



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월12일

(11) 등록번호 10-1501612

(24) 등록일자 2015년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0095065

(22) 출원일자 2014년07월25일

심사청구일자 2014년07월25일

(56) 선행기술조사문헌

US20050119352 A1*

Cancer Therapy: Preclinical, Vol. 15(1), pp. 131-139(2009년1월)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

권기량

대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 503동 1001호

허준영

대전광역시 유성구 상대남로 26, 918동 2702호

(74) 대리인

백경업

전체 청구항 수 : 총 4 항

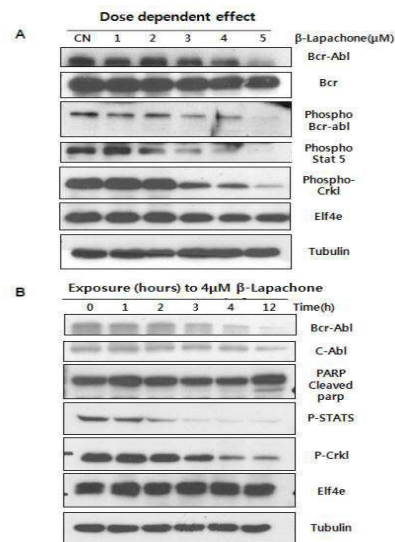
심사관 : 김용원

(54) 발명의 명칭 베타-라파콘을 함유하는 만성 골수성 백혈병 예방용 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 NQO1[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1] 기질인 베타-라파콘(β -Lapachone)과 NQO2 억제제 화합물인 퀘세틴(quercetin), 벤조-a-피렌(benzo-a-pyrene), 크리신(chrysin), 갈란긴(galangin), 모린(morin), 4-히드로시에스라디올(4-hydroxyestradiol), 디코우마롤(dicoumarol), 이매티닙(imatinib), 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib)] 중에서 1종 이상 선택된 화합물을 포함하는 암 치료용 조성물로서, 특히 만성 골수성 백혈병 치료 또는 예방하는데 우수한 효과를 갖는다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

NQO1[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1] 기질 화합물인 베타-라파콘(beta-lapachone)과 NQO2 억제제 화합물인 퀘세틴(quercetin)을 포함하는 암 치료용 조성물이며, 상기 암은, 만성 골수성 백혈병, 만성성 골수종, 혈액학적 종양, 혈액 악성 종양, 소아백혈병, 소아 림프액 증, 다발성 골수종, 호지킨 병, 림프액 구 기원의 림프액 증, 피부 기원의 림프액 증, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 형질 세포 종 및 림프액계 종양으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 2

NQO1[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1] 기질 화합물인 베타-라파콘(beta-lapachone)과 NQO2 억제제 화합물인 퀘세틴(quercetin)을 100:1 내지 1:100 중량비율로 혼합한 것을 함유하는 암 치료용 조성물이며, 상기 암은, 만성 골수성 백혈병, 만성성 골수종, 혈액학적 종양, 혈액 악성 종양, 소아백혈병, 소아 림프액 증, 다발성 골수종, 호지킨 병, 림프액 구 기원의 림프액 증, 피부 기원의 림프액 증, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 형질 세포 종 및 림프액계 종양으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 암은 만성 골수성 백혈병인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 4 항에 있어서,

상기 암은 이매티닙(imatinib)에 내성을 가진 만성 골수성 백혈병인 것을 특징으로 하는 암 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 베타-라파콘(beta-lapachone)을 포함하는 백혈병, 특히 만성 골수성 백혈병 예방용 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 베타-라파콘(beta-lapachone)과 NQO[NAD(P)H:quinone oxidoreductase] 억제제를 포함하는 만성 골수성 백혈병을 포함한 백혈병 예방용 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 베타-라파콘(beta-lapachone)은 라파초 트리(lapacho tree, Tabebuia avellanedae)로부터 얻어지는 천연 퀴논 물질로서, 다양한 식물로부터 추출된다. 종래 연구를 통해 베타-라파콘(beta-lapachone)이 항암효과[K Terai et al., Cisplatin enhances the anticancer effect of beta-lapachone by upregulating NQO1., Anticancer Drugs, 20(10), 901-9 (2009); 미국특허 제7,074,824호, 제6,962,944호, 제6,664,288호, 제7,361,691호], 항종

양 효과[H R Shah et al., beta-lapachone inhibits proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cell lines beta-lapachone in retinoblastoma cell lines, Eye, 22, 454-460 (2008); 미국특허 제 2009/0226395호, 제7,070,797호], 항염증 효과[D O Moon et al., Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia, International Immunopharmacology, 7(4), 506-514, (2007)], 항진균 효과[S H Liu et al., Inhibition of inducible nitric oxide synthase by β -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta, Br J Pharmacol., 126(3), 746-50 (1999)]를 나타내는 것으로 밝혀졌다.

- [0004] 베타-라파콘(beta-lapachone)은 한정된 수의 암에 있어서 보고된 항암활성을 갖는 물질로써, 탁산 유도체와 결합된 효과적인 양의 베타-라파콘(beta-lapachone)의 투여를 포함하는 암의 치료방법과 조성물이 보고(국제공개 제00/61142) 되었으며, 미국특허 제6,245,807호에는 사람 전립선 질병의 치료에 이용하기 위해서 베타-라파콘(beta-lapachone)의 사용이 개시하였다.
- [0005] 단일 물질로서 베타-라파콘(beta-lapachone)은, 사람 난소암의 이종 이식 된 마우스 모형[(C J Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(23), 13369-13374 (1999)], 사람 유방암[C J Li et al., AACR Proc., 9 (2000)] 및 사람 다발성 골수종(미국특허 제2003-0036515, 국제공개 제3/011224호)에 있어서, 종양의 수를 감소해, 종양의 크기를 감소하고, 또는 생존기간을 증가하고, 또는 이들의 조합을 실시하는 것도 개시되어 있다.
- [0006] 또한, 베타-라파콘(beta-lapachone)의 백혈병 치료효과와 관련해서는, 베타-라파콘(beta-lapachone)이 만성 골수성 백혈병 세포(K562 세포)에 대한 항암활성을 통한 만성 골수성 백혈병 치료효과 및 베타-라파콘(beta-lapachone)과 이매티닙(imatinib, 글리벡) 병용투여로 유의한 항암효과(미국특허 제7361691호)가, 사람 다발성 골수종에 치료효과(일본공개 제2007-523187호)가 개시되어 있으며, ACS Chem Biol. 8(10), 2173-2183 (2013)에는 퀴논계열 약물인 베타-라파콘(beta-lapachone)이 NQO1 기질로서 선택성이 있는 항암제 약물 개발에 유망함이 개시되어 있다.
- [0007] 한편, 백혈병 치료제 개발에 있어서는, Bcr-Abl 단백질은 만성 골수성 백혈병을 일으키는 중심적인 역할을 담당하므로, Bcr-Abl 단백을 타깃으로 하는 치료약물의 개발은 만성 골수성 백혈병의 질환 제어를 위한 원천기술을 확보 하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 현재 진행되고 있는 세계적인 연구의 방향은 단순히 Bcr-Abl 단백질의 기능을 감소하는 약물개발에 집중하고 있으나, 저항성을 가지는 환자군의 출현으로 보다 근본적인 Bcr-Abl 단백 제어를 위한 연구가 필요한 상황이고, 치료약물의 부작용을 최소화하기 위해 Bcr-Abl 단백 제어를 하는 약물의 정확한 기전을 밝히는 노력이 필수적이다.
- [0009] 이러한 연구 결과의 활용은 일차적으로 신개념의 만성 골수성 백혈병의 치료약으로 제시할 수 있으며 더 나아가 다른 혈액 암을 조절하는 약물개발 스크리닝 기술을 제공함으로써 의료비용 감소와 국제적인 제약 시장에 우리나라의 위상을 높일 수 있을 거라 예상되며, Bcr-Abl 단백질은 9번 염색체와 22번 염색체의 상호 전좌 현상에 의해 만들어지며 이는 지속적인 단백 활성을 유지시켜 세포를 증식시키는 신호전달을 담당하고(MAPK Pathway, CRKL, Src 등 백혈구증식에 중요한 분자들의 활성화에 중심이 됨.) CML 환자의 95%이상에서 BCR-ABL 단백 발현이 발생하므로 BCR-ABL 단백을 억제하려는 노력이 전 세계적으로 집중되고 있는 상황이다.
- [0010] 글리벡(Gleevec[®], imatinib) 치료의 한계점을 극복하고자 다른 백혈구 증식 단백(Src, Crkl 등)의 활성을 동시에 억제 하려는 노력이 진행되고 있으나 완전한 관해를 유도 하지 못하고 있는 실정이다.
- [0011] 단순히 Bcr-Abl 단백 활성을 억제하는 약물이 아닌 근본적인 단백을 분해시키는 약물 개발은 새로운 치료법을 제시 할 수 있으며 명확한 기전 연구가 수반된다면 예상 되는 부작용을 줄여 CML 치료에 더불어 다른 고형암 치료에도 적용 가능한 플랫폼을 형성 할 수 있다고 보여진다.
- [0012] 만성 골수성 백혈병(CML, chronic myeloid leukemia)은 전체 백혈병 환자 중 20%를 차지하며 평균 40, 50대의 호발 연령으로 인해 급격한 노령화 사회로 진입에 따른 발생률의 증가는 국가적인 문제로 대두되고 있으며, 실제로 CML은 한국 중앙 암 등록 본부에 의하면 매년 500명의 환자가 새로이 발생 하고 있다.
- [0013] CML은 Bcr-Abl 종양단백을 생성하는 비정상적인 필라델피아 염색체(Philadelphia chromosome)에 의해 야기되며 글리벡(Gleevec[®])은 Bcr-Abl 단백질의 ATP 결합부위에 결합하여 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 활성을 억제함으로써 암의 성장을 저해하는 획기적 신약이다.
- [0014] 2006년 NEJM에 보고된 바에 의하면 2002년부터 보급된 CML의 획기적 치료제인 글리벡을 복용한 환자의 90%가 5

년 생존율을 나타내고 있으나, 늦게 진단되는 경우 글리벡에 내성을 지니는 환자 군이 증가함에 따라 치료가 실패하는 경우가 20% 이상으로 증가 하고 있으며, 또한 환자가 급성기로 진행된 경우 글리벡 치료에도 불구하고 사망률이 50%를 상회하므로 단순히 티로신 키나제(tyrosine kinase)의 활성을 억제 하는 것 이외에 새로운 작용기전을 가진 치료약의 개발이 절실한 실정이다.

[0015] 만성 골수성 백혈병(CML, chronic myeloid leukemia) 관련 국내외 연구 현황은, 2000년도부터 시작된 글리벡 치료는 Bcr-Abl의 ATP 결합부위(binding site)를 경쟁적으로 억제함으로써 그 하위에 존재하는 분자적 신호 전달을 억제 하는 것으로 알려져 있으나, 글리벡에 저항성을 가진 환자 군이 나타나면서 2세대 약물인 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib)을 개발하였지만 T315I 돌연변이(mutation)를 지닌 환자군에 대한 치료는 결과적으로 실패하고 있는바, 이러한 단점을 극복하고자 돌연변이(mutation)가 있는 Bcr-Abl의 활성을 억제하는 약물이 개발되고 있다.

[0016] 그러나 모든 종류의 돌연변이(mutation) 된 Bcr-Abl의 발현을 막을 수 없다는 한계가 발생하고 있고, 또한 Bcr-Abl 단백 발현을 직접 감소시키는 약물이 개발 되어 보고되어 있으나 아직 그 정확한 작용기전을 알 수 없고 활성 산소종과 같은 세포내 소기관에 위험을 주는 인자들을 발생 시킬 수 있다는 단점이 있어 CML을 치료함에 있어 완전한 관해를 유도 할 수 있는 새로운 약물개발이 절실히 요구되고 있다.

[0017] CML 치료에 대한 연구동향에 대해서는 많은 보고서가 있으며, 최근 동향은 유일무이한 치료제로 생각되던 이미티닙(Imatinib, 글리벡®)의 한계점과 저항성을 가진 환자 군이 발생하면서 제 2세대(nilotinib), 제 3세대(dasatinib) 타이로신 카이네이즈 억제제의 개발이 노바티스회사, Richard Jove 그룹, John Kuriyan's 그룹에서 각각 이루어지고 있으나, 이 약물들 역시 완전한 관해를 이루지 못하며 급성기 환자에서의 치료 성공률이 30% 정도 증가한 수준이라는 단점이 있으며, 또한 임상시험 단계에서 흉막 삼출증과 간독성의 부작용이 보이고 있으며, 일본그룹에서 개발한 Bcr-Abl kinase와 Lyn kinase 모두를 억제하는 효과가 있는 INNO-406은 역시 CML 증식에 관여하는 또 다른 카이네이즈를 억제한다는 의의를 가지고 있긴 하나 T315I mutation으로 저항성을 가지는 세포를 억제 하지 못한다는 단점이 있다.

[0018] 미국의 MD Anderson Cancer Center 에서의 MK-0457 오로라 키나제 억제제(Aurora kinase inhibitor)는 앞서 개발된 INNO-406보다 저항성을 가진 세포 주에 반응성이 있으나 혈관주사를 통한 약물투여만 가능하다는 단점이 있고, 올해 보고된 연구 결과에 의하면 이미티닙(Imatinib) 저항성을 가진 환자 군의 출현이 혈액 줄기세포에 기인하다는 가설 아래 이를 조절하는 HDAC(Histone deacetylase) 억제제와 같이 병용투여 시 치료 효과를 보여 파급효과가 클 것으로 기대 되고 있으나 아직까지 정상 혈액 줄기세포에 영향을 주지 않고 암 유래의 혈액 줄기세포에 특이적으로 반응성을 보이는 약물 개발엔 한계가 있을 것으로 예상되고 있다.

[0019] 한편, NQO1(NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1)의 치료표적으로 한계점과 이용 가능성이 있는데, NQO1은 NAD(P)H를 보조인자로 사용하여 기질에 두 개의 전자를 전달하는 효소로서, 주로 퀴논계열 화합물을 기질로 사용하는데, NAD(P)H:quinone oxidoreductase(EC1.6.99.2)는 DT-diaphorase, quinone reductase, menadione reductase, vitamin K reductase, 또는 azo-dye reductase 등으로 불리고 있으며, 이러한 NQO는 두 개의 isoform, 즉, NQO1과 NQO2로 존재한다.

[0020] NQO는 플라보프로테인(flavoprotein)으로서, 퀴논 또는 퀴논 유도체들의 쌍전자환원(two electron reduction) 및 무독화를 촉매하는 작용을 한다. NQO는 전자공여체로 NADH 및 NADPH를 모두 사용한다. NQO의 활성은 반응성이 매우 큰 퀴논 대사물의 형성을 예방하고, 벤조(d)피렌(benzo(d)pyrene), 퀴논(quinone)을 무독화시키며, 크롬의 독성을 감소시킨다. NQO의 활성은 모든 조직에 존재하지만, 활성은 조직에 따라 다르며 일반적으로 암세포 조직, 간, 위, 신장과 같은 조직에서 NQO의 발현량이 높은 것으로 확인되었다.

[0021] NQO의 유전자 발현은 생체이물질(xenobiotics), 항산화제, 산화제, 중금속, 자외선, 방사선 등에 의해 유도된다. NQO는 산화적 스트레스에 의해 유도되는 수많은 세포방어기작 중의 일부이다. NQO를 포함한 이러한 방어기작에 관여하는 유전자들의 연합된 발현은 산화적 스트레스, 유리기 및 종양형성(neoplasia)에 대하여 세포를 보호하는 역할을 수행하며, NQO는 매우 넓은 기질 특이성을 갖고 있는데, 퀴논 이외에 퀴논-이민(quinone-imines), 니트로(nitro) 및 아조(azo) 화합물이 기질로서 사용될 수 있다.

[0022] NQO1은 위장관 상피세포, 전립선 상피세포 및 간세포에 다량 발현하며 CML을 포함하여 여러 종류의 암세포에서 높은 발현 정도를 보이고 있으며, Boothman DA 등은 퀴논계열 약물인 베타-라파콘(β -lapachone)을 이용, NQO1을 표적으로 하여 세포 내에서 NAD^+ , NADH의 양적인 감소를 통해 ATP를 고갈시킴으로서 비소세포 폐암세포(non-

small-cell lung cancer cell)에 대한 세포사멸기작을 밝힌 바 있다.

[0023]

본 발명자들은, NQO1의 인체에 존재하는 기질로서 코엔자임-Q10(Coenzyme Q₁₀), 비타민-E(vitamin E), 및 메나디온(menadione) 등이 있으나 효소와의 친화력이 낮아 세포내 레독스(redox) 변화를 일으킬 수 없으므로, 이에 70여종의 NQO1 기질의 NADH 감소능력과 리사이클링(recycling) 능력을 스크리닝 했을 때 최적의 효과를 나타내고 인-비보(in vivo)에서 평가하여 이중에서 전임상이 완료된 베타-라파콘(β -lapachone)을 선도화합물(lead compound)로 선택하여 예비실험을 진행하였으며, 이로부터 NQO1의 기질인 베타-라파콘(β -lapachone)이 세포내 redox 변화를 유발함으로써 CML 치료제로 이용될 수 있고, 베타-라파콘(beta-lapachone)과 NQO2 억제제의 병용 투여로 글리벡 내성 암세포를 포함하여 다양한 암세포에서 상승적인 우수한 항암활성을 보여주었고, 특별히 만성 골수성 백혈병에서 우수한 효과를 나타냄을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0024]

- (특허문헌 0001) 미국특허 제7,074,824호
- (특허문헌 0002) 미국특허 제6,962,944호
- (특허문헌 0003) 미국특허 제6,664,288호
- (특허문헌 0004) 미국특허 제7,361,691호
- (특허문헌 0005) 미국특허 제6,664,288호
- (특허문헌 0006) 국제공개 제00/61142호
- (특허문헌 0007) 미국특허 제6,245,807호
- (특허문헌 0008) 미국특허 제2003-0036515호
- (특허문헌 0009) 국제공개 제3/011224호
- (특허문헌 0010) 미국특허 제7361691호
- (특허문헌 0011) 일본공개 제2007-523187호

비특허문헌

[0025]

- (비특허문헌 0001) K Terai et al., Anticancer Drugs, Nov, 01; 20(10): 901-9 (2009)
- (비특허문헌 0002) H R Shah et al., Eye 22, 454-460 (March 2008)
- (비특허문헌 0003) D O Moon et al., Vol 7, Issue 4, 506-514 (April 2007)
- (비특허문헌 0004) C J Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(23): 13369-13374 (1999)
- (비특허문헌 0005) C J Li et al., AACR Proc., 9 (2000)
- (비특허문헌 0006) E I Parkinson et al., ACS Chem Biol. 8(10), 2173-83 (2013)

발명의 내용

해결하려는 과제

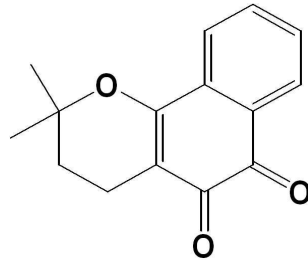
[0026]

본 발명의 목적은 NQO1 기질인 베타-라파콘(β -Lapachone)과 NQO2[NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2] 억제제를 포함하는 글리벡 내성 암세포를 포함하는 백혈병, 특히 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0027] 본 발명은 NQ01 기질인 베타-라파콘(β -Lapachone)과 NQ02[NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2] 억제제를 포함하는 백혈병, 특히 만성 골수성 백혈병 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 본 발명은, 상기 화학식 1의 NQ01[NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1] 기질로 알려진 베타-라파콘(β -Lapachone)과 NQ02[NAD(P)H:quinone oxidoreductase 2] 억제제 중에 1종 이상 선택된 화합물과 병용 또는 일정 시간간격 두고 투여하는 것을 특징으로 하는 글리백 내성 암세포를 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료 또는 예방하는 조성물을 제공한다.

[0031] 상기 NQ02 억제제로는 퀘세틴(quercetin), 벤조-a-피렌(benzo-a-pyrene), 크리신(chrysin), 갈란긴(galangin), 모린(morin), 4-히드록시에스트라디올(4-hydroxyestradiol), 디코우마롤(dicoumarol), 이매티닙(imatinib), 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib) 등에서 선택된 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 퀘세틴(quercetin)인 것을 특징으로 한다.

[0032] 한편 NQ01 억제제로는 디코마롤(dicoumarol), 시바크론(cibacron), 페닌드론(phenindrone) 등이 알려져 있다.

[0033] 상기 NQ01 기질로서 베타-라파콘(beta-lapachone)과 NQ02 억제제와의 배합 함량 중량비율이 100:1 내지 1:100으로 혼합된 조성물이며, 더욱 바람직하게는 50:1 내지 1:50 중량비율로 혼합된 암 치료용 조성물인 것을 특징으로 한다.

[0034] 상기 암은, 만성 골수성 백혈병을 포함하여 만성성 골수종, 췌장암, 비소세포 폐암, 폐암, 유방암, 결장암, 난소암, 전립선암, 악성 멜라노마, 비멜라노마 피부암, 혈액학적 종양, 혈액학적 종양, 소아백혈병, 소아 림프액종, 다발성 골수종, 호지킨 병, 림프액 구 기원의 림프액 종, 피부 기원의 림프액 종, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 형질 세포 종, 림프액계 종양, AIDS 관련암, 설, 구, 인두 및 구강의 암, 식도암, 위암, 소장의 암, 항문암, 항문관의 암, 직장 항문암, 간암, 간내 담관암, 담낭암, 담관암, 다른 소화기관의 암, 후두암, 골관절 암, 자궁암, 자궁목암자궁체암, 음문의 암, 질암, 고환암, 음경암, 방광암, 신장암(kidney cancer), 신장암(renal cancer), 요관 및 다른 비뇨기의 암, 눈의 암, 뇌 및 신경계의 암, CNS 암 및 갑상선 암에서 이루어진 군에서 선택되는 질환의 예방 또는 치료용 조성물일 수 있다.

[0035] 바람직한 실시 형태에 있어서, 치료 유효량은 정상세포에 대한 세포 독이 아니고, 정상세포의 생존성에 영향을 주지 않으며, 본 발명은, NQ01 기질 또는 NQ01 기질의 화합물인 베타-라파콘(β -Lapachone) 또는 그 유도체 또는 유사체, 또는 그 약학적으로 허용되는 염, 또는 그 대사 산물 및 약학적으로 허용 되는 담체로 이루어진 의약 조성물과 함께, NQ02 억제제 및 치료 유효량의 제2 항암제 또는 제2 항증식제, 또는 그 유도체 또는 유사체를 투여하는 것도 포함될 수 있다.

[0036] 상기 대표적인 제2 항암제 또는 제2 항증식제는, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 노코다졸, 에포틸론, 나베르빈, 에트포시드, 아드리아마이신, 캄토세신, 다우노르비신, 다크치노마이신, 미토산트론, 암사크리, 에피루비신, 이다루비신, 겐시타빈 및 이매티닙(imatinib), 다사티닙(dasatinib), 닐로티닙(nilotinib)일 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 베타-라파콘(beta-lapachone)을 함유하는 만성 골수성 백혈병을 포함하는 암 치료용 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스

테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 추출물 또는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텍솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0038] 당 분야에서 사용되는 통상적인 용해 담체 분자의 일례 형태로는, 폴록사머(Poloxamer), 포비돈(Povidone) K17, Povidone K12, Tween 80, 에탄올, Cremophor/에탄올, Lipidol, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 400, 프로필렌 글리콜, Trappsol, 알파-사이클로덱스트린 또는 그 유사체, 베타-사이클로덱스트린 또는 그 유사체 및 감마 사이클로덱스트린 또는 그 유사체를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명은 NQ01 기질인 베타-라파콘(β -Lapachone)을 포함하는 조성물로서, NQ02 억제제와 동시에 또는 일정 시간간격으로 투여하는 것을 특징으로 하는 만성 골수성 백혈병 치료용 또는 예방용 조성물로서 용이하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 베타-라파콘(beta-lapachone) 화합물의 농도와 시간에 따른 Bcr-Abl 활성변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는 베타-라파콘(beta-lapachone) 화합물과 NQ01 억제제와 NQ02 억제제 병용 처리에 따른 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 베타-라파콘(beta-lapachone) 화합물과 NQ01 억제제와 NQ02 억제제 병용 처리에 따른 Bcr-Abl 활성변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 NQ02 siRNA를 이용한 효능평가 실험과 독성 실험을 나타낸 그래프이다.

도 5는 NQ01 siRNA를 이용한 효능평가 실험과 독성 실험을 나타낸 그래프이다.

도 6은 베타-라파콘(beta-lapachone) 화합물과 이매티닙(imatinib) 병용 처리에 따른 Bcr-Abl 활성변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0044] <실시예 1> 베타-라파콘 화합물의 농도와 시간에 따른 Bcr-Abl 활성

[0045] 베타-라파콘(β -lapachone)에 의한 만성 골수성 백혈병 세포 증식에 필수적인 Bcr-Abl 단백질의 변화를 알아보기

위해 웨스턴 블롯(western blotting)을 시행하였다. 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포에 베타-라파콘(beta-lapachone)을 1, 2, 3, 4, 5 μ M 농도로 처리한 후 12시간 후에 세포를 각각 모아 단백질을 획득하였다. Western blotting 방법으로 Bcr-Abl 단백을 비롯한 Bcr-Abl 단백질의 활성을 의미할 수 있는 phospho-bcr-abl, phospho-crkl, phospho-stat5의 변화를 관찰하였고 정상 혈구 세포에도 존재하는 Bcr, EIF4E 단백질은 정상세포에 영향을 주지 않는다는 것을 보여 주기 위해 대조군으로 같이 확인하였다. 그 결과 베타-라파콘(beta-lapachone) 농도 의존적으로 phospho-bcrabl, phospho-stat5, phospho-crkl의 단백질 발현양이 감소하였으며, Bcr-Abl 단백질 역시 감소하였다. 하지만 Bcr 이나 EIF4e 단백질의 차이가 없는 것으로 보아 정상세포에서 발현하는 단백질에 영향을 미치지않고 만성 골수성 백혈병에만 발현하는 단백질에만 감소를 유발하는 약물임을 확인하였다. (도 1)

[0046] <실시예 2> 베타-라파콘 화합물과 NQO1 억제제와 NQO2 억제제 병용 처리에 따른 K562 세포 독성

[0047] 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562 세포에 각각 대표적 NQO1 억제제인 디쿠마롤(dicumarol)과 NQO2 억제제인 퀘세틴(quercetin)을 베타-라파콘(beta-lapachone) 처리 두시간 전에 5 μ M 농도로 전처리 하였다. 그 후에 베타-라파콘(beta-lapachone)을 1, 2, 3, 4 μ M의 농도로 각각 처리하였다. 24시간이 지난 후에 CCK(cell counting kit-8)를 이용하여 세포독성 효능검사를 시행하였다. 디쿠마롤(Dicumarol)을 전 처리한 결과 베타-라파콘(beta-lapachone)만 처리한 세포보다 2-4 μ M 농도에서 15% 정도의 세포독성이 감소하였으며, 이와 반대로 퀘세틴(quercetin)의 세포독성 나타나지 않은 농도(quercetin 5 μ M)로 처리하고 베타-라파콘(beta-lapachone)을 1-3 μ M 농도로 병용 처리한 구간에서는 베타-라파콘(beta-lapachone) 단독처리보다 40~50% 정도로 세포독성이 상승적으로 증가하였다.(도 2)

[0048] <실시예 3> 베타-라파콘 화합물과 NQO1 억제제와 NQO2 억제제 병용 처리에 따른 Bcr-Abl 활성

[0049] 만성 골수성 백혈병은 Bcr 유전자와 Abl이라는 유전자가 지속적으로 재조합(recombination mutation)이 일어나서 생기는 질병으로 알려져 있으며 전사된 Bcr-Abl단백은 만성 골수성 백혈병 세포의 지속적인 성장과 직접적인 관계를 가지고 있다. Bcr-Abl 단백을 웨스턴 블롯(western blotting) 방법을 이용하여 K562 세포주에서 검정을 하였고 이는 2, 4 μ M의 베타-라파콘(beta-lapachone)을 처리하였을 때 감소하는 것을 확인하였다. 같은 방법으로 dicumarol과 quercetin을 전처리한 후 western blotting으로 Bcr-Abl단백을 검정한 결과 세포 독성 실험과 일치하게 Bcr-Abl 이 dicumarol처리한 경우 덜 감소하였고 quercetin을 처리한 결과 Bcr-Abl 단백질 아예 사라지는 것을 확인하였다.(도 3)

[0050] <실시예 4> NQO2 siRNA를 이용한 효능평가와 독성

[0051] 실제로 억제제 자체의 세포 성장과 관련된 효과에 의한 결과가 아님을 증명하기 위하여 각각 NQO1, NQO2 siRNA를 이용하여 유전자 녹다운(knock down)을 유발한 후 베타-라파콘(beta-lapachone)을 처리하는 실험을 계획하였다. 두가지의 NQO2 siRNA의 효능을 웨스턴 블롯(western blotting)으로 평가한 결과 Control siRNA나 GAPDHsiRNA와 처리 한 것을 비교했을 때 두 가지의 NQO2 siRNA와 그리고 그 두 가지 siRNA를 합쳐서 처리한 결과 각각 NQO2의 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 앞선 실험과 마찬가지로 두 가지의 NQO2 siRNA를 처리한 그룹에서 10% 정도의 세포독성이 베타-라파콘(beta-lapachone)을 처리 하였을 때 증가하는 것을 알 수 있었다. (도 4)

[0052] <실시예 5> NQO1 siRNA를 이용한 효능평가와 독성

[0053] 비슷한 방법으로 NQO1 siRNA를 이용한 효능평가 실험과 독성 실험을 진행 하였다. 세가지의 NQO1 siRNA를 처리하였을 때 NQO1의 발현이 유지 되었지만 세가지의 siRNA를 합쳐서 처리한 결과 control siRNA처리 그룹보다 NQO1의 발현이 감소하였으며 이는 NQO2의 발현에는 영향을 주지않았다. siRNA를 처리 후 베타-라파콘(beta-lapachone)을 처리한 결과에서도 역시 앞선 억제제 실험과 동일하게 NQO1 siRNA에 의해 세포 독성효과가 증가하였다. (도 5)

[0054] <실시예 6> 베타-라파콘 화합물과 이매티닙(imatinib) 병용처리에 따른 Bcr-Abl 활성

[0055] 이매티닙(imatinib)의 독성 효과를 평가하기 위하여 CCK-8 assay를 시행하였다. 그 결과 200nM 이하의 농도로 이매티닙 처리시 세포가 사멸되지 않았고 200nM의 농도로 K562 세포주에 전 처리하여 세포가 사멸되지 않는 농도에서 베타-라파콘(beta-lapachone)의 세포독성 효과의 상승적인 억제효과를 평가하였다. 세포독성이 나타나지 않은 농도(이매티닙 200nM)로 전 처리한후 2시간 후에 베타-라파콘(beta-lapachone)을 1, 2, 3, 4 μ M 농도 의존적으로 처리하였고 12시간 후에 CCK-8 실험을 진행하였다. 그 결과 1, 2, 3 μ M 농도의 베타-라파콘(beta-lapachone) 처리하였을 때 40% 이상의 상승적인 세포독성 효과를 보였다. 실제로 Bcr-Abl 단백질의 변화를 관찰하

기 위하여 western blotting 실험을 진행하였고, 이매티닙을 전 처리한 후 베타-라파콘(beta-lapachone)을 처리하였을 때 4 μ M의 농도에서 Bcr-Abl 단백질의 분해능이 상승적으로 훨씬 증가하는 것을 확인하였다. (도 6)

<제제예-1> 정제의 제조

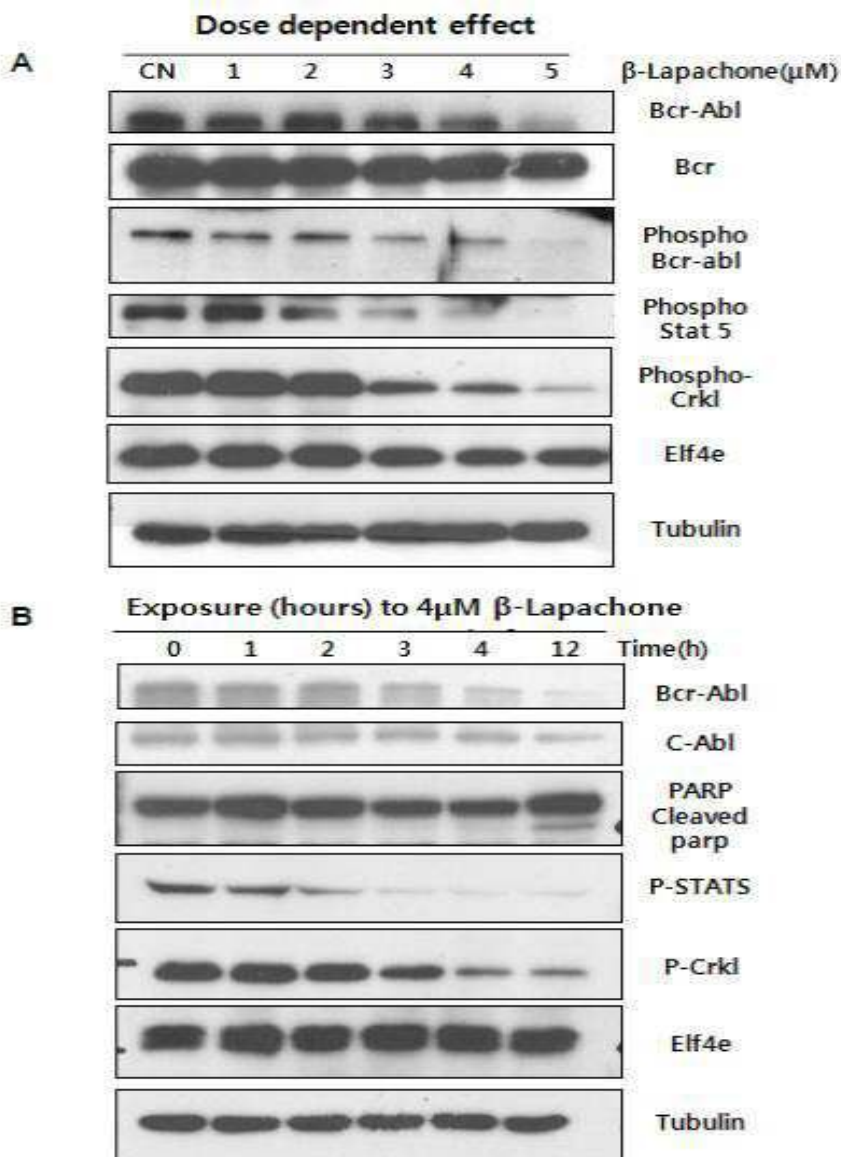
본 발명의 베타-라파콘(beta-lapachone) 화합물 100g과 퀘세틴 100g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

<제제예-2> 주사제의 제조

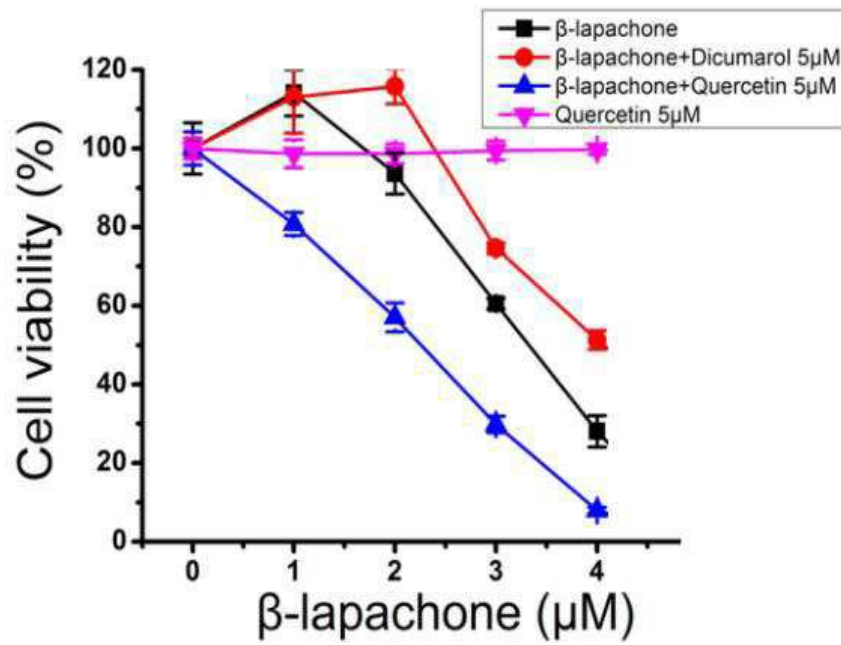
본 발명의 베타-라파콘(beta-lapachone) 화합물 0.5g, 퀘세틴 화합물 0.5g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100ml를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

도면

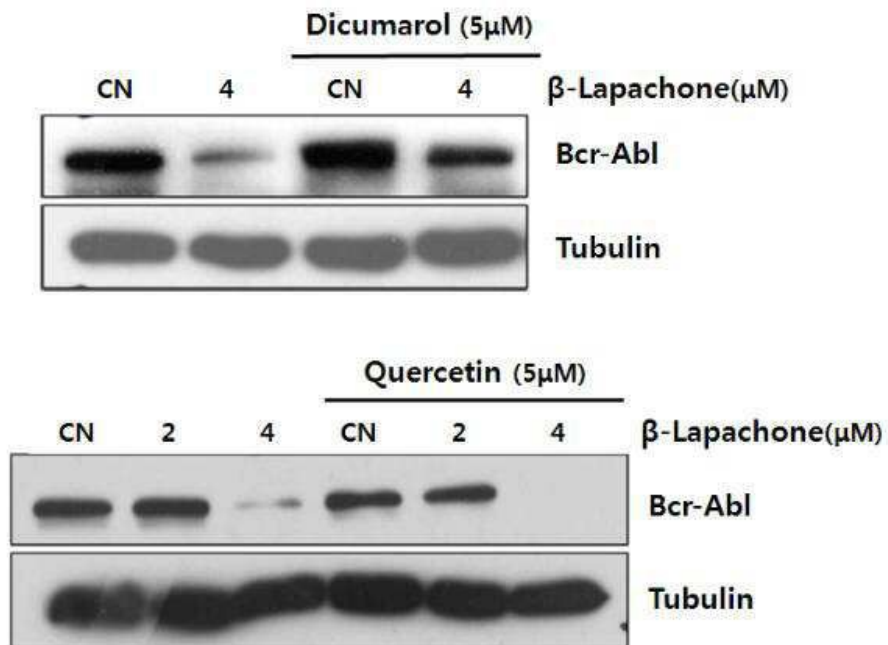
도면1



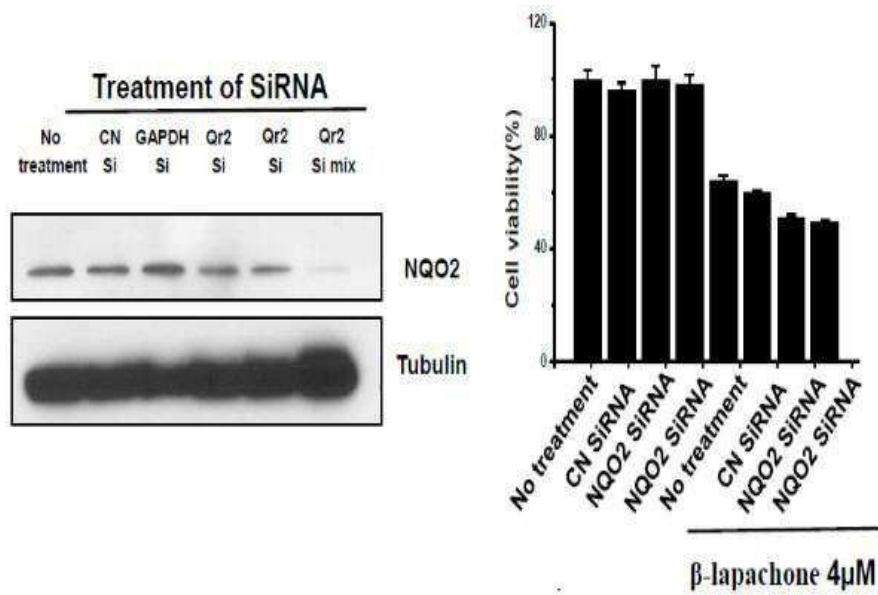
도면2



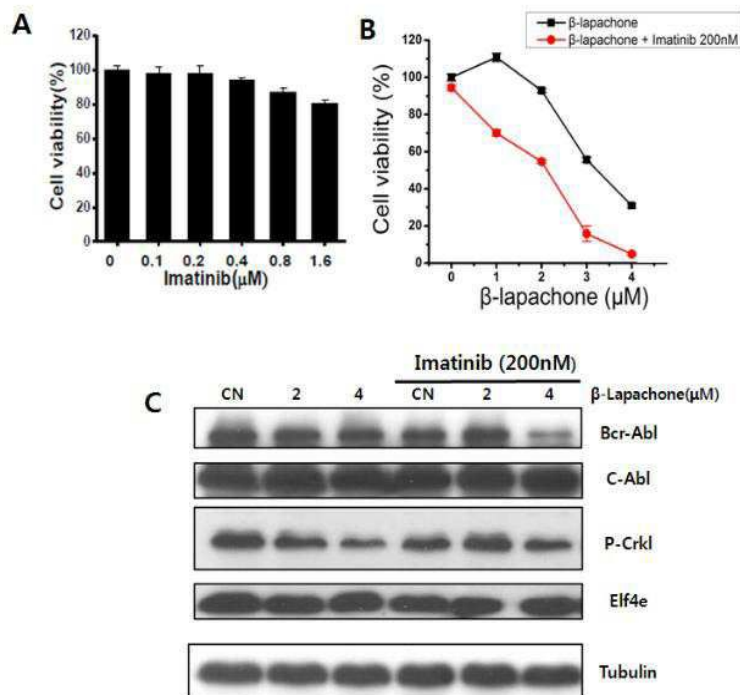
도면3



도면4



도면5



도면6

