



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년04월08일

(11) 등록번호 10-2655833

(24) 등록일자 2024년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4184 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/4184 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7037098

(22) 출원일자(국제) 2018년06월13일

심사청구일자 2021년05월28일

(85) 번역문제출일자 2019년12월16일

(65) 공개번호 10-2020-0015563

(43) 공개일자 2020년02월12일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/065664

(87) 국제공개번호 WO 2018/229132

국제공개일자 2018년12월20일

(30) 우선권주장

1709402.0 2017년06월13일 영국(GB)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170005106 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 김수진

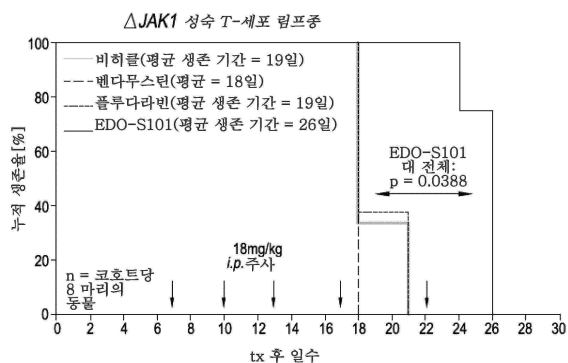
(54) 발명의 명칭 T-세포 전립프구성 백혈병의 치료에 사용하기 위한 티노스타무스틴

(57) 요약

T-PLL 요법

T-세포 전립프구성 백혈병(T-PLL)의 치료를 필요로 하는 환자에서 T-PLL의 치료에 사용하기 위한 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 제공된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61P 35/02 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170005125 A*

KR1020170008846 A

W02015180865 A1

W02015181154 A1

W02015181157 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

티노스타무스틴(tinostamustine) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, T-세포 전립프구성 백혈병 (T-PLL)의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서,

상기 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 조합 치료에 사용되지 않는 것인 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 T-PLL은 전이성인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 T-PLL은 진행성인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 이를 필요로 하는 환자에게 상기 환자의 신체 표면적 m^2 당 0.3 mg 내지 300 mg, 또는 상기 환자의 신체 표면적 m^2 당 20 mg 내지 150 mg의 투여량 수준으로 정맥내 투여되는, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 치료 사이클의 1일째에, 또는 21일 치료 사이클의 1일째에 이를 필요로 하는 환자에게 정맥내 투여되는, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 이를 필요로 하는 환자에게 60분의 주입 시간; 또는 45분의 주입 시간; 또는 30분의 주입 시간에 걸쳐 정맥내 투여되는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 이를 필요로 하는 환자에게, 21일 치료 사이클의 1일째에, 60분의 주입 시간에 걸쳐, 상기 환자의 신체 표면적 m^2 당 20 mg 내지 150 mg의 투여량 수준으로 정맥내 투여되는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 환자는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 방사선 요법으로 치료되는, 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 방사선 요법 치료는 이를 필요로 하는 상기 환자에게 연속 5일 내지 10일에 걸쳐 1 Gy 내지 5 Gy의 선량으로 제공되는, 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 방사선 요법 치료는 이를 필요로 하는 상기 환자에게 연속 5일 내지 10일에 걸쳐 2 Gy의 선량으로 제공되는, 약학적 조성물.

청구항 11

T-세포 전립프구성 백혈병(T-PLL)을 치료하기 위한 설명서와 함께 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용

되는 염을 포함하는 T-PLL 치료용 키트로서, 상기 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 조합 치료에 사용되지 않는 것인 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 T-세포 전립프구성 백혈병(T-PLL)을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 가장 생명을 위협하는 질병들 중 하나이다. 암은 신체의 일부에 있는 세포가 제어 불능의 성장을 겪는 질환이다. 미국 암 협회(American Cancer Society)로부터의 최근 데이터에 따르면, 2017년에 미국에는 169만건의 신규 암 사례가 존재할 것으로 추정된다. 암은 미국에서 사망의 두 번째 주요 원인이며(심장병 다음임), 2017년에 601,000명이 넘는 생명을 앗아갈 것이다. 실제로, 암을 발병할 평균 생애 위험은 미국 남성의 경우 40.8%이고 미국 여성의 경우 37.5%인 것으로 추정된다. 따라서, 암은 주요 공중 보건 부담을 구성하며, 미국에서 상당한 비용에 해당한다. 이러한 수치는 세계적으로 대부분의 국가들에 걸쳐 다른 곳에 반영되어 있지만, 암의 유형 및 암을 발병하는 인구의 상대적 비율은 유전학 및 식이를 비롯한 많은 상이한 인자들에 따라 달라진다.

[0003] 수십년 동안, 수술, 화학 요법, 및 방사선은 다양한 암에 대한 확립된 치료법이였다. 환자들은 일반적으로 그들의 질병의 유형 및 정도에 따라 이들 치료법의 조합을 적용받는다. 그러나, 화학 요법은 외과적 치료(즉, 질병 조직의 제거)가 불가능할 때 암 환자를 위한 가장 중요한 옵션이다. 수술은, 예를 들어, 유방, 결장, 및 피부의 특정 부위에 위치한 종양을 제거하는 데 때때로 효과적이지만, 이는 척추와 같은 다른 영역에 위치한 종양의 치료, 또는 혈액 및 혈액-형성 조직(예컨대 골수)의 암을 비롯한 산재성 혈액암의 치료에는 사용될 수 없다. 그러한 암은 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병을 포함한다. 방사선 요법은 이온화 방사선으로의 살아있는 조직의 노출을 수반하여 노출된 세포의 사멸 또는 손상을 초래한다. 방사선 요법으로부터의 부작용은 급성이고 일시적일 수 있지만, 다른 것들은 비가역적일 수 있다. 화학 요법은 세포 복제 또는 세포 대사의 중단을 수반한다. 이는 유방암, 폐암, 및 고환암의 치료에 가장 흔히 사용된다. 이 암 치료에서 실패의 주요 원인들 중 하나는 질병의 재발 또는 심지어 사망을 야기할 수 있는 심각한 문제인 암 세포에 의한 약물 내성의 발달이다. 따라서, 더욱 효과적인 암 치료법이 필요하다.

[0004] 백혈병은 혈액 세포의 암이다. 백혈병은 골수라는 혈액-형성 조직에서 시작된다. 이러한 암은 고형 종양을 형성하지 않고, 대신에 다수의 비정상 백혈구(백혈병 세포 및 백혈병 모세포)가 혈액 및 골수에 축적된다. 4가지 주요 유형의 백혈병이 있다: 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 및 만성 림프구성 백혈병(CLL).

[0005] T-세포 전립프구성 백혈병(T-PLL)은 혈액 악성종양의 WHO 분류에서 백혈병 말초 T-세포 신생물로서 인식되며, 성숙 T-세포 표현형을 갖는다. 가장 빈번한 성숙 T-세포 백혈병을 나타내지만, T-PLL은 그럼에도 불구하고 극히 흔치 않은 혈액 악성종양이며, 일상에서 좀처럼 접하지 못한다(발생률이 백만명당 약 0.6명임). T-PLL은 또한 매우 불량한 예후를 가지며, T-PLL에 걸린 환자의 전체 생존 중위 기간은 종래의 화학 요법으로 대략 7개월이다.

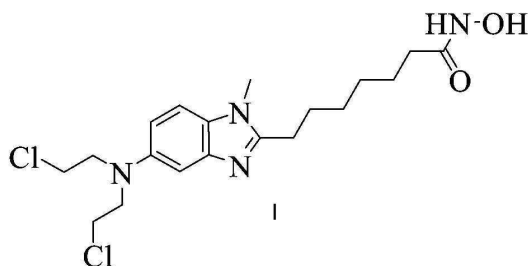
[0006] 전형적으로 T-PLL에 걸린 환자는 림프절병증과 간비종대를 동반하며 말초 혈액에서 기하급수적으로 상승하는 림프구 카운트, 및 골수 침범을 나타낸다.

[0007] T-PLL은 특징적으로 신속한 진행을 나타내며, 표준 다중-제제 화학 요법에 잘 반응하지 않는다. 모노클로날 항-CD52 항체인 알렘투주맵은 비록 재발 규칙은 있지만 높은 관해율을 유도하는 것으로 밝혀진 유일한 (표적화된) 제제였다. 알렘투주맵은 완전한 반응을 달성하는 환자에서 15개월 내지 19개월의 생존 중위 기간과 함께 51% 내지 95% 범위의 전체 반응 속도를 가졌다.

[0008] 그러나, 알렘투주맵은 2012년에 시장으로부터 회수되었고, 현재 T-PLL에 대한 효과적인 1차 치료제는 존재하지 않는다.

[0009] 따라서, T-PLL의 효과적인 화학 요법적 치료제가 필요한 실정이다.

[0010] WO-A-2010/085377에는 하기 화학식 I의 화합물이 개시되어 있다. 이는 HDAC 경로를 강력하게 억제하는 퍼스트-인-클래스(first-in-class) 이중-작용성 알킬화-HDACi 융합 분자이다.



[0011]

[0012]

생물학적 검정은 화학식 I의 화합물이 HDAC 효소를 강력하게 억제함을 보여주었다(9 nM의 HDAC1 IC₅₀). 화학식 I의 화합물은 티노스타무스틴(tinostamustine)이라는 INN을 가지며, 또한 당업계에서 EDO-S101로 알려져 있다. 이는, 전임상 연구에서, 암 세포 내의 DNA 가닥으로의 접근 개선, 암 세포 파괴 및 손상 복구 차단을 동시에 달성하는 것으로 밝혀진 AK-DAC(퍼스트-인-클래스 알킬화 데아세틸라제 분자)이다.

발명의 내용

[0013]

본 발명의 제1 태양에서, T-세포 전립프구성 백혈병(T-PLL)의 치료에 사용하기 위한 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 제공된다.

[0014]

티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 T-PLL의 치료에 특히 효과적이라는 것이 놀랍게도 발견 되었으며, 이때 활성 데이터는 이 화합물에 대한 강한 시험관내 및 생체내 민감성을 나타낸다. 따라서, 새롭고 효과적인 T-PLL 치료제에 대한 필요가 본 발명에 의해 충족된다.

[0015]

본 발명의 추가의 태양에 있어서, T-PLL 치료용 의약의 제조를 위한 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도가 제공된다.

[0016]

본 발명의 추가의 태양에 있어서, T-PLL의 치료를 필요로 하는 환자에게 유효량의 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 T-PLL을 치료하는 방법이 제공된다.

[0017]

본 발명의 추가의 태양에 있어서, T-PLL을 치료하기 위한 설명서와 함께 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 키트가 제공된다.

[0018]

하기 특징들은 본 발명의 모든 태양에 적용된다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1a는 증가하는 농도의 HDAC 억제제인 SAHA(vorinostat), 벤다무스틴(bendamustine), SAHA + 벤다무스틴, 및 EDO-S101로의 노출 후의 대조군에 대한 HH 세포 생존력의 플롯을 도시하고;

도 1b는 HH 세포에서의 SAHA(vorinostat), 벤다무스틴, SAHA + 벤다무스틴, 및 EDO-S101에 대한 용량 반응 곡선을 도시한다.

도 2는 T-PLL과 관련된 다양한 마커에 대한 SAHA(vorinostat), 벤다무스틴, SAHA + 벤다무스틴, 및 EDO-S101의 효과를 나타내는 환자의 T-PLL 샘플의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다.

도 3a는 SAHA(vorinostat), 벤다무스틴, SAHA + 벤다무스틴, 및 EDO-S101을 비교한 48시간 치료 후의 현탁 배양 중의 살아있는 T-PLL 세포의 상대적인 수를 나타내는 용량 반응 곡선이고;

도 3b는 인간 골수 기질 세포주인 NKtert와 공동 배양되거나 공동 배양되지 않은 원발성 T-PLL 세포에 대한, 증가하는 농도의 SAHA(vorinostat), 벤다무스틴, SAHA + 벤다무스틴, 및 EDO-S101의 효과를 도시한다.

도 3c는, NKtert 세포 생존력에 대한, 증가하는 농도의 SAHA(vorinostat), 벤다무스틴, SAHA + 벤다무스틴, 및 EDO-S101의 효과를 도시한다.

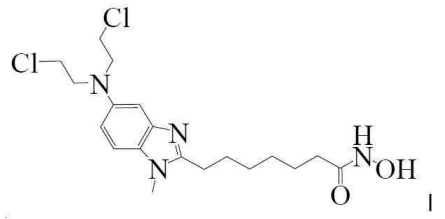
도 4a, 도 4b 및 도 4c는 플루다라빈, 벤다무스틴 및 EDO-S101을 조사한 CD2-MTCP1 p13 마우스에 대한 전이 모델의 결과를 도시한다.

도 5는 플루다라빈, 벤다무스틴 및 EDO-S101을 조사한 ΔJAK1 마우스에 대한 전이 모델의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 출원에서, 다수의 일반적인 용어 및 문구가 사용되며, 이는 다음과 같이 해석되어야 한다.

[0021] 화학식 I의 화합물은 티노스타무스틴이라는 INN을 가지며, 또한 당업계에서 EDO-S101로 알려져 있다. IUPAC 명칭은 7-(5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)-N-하이드록시헵탄아미드이다.



[0022]

[0023] "환자"는 인간, 비-인간 포유류(예를 들어, 개, 고양이, 토끼, 소, 말, 양, 염소, 돼지, 사슴 등) 및 비-포유류(예를 들어, 조류 등)를 포함한다.

[0024] "약제학적으로 허용되는 염"은 상기 정의된 바와 같이 약제학적으로 허용되며 요망되는 약리학적 활성을 보유하는 본 발명의 화합물의 염을 의미한다. 그러한 염은 무기산으로 또는 유기산으로 형성된 산 부가 염을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 염은 존재하는 산 양성자가 무기 염기 또는 유기 염기와 반응할 수 있을 때 형성될 수 있는 염기 부가 염을 또한 포함한다. 일반적으로, 그러한 염은, 예를 들어, 물 중에서 또는 유기 용매 중에서 또는 이 둘의 혼합물 중에서 이러한 화합물의 유리 산 또는 염기 형태를 화학량론적 양의 적절한 염기 또는 산과 반응시킴으로써 제조된다. 일반적으로, 에테르, 에틸 아세테이트, 에탄올, 아이소프로판올 또는 아세트니트릴과 같은 비-수성 매체가 바람직하다. 산 부가 염의 예에는 무기산 부가 염, 예를 들어, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요다이드, 설페이트, 바이설페이트, 설파메이트, 니트레이트, 포스페이트, 및 유기산 부가 염, 예를 들어, 아세테이트, 트라이플루오로아세테이트, 말레에이트, 푸마레이트, 시트레이트, 옥살레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 살리실레이트, 토실레이트, 락테이트, 나프탈렌설포네이트, 말레이트, 만델레이트, 메탄설포네이트 및 p-톨루엔설포네이트가 포함된다. 알칼리 부가 염의 예에는 무기 염, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 칼슘 및 암모늄 염, 및 유기 알칼리 염, 예를 들어, 에틸렌다이아민, 에탄올아민, N, N-다이알킬렌에탄올아민, 트라이에탄올아민 및 염기성 아미노산 염이 포함된다.

[0025] 본 발명에서, 티노스타무스틴의 약제학적으로 허용되는 염은 바람직하게는 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요다이드, 설페이트, 바이설페이트, 설파메이트, 니트레이트, 포스페이트, 시트레이트, 메탄설포네이트, 트라이플루오로아세테이트, 글루타메이트, 글루쿠로네이트, 글루타레이트, 말레이트, 말레에이트, 옥살레이트, 석시네이트, 푸마레이트, 타르트레이트, 토실레이트, 만델레이트, 살리실레이트, 락테이트, p-톨루엔설포네이트, 나프탈렌설포네이트 또는 아세테이트 염일 수 있다.

[0026] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 T-PLL에서 놀라운 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 특히, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 T-PLL의 치료에 유용한 것으로 밝혀졌다.

[0027] T-세포 전립선암 백혈병 또는 T-PLL은 백혈병 말초 T-세포 신생물이며, 성숙 T-세포 표현형을 갖는다(문헌 [Campo, E *et al*, Blood 117, 2011 5019-32]). 가장 빈번한 성숙 T-세포 백혈병을 나타내지만, T-PLL은 그럼에도 불구하고 극히 흔치 않은 혈액 악성종양이며, 일상에서 좀처럼 접하지 못한다(발생률이 백만명당 약 0.6명임). T-PLL은 또한 매우 불량한 예후를 가지며, T-PLL에 걸린 환자의 전체 생존 중위 기간은 종래의 화학 요법으로 대략 7개월이다.

[0028] 전형적으로 T-PLL에 걸린 환자는 림프절병증과 간비종대를 동반하며 말초 혈액에서 기하급수적으로 상승하는 림프구 카운트, 및 골수 침범을 나타낸다.

[0029] 환자에게 투여되는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 치료적 유효량은, 임의의 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 이익/위험 비로, 치료 대상체에 대해 본 발명에 따른 치료 효과를 부여하는 양이다. 치료 효과는 객관적일 수 있거나(즉, 일부 시험 또는 마커에 의해 측정 가능함) 또는 주관적일 수 있다(즉, 대상체가 효과의 표시를 제공하거나 효과를 감지함). 본 발명에 따른 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 유효량은, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이 환자의 신체 표면적 m^2 당 0.3 mg 내지 300 mg 또는 환자의 신체 표면적 m^2 당 20 mg 내지 150 mg의 투여량 범위로 포함되는 양으로 여겨진다.

- [0030] 임의의 특정 환자에 대한 특정 치료적 유효 용량 수준은 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로, 및 사용되는 특정 화합물의 배출 속도; 치료 기간; 사용되는 특정 화합물과 조합하여 또는 그와 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자들을 비롯한 다양한 인자에 좌우될 것이다.
- [0031] "전이성 암". 암은 신체 내에서 확산하는 능력을 갖는다. 암 세포는 근처의 정상 조직 내로 이동함으로써 국소적으로 확산될 수 있다. 암은 근처의 림프절, 조직, 또는 기관으로 또한 국지적으로 확산될 수 있다. 따라서, 암은 신체의 멀리 떨어져 있는 부분까지 확산될 수 있다. 이것이 발생할 때, 이는 전이성 암(IV기 암으로도 알려짐)이라고 일컬어지며, 신체의 다른 부분으로 암 세포가 확산되는 과정은 전이라고 일컬어진다. 따라서, 전이의 경우, 암 세포는 그것이 최초로 형성된 곳(원발성 암)으로부터 떨어져 나와서, 혈액 또는 림프계를 통해 이동하여, 신체의 다른 부분에서 새로운 종양(전이성 종양)을 형성한다.
- [0032] 전이성 암 세포는 원발성 암과 유사한 특징을 가지며, 암이 발견된 장소에 있는 세포와는 유사하지 않은 특징을 가진다. 이는 의사들이 암이 전이성인지 여부를 구별할 수 있게 한다. 전이성 암에는 원발성 암과 동일한 명칭이 주어진다. 예를 들어, 폐로 확산된 유방암은 폐암이 아닌 전이성 유방암으로 일컬어진다. 이는 폐암이 아닌 IV기 유방암으로 취급된다.
- [0033] 전이성 T-PLL은 신체의 새로운 위치로 전이된 T-세포 전립프구성 백혈병을 지칭한다. 이러한 암은 IV기 T-PLL 암으로 취급된다.
- [0034] "진행성 암"은 치유가 가능하지 않지만 치료에 반응하는 암이다. 질병 유도(disease-directed) 요법이 여전히 매우 중요한데, 이는 그것이 수명을 연장시키기 때문이다. 말기 암의 경우, 요법은 질병의 진행성 성질로 인해 생존을 유의하게 연장시킬 수 없고, 완화 치료(palliative care)가 주요 치료 옵션이다.
- [0035] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 투여 형태의 적합한 예에는 경구, 국소, 비경구, 설하, 직장, 질, 안구, 및 비내 투여 형태가 제한없이 포함된다. 비경구 투여는 피하 주사, 정맥내, 근육내, 흉골내 주사 또는 주입 기법을 포함한다. 바람직하게는, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 비경구적으로 투여되고, 가장 바람직하게는 정맥내 투여된다.
- [0036] 바람직하게는, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 이를 필요로 하는 환자에게 환자의 신체 표면적 m^2 당 0.3 mg 내지 300 mg의 투여량 수준으로 정맥내 투여된다.
- [0037] 바람직하게는, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 이를 필요로 하는 환자에게 환자의 신체 표면적 m^2 당 20 mg 내지 150 mg의 투여량 수준으로 정맥내 투여된다.
- [0038] 본 발명의 실시 형태에서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약품 바람직하게는 각각의 치료 사이클의 1일째에 이를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0039] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 21일 치료 사이클의 1일째에 투여될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 실시 형태에서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약품은 이를 필요로 하는 환자에게 60분의 주입 시간; 또는 45분의 주입 시간; 또는 30분의 주입 시간에 걸쳐 투여된다.
- [0041] 본 발명에 따른 실시 형태에서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 이를 필요로 하는 환자에게, 21일 치료 사이클의 1일째에, 60분의 주입 시간에 걸쳐, 환자의 신체 표면적 m^2 당 20 mg 내지 150 mg의 투여량 수준으로 투여된다.
- [0042] 본 발명의 실시 형태에서, T-PLL을 치료하기 위한 설명서와 함께 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0043] 설명서는 치료되는 T-PLL의 상태; 환자의 연령, 체중, 전반적 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로, 및 사용되는 특정 화합물의 배출 속도; 치료 기간; 사용되는 특정 화합물과 조합하여 또는 그와 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자들과 같은 변수에 따라 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여할 것을 권고할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 추가의 실시 형태에서, 상기 치료를 필요로 하는 환자는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의한 T-PLL의 치료와 함께(그러한 치료 전, 그러한 치료 동안 또는 그러한 치료 후를 포함함) 방사

선 요법을 제공받는다. 본 발명의 실시 형태에서, 환자는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 방사선 요법으로 치료된다. 바람직하게는, 환자는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의한 치료 전에 방사선 요법 치료를 제공받는다. 방사선 요법은 연속 5일 내지 10일에 걸쳐 1 Gy 내지 5 Gy의 선량으로, 바람직하게는 연속 5일 내지 10일에 걸쳐 2 Gy의 선량으로 제공될 수 있다.

- [0045] 본 발명의 추가의 실시 형태에서, 상기 치료를 필요로 하는 환자는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의한 T-PLL의 치료 전 또는 그러한 치료 후에 방사선 요법을 제공받는다. 바람직하게는, 환자는 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 의한 치료 전에 방사선 요법 치료를 제공받는다. 방사선 요법은 연속 5일 내지 10일에 걸쳐 1 Gy 내지 5 Gy의 선량으로, 바람직하게는 연속 5일 내지 10일에 걸쳐 2 Gy의 선량으로 제공될 수 있다.
- [0046] 경구 투여용으로 의도된 경우, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약은 고체 또는 액체 형태일 수 있으며, 이때 반-고체, 반-액체, 현탁액 및 겔 형태가 본원에서 고체 또는 액체로 간주되는 형태에 포함된다.
- [0047] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약은 약학 분야에 잘 알려진 방법을 이용하여 투여용으로 제조될 수 있다. 적합한 약제학적 제형 및 담체의 예는 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E. W. Martin]에 기재되어 있다.
- [0048] 경구 투여용 고체 조성물로서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 분말, 과립, 압축 정제, 알약, 캡슐, 추잉 껌, 웨이퍼 등의 형태로 제형화될 수 있다. 그러한 고체 조성물은 전형적으로 하나 이상의 비활성 희석제 또는 담체를 함유한다. 담체 또는 희석제로서 일반적으로 사용되는 임의의 비활성 부형제, 예컨대 당, 폴리알코올, 가용성 중합체, 염 및 지질이 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 당 및 폴리알코올은 락토스, 수크로스, 만니톨, 및 소르비톨을 제한없이 포함한다. 사용될 수 있는 예시적인 가용성 중합체는 폴리옥시에틸렌, 폴록사머, 폴리비닐피롤리돈, 및 텍스트란이다. 유용한 염은 염화나트륨, 염화마그네슘, 및 염화칼슘을 제한없이 포함한다. 사용될 수 있는 지질은 지방산, 글리세롤 지방산 에스테르, 당지질, 및 인지질을 제한없이 포함한다.
- [0049] 또한, 다음 중 하나 이상이 존재할 수 있다: 결합제, 예컨대 카르복시메틸셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 전분, 락토스 또는 텍스트린, 붕해제, 예컨대 알긴산, 알긴산나트륨, 옥수수 전분 등; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트; 활택제, 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제, 예컨대 수크로스 또는 사카린; 착향제, 예컨대 페퍼민트, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 착향료; 및 착색제.
- [0050] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 조성물이 캡슐(예를 들어, 젤라틴 캡슐)의 형태일 때, 이는, 상기 유형의 물질에 더하여, 폴리에틸렌 글리콜, 사이클로텍스트린 또는 지방 오일과 같은 액체 담체를 함유할 수 있다.
- [0051] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 조성물은 액체, 예를 들어, 엘릭시르, 시럽, 용액, 에멀전 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 액체는 경구 투여 또는 주사에 의한 전달을 위해 유용할 수 있다. 경구 투여용으로 의도된 경우, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 조성물은 감미제, 방부제, 색소/착색제 및 풍미 향상제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 주사에 의한 투여를 위한 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 조성물에는, 계면활성제, 방부제, 습윤제, 분산제, 현탁제, 완충제, 안정제 및 등장제 중 하나 이상이 또한 포함될 수 있다.
- [0052] 바람직한 투여 경로는 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비내, 경막외, 비내, 뇌내, 뇌실내, 척추강내, 질내 또는 경피 투여를 포함하지만 이로 한정되지 않는 비경구 투여이다. 바람직한 투여 방식은 진료의의 재량에 맡겨지며, 의학적 질환의 부위(예컨대 암의 부위)에 부분적으로 좌우될 것이다. 더 바람직한 실시 형태에서, 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약은 정맥내 투여된다.
- [0053] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약의 액체 형태는 용액, 현탁액 또는 기타 유사 형태일 수 있으며, 또한 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 식염수, 바람직하게는 생리 식염수, 링거액, 등장성 염화나트륨, 고정유, 예컨대 합성 모노글리세리드 또는 다이글리세리드, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 또는 다른 용매; 향균제, 예를 들어 벤질 알코올 또는 메틸 파라벤; 및 긴장성(tonicity) 조정제, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스. 비경구 조합물 또는 조성물은 유리, 플라스틱 또는 다른 재료로 제조된 앰플, 일회용 주사기 또는 다회-용량 바이알 내에 봉입될 수 있다. 생리 식염수가 바람직한 애주번트이다.

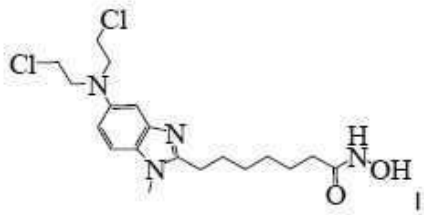
[0054] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 이를 포함하는 의약은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어 주입 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내층을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 바람직하게는 볼루스에 의해 투여될 수 있다.

[0055] 티노스타무스틴 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 조성물의 예는 W02013/040286에 개시되어 있다.

[0056] 본 발명은 하기 비-제한적 실시예를 고려하여 추가로 이해될 수 있다.

[0057] 실시예

[0058] 하기 실시예에서, 하기 화학식 I을 갖는 화합물은 EDO-S101로 지칭된다.



[0059]

[0060] EDO-S101은 WO-A-2010/085377의 실시예 6에 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0061] 재료 및 방법

[0062] EDO-S101 및 대조 화합물

[0063] EDO-S101은 EDO MundiPharma에 의해 제공받았으며, WO-A-2010/085377의 실시예 6에 기술된 바와 같이 합성된 것이었다.

[0064] 벤다무스틴은 EDO MundiPharma에 의해 제공받았다.

[0065] 보리노스탤(vorinostat)(SAHA)(카탈로그 참조 번호 SML0061-5mg) 및 플루다라빈은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[0066] 세포 배양

[0067] 1% L-글루타민(200 mM; Sigma-Aldrich), 10% 소 태아 혈청(FBS)(Sigma-Aldrich) 및 페니실린/스트렙토마이신(100 U/0.1 M; PAA)이 보충된 RPMI-1640 배지(Sigma-Aldrich)를, 원발성 T-PLL 세포, 건강한 CD3+ T 세포, HH 세포의 현탁 배양물에 대한 시험관내 실험을 위해 그리고 NKtert 세포를 사용한 공동 배양 실험에 사용하였다. 세포 현탁액을 모든 세포 배양 실험을 위해 1.0×10^6 세포/mL(원발성 T-PLL 세포) 및 2.5×10^5 세포/mL(HH 세포)의 밀도로 유지시켰다.

[0068] 세포를 90% 습도를 갖는 37°C 및 5% CO₂의 HERAcell 인큐베이터(Thermo Scientific Heraeus)에서 배양하였다.

CD4+ 성숙 T-세포 백혈병 HH 세포는 본래 세자리 증후군(Sézary Syndrome) 환자로부터 분리된 것이었다(문헌 [Starkebaum et al., 1991]). NKtert(인간 골수 기질 세포[BMSC])는 2011년에 RIKEN 셀 뱅크(Cell Bank)로부터 구입한 것이었다. 구입한 바와 같은 본래의 세포 스톡(stock)으로부터 유래되며 액체 질소에서의 장기간 보관 전에 2회 내지 3회 계대 동안 증식된 세포만을 사용하였다. 10회째 계대(배양한 지 4주 내지 6주) 후에 세포 배양을 종결하였다. 해동 후에 특징적인 성장 거동의 평가에 의해 그리고 유세포 분석법에 의해 세포를 인증하였다. 표준 PCR 프로토콜(프라이머: for1: 5'-acaccatgggagytgtaaat-3'(서열 번호 1), rev1: 5'-cttcwtgcattcagaccaaggcat-3'(서열 번호 2), for2: 5'-gtgsggmtggatcacctcct-3'(서열 번호 3), rev2: 5'-gcatccaccawawacyctt-3'(서열 번호 4))을 이용하여 마이코플라스마의 존재에 대해 세포를 정례적으로 시험하였다.

[0069] 건강한 CD3+ T-세포를 건강한 인간 공여자로부터 분리하였다.

[0070] 공동 배양 실험의 경우, 인간 골수 기질 세포(BMSC) NKtert 세포(일본에 소재한 RIKEN BRC)를 1.5×10^4 세포/웰(96 웰 플레이트)의 농도로 시딩(seeding)하고, 5% CO₂ 중의 37°C에서 인큐베이션하였다. 24시간 후에, 대략

60% 내지 80% 컨플루언시의 NKtert 세포를 RPMI-1460 중에서 0.02 mg/mL의 마이토마이신 C로 3시간 동안 처리하고, 이어서 PBS(Life Technologies)로 2회 세척하였다. 추가 24시간 후, 4×10^5 개의 T-PLL 세포를 (피더(feeder) 세포 지원과 함께 그리고 그러한 지원없이) 웰마다 첨가하고, 지시된 화합물로 48시간 동안 처리하였다.

[0071] 시험관내 약물 치료 및 세포 생존력

[0072] EDO-S101(EDO MundiPharma), 및 보리노스탯(SAHA; SML0061-5mg, Sigma-Aldrich)을 DMSO 중에 용해시켰다. 알킬화제인 벤다무스틴(MundiPharma)을 메탄올 중에 용해시켰다. 세포를 지시된 농도의 각각의 화합물(또는 화합물들)로 지시된 시간에 처리하였다. 투약은 공개된 범위 및 IC_{50}/LD_{50} 적정에 기초하였다. 아넥신-V(AnxV) 및 7AAD에 대한 이중 염색을 이용하여 유세포 분석법을 통해 세포 아포토시스를 결정하였다.

[0073] 인간 원발성 T-PLL 세포는, 부분적으로, 높은 수준의 계층 불균일성 및 가변적 표현형으로 인해, 표준 실험실 세포 배양 조건 하에서의 배양에 부적합하다. HH 세포는 고도로 화학 요법 내성인 피부 림프종으로부터 유래되며, 실험실 조건 하에서의 배양에 적합하다. HH 세포는 T-PLL 세포와 유사한 표현형을 나타내며, 그에 따라 시험관내 실험을 위한 T-PLL 세포에 대한 대용 세포주로서 빈번하게 사용된다. 따라서, EDO-S101의 시험관내 검증을 위해 HH 세포를 선택하였다.

[0074] 뮤린 모델

[0075] DBA2xC57B6JF1 마우스를 모든 실험에서 수령체로서 사용하였다. CD2-MTCP1p13 tg 마우스로부터 유래된 이식 가능한 백혈병/림프종 세포(문헌[Gritti et al, Blood 1998, 92, 268-73]; 혈액, 비장, 및 골수)를 (균일한 코호트의 생성을 용이하게 하기 위해) 백그라운드-일치(background-matched) 마우스 내로 복강내 주사하였다. CD2-MTCP1p13 마우스로부터의 1×10^7 개 세포를 동계 수령체(n=26) 내로 복강내 주사하였다. 이식 후 10 일째에서 시작하여, 백혈병 혈액 백혈구(WBC)의 균일한 분포를 갖는 마우스들을 선택하고, 이들을 4개의 처리 그룹으로 무작위로 배정하였다. 이어서, 각각의 그룹을 지시된 용량으로 지시된 일자에 비히클 대조군(DMSO), 플루다라빈(34 mg/kg, 10일째, 15일째, 17일째, 21일째), 벤다무스틴(10일째에 60 mg/kg, 15일째, 17일째, 21일째에 20 mg/kg), 및 EDO-S101(10일째에 50 mg/kg, 15일째, 17일째, 21일째에 20 mg/kg)으로 처리하였다.

[0076] Δ JAK1 마우스로부터 유래된 이식 가능한 백혈병/림프종 세포(문헌[Heinrich et al, Mol. Ther. 2013, 21, 1160-8]; JAK1을 활성화시키는 삼입 돌연변이 유발에 기초한 결절/비장 성숙 T-세포 림프종)를 (균일한 코호트의 생성을 용이하게 하기 위해) 백그라운드-일치 마우스 내로 정맥내 주사하였다. 2.5×10^6 개 세포를 Rag1-결손 마우스 내로 정맥내 이식하였다. 이어서, 유사한 백혈구 카운트의 수령체들을 4개의 처리 그룹으로 무작위로 나누었다. 이어서 각각의 처리 그룹을 7일째, 10일째, 13일째, 17일째, 22일째에 18 mg/kg의 벤다무스틴, 플루다라빈, EDO-S101로, 또는 비히클 대조군(DMSO)으로 처리하였다.

[0077] 환자 샘플

[0078] WHO 기준에 따라 진단된 T-PLL 환자의 말초 혈액(PB)으로부터 T-PLL 세포를 분리하였다(문헌[Swerdlow, S. H. et al Blood 2016, 127, 2375-90]; 문헌[Herling et al Blood 2004, 104, 328-335]). 진단은 임상적 특징, 면역표현형(유세포 분석법 및 조직화학; TCL1A/MTCP1 발현을 포함함), FISH/핵형, 및 분자 연구(TCRmonoclonality)에 기초하였다. 헬싱키 선언(Declaration of Helsinki)에 따라 고지된 서면 동의 후에 임상시험 심사 위원회(institutional review board)(IRB)-승인 프로토콜 하에서 인간 종양 샘플을 얻었다. 수집 및 사용은 유니버시티 하스피탈 오브 콜른(University Hospital of Cologne)의 윤리 위원회에 의해 연구 목적으로 승인되었다(#11-319). TPLL120(NCT00278213) 및 TPLL2(NCT01186640, 미공개됨) 전향적 임상 시험의 일부로서 또는 독일 CLL 스터디 그룹(German CLL Study Group)의 전국적 T-PLL 레지스트리(IRB# 12-146)에 포함된 바와 같은 단일-제제 알렘투주맙 또는 플루다라빈-미토산트론-사이클로포스파미드(FMC) + 알렘투주맙 화학면역 요법에 의한 균일한 제1선 처리(사례들의 87%)에 기초하여 환자 코호트를 선택하였다. 진단시, 환자들의 중위 연령은 62세였으며, 여성보다 1.5배 더 많은 남성을 포함하였다. FISH 분석은 표준 프로토콜(Vysis, Abbott)을 이용하였다.

[0079] 웨스턴 블롯 분석

[0080] T-PLL 세포를 T-PLL 환자의 말초 혈액(PB)으로부터 분리하였다. T-PLL 세포를 현탁 배양하고, 벤다무스틴(1 μ M), 보리노스탯(1 μ M), EDO-S101(1 μ M) 또는 보리노스탯/벤다무스틴의 등몰 조합물(1 μ M)로 지시된 농도로

36시간 동안 처리하였다. 이 시간 후에, 세포를 수거하여 용해시키고, 세포 용해물을 초음파 처리하고, 원심분리하여 임의의 세포 잔해를 제거하고, 상청액을 수집하였다. 각각의 세포 용해물 용액(상청액)의 단백질 농도를 결정하고, 표준 방법을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0081] 사용된 항체는 acHistone 3(Sigma Aldrich), 포스포-ATM 세린1981(Sigma Aldrich), ATM(Sigma Aldrich), 포스포-KAP-1 세린824(Sigma Aldrich), KAP-1(Sigma Aldrich), 포스포-p53 세린15(Sigma Aldrich), 아세틸-p53(Sigma Aldrich), p53(Sigma Aldrich), PARP(Sigma Aldrich), 절단-PARP(Sigma Aldrich), 및 β -액틴(Sigma Aldrich)이었다.

[0082] 실시예 1 - 세포 생존력

[0083] 벤다무스틴 및 보리노스탤(SAHA)과 비교하여 EDO-S101의 세포독성을 평가하기 위하여, HH 세포를 EDO-S101, 벤다무스틴, 보리노스탤 또는 등물의 벤다무스틴/보리노스탤 조합물로 48시간의 기간에 걸쳐 처리하였다. 세포를 지시된 화합물의 0.1 μ M, 1 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M 또는 10 μ M 용액으로 처리하였다(도 1a).

[0084] 처리 후, 세포를 아포토시스 마커인 아넥신-V 및 7-AAD로 염색함으로써 세포 사멸을 평가하였고, 유세포 분석법에 의해 아포토시스 세포의 수를 정량하였다. 아넥신-V는 아포토시스 세포를 특이적으로 표적화하고 확인한다. 7-AAD는 후기 아포토시스 세포, 또는 괴사 세포의 마커이다. 아넥신-V 및 7-AAD 음성 세포의 수를 각각의 샘플에 대해 카운팅하였다. 각각의 실험을 지시된 횟수 동안 반복하였고, 아포토시스 음성 세포의 평균 수를 플롯팅하고 미처리된 대조 샘플에 대해 정규화하였다(도 1a). 후속하여 각각의 처리에 대한 용량 반응 곡선(도 1b)을 플롯팅하고, 각각의 처리의 LD₅₀(중위 치사 용량)을 결정하였다.

[0085] 벤다무스틴과 보리노스탤의 등물 조합물(LD₅₀: 1.1 μ M), 및 EDO-S101(LD₅₀: 1.5 μ M)은 48시간 처리 후에 HH 세포 사멸 유도에서 현저한 효능을 나타냈다. 벤다무스틴/보리노스탤 조합물 및 EDO-S101 둘 모두는 낮은 마이크로몰 범위에서 LD₅₀ 값을 나타냈다. 더욱이, EDO-S101 및 벤다무스틴/보리노스탤 조합 치료 둘 모두는 단일 제제로서의 보리노스탤(LD₅₀: 2.7 μ M) 및 벤다무스틴(LD₅₀: 8.0 μ M)과 비교하여 향상된 세포독성을 나타냈다.

[0086] 실시예 2 - 환자 T-PLL 샘플의 웨스턴 블롯 분석

[0087] T-PLL 세포(L1238*에서 ATM 돌연변이됨, 단일-대립유전자 ATM 손실, 카피 수 = 1.41)를 T-PLL 환자의 말초 혈액(PB)으로부터 분리하고, 현탁 배양하고, 1 μ M의 벤다무스틴(도 2, 라인 2), 보리노스탤(라인 3), EDO-S101(라인 5) 또는 보리노스탤/벤다무스틴의 등물 조합물(라인 4)로 36시간 동안 처리하였다. 이 시간 후에, 세포를 수거하고, 용해시키고, 웨스턴 블롯 분석에 의해 단백질 발현 수준을 결정하였다.

[0088] 도 2는, 음성 대조군(라인 1)과 비교한, 각 처리에 대한 세포 용해물의 웨스턴 블롯을 도시한다. β -액틴에 대한 염색을 각각의 웨스턴 블롯 실행(각각 a행 내지 k행, 및 l행 내지 o행)에 대한 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0089] HDAC 억제제는 히스톤의 탈아세틸화, 또는 다른 단백질의 탈아세틸화를 촉진하는 단백질을 표적화한다. 히스톤의 아세틸화 및 탈아세틸화는 DNA 복제 및 복구와 관련된 번역후 변형이며, 그에 따라 히스톤의 아세틸화 상태는 세포 복제 경로에서 중요하다. 따라서, HDAC 활성의 억제는 DNA 손상 반응의 유도과 연관된다. 이들 실험에서 사용된 HDAC 억제제는 보리노스탤 및 융합 분자 EDO-S101을 포함한다.

[0090] DNA 알킬화제는 DNA에 결합함으로써 정상적인 DNA 복제 경로가 기능하지 못하게 하고, 그에 따라 복제 스트레스를 야기한다. 야기된 손상을 복구하려는 시도에서, 세포는 DNA 손상 반응(DDR)으로 지칭되는 것으로 다수의 단백질을 동원한다. DDR에서 동원된 많은 단백질은 손상 및 복제 스트레스에 대한 바이오마커로서 사용될 수 있다. 그러한 바이오마커는 증가된 발현 수준의 γ H2AX, 인산화 ATM(pATM), 인산화 Kap1(pKap1), 및 p53의 안정화를 포함한다. 본 실시예에서 사용되는 DNA 알킬화제는 벤다무스틴, 및 융합 분자 EDO-S101(이는 또한 HDAC 억제제임)을 포함한다.

[0091] 도 2를 참조하면, EDO-S101에 의한 환자로부터 분리된 T-PLL 세포 샘플의 처리는, 벤다무스틴, 보리노스탤 또는 이들의 조합물에 의한 처리와 비교하여 DDR의 가장 유의한 유도를 가져왔음이 명백하다. EDO-S101로 처리된 세포는 γ H2AX(1열), pATM(b열), 및 pKAP1(d열)의 수준의 가장 큰 증가를 나타냈으며, 이들 모두는 DNA 손상 반응과 크게 관련된다. DDR의 유도에 따라, Kap1(e열)의 발현 수준은 pKap1의 수준과 상호 관련되었다. 이러한 결과는 EDO-S101이 보리노스탤 및 벤다무스틴과 비교하여 가장 강력한 DNA 알킬화 활성을 나타내고, 더욱이, EDO-

S101이 보리노스탤과 벤다무스틴의 조합물의 효능을 증가함을 나타낸다.

- [0092] DDR의 유도는 p53의 안정화(h열) 및 후속 인산화(f열) 및 p53의 아세틸화(아세틸-p53; g열)를 또한 가져온다. 도 2를 참조하면, EDO-S101에 의한 세포의 처리는 벤다무스틴, 보리노스탤 또는 이들의 조합물과 비교하여, 아세틸-p53(g열) 및 p-p53(f열)의 최대 축적을 가져왔다. 이러한 결과는 EDO-S101이 DNA 손상의 가장 강력한 유도 인자임을 추가로 뒷받침한다.
- [0093] DNA 손상이 광범위하고 DNA가 복구될 수 없는 경우, p53 경로는 세포 아포토시스를 유도하는 것을 담당한다. 한 가지 그러한 경로는 PARP의 절단을 특징으로 한다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이, EDO-S101에 의한 세포의 처리는, 벤다무스틴, 보리노스탤, 또는 이들의 조합물과 비교하여, 절단 PARP(cPARP; j열)의 최대 증가를 가져왔다. 이러한 데이터는 EDO-S101에 의한 처리가 T-PLL 세포에서 가장 광범위하고 회복할 수 없는 DNA 손상을 일으켜서 세포 아포토시스를 촉진함을 나타낸다. 더욱이, 이러한 데이터는 EDO-S101에 의한 환자로부터의 T-PLL 세포의 처리가 세포 아포토시스에 대해 기질 세포에 의해 부여되는 보호 효과를 효과적으로 극복함을 나타낸다.
- [0094] 도 2를 참조하면, EDO-S101에 의한 T-PLL 세포의 처리는, 보리노스탤 또는 보리노스탤과 벤다무스틴의 조합물과 비교하여, 히스톤3(acHistone3)의 아세틸화의 가장 큰 증가를 가져왔다. 이러한 데이터는 EDO-S101이 T-PLL 세포에서 보리노스탤 단독, 또는 벤다무스틴과 조합된 보리노스탤보다 더 효과적인 HDAC 억제제이었음을 나타낸다.
- [0095] 결론적으로, 도 2는 EDO-S101이 세포에서 가장 강한 DNA 손상 반응을 유도함을 나타낸다. 이는, 벤다무스틴 또는 보리노스탤과 비교하여, DNA 알킬화제로서 그리고 또한 HDAC 억제제로서의 그의 향상된 효능에 기인할 수 있다. 더욱이, EDO-S101에 의해 유도된 DNA 손상 및 과아세틸화는 보리노스탤과 벤다무스틴의 조합물에 의해 유도된 것을 증가함이 명백하다(예를 들어, pATM, 아세틸-p53, pKAP1, γH2AX 및 acHistone 3의 유사하게 상승된 수준 참조). 그 결과, 아포토시스는, 보리노스탤과 벤다무스틴의 조합물로 처리된 세포와 비교하여, EDO-S101 처리된 세포에서 강하게 유도된다(cPARP의 상승된 수준 참조).
- [0096] 실시예 3 - T-PLL에서의 기질 세포 매개된 보호에 대한 EDO-S101 처리된 세포의 아포토시스 및 내성의 유도
- [0097] EDO-S101로 처리된 세포에서 아포토시스를 추가로 평가하기 위하여, 원발성 인간 T-PLL 세포를, 0.01 μM, 0.1 μM, 1 μM, 5 μM 또는 10 μM 농도의, 보리노스탤, 벤다무스틴, EDO-S101, 또는 보리노스탤과 벤다무스틴의 등물 조합물로 처리하고, 48시간 동안 인큐베이션하였다. 처리 후, 세포를 아포토시스 마커인 아넥신-V 및 7-AAD로 염색함으로써 세포 사멸을 평가하였고, 유세포 분석법에 의해 아포토시스 세포의 수를 정량하였다. 각각의 실험을 지시된 횟수 동안 반복하였고, 아포토시스 음성 세포의 평균 수를 플롯팅하고 미처리된 대조 샘플에 대해 정규화하였다. 후속하여 각각의 처리에 대한 용량 반응 곡선(도 3a)을 플롯팅하고, 각각의 처리의 LD₅₀(중위 치사 용량)을 결정하였다.
- [0098] 각각의 처리에 대한 LC₅₀ 값을 보리노스탤(20.4 μM), 벤다무스틴(7.3 μM), EDO-S101(1.0 μM), 또는 보리노스탤과 벤다무스틴의 등물 조합물(4.4 μM)에 대해 계산하였다. EDO-S101에 대한 LC₅₀ 값은 유사한 실험 조건 하에서 HH 세포(1.5 μM)(도 1b)에서보다 원발성 인간 T-PLL 세포(1.0 μM)(도 3a)에서 더 낮은 것으로 밝혀졌으며, 이는 T-PLL 세포에 대한 향상된 효능을 나타낸다. 더욱이, EDO-S101(1.0 μM)은 보리노스탤과 벤다무스틴의 조합물(4.4 μM)과 비교하여 T-PLL 세포에 대해 효능의 대략 4배 증가를 나타냈다.
- [0099] 건강한 CD3+ T-세포에서의 EDO-S101의 LC₅₀은 4.4 μM인 것으로 결정되었으며, 이는 EDO-S101이, 실험 조건 하에서, 건강한 CD3+ T-세포와 비교하여 T-PLL 세포에 대해 대략 4배 더 강력함을 나타낸다. 이 결과는 EDO-S101이 건강한 T-세포에 비하여 T-PLL 세포에 대해 선택성을 갖는다는 것을 입증하였다.
- [0100] NKtert 골수 기질 세포는 약물의 효과에 대해 그리고 아포토시스에 대해 돌연변이된 T-세포를 보호하는 것으로 알려져 있다. 원발성 인간 T-PLL 세포에 대해 NKtert 세포에 의해 부여된 보호를 평가하기 위하여, EDO-S101에 의한 처리를 위해 NKtert 세포 및 T-PLL 세포를 공동 배양하였다. NKtert 세포와 공동 배양되거나(도 3b) 공동 배양되지 않은(도 3c) 원발성 T-PLL 세포를, 증가하는 농도(0.1, 1, 또는 10 μM)의 보리노스탤, 벤다무스틴, 보리노스탤과 벤다무스틴의 등물 조합물, 또는 EDO-S101로 처리하고, 48시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0101] 처리 후, 세포를 아포토시스 마커인 아넥신-V 및 7-AAD로 염색함으로써 세포 사멸을 평가하였고, 유세포 분석법에 의해 아포토시스 세포의 수를 정량하였다. 각각의 실험을 지시된 횟수 동안 반복하였고, 아포토시스 음성

세포의 평균 수를 미처리된 대조 샘플에 대한 비로 플롯팅하였다(도 3b, 도 3c).

[0102] 도 3b를 참조하면, 왼쪽 그래프 상의 대조군 샘플 0는 정상 T-PLL 세포에 대해 1로 정규화된다. 도 3c로부터 알 수 있는 바와 같이, T-PLL/NKtert 공동 배양된 세포에 대한 대조 샘플 0는 1보다 크며, 이는 단일 배양과 비교하여 NKtert 세포의 존재 하에서의 T-PLL 세포의 향상된 생존을 나타낸다.

[0103] 도 3b 및 도 3c를 참조하면, T-PLL 세포 및 T-PLL/NKtert 공동 배양된 세포 둘 모두는 EDO-S101에 의한 처리에 민감하였다. 10 μ M EDO-S101로 처리되었을 때, T-PLL 세포, 및 공동 배양된 T-PLL/NKtert 세포 둘 모두에서 광범위한 아포토시스가 관찰되었으며, 대략적인 세포 사멸 카운트는 95% 초과였다. 이러한 데이터는 EDO-S101에 의한 T-PLL 세포의 처리가 NKtert 세포에 의해 부여된 보호를 극복하였음을 나타낸다. 더욱이, 벤다무스틴, 보리노스텍, 또는 벤다무스틴과 보리노스텍의 등물 조합물로 처리된 T-PLL 세포는 공동 배양된 T-PLL 세포에서 NKtert 관련된 보호를 극복하는 데 있어서 EDO-S101만큼 효과적이지 않았다. 이러한 데이터는 EDO-S101에 의한 인간 T-PLL 세포의 처리가 세포 아포토시스의 핵심 지표인 cPARP의 가장 향상된 수준을 가져왔다는 관찰에 의해 추가로 뒷받침된다(도 2).

[0104] EDO-S101이 도 3c에 도시된 공동 배양된 T-PLL/NKtert 세포 실험에서 NKtert 세포의 생존력에 영향을 미칠 수 있는 것으로 가설이 세워졌다. 결과적으로, NKtert 골수 기질 세포(BMSC) 피더 세포 단독의 세포 생존력에 대한 효과를 또한 조사하였다. 세포를, 0.1, 1, 5 또는 10 μ M 농도의, 벤다무스틴, 보리노스텍, 벤다무스틴과 보리노스텍의 등물 조합물, 또는 EDO-S101로 처리하고, 48시간 동안 인큐베이션하고, MTT 검정을 이용하여 세포 생존력을 평가하였다(도 3d). 도 3d에서 알 수 있는 바와 같이, EDO-S101, 보리노스텍, 또는 보리노스텍과 벤다무스틴의 등물 조합물로 처리된 NKtert 세포의 생존력의 감소는 조사된 농도에 걸쳐 대체로 유사하였다. 벤다무스틴 처리는 NKtert 세포의 생존력에 대해 두드러진 농도 의존적 효과를 갖지 않았다. 중요하게는, 10 μ M의 EDO-S101 및 보리노스텍으로 처리된 세포의 생존력은 유사하였는데, 이는 EDO-S101에 의한 T-PLL/NKtert 공동 배양된 세포의 처리에 의해 유도된 세포 사멸(도 3c)이 NKtert 세포의 생존력 감소의 결과가 아니었다는 확신을 제공한다(도 3d).

[0105] 실시예 4 - EDO-S101에 의한 처리 후 백혈병 혈액 백혈구(WBC) 카운트의 생체내 분석

[0106] 앞서 기재된 바와 같이, CD2-MTCP1 마우스로부터 유래된 백혈병 세포를 마우스에 주사하였다(도 4a).

[0107] CD2-MTCP1 세포는 공격적이고 이식 가능한 서브라인(subline)이며, T-PLL 유사 모델로서 생체내 분석에 적합하다. 복강내 주사에 의한 CD2-MTCP1 세포의 이식 후 10일째에, 유사한 백혈병 혈액 백혈구(WBC) 카운트를 갖는 마우스들을 무작위로 4개의 그룹으로 나누었다. 각각의 그룹에, 이식 후 10일째, 15일째, 17일째, 19일째 및 21일째에, 지시된 용량의 플루다라빈(34 mg/kg), 벤다무스틴(10일째, 60 mg/kg; 15일째 내지 21일째, 20 mg/kg) 또는 EDO-S101(10일째, 50 mg/kg; 15일째 내지 21일째, 20 mg/kg)을 정맥내 투여하였다. 혈액의 샘플을 규칙적인 간격으로(이식 후 9일째 및 14일째에) 채취하였고, 이식 후 22일째에 마우스를 희생시켰다(도 4a).

[0108] 플루다라빈은 비교 화합물로서 실험을 위해 선택되었으며, 백혈병 및 림프종의 치료를 위한 FDA 승인된 화학 요법이다. 플루다라빈은 퓨린 유도체이며, DNA의 복제를 방해한다. 이는 세계 보건 기구(World Health Organisation)의 필수 의약품 목록(List of Essential Medicines)에 실려 있다.

[0109] 채취된 혈액 샘플을 백혈병 혈액 백혈구(WBC) 수준에 대해 분석하였고, 각각의 그룹에서의 평균 세포 카운트를 결정하였다. 14일째 및 9일째의 WBC 카운트의 비교는 벤다무스틴 및 EDO-S101이 대조 샘플 및 플루다라빈과 비교하여 WBC 세포의 증가를 유의하게 지연시켰음을 나타냈다(도 4b). 이러한 데이터는 EDO-S101 및 벤다무스틴이 수령 마우스에서 질병 진행의 개시를 지연시켰음을 나타냈다.

[0110] 이식 후 22일째에 마우스를 희생시킨 후, 각 마우스의 사후 비장 중량을 결정하였다(도 4c). 플루다라빈 또는 대조군으로 처리된 코호트와 비교하여 벤다무스틴 또는 EDO-S101로 처리된 마우스 코호트에서의 감소된 평균 비장 중량은 도 4b에서 앞서 논의된 발견을 확증한다. 따라서, 중앙 징후는, 플루다라빈 처리된 또는 대조군 코호트와 비교하여, EDO-S101 또는 단일-제제 벤다무스틴으로 처리된 코호트에서 덜 진행된 것으로 나타났다.

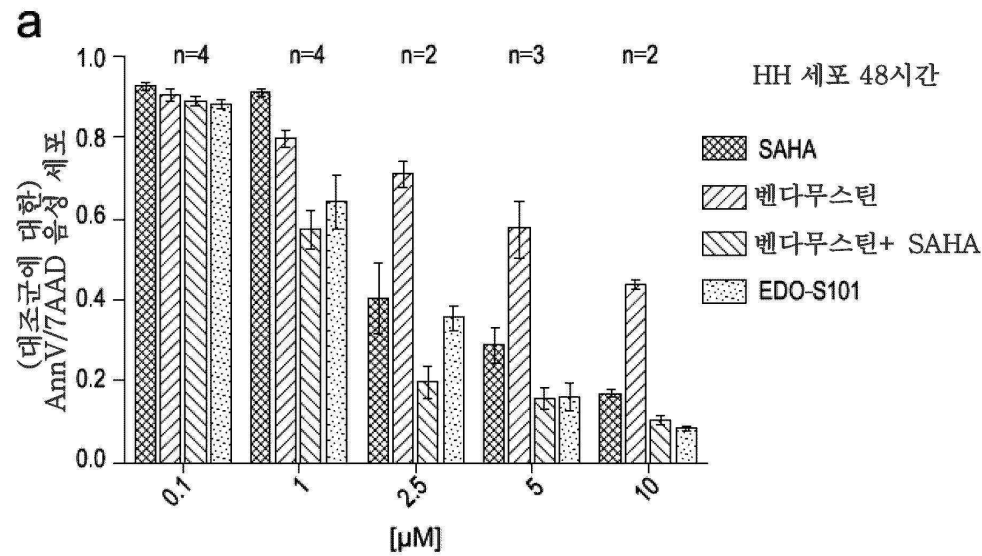
[0111] 실시예 5 - EDO-S101에 의한 처리 후 백혈병 혈액 백혈구(WBC) 카운트의 생체내 분석

[0112] 앞서 기재된 바와 같이, Δ JAK1 마우스로부터 유래된 백혈병/림프종 세포를 마우스에 주사하였다(도 5). Δ JAK1은 성숙 T-세포 림프종에 대한 모델이다. 마우스들을 이식 후 무작위로 4개의 그룹으로 나누었다. 각각의 그룹에 7일째, 10일째, 13일째, 17일째 및 22일째에 지시된 용량의 플루다라빈(18 mg/kg), 벤다무스틴(18 mg/kg) 또는 EDO-S101(18 mg/kg)을 정맥내 투여하였다. 각각의 코호트의 생존율을 시간의 함수로서 플롯팅하였

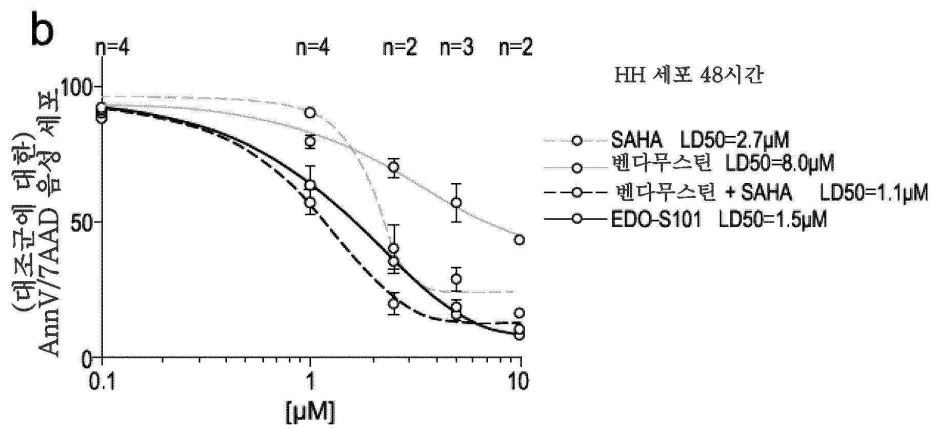
다(도 5). EDO-S101로 처리된 마우스의 전체 생존 기간(평균 생존 기간 26일)은 대조 마우스(평균 생존 기간 19일), 벤다무스틴(평균 생존 기간 18일) 또는 플루다라빈(평균 생존 기간 19일)과 비교하여 유의하게 연장된 것으로 밝혀졌다. 이러한 데이터는 EDO-S101에 의한 처리가 T-세포 림프종이 있는 마우스의 전체 생존 기간에 긍정적인 효과를 갖는다는 것을 나타내는데, 벤다무스틴 또는 플루다라빈과 비교하여 평균 생존 기간을 8일 증가시킨다.

도면

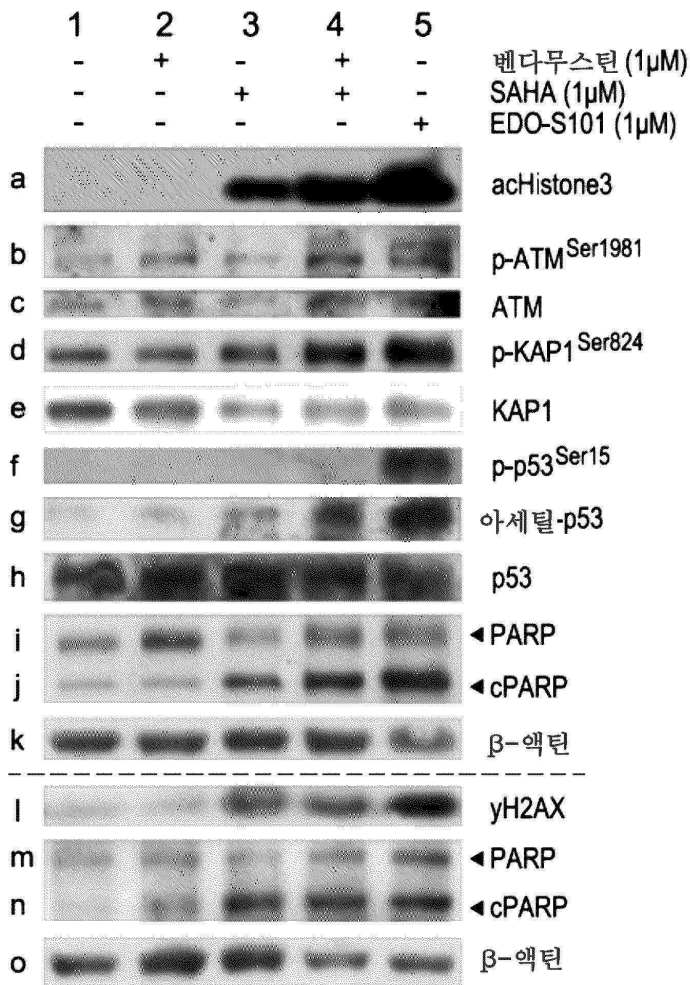
도면1a



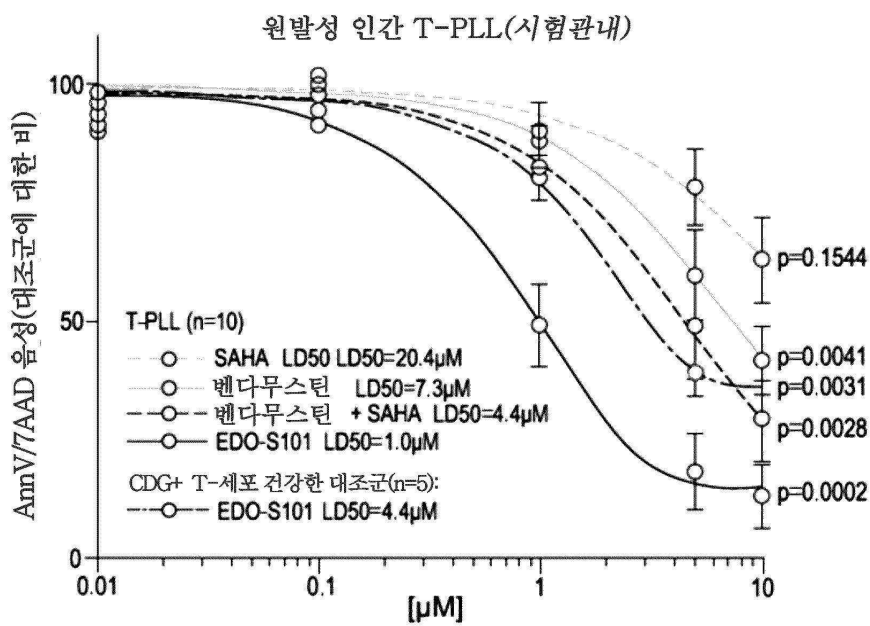
도면1b



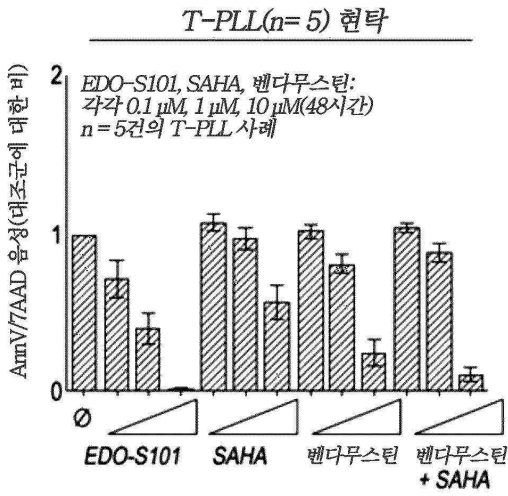
도면2



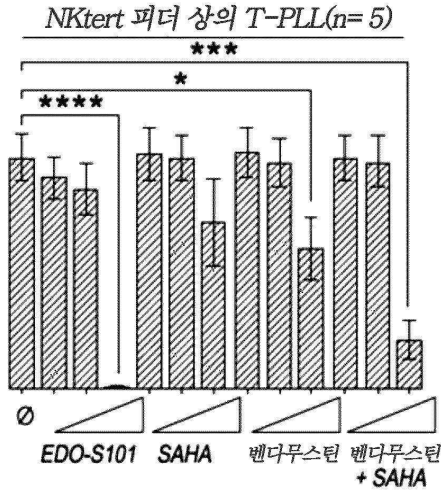
도면3a



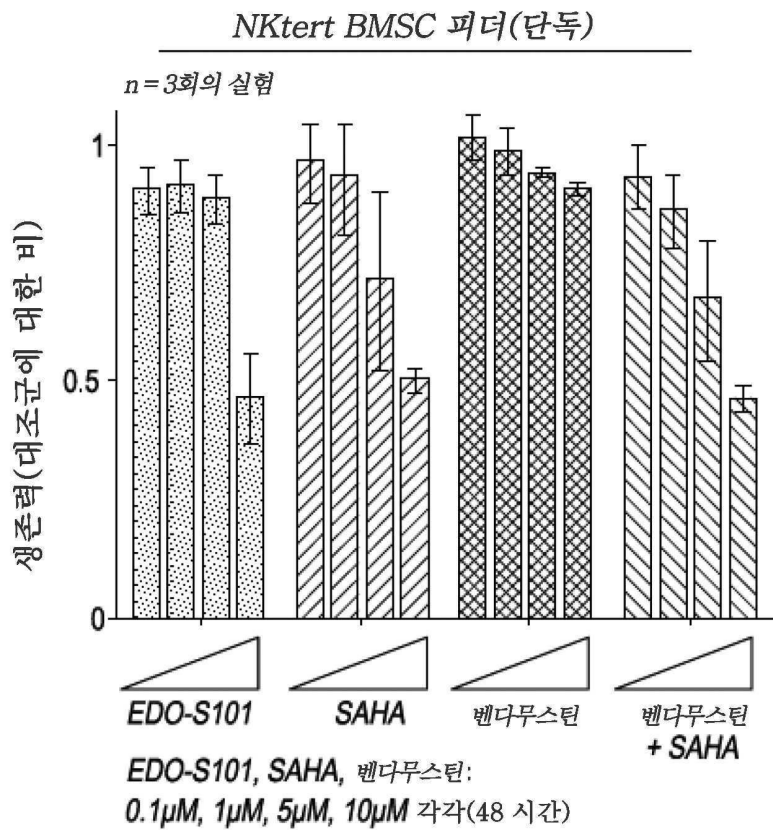
도면3b



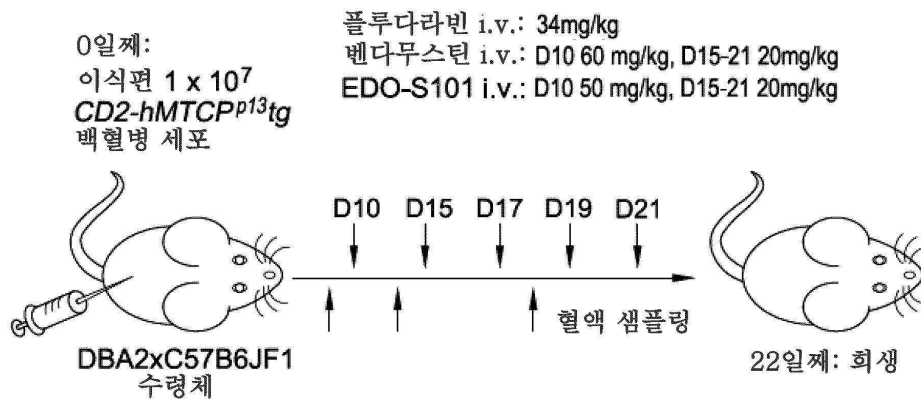
도면3c



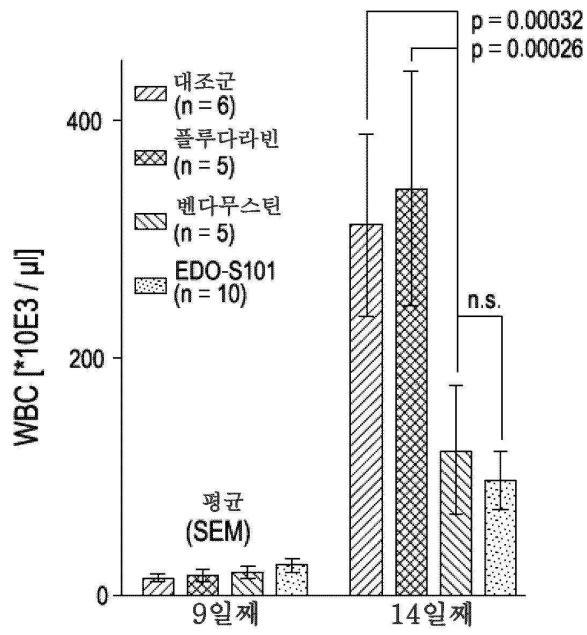
도면3d



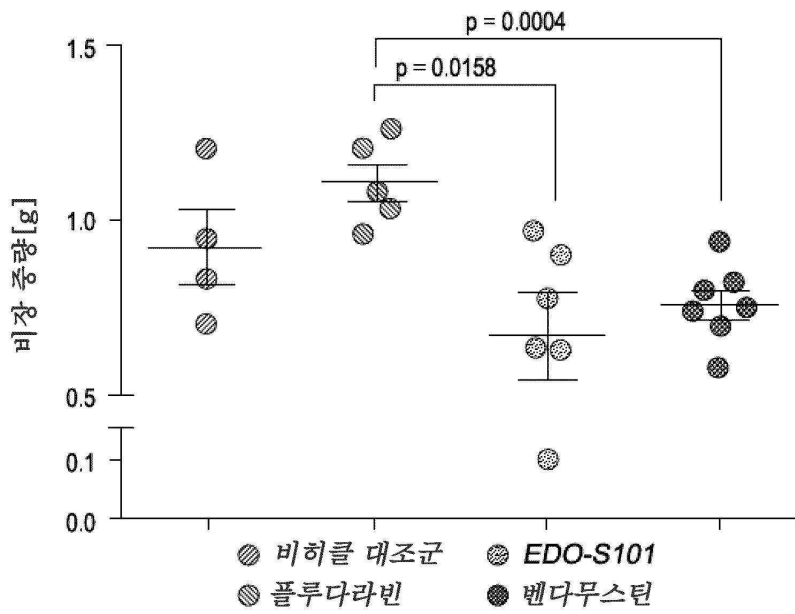
도면4a



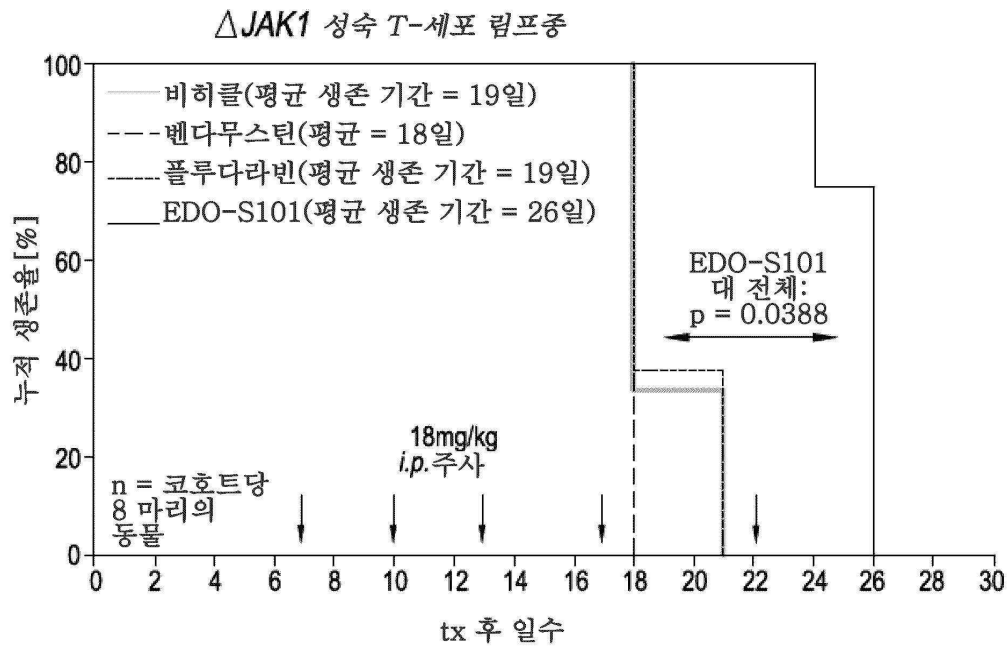
도면4b



도면4c



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Marks & Clerk LLP

Gurney, Steven

<120> Treatment of T-PLL

<130> PC928106W0

<140> PCT/EP2018/065664

<141> 2018-06-13

<150> GB 1709402.0

<151> 2017-06-13

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

acaccatggg agytggtaat

20

<210> 2	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 2	
cttcwtcgat tycagaccca aggcat	26
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
gtgsggmtgg atcacctcct	20
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
gcatccacca wawacyctt	19