상이 있으며, 이러한 경우에 상응하는 질환이 발병하기 쉽다.

조합물 파트너 (a) 및 (b)에 대한 언급은 또한 제약상 허용가능한 염을 포함하는 의미인 것으로 이해된다. 상기 조합물 파트너 (a) 및 (b)가 예를 들어 하나 이상의 염기 중심을 갖는 경우, 이들은 산 부가 염을 형성할 수 있다. 또한, 상응하는 산 부가 염은, 필요하다면, 추가로 존재하는 염기 중심을 갖도록 형성될 수 있다. 산 기 (예를 들어, COOH)를 갖는 조합물 파트너 (a) 및 (b)는 또한 염기와 함께 혐을 형성할 수도 있다. 조합물 파트너 (a) 또는 (b) 또는 그의 제약상 허용가능한 염은 수화물 형태로 사용될 수 있거나 또는 결정화에 사용되는 다른 용매를 포함할 수 있다. 본 발명에서 N-[5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미노]-2-메틸페닐]-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민, 즉 조합물 파트너 (a)는 바람직하게는 그의 모노메실레이트 염 형태로 사용된다. 하이퓨지네이션 억제제의 화학 구조에 따라, 그의 염 형태가 존재하지 않을 수 있다.

조합물 파트너 (a)는 WO 99/03854에 기재된 바와 같이 제조 및 투여될 수 있으며, 특히 N-[5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐]-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민의 모노메실레이트 염은 WO 99/03854의 실시예 4 및 6에 기재된 바와 같이 제제화될 수 있다. 이 약물은, 예를 들어 WO 03/090720에 개시된 바와 같은 제약 조성물의 형태로 적용될 수 있다.

용어 "하이퓨지네이션 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 하이퓨진(hypusine)의 형성을 감소시킬 수 있는 시약, 약물 또는 화학물질을 정의한다. 하이퓨진은 진핵세포 개시 인자 5A (eIF-5A)에서 리신 잔기의 번역 후 변형에 의해 형성되는 독특한 아미노산이며, 세포 생존 및 증식에 있어서 중요하다 (예를 들어, 문헌 [Chen et al., J. Chin. Chem. Soc., Vol. 46, No. 5, 1999] 참조). 최근의 데이터는, 시험관내 세포에서, 하이퓨진 형성에 필요한 금속효소인 데옥시하이퓨진 히드록실라제를 표적화하는 키레이팅 분자들, 예를 들어 시클로피록스, 데페리프론 및 데페록사민에 노출시킴으로써 세포 증식을 억제할 수 있음을 나타낸다 [Clement, et al. Int. J. Cancer 2002 Aug 1; 100(4):491-8].

하이퓨진 형성에 적합한 세포의 추출물 또는 다른 제제 처리 조건을 잠재적인 억제제와 접촉하여 위치시키고 하이퓨지네이션 활성의 수준을 억제제의 존재하에 또는 부재하에 또는 다양한 양의 억제제의 존재하에 측정하는 표준 스크리닝 프로토콜을 사용하여 하이퓨지네이션 억제제를 쉽게 확인할 수 있다. 이러한 방식으로, 유용한 억제제뿐만 아니라 이 억제제의 최적 수준도 시험관내에서 결정하여 생체내에서 추가로 시험할 수 있다. 적합한 하이퓨지네이션 억제제의 예는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 그러한 예로는 시클로피록스, 데옥시스페르구알린, 인터페론 알파, 데페록사민, 데페리프론, 및 히드록시피리돈 패밀리에 속하는 추가의 화합물 (예를 들어, 문헌 [Mycoses 1997; 40:243-247] 참조), 및 철 키레이터로서 활성을 갖는 기타 화합물을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 후자의 화합물로는 PCT 공보 제WO 03/039541호, 동 제WO 97/49395호 및 미국 특허 제6,465,504호 및 동 제6,596,750호에 개시된 화합물, 예를 들면 치환된 3,5-디페닐-1,2,4-트리아졸을 들 수 있다.

또한, 적합한 하이퓨지네이션 억제제로는 하이퓨진 형성에 필요한 효소의 활성을 억제함으로써 하이퓨지네이션을 억제하는 것들, 예를 들어 데옥시하이퓨진-신타제를 차단함으로써 작용하는 데옥시스페르구알린 및 N¹-구아닐-1,7-디아미노헵탄 (GC-7; 예를 들어, 문헌 [Jansson et al., J. Bacteriology 182: No. 4, 1158-1161] 참조), 및 데옥시하이퓨진-히드록실라제를 억제하는 시클로피록스 및 데페록사민을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 바람직한 실시양태에서, 하이퓨지네이션 억제제는 당업자에게 잘 알려져 있으며 (예를 들어, 문헌 [Gupta A. K. and Skinner A. R., Intl. J. Dermatol. 2003 Sept; 42 Suppl 1:3-9] 참조) 널리 시판되는 (예, Sigma, Taufkirchen, Germany) 통상의 항진균 약물인 시클로피록스 또는 6-시클로헥실-1-히드록시-4-메틸-2(1H)-피리디논이다.

다른 바람직한 실시양태에서, 하이퓨지네이션 억제제는 4-[3,5-비스(2-히드록시페닐)-[1,2,4]트리아졸-1-일]벤조산이다. 이 화합물 및 그의 제조는 예를 들어 미국 특허 제6,465,504 B1호에 기재되어 있다. 이 약물은 예를 들어 미국 특허 제6,465,504 B1호 또는 WO 2004/035026호에 기술된 바와 같이 적용될 수 있다.

코드 번호, 일반명 또는 상표명에 의해 확인되는 활성제의 구조는 표준 일람표 "머크 인덱스(The Merck Index)"의 현행판 또는 데이터베이스, 예를 들어 페이턴츠 인터내셔널(Patents International)(예, IMS World Publications)을 참고할 수 있다. 이들의 상응하는 내용은 본원에 참고로 포함된다.

(a) N-{5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐}-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민 및 (b) 1종 이상의 하이пу지네이션 억제제, 및 임의로 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하며, 활성 성분들은 각 경우에서 유리 형태 또는 제약상 허용가능한 염 형태로 존재하는 조합물은 하기에서 본 발명의 조합물라고 지칭될 것이다. 하이пу지네이션 억제제의 구조에 따라, 염 형태는 가능하지 않을 수 있다.

고상 종양 질환과 유사한 증식성 질환의 특성은 다인성(multifactorial)이다. 어떤 상황하에서, 상이한 작용 기전을 갖는 약물들을 조합할 수 있다. 그러나, 단지 상이한 작용 방식을 갖는 약물들의 임의의 조합물을 고려하는 것에 의해 반드시 유리한 효과를 나타내는 조합물이 얻어지지는 않는다.

백혈병과 같은 증식성 질환의 치료를 위한 본 발명의 유용성은, 상승작용성으로 세포의 세포독성을 유발하고 아폽토시스를 유도하는 작용을 하는 본 발명의 조합물의 능력에 의해 입증된다. 구체적으로, 데이터는 단일 작용제인 시클로피록스가 K562 및 HL-60 세포의 세포 생존능을 억제하고 아폽토시스를 유도함을 나타내지만, 시클로피록스 및 이마티니브의 조합물은 이들 세포에서 세포의 세포독성 및 아폽토시스 유도 둘 다에 대하여 상승작용성 효과를 나타낸다. 이러한 상승작용성 효과는 Bcr-Abl-음성 HL-60 대조군 세포에서는 관찰되지 않는다. 이들 데이터를 기초로 하여 다수의 하이пу지네이션 억제제는 허용가능한 독성 프로필을 갖는 임상에서 승인된 약물이기 때문에, 본 발명자들의 결과는 Bcr-Abl-양성 백혈병을 앓는 환자 및 잠재적으로 다른 이마티니브-반응성 질환에 대한 신규 상승작용성 치료 전략을 설계하는데 있어서 중요하게 이용된다.

추가의 이점은 본 발명의 조합물의 활성 성분을 더 적은 투여량으로 사용할 수 있다는 점, 예를 들어 투여가 흔히 더 적은 투여량뿐만 아니라 더 적은 빈도로 필요하거나 또는 부작용의 발생을 감소시킬 목적으로 이용될 수 있다는 점이다. 이는 치료받는 환자의 희망 및 요구사항과 일치한다. 이러한 상승적 상호작용은 잠재적인 악영향의 유사한 증가와 관련이 없다.

본 발명의 조합물이 증식성 질환에 대하여 단일 조합물 파트너에서 관찰되는 효과에 비해 더 효과적인 진행 지연 또는 치료에 사용될 수 있다는 것은, 확립된 시험 방식, 특히 본원에 기술된 시험 방식에 의해 증명될 수 있다. 당업자라면 능히 관련된 시험 방식을 선택하여 상기 및 하기에 언급된 치료 증상 및 유익한 효과를 입증할 수 있을 것이다. 본 발명의 조합물의 약리 활성은, 예를 들어, 임상 연구 또는 본질적으로 이하에 기재된 바와 같은 실험 절차에서 입증될 수 있다.

적합한 임상 연구는, 예를 들어, 진행성 증식성 질환을 앓는 환자에서의 개방 표지 비-랜덤화 투여량 상승 연구이다. 이러한 연구는 특히 본 발명의 조합물의 활성 성분의 상승작용을 입증할 수 있다. 증식성 질환에 대한 유익한 효과는 이들 연구의 결과를 통해 직접 또는 당업자에게 공지된 연구 설계에서의 변화에 의해 결정할 수 있다. 이러한 연구는 특히, 활성 성분을 사용하는 단일요법의 효과와 본 발명의 조합물의 효과를 비교하는데 적합하다. 바람직하게는, 조합물 파트너 (a)는 고정 투여량으로 투여되며, 조합물 파트너 (b)의 투여량은 최대 허용 투여량에 이를 때까지 증가된다. 이 연구의 바람직한 실시양태에서, 각 환자는 조합물 파트너 (a)를 매일 투여받는다. 상기 연구에서 치료 효능은, 예를 들어 18주 또는 24주 후에, 매 6주마다 방사선을 이용하여 종양을 평가함으로써 결정할 수 있다.

별법으로, 위약-조절된 이종 맹검 연구는 본원에 언급된 본 발명의 조합물의 이점을 입증하기 위해 사용될 수 있다.

또한, 본 발명의 조합물은 수술적 개입, 장시간의 온화한 전신 온열요법 및(또는) 방사선조사 요법과 조합하여 적용할 수 있다.

본 발명의 조합물은 조합 제제 또는 제약 조성물일 수 있다.

본 발명의 한가지 목적은 증식성 질환에 대해 공동 치료상 효과적인 양의 본 발명의 조합물을 포함하는 제약 조성물을 제공하는 것이다. 이 조성물에서, 조합물 파트너 (a) 및 (b)는 하나의 조합된 단위 투여 형태로 하여 함께 투여될 수 있거나 또는 두 개의 별도의 단위 투여 형태로 하여 차례로 또는 개별적으로 투여될 수 있다. 단위 투여 형태는 고정된 조합물일 수도 있다.

조합물 파트너 (a) 및 (b)의 개별 투여를 위한 제약 조성물 및 고정된 조합물로의 투여를 위한 제약 조성물, 즉 본 발명에 따른 2종 이상의 조합물 파트너 (a) 및 (b)를 포함하는 단일 생약 조성물은 그 자체로 공지된 방식으로 제조할 수 있으며, 치료상 효과적인 양의 1종 이상의 약리 활성 조합물 파트너를 단독으로 또는 1종 이상의 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는, 인간을 비롯한 포유동물(온혈 동물)에게 장, 예를 들어 경구 또는 직장, 및 비경구 투여하기에 적합하며, 장 또는 비경구 적용에 특히 적합한 것들이다.

신규 제약 조성물은, 예를 들어 활성 성분을 약 10% 내지 약 100%, 바람직하게는 약 20% 내지 약 60% 함유한다. 장 또는 비경구 투여용의 조합물 요법을 위한 제약 제제는, 예를 들어 당의정제, 정제, 캡슐제 또는 좌제, 및 또한 앰플과 같은 단위 투여 형태의 것들이다. 달리 나타내지 않는다면, 이들은 그 자체로 공지된 방식으로, 예를 들어 통상의 혼합, 과립화, 당-코팅, 용해 또는 동결건조 방법에 의해 제조된다. 복수개의 투여 단위를 투여함으로써 필요한 유효량에 도달할 수 있기 때문에, 각 투여 형태의 개별 투여량에 함유된 조합물 파트너의 단위 함량은 본래 유효량을 구성할 필요가 없는 것으로 이해된다.

특히, 본 발명의 조합물의 각 조합물 파트너의 치료상 효과적인 양은 동시에 또는 임의의 순서로 연속하여 투여될 수 있으며, 이들 성분은 개별적으로 또는 고정된 조합물로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따른 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료 방법은 (i) 유리 또는 제약상 허용가능한 염 형태의 조합물 파트너 (a) 및 (ii) 유리 또는 제약상 허용가능한 염 형태의 조합물 파트너 (b)를, 공동 치료상 유효량, 바람직하게는 상승작용성 유효량, 예를 들어 본원에 기재된 양에 상응하는 일일 투여량으로, 동시에 또는 임의의 순서로 연속하여 투여하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 조합물의 각각의 조합물 파트너는 요법 과정 동안 상이한 시점에서 개별적으로 투여될 수 있거나 또는 분할 또는 단일 조합물 형태로 동시에 투여될 수 있다. 또한, '투여하는'이라는 용어는 생체내에서 조합물 파트너로 전환되는 조합물 파트너의 전구약물의 사용을 포함한다. 따라서, 본 발명은 그러한 모든 동시 또는 교차 치료 요법을 포함하는 것으로 이해되며, 용어 "투여하는"은 그에 따라 해석된다.

연속 투여의 예는 이 요법에 대한 내성이 관찰될 때까지 N-[5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐]-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민을 제1 투여하고, 이어서 하이퓨지네이션 억제제를 단독으로 또는 이마티니브와 함께 투여하는 것일 수 있다.

본 발명의 조합물에 사용된 조합물 파트너의 각각의 유효 투여량은 사용되는 특정 화합물 또는 제약 조성물, 투여 방식, 치료되는 증상, 치료되는 증상의 중증도에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 조합물의 투여 요법은 투여 경로 및 환자의 신장 및 간 기능을 비롯한 다양한 인자에 따라 선택된다. 당업계의 의사, 임상의 또는 수의사라면 증상의 진행을 예방, 저지 또는 억제하는데 필요한 단일 활성 성분의 유효량을 쉽게 결정하여 처방할 수 있을 것이다. 독성 없이 효능을 나타내는 범위내의 활성 성분 농도를 최적으로 정확하게 달성하기 위해서는 표적 부위에 대한 활성 성분의 이용성의 거동을 기초로 한 요법이 필요하다. 다수의 하이퓨지네이션 억제제가 다른 증상에서 기준에 공지된 치료적 유용성을 갖기 때문에 (예, 항진균제, 철 킬레이터), 효과적이고 안전한 투여량 범위는 본원에 개시된 증상에 대하여 과도한 실험 없이도 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

N-[5-[4-(4-메틸-피페라지노-메틸)-벤조일아미도]-2-메틸페닐]-4-(3-피리딜)-2-피리미딘-아민 모노메실레이트는 인간에게 바람직하게는 약 2.5 내지 850 mg/일, 보다 바람직하게는 5 내지 600 mg/일, 가장 바람직하게는 20 내지 300 mg/일 범위의 투여량으로 투여된다. 본원에서 달리 진술하지 않는다면, 화합물은 바람직하게는 1일 1회 내지 4회, 보다 바람직하게는 1일 1회 투여된다.

또한, 본 발명은 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료를 위한 본 발명의 조합물의 용도, 및 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료를 위한 약물의 제조에 있어서 본 발명의 조합물의 용도에 관한 것이다.

바람직하게는, 증식성 질환은 백혈병, 이마티니브-내성 백혈병 또는 종양이다.

게다가, 본 발명은 본 발명의 조합물을, 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료에서 상기 조합물의 동시, 별도 또는 연속 사용을 위한 지침과 함께 포함하는 시판 패키지를 제공한다.

하기 실시예는 상기 기재된 본 발명을 예시하지만, 그러나 어떠한 식으로든지 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니다. 본 발명의 조합물의 유익한 효과 (즉, 우수한 치료적 학제, 적은 부작용, 상승작용성 치료적 효과, 및 본원에 언급된 다른 이점)는 당업자에게 공지된 다른 시험 방식에 의해 결정될 수도 있다. 상승작용성 치료적 효과는, 예를 들어 임상 연구 또는 당업자에게 잘 알려진 시험 절차에서 입증될 수 있다.

본원에 기재된 본 발명은, 달라질 수 있는 것으로 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 한정되지 않는 것으로 고려된다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 기술하기 위한 것일 뿐이며 어떠한 식으로든지 본 발명의 범위를 한정하려는 것은 아닌 것으로 이해된다.

달리 정의하지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 당업계의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본 발명을 실시 또는 시험하는데 있어서 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료를 사용할 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 재료를 이하에 기재한다. 본원에 언급된 모든 간행물들은 본 발명과 관련하여 이용될 수 있는 간행물에 보고된 재료 및 방법을 기술 및 개시할 목적으로 본원에 참고로 포함된다.

본 발명의 실시에 있어서, 분자생물학 및 세포생물학의 다수의 통상의 기술을 사용한다. 이들 기술은 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I, II and III, 1997 (F. M. Ausubel ed.); Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.]에 설명되어 있다.

실시예

재료 및 방법:

시약

이마티니브 (10 mg/ml)의 스톡 용액은 이 화합물을 DMSO/H₂O (1:1) 중에 용해시켜 제조하였으며, -20 °C에서 저장하였다. 배지 중 디메틸 술폴시드의 최종 농도는 0.1% 미만이었으며, 본 연구에서 세포 성장 억제에 영향을 주지 않았다. 시클로피록스 (Sigma, Taufkirchen, Germany)는 시험관내 실험을 위해 PBS (10 mg/ml) 중에 새로 용해시켰다.

세포 배양 기술

K562 세포를 DSMZ (Bielefeld, Germany)로부터 얻었다. HL-60 라인은 친절하게도 뷔링 박사 (Dr. Buehring) (Tuebingen, Germany)로부터 제공받았다. 이들 두 세포주를, 10 % 송아지 태아 혈청 (FCS) (Biochrom KG, Berlin, Germany)을 함유하는 RPMI 1640 배지 (Gibco-BRL, Invitrogen, UK) 중에서 배양하였다. 이들 세포를, 37 °C에서 공기 중 5% CO₂를 함유하는 습윤 대기 중에서 인큐베이션하였다.

세포 용해 및 단백질 가용화

단백질 샘플은 1000 µg의 단백질을 생성시킨 10⁷ K562 세포로부터 단리하였다. 세포를 샘플 완충액 중에 용해시킨 다음, 12000 g에서 5분 동안 원심분리하였다. 상동액 중의 단백질 농도를 브래드포드 방법 [Bradford, M., Anal. Biochem. 72, 248 (1976)]에 따라 결정하였다.

2-차원 (2D) 겔 전기영동

등전점 포커싱을 선행 문헌 [Goerg et al., Electrophoresis 21, 1037-1053 (2000)]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 샘플을 인 겔(in gel) 재수화에 의해 IPG 스트립 (pH 4-7, 18 cm, Amersham Biosciences)에 적용하였다. 멀티포어 (Multiphor) II (Pharmacia, Sweden) 상에서의 등전점 포커싱 후, IPG 스트립을 제1 평형화 기간의 경우 1 % DTT 또는 제2 평형화 기간의 경우 4.8 % 요오도아세트아미드를 함유하는 6 M 우레아, 4 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.8) 중에서 2 x 15분 동안 평형화하였다. 스트립을 수직 SDS-PAGE 겔 상에 배치하고, 0.6 % 아가로스로 오버레이하였다. 1.5 mm 두께의 겔 및 15% T, 2.5% C의 아크릴아미드 농도를 사용하는 아머 샘 바이오사이언시즈 이소달트(Amersham Biosciences IsoDalt) 시스템에서 SDS-PAGE를 수행하였다. 2D 겔을 콜로이드 쿠마지(Coomassie)로 밤새 염색한 다음, 1일 동안 탈염색하였다.

질량 분광법

선행 문헌 [Shevchenko et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 93, 14440-14445 (1996)]에 기재된 바와 같이 하되 약간 변형시켜 인-겔 분해를 수행하였다. 단백질 스폿(spot)을 겔로부터 절단하고, 밀리포어(Millipore)-정제수 및 50% 아세토니트릴/물로 세척하였다. 건조 후, 트립신 (시퀀싱 등급, Promega, Mannheim, Germany)을 각 샘플에 첨가하였다. 5% 포름산 및 50%아세토니트릴/5% 포름산을 사용하여 트립신분해 단백질 단편을 겔 매트릭스로부터 추출하였다. 추출물을 취합하고, 급속 진공 농축기로 농축하였다. ZipTips(C18-ZipTip, Millipore, Bedford, MA, USA)를 사용한 정제 후, 분취

액을 알파-시아노-4-히드록시신남산/니트로셀룰로스의 스폷 상에 침착시키고, N₂ 337 nm 레이저가 장착된 리플렉스(Reflex) III MALDI-TOF 질량 분광기 (Bruker Daltonic, Bremen, Germany)를 사용하여 분석하였다. 모든 측정은 23 kV의 가속 전압에서 양성-이온 반사 방식 및 지연-펄스화(delayed-pulsed) 이온 추출로 수행하였다. 트립신분해 단편의 서열 확인은, 나노흐름 전자분무 이온화 공급원이 장착된 하이브리드 사중 직각 가속 비행시간(time-of-flight) 질량 분광기 (QSTAR Pulsar i, Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA) 상에서 나노전자분무 직렬 질량 분광법에 의해 수행하였다. 정제된 분취액을 나노전자분무 바늘 (Biomedical Instruments, Zoellnitz, Germany) 내에 로딩하고, 선택된 전구체 이온의 충돌로부터 유도된 봉괴에 의해 직렬 질량 스펙트럼을 얻었다. 상기 기기는 외부적으로 측정되었다.

가변성 변형 (확률 값 $p < 0.05$)으로서 메티오닌 산화 및 시스테인 카르복시메틸화와 함께, 매트릭스 사이언스(Matrix Science)사로부터의 MASCOT 소프트웨어를 사용하여 [Perkins et al., Electrophoresis 20, 3551-3567 (1999)] 데이터베이스 검색 (NCBInr, 비-과잉 단백질 데이터베이스)을 수행하였다.

웨스턴 블로팅

단백질 추출을 위해, 얼음 상에서 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.25% Na-데속시콜레이트, 5 mM EDTA, 1 mM NaF, 25 mM Na₃VO₄ 및 0.1 mM PMSF를 함유하는 용해 완충액 중에서 세포를 균질화하였다. 용해물을 얼음 상에서 10분 동안 방치하고, 세포 잔해물을 4 °C에서 20분 동안 14000 rpm에서 펠렛화하였다. 상동액을 -80 °C에서 동결시켰다. BCA 단백질 검정 키트 (Pierce, Rockford, USA)를 사용하여 용해물의 단백질 농도를 결정하였다.

12.5% SDS-PAGE에 의해 단백질 (20 μ g)을 분리하였으며, 바이오-래드 트랜스블로트(Bio-Rad Transblot) 시스템을 사용하여 니트로셀룰로스 막 상에 전달하였다. 1시간 동안 TBS-트윈(Tween)/5% w/v BSA 중에서 차단한 다음, TBS-트윈/5% w/v BSA에 희석된 1차 항체 중에서 막을 인큐베이션하였다. 다음과 같은 1차 항체가 사용되었다: 빈쿨린(Vinculin), RHO-GDI. 세척 후, TBS-T/5% w/v BSA 중에 희석된 토끼 항-마우스 Ig (1/10000) 또는 HRP-접합된 토끼 항-염소 Ig (1/10000) 중에서 1시간 동안 막을 인큐베이션하였다. 세척 후, 증대된 화학발광 키트 (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.)를 사용하여 2차 항체를 시각화하였다.

MTT 검정

K652 및 HL-60 세포를 96-웰 평면-바닥 미량역가 플레이트 (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany)에서 각 배지 150 μ l 중 1.5×10^4 세포/웰로 플레이팅하였다. 세포를 24시간 동안 예비인큐베이션한 다음, 증가하는 농도로 이마티니브 (0 μ M에서 3 μ M로) 또는 시클로피록스 (0 μ M에서 81 μ M로) 또는 이를 두 약물의 조합물을 첨가하였다. 모든 분석은 3회 반복하여 수행하였다. 24시간 및 48시간 후, 각 웰 중의 생존가능한 세포를, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드 (MTT)를 보라색 포르마잔으로 전환시키는 능력에 대하여 검정하였다 [Twentyman et al., Br. J. Haematol. 71, 19-24 (1989), Arnould et al., Anticancer Res. 10, 145-154 (1990)]. 따라서, 10 mg/ml MTT 용액 10 μ l를 각 웰에 가하였다. 37 °C에서 2시간의 인큐베이션 기간 후, 용해 완충액 (DMF/H₂O (1:1) 중 15% 나트륨 도데실 술레이트 [SDS], pH 4.5)을 가하고 암 조건하에 밤새 진탕하여 보라색 포르마잔을 방출시켰다. 570 nm에서 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA) 플레이트 판독기 (Dynatech MR7000) 상에서 샘플의 흡광도를 측정하였다. IC₅₀의 지점에서 이마티니브에 대한 투여량-효과 관계는, 캘쿠신(Calcusyn) 소프트웨어 (Biosoft, Cambridge, UK)를 사용하는 중위(median)-효과 방법 [Chou et al, Eur. J. Biochem. 115, 207-216 (1981), Chou et al., Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55 (1984)]에 의해 분석하였다. IC₅₀은 50% 세포 성장 억제를 나타내며 0.5의 영향받은 비율(F_a 값)에 상응하는 약물 농도로서 정의된다.

아폽토시스

K562 및 HL-60 (웰 당 2×10^5 세포)을 상기 기재된 조건 하에 24-웰 조직 플레이트에서 배양하였다. 24시간의 예비인큐베이션 후, 세포를 0. 15 μ M 이마티니브 중에서 시클로피록스의 농도를 (0 μ M에서 81 μ M로) 증가시켜 인큐베이션하고, 24시간 내지 48시간의 시점에서 샘플링한 다음, 니콜레티(Nicoletti) 등의 문헌 [Nicoletti et al., J. Immunol. Methods 139, 271-279 (1991)]에 따라 유동세포계수법에 의해 아폽토시스 세포의 비율을 측정하였다.

요컨대, 세포를 저장성(hypotonic) 용해 완충액 (1% 시트르산나트륨, 0.1% Triton X-100, 1 ml 당 요오드화 프로피odium 50 µg) 중에 용해시켜 핵을 준비한 다음, 유동세포계수법에 의해 분석하였다. 저이배체(hypodiploid) DNA를 함유하는 2N 피크의 좌측에 대한 핵은 아폽토시스성으로 고려되었다. CELLQUEST 분석 소프트웨어를 사용하여 FACScalibur (Becton Dickinson) 상에서 유동세포계수 분석을 수행하였다.

실시예 1

차별적인 단백질 발현

Bcr-Abl 티로신 키나제에 의해 유도되는 세포내 신호전달 캐스케이드에 대한 설명은 필라델피아 염색체 (Ph)-양성 백혈병의 생물학에 대한 더 나은 이해를 위한 선행 조건을 제시한다. 이 실시예에서, 시험관내에서 24 내지 48 시간 동안 이마티니브를 사용한 치료시에 잘 확립된 Bcr-Abl 양성 K562 세포주의 차별적인 단백질 발현이 측정된다.

Bcr-Abl-양성 K562 세포로부터의 단백질의 2-차원 겔 분석을 수행하여, 24시간 동안 4 마이크로몰의 이마티니브와 함께 또는 이마티니브 없이 인큐베이션된 K562 세포로부터의 단백질 프로필을 생성시켰다. pH 범위 4 내지 7의 IPG 겔 (제 1 차원), 15% 아크릴아미드 겔 (제2 차원)를 사용하는 2-D 겔 전기영동에 의해 총 1000 µg의 단백질을 분리하고, 콜로이드 쿠마지를 사용하여 단백질을 시각화하였다. 특정 단백질 스폷은 대조군에서 고도로 발현되기 때문에 (데이터는 나타내지 않음), 상기 스폷은 MALDI-MS 및 ESI-MS/MS에 의한 추가의 특성화를 위해 선택되었다.

처리 세포 대 비처리 세포의 비교 분석에 의해, 차별적으로 발현된 19가지 단백질을 검출할 수 있는데, 이중 7가지는 이마티니브 처리 하에 과발현되며, 다른 12가지는 하향조절되는 것으로 밝혀졌다. 3가지 독립적인 실험에서 28시간 및 48시간 둘 다의 시점에서 재현가능하게 검출되는 후보 단백질만이 차별적인 발현 측면에서 유의한 것으로 고려되었다.

실시예 2

단백질의 확인

K562 세포에서 Bcr-Abl 신호전달과 관련된 이마티니브-유도된 차별적인 단백질 발현을 분석하는 프로테오믹스 (proteomics) 접근법의 이용시, 단백질은 차별적으로 조절되는 것으로 나타났다. 확인된 경우, 단백질은 그의 공지된 생물학적 기능으로 인해 분류될 수 있었다.

상기 기술된 바와 같이 NCBIInr 데이터베이스 및 MASCOT 검색 수단을 사용하는 웨티드 서열분석 및 웨티드 질량-핑거 프린팅에 의해 후보 단백질의 확인을 수행하였다.

또한, 2-D 겔의 결과를 확인하기 위해, 선택된 대표적인 단백질의 이뮤노블로트을 수행하였다. 세포 추출물을 용해 완충액 중에 준비하고, 동등량의 단백질을 12.5% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리하여 니트로셀룰로스 막에 전달하였다. α-튜불린의 검출은 모든 레인에서 필적하는 단백질 함량을 확인하는데 사용된다 (데이터는 나타내지 않음).

이 결과는, 분석 및 확인된 단백질들 중에서 7가지 단백질은 세포 주기 조절 및 증식 조절과 관련될 수 있고, 7가지 단백질은 병소 부착 및 세포골격 조직의 조절과 관련되고, 2가지 단백질은 핵 유입/유출에서 역할을 수행하고, 2가지 단백질은 아미노산/펩타이드 대사에 관여하며, 다른 2가지 단백질의 기능은 여전히 알려져 있지 않다는 것을 나타낸다. 특히 관심의 대상이 되는 한가지 하향조절된 단백질로서 번역 후 하이퓨지네이션에 의해 활성화되는 공지된 유일한 진핵세포 단백질인 eIF5A는 추가의 연구의 초점이 된다.

실시예 3

eIF5A, 및 이마티니브 및 시클로피록스의 상승작용성 효과

근간이 되는 작용 기전은 불충분하게 이해되었지만, CML의 치료에 현재 사용되는 인터페론-알파 및 Ara-C 및 다른 약물의 활성은 eIF5A의 하이퓨지네이션의 억제를 포함할 수 있다는 것이 제안되었다.

하이퓨지네이션은 두 가지 기전에 의해 단계적으로 유도된다. 효소 데옥시하이퓨진-신타제에 의해 촉매되는 제1 단계에서, 4-아미노부틸이 eIF5a 전구체의 리신 잔기로 NAD-의존성 전달됨으로써 데옥시하이퓨진 중간체가 형성된다. 제2 단계는 활성 형태의 eIF5a를 생성시키며, 데옥시하이퓨진 중간체 측쇄가 데옥시하이퓨진 히드록실라제라고 부르는 제2 효소에 의해 히드록실화되는 것을 포함한다.

하이퓨진 합성의 봉괴가 세포 주기 정지를 초래하기 때문에, eIF5a는 세포의 증식에 필수적인 것으로 보인다. 소수의 인간 이소폼인 eIF5a2는 종양유전자인 것으로 의심되었다. eIF5a는 특정 mRNA의 수송 및(또는) 번역을 촉진시키는 것으로 고찰된다. 따라서, eIF5a의 Bcr-Abl 유도된 상향조절은 잠재적으로 Bcr-Abl 양성 백혈병에서 관찰되는 증가된 세포 증식에서 역할을 수행할 수 있다. 유사하게, Bcr-Abl의 억제는 eIF5a 발현의 억제를 통해 그의 항증식 효과를 발휘할 수 있었다.

상기 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 하이퓨지네이션 억제제 및 이마티니브를 사용하여 Bcr-Abl 양성 백혈병 세포를 처리함으로써 누가적 효과 또는 심지어 상승작용성 효과가 검출될 수 있는지를 조사하였다. 구체적으로, 본 발명자들은 세포의 세포독성 및 아폽토시스를 측정함으로써 Bcr-Abl 양성 K562 세포에 대한 이마티니브 및 시클로피록스의 잠재적인 상승작용성 효과를 분석하였다.

테트라졸륨-기초의 MTT 검정을 이용하여, 본 발명자들은 K562 세포 및 또한 Bcr-Abl-음성 HL-60 세포에서 시클로피록스 및 이마티니브의 조합물에 대한 노출 뿐만 아니라 시클로피록스 또는 이마티니브 단독에 대한 노출로부터 24시간 후에 K562 세포에서의 성장 억제를 정량하였다. 이들 세포를 다음과 같이 증가하는 농도에서 시클로피록스 또는 이마티니브로 처리하였다: K562 세포를 0, 0.33, 1, 3, 9, 27, 81 μ M 시클로피록스 및(또는) 0, 0.01, 0.037, 0.11, 0.33, 1.0, 3.0 μ M 이마티니브로 처리하였으며, HL-60 세포를 0, 0.33, 1, 3, 9, 27, 81 μ M 시클로피록스 및(또는) 0, 0.33, 1, 3, 9, 27, 81 μ M 이마티니브로 처리하였다.

시클로피록스 단독에 의해 항증식 효과가 검출되었지만, 데이터는 이마티니브와 시클로피록스의 조합물이 Bcr-Abl 양성 K562 세포에서 세포의 세포독성에 대해 유의하게 상승작용성이었음을 나타낸다. 이와는 달리, Bcr-Abl-음성 HL-60 세포는 이러한 조합물에 의해 영향받지 않았기 때문에 Bcr-Abl 음성 골수성 백혈병 세포주 HL60을 상기 두 약물로 처리한 경우, 이마티니브에 의한 상승작용성 효과는 관찰되지 않았다. 결과는 3회 이상의 독립적인 실험을 대표한다 (데이터는 나타내지 않음).

또한, 아폽토시스는 상기 방법에 기재된 바와 같은 저이배체 핵의 유동세포계수 평가에 의해 24시간 후에 측정되었다. 이 실험에서, K562 및 HL-60 세포를 (0 μ M에서 81 μ M로) 증가하는 농도의 시클로피록스로, 또는 0.15 μ M 이마티니브 및 (0 μ M에서 81 μ M로) 증가하는 농도의 시클로피록스로 처리하였다. 데이터는 시클로피록스-유도된 아폽토시스에 대하여 이마티니브가 Bcr-Abl-양성 K562 세포를 감작하지만 Bcr-Abl 음성 HL-60 세포는 감작하지 않음을 나타낸다. 결과는 3회 이상의 독립적인 실험을 대표한다 (데이터는 나타내지 않음).

본 발명자들의 발견은 Bcr-Abl-양성 백혈병에서 세포 주기 조절에 있어서 eIF5A의 중심 역할을 뒷받침하며 이 단백질이 향후 요법에 대한 잠재적인 새로운 표적이 됨을 지적한다. 흥미롭게도, 하이퓨지네이션을 억제하는 것으로 공지된 물질들 중에서, 데페록사민 (철 오버로드(overload) 작용제) 및 시클로피록스 (전형적으로 사용되는 항진균제)는 허용가능한 독성 프로필을 갖는 임상적으로 승인된 약물들이다. 따라서, 본원에 보고된 결과를 기초로, 하이퓨지네이션 억제제를 이마티니브와 함께/이마티니브 없이 조합하는 임상 치료 전략은 Bcr-Abl 양성 백혈병 및 이마티니브로 처리된 다른 질환 실재에서 이마티니브에 대한 임상 내성의 발생을 감소시킬 목적으로 사용될 수 있는 것으로 고려된다.