



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0124640
(43) 공개일자 2017년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/16 (2006.01) **A61K 31/167** (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01) **A61K 45/06** (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/16 (2013.01)
A61K 31/167 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7031565(분할)

(22) 출원일자(국제) 2009년09월21일
 심사청구일자 2017년11월01일

(62) 원출원 특허 10-2016-7020675
 원출원일자(국제) 2009년09월21일
 심사청구일자 2016년07월29일

(85) 번역문제출일자 2017년10월31일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/062214

(87) 국제공개번호 WO 2010/034693
 국제공개일자 2010년04월01일

(30) 우선권주장
 MI2008A001720 2008년09월29일 이탈리아(IT)
 61/193,283 2008년11월13일 미국(US)

(71) 출원인
 이탈파마코 에스.피.에이.
 이탈리아 밀라노 20126 비알레 폴비오 테스티 330

(72) 발명자
 올도니 티지아노
 이탈리아, 아이-20017, 로 (밀라노), 비아 툴리아
 티, 9
 마스카니 파울로
 이탈리아, 아이-20058, 빌라싼타 (밀라노), 비아
 돈 갈리, 25
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 정홍식, 김태현

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군의 관리를 위한 히스톤 디아세틸라아제 억제제의 용도

(57) 요 약

필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군 (진성 적혈구증가증, 본태성 고혈소판증 또는 특발성 골수섬유증)의 치료적 치료를 위한 히스톤 디아세틸라아제 계통의 하나 이상의 효소를 억제할 수 있는 성분 (히스톤 디아세틸라아제 억제제)의 용도가 기재되어 있다. 상기 언급된 성분의 투여량은 다른 종양 증후군의 관리에 보통 사용되는 양보다 유의하게 낮고, 10 내지 150 mg/일/환자 일 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/18 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자
램발디 알렉산드로
이탈리아, 아이-24128, 베르가모, 비아 다미아노
치에사, 1

바르부이 티지아노
이탈리아, 아이-24100, 베르가모, 비아 주세페 마
치니, 13

명세서

청구범위

청구항 1

필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군의 치료용 의약 조성물에 있어서,

디에틸-[6-(4-히드록시카르바모일-페닐카르바모일옥시메틸)-나프탈렌-2-일-메틸]-암모늄 클로라이드, 또는 기타 약학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 포함하고,

일일 투여량이 환자 당 50 내지 100 mg인 것을 특징으로 하는 의약 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 일수화물 형태인 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 일수화물 결정 형태인 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군이 진성 적혈구증가증인 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군이 본태성 고혈소판증인 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군이 원발성 골수섬유증인 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군이 이차성 골수섬유증인 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 다른 활성 성분과 조합으로 투여되지 않는 것을 특징으로 하는, 의약 조성물.

발명의 설명

배경기술

[0001]

골수증식 증후군은 골수 유래의 다능성 줄기 세포, 즉, 분열에 의해 다양한 유형의 혈액 세포를 형성할 수 있는 세포로부터 기원한다는 사실을 공통으로 하는 신생물성 유형의 장애이다.

[0002]

골수증식 증후군은 하기 4 가지 유형으로 나뉜다: 만성 골수성 백혈병 (CML: chronic myeloid leukaemia), 진성 적혈구증가증 (PV: polycythaemia vera), 본태성 고혈소판증 (ET: essential thrombocythemia), 및 특발성 골수섬유증 (IM: idiopathic myelofibrosis).

[0003]

만성 골수성 백혈병에 대한 분자적 근거는 예전부터 알려져 있고, 필라델피아 (Philadelphia) 염색체의 형성, 또는 9;22 전위, 및 *BCR-ABL* 융합 유전자의 생성으로 이루어지며 (이 경우, 필라델피아 염색체-양성 골수증식 증후군이라고 불림), 특이적 ABL 티로신 키나아제 억제제 (예컨대 이미티니브(imatinib) 또는 데사티니브(desatinib))의 사용은 병리학을 담당하는 세포에 선택적으로 개입하여, 건강한 세포에 손상을 주는 비-특이적 세포독성의 가능한 결과를 제한할 수 있다.

[0004] 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군의 이름으로 그룹지어진 다른 3 가지 병리학에 대해서는, 분자적 근거는 좀더 최근에 확인되었고 [예를 들어: Robert Kralovics *et al.* in *The New England Journal of Medicine* 352, 1779-1790 (2005); Chloe James *et al.* in *Nature* 434, 1144-1148 (2005) 참조], JAK2 티로신 키나아제에 영향을 주는 유전자 돌연변이와 관련이 있는 것 같다.

[0005] 상기 증후군에 대해, 헌행의 요법은 또한, 특정 기간의 치료 후, 골수이형성 상태 및 백혈병 형태에 대한 병리학의 발달을 비롯한 위험이 존재하는 비-특이적 작용을 갖는 세포증식억제 약물, 주로 히드록시우레아의 사용을 제공한다.

[0006] 유럽에서, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군의 발병률은 매년 매 100,000 명의 거주민 당 대략 5 회 경우이다.

[0007] 그러므로 더욱 민감한 방식으로 무-독성 투여량으로 작용할 수 있는, 심지어 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군 (PV, ET 및 IM)에 대한 신규 약물을 확인하는 것이 필요하다는 것이 명백하다.

[0008] 히스톤 디아세틸라아제 (HDAC)는 히스톤의 N-말단 부분 내 또는 다른 단백질 내 라이신 잔기에 결합된 아세틸기를 제거할 수 있는 효소이다.

[0009] HDAC는, 구조적 상동에 근거하여 4 개 계열로 나뉠 수 있다. 계열 I HDAC (HDAC 1, 2, 3 및 8)는 RPD3 효모 단백질과 유사하며, 세포 핵에 위치한다. 계열 II HDAC (HDAC 4, 5, 6, 7, 9 및 10)은 HDA1 효모 단백질과 유사하며, 핵과 세포질 모두에 존재한다. 계열 III HDAC는 SIR2 효모 단백질과 연관성이 있는 NAD-의존성 효소의 구조적으로 구별되는 형태이다. 계열 IV (HDAC 11)는 특정한 구조적 특징을 갖는 단일 효소의 모멘트로 이루어진다. 계열 I, II 및 IV의 HDAC는 아연 효소이고, 다양한 계열의 분자: 히드록삼산 유도체, 시클릭 테트라펩ти드, 단쇄 지방산, 아미노벤자미드, 친전자성 케톤의 유도체 등에 의해 억제될 수 있다. 계열 III HDAC는 히드록삼산에 의해 억제되지 않고, 이들의 억제제는 다른 계열의 억제제와 상이한 구조적 특징을 갖는다.

[0010] 본 발명과 관련하여 "히스톤 디아세틸라아제 억제제"라는 표현은 계열 I, 계열 II 또는 계열 IV의 히스톤 디아세틸라아제로서 분류되는 효소 중 하나 이상의 활성을 억제할 수 있는 천연, 재조합 또는 합성 기원의 임의의 분자를 의미하는 것으로 이해된다.

[0011] 히스톤 디아세틸라아제 억제제는 항-신생물성 및 항-염증성 활성이 있는 분자의 계열이다.

[0012] 종양 세포에서, 히스톤 디아세틸라아제 억제제는 세포 증식을 억제하고, 세포 사멸 및 분화를 유도한다 [Gaofeng Bi and Guosheng Jiang in *Cellular & Molecular Immunology* 3, 285-290 (2006)].

[0013] 히스톤 디아세틸라아제 억제제는 또한 면역-적격성 세포 (immuno-competent cell)의 일부에 대한 사이토카인 및 기타 전-염증성 인자의 생성을 조절할 수 있으며, 생체 내에서 항-염증성 특성이 입증되었다 [Frederic Blanchard and Celine Chipoy in *Drug Discovery Today* 10, 197-204 (2005); IM Adcock in *British Journal of Pharmacology* 150, 829-831 (2007)].

[0014] 종양 병리학 및 염증 병리학 모두에 대한 수많은 임상 연구는 현재 진행중이고, 다양한 억제제를 사용하는 다양한 진행 단계에 있다 [Marielle Paris *et al.* in *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 1505-1529 (2008)].

[0015] 최근, 히스톤 디아세틸라아제 억제제 (Zolinza, 보리노스타트 (vorinostat))가 피부 T-세포 림프종의 치료에 대해 승인되었다.

[0016] 현재 임상 연구 단계에 있는 히스톤 디아세틸라아제 억제제 중 일부는 그들의 다른 유사체와 함께, 하기 특히: WO 2004/092115, WO 2005/019174, WO 2003/076422, WO 1997/043251, WO 2006/010750, WO 2006/003068, WO 2002/030879, WO 2002/022577, WO 1993/007148, WO 2008/033747, WO 2004/069823, EP 0847992 및 WO 2004/071400에 기재되어 있다 (이들의 내용은 본원에 참조로서 전체가 인용되어 있다).

[0017] 본원에 모두 참조로서 인용되어 있는 WO 97/43251 (무수물 형태) 및 WO 2004/065355 (일수화물 결정 형태)에 기재되어 있는 디에틸-[6-(4-히드록시카르바모일-페닐카르바모일옥시메틸)-나프탈렌-2-일 메틸]-암모늄 클로라이드는 양호한 항-염증성 활성을 가진 HDAC 억제제이고; 이러한 활성 성분은 또한 ITF2357 및/또는 지비노스타트 (Givinostat)로서 알려져 있다. 리포폴리사카라이드 (LPS)-자극된 배양된 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에서, ITF2357은 10 내지 22 nM에서 종양 괴사 인자- α (TNF α)의 방출, 12 nM에서 세포내 인터류킨 (IL)-1 α 의 방출, 12.5 내지 25 nM에서 IL-1 β 의 분비, 및 25 nM에서 인터페론- γ (IFN γ)의 생성을

50% 감소시킨다. 마우스에게 1.0 내지 10 mg/kg ITF2357 을 경구 투여하면 LPS-유도 혈청 TNF α 및 IFN γ 를 50% 초과 감소시킨다 [Flavio Leoni et al. in *Molecular Medicine* 11, 1-15 (2005)].

[0018] 최근에는 ITF2357 이 서브-마이크로몰 농도에서, PV 또는 ET 환자로부터 수득된 줄기 세포의 클론원성 활성을 억제할 수 있다는 것이 보고되었다 [V. Guerini et al. *Leukemia* 22, 740 - 747 (2008)]. 그러나, 클론원성 활성의 억제가 수득되는 농도는 분자 마커 (JAK2^{V617F} 및 STAT 단백질) 의 변형 또는 세포독성 효과가 수득되는데 필요한 농도보다 훨씬 적다; 이러한 결과의 모호성은 시험관 내에서 수득된 상기 결과의, 특히 인간에서의 임의의 치료적 치료를 위한 생체 내 치료 상황으로의 전환가능성 (transferability) 을 제공하기를 어렵게 한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

발명의 설명

[0019] 이제 디에틸-[6-(4-히드록시카르바모일-페닐카르바모일옥시메틸)-나프탈렌-2-일 메틸]-암모늄 클로라이드의, 바람직하게는 일수화물 형태, 더욱 바람직하게는 일수화물 결정 형태로의, 진성 적혈구증가증, 본태성 고혈소판증 또는 골수섬유증을 앓고 있는 환자에 대한 투여가 완전한 또는 부분적인 반응을 일으키고; 또한, 비장비대 상태로 초기에 입증된 환자에서, 비장 부피의 유의한 감소가 관찰되었음을 발견하였고, 이것이 본 발명의 하나의 양상을 구성한다.

[0020] 이제 인간에서 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군의 치료를 위한, 이러한 활성 성분의 치료적 투여량은, 종양 증후군의 관리에 보통 사용되는 양보다 유의하게 낮고, 10 내지 150 mg/일/환자, 바람직하게는 30 내지 120 mg/일/환자, 더욱 더 바람직하게는 50 내지 100 mg/일/환자 일 수 있다는 것을 발견하였고, 이것이 본 발명의 제 2 양상을 구성한다.

[0021] 예를 들어, 피부 T-세포 림프종의 치료를 위해 지시되는 Zolinza™ (보리노스타트 (vorinostat)) 의 투여량은 400 mg/일 이다.

[0022] 본 발명은 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군 (진성 적혈구증가증, 본태성 고혈소판증 또는 특발성 골수섬유증) 의 치료적 치료를 위한, 디에틸-[6-(4-히드록시카르바모일-페닐카르바모일옥시메틸)-나프탈렌-2-일 메틸]-암모늄 클로라이드의, 바람직하게는 일수화물 형태, 더욱 바람직하게는 일수화물 결정 형태로의 용도에 관한 것이다. 이러한 활성 성분은 단독으로, 즉, 다른 활성 성분과 조합되지 않고, 또는 다른 세포증식억제 활성 성분, 예를 들어, 히드록시우레아(hydroxyurea) 또는 피포브로만(pipobroman)과 조합으로 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명은 또한 종양 병리학 (예를 들어: 피부 T-세포 림프종) 의 치료에 사용되는 양보다 적은 일일 투여량으로의, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군의 치료를 위한 이러한 활성 성분의 치료적 용도에 관한 것이다. 투여량은 10 내지 150 mg/일/환자, 바람직하게는 30 내지 120 mg/일/환자, 더욱 더 바람직하게는 50 내지 100 mg/일/환자 이다.

[0024] 본 발명과 관련하여 "치료" 라는 용어는 질환의 진행 또는 병리학적 상태를 야기하는 유해한 영향을 경감, 완화, 최소화, 제거 또는 차단하기 위한 관리 행위를 의미하는 것으로 이해된다.

[0025] 히스톤 디아세틸라아제와 관련하여 특정 화합물의 억제 활성을 예를 들어, 상기 효소 중 하나 이상의 억제를 입증하는 효소 시험을 사용하여 시험관 내에서 측정될 수 있다. 상기 유형의 시험은 문헌에 공지되어 있다: 예를 들어, P. A. Marks et al. in *J. Natl. Cancer Inst.* 92 1210-1215 (2000); L.M. Butler et al. in *Cancer Res.* 60 5165-5170 (2000); V.M. Richon et al. in *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 3003-3007 (1998); M. Yoshida et al. in *J. Biol. Chem.* 265 17174-17179 (1990) 참조; HDAC 억제를 측정하기 위한 키트는 또한 시판된다 (예를 들어, Biomol International LP (USA); HDAC1 Fluorimetric Drug Discovery Kit, 제품 번호 BML-AK511-0001).

[0026] 하기 실시예는 본 발명의 범주를 제한하기 보다는 설명하기 위한 것으로 의도된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1

[0029] 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군을 앓는 환자에서의 ITF2357 의 임상 연구. 디자인: 제 II 상, 개방, 비-랜덤화 연구.

[0030] 연구 내 집단: 표준 약리학적 치료 (히드록시우레아) 에 의해 적합하게 조절되지 않는, 골수증식 증후군을 앓고 있는 JAK2^{V617F} 돌연변이를 가지고 있는 27 명의 환자.

[0031] 연구 중 약물: 1 일 2 회 50 mg 의 투여량의 ITF2357.

[0032] 치료 기간: 최대 24 주까지의 연속 투여.

[0033] 1 차 목적: JAK2^{V617F}-양성 골수증식 질환 (PV, ET, IM) 을 가진 환자의 치료에서의 ITF2357 의 효능 및 내약성을 평가하기 위함.

[0034] 2 차 목적: 정량적 PCR 에 의해 돌연변이된 JAK2 대립유전자 적재에 대한 치료 효과를 평가하기 위함.

[0035] 예비 데이터의 시험 (4 내지 12 주의 치료 기간) 은 진성 적혈구증가증, 본태성 고혈소판증 또는 골수섬유증을 앓고 있는 환자에 대한 ITF2357 의 투여는 대략 60% 의 경우에서 완전한 또는 부분적인 반응을 유도하고; 또한, 비장비대 상태로 초기에 입증된 환자에서, 비장 부피의 유의한 감소가 관찰되었음을 나타낸다.

[0036] 실시예 2

[0037] 인간 세포주 SET-2 의 클로닝 효율에 대한 비교 효과

[0038] JAK2^{V617F} 돌연변이된, 인간 세포주 SET-2 (본태성 고혈소판증의 백혈병 세포 전환을 갖는 환자의 말초 혈액으로부터 성립된 거핵모구성 세포주) 를 독일 세포 은행 DSMZ (카탈로그 번호 ACC 608) 에 의해 입수하고, 배양 배지 (RPMI 1640 + 헤페스 (Hepes) 완충액 1M + 페니실린 10.000 IU/ml + 스트렙토마이신 10.000 µg/ml + 20% 우태 혈청)의 24 웨 플레이트에서 성장시켰다. 재현가능한 계수를 하도록 각 페트리 디쉬에 충분한 수의 클론을 산출하는 최적의 세포 수를 측정하기 위해 이전 실험을 수행하였다. SET-2 라인의 경우, 상기 세포 수는 3×10^3 세포/페트리 디쉬에 상응하였다. 충분한 수의 세포가 수득되었을 때, 원심분리 (10^3 rpm 에서 10 분) 에 의해 세포를 수화한 다음, 90×10^3 세포/ml 의 농도로 배양 배지에 혼탁하였다. 100 µl 의 혼탁액을 제조자에 의해 설명된 대로 제조된 3.0 ml 의 메틸-셀룰로오스 (Methocult™, 카탈로그 번호 H4230, Stemcell Technologies) 에 첨가한 다음, 0.1% DMSO 중 HDAC 억제제의 63 배 농축 용액 50 µl 을 첨가하였다. 각각의 화합물에 대해, 5 개의 연속 희석액 (1000 - 12 nM 범위) 을 시험하였다. 그 다음 HDAC 억제제를 함유하는 메틸-셀룰로오스 용액을 기포가 생기지 않도록 하면서 멸균 플라스틱 퍼스터일 파이펫을 사용하여 조심스럽게 혼합하였다. 마지막에 1 ml 의 용액을 18G 바늘의 주사기를 사용하여 페트리 디쉬 (격자가 있는 직경 35 mm의 페트리디쉬, 카탈로그 번호 174926 Nunc) 에 균질하게 분배하였다. 각각의 실험에 대해, 2 개의 페트리 디쉬를 사용하였다. 2 개의 실험 디쉬를 일정한 습도를 확보하도록 멸균수의 저장소와 함께 큰 페트리 디쉬에 두었다. 그 다음 모든 디쉬를 습도 및 CO₂-조절 멸균 인큐베이터 내, 37°C 에서 유지시켰다. 14 일 성장 후, 각 디쉬 내의 클론의 수를 양안 현미경에 의해 측정하였다. 디쉬의 각 쿠퍼 (coupe) 에 대한 클론의 평균 수를 계산하고, 클론 형성 억제 % 를 임의의 화합물 (대조군 디쉬) 의 부재하에서 수득된 클론의 수에 대해 측정하였다. EC₅₀ 값 (클론의 수를 50% 감소시키는데 필요한 농도) 을 GraphPad Prism 5.0 소프트웨어를 사용하여 계산하고 하기 표에 보고하였다. rhHDAC1 억제에 대한 값을 또한 보고하였다: 효소를 BPS Biosciences (cat n. 50001) 로부터 입수하고, 시험을 공급자의 지침에 따라 BIOMOL 키트를 사용하여 수행하였다.

[0039]

[표 1]

| 코드 | 창시사 | INN | 약품 계열 | EC ₅₀ μM | IC ₅₀ nM (rhHDAC1) |
|-----------|----------------|---------|-------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| ITF2357 | Italfarmaco | 지비노스타트 | 히드록심산 | 0.028 - 0.054 [*] | 121 |
| MGCD-0103 | MethylGene | 모세티노스타트 | 벤자미드 | 1.196 ^{**} | 17 |
| KD-5170 | Kalypsys | --- | S,아세틸- α -메르캅토케톤 | 1μM 에서 <20% 억제 | 24 |
| SNDX-275 | Bayer Schering | 엔티노스타트 | 벤자미드 | 1.820 ^{**} | 293 |

*) 2 개의 상이한 실험에서 수득된 값

**) 동일한 실험에서 ITF2357 에 대해 p<0.05

[0040]

[0041]

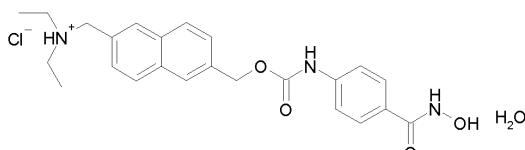
모세티노스타트 (Mocetinostat) 및 엔티노스타트 (Entinostat) 가 계열 I 특이적 HDAC 억제제로서 고려되지만 [Zhou, N. et al. *J Med Chem* 51, 4072 (2008) 및 Jones, P. et al. *J Med Chem* 51, 2350 (2008)], KD-5170 가 ITF2357 과 동일한 광역 스펙트럼 계열 I 및 II-HDAC 억제제인 것으로 보고되었다 [WO 2007/067795; Payne, J.E. et al. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 6093 (2008)].

[0042]

SET-2 세포의 클로닝 효율 억제가 필라델피아 염색체-음성, JAK2^{V617F}-양성, 골수증식 증후군의 치유에 대해 예측적인 것으로 입증되지 않지만, 다른 HDAC 억제제와 비교하는 경우 ITF2357 의 강력한 억제 효과는, 필라델피아 염색체-음성 골수증식 증후군과 관련하여 ITF2357 에 의해 제시된 임상 효능을 수득하는데 히스톤 디아세틸라제 억제의 존재가 필수적이지 않다는 것을 나타내는 것으로 보인다.

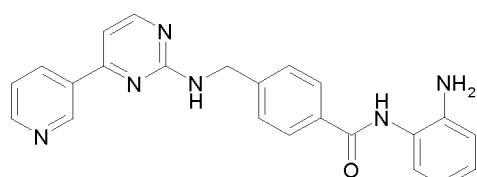
[0043]

시험된 화합물은 하기 화학식에 상응한다:



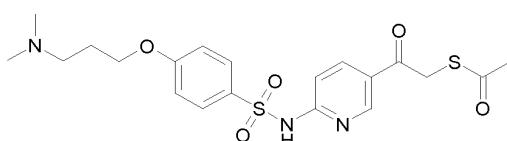
[0044]

지비노스타트 (Givinostat) (ITF2357)



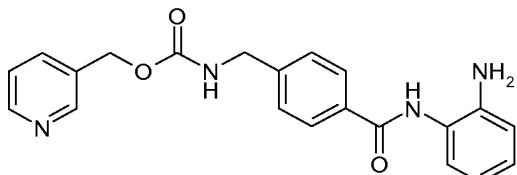
[0046]

모세티노스타트 (Mocetinostat) (MGCD-0103)



[0048]

KD-5170



[0050]

[0051] 엔티노스타트 (Entinostat) (MS-275; SNDX-275)