



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0142746
(43) 공개일자 2019년12월27일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/5377</i> (2006.01) <i>A61K 31/496</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/553</i> (2006.01) <i>A61K 45/06</i> (2006.01)
 <i>A61P 35/02</i> (2006.01) <i>G01N 33/50</i> (2017.01)
 <i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/5377</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/496</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0072323
 (22) 출원일자 2019년06월18일
 심사청구일자 2019년06월18일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020180069510 2018년06월18일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 연세대학교 산학협력단
 서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)</p> <p>(72) 발명자
 박현우
 서울특별시 서대문구 통일로25길 30, 107동 905호 (홍제동, 홍제한양아파트)</p> <p>신지은
 서울특별시 은평구 연서로44길 7, 415동 1202호(진관동, 은평뉴타운 폭포동)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인충현</p> |
|---|--|

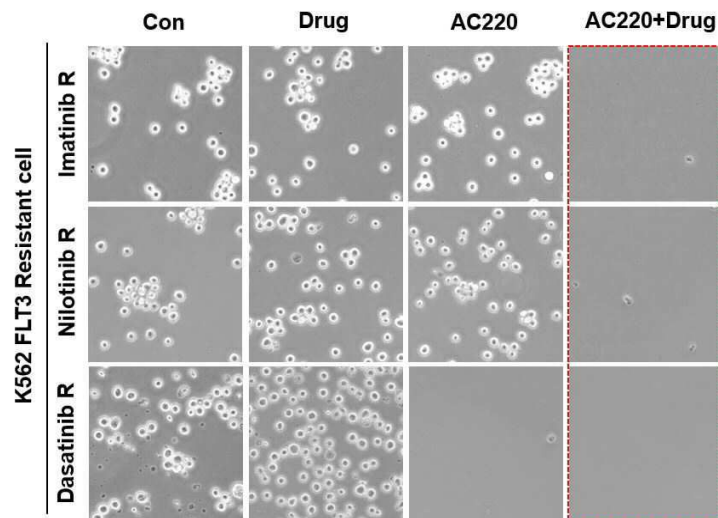
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **FLT3 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 약물 내성 억제용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 약물 내성 억제용 조성물을 제공한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/553 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/02 (2018.01)

G01N 33/5011 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 FLT3 억제제는 포나티닙(Ponatinib), 퀴자티닙(Quizartinib), 미도스타우린(Midostaurin), 도비티닙(Dovitinib), 아뮤바티닙(Amuvatinib), 탄듀티닙(Tandutinib), 소라페닙(Sorafenib), 길테리티닙(Gilteritinib), 크레놀라닙(crenolanib) 및 파크리티닙(Pacritinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 만성 골수성 백혈병(CML)은 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물은 티로신 키나아제(Tyrosine kinase) 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 티로신 키나아제 억제제는 이마티닙(Imatinib), 다사티닙(Dasatinib), nil로티닙(Nilotinib), 보수티닙(Bosutinib), 및 포나티닙(ponatinib)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

FLT3 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 FLT3 억제제는 포나티닙(Ponatinib), 퀴자티닙(Quizartinib), 미도스타우린(Midostaurin), 도비티닙(Dovitinib), 아뮤바티닙(Amuvatinib), 탄듀티닙(Tandutinib), 소라페닙(Sorafenib), 길테리티닙

(Gilteritinib), 크레놀라닙(crenolanib) 및 파크리티닙(Pacritinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 티로신 키나아제(Tyrosine kinase) 억제제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 티로신 키나아제 억제제는 이마티닙(Imatinib), 다사티닙(Dasatinib), 닐로티닙(Nilotinib), 보수티닙(Bosutinib), 및 포나티닙(ponatinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 만성 골수성 백혈병(CML)은 약물 내성(drug tolerance)인 약학적 조성물.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물의 스크리닝 방법:

(a) FLT3를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험 제제를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 시료 내 FLT3의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 FLT3의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험 제제는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물로 판정한다.

청구항 12

FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)에 대한 예방 또는 치료용 조성물의 반응성 예측용 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 FLT3 단백질의 발현량을 측정하는 제제는 상기 FLT3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 FLT3 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML) 진단용 조성물.

청구항 16

JAK(Janus kinase), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), TEAD(Transcriptional enhancer factor domain) 및 CD36로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물.

청구항 17

JAK(Janus kinase), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), TEAD(Transcriptional enhancer factor domain) 및 CD36로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 조성물은 티로신 키나아제(Tyrosine kinase) 억제제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 FLT3 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 약물 내성 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 백혈병은 골수 및 혈액의 암성 질환이다. 백혈병은 4가지 유형(만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병 및 급성 림프성 백혈병)으로 분류될 수 있다.

[0004] 빠르게 진행되는 급성 유형의 골수성 백혈병은 AML 또는 급성 골수성 백혈병으로 불린다. 점진적으로, 덜 침습적으로 진행되는 만성 유형의 골수성 백혈병은 CML 또는 만성 골수성 백혈병으로 불린다.

[0005] 만성 골수성 백혈병(Chronic myelogenous leukemia; CML)은 필라델피아 염색체(Philadelphia chromosome)를 지닌 조혈모세포의 클론이 비정상적으로 확장되면서 생기는 혈액암이다.

[0006] 만성 골수성 백혈병은 9번 염색체 및 22번 염색체의 전위(translocation)에 의해서 생긴 필라델피아 염색체에 의해서 발병한다.

[0007] 염색체 전위로 인해 9번 염색체의 ABL 유전자와 22번 염색체의 BCR 유전자의 융합이 일어나고, BCR-ABL 융합 유전자로 인해 비정상적인 티로신 키나아제(tyrosine kinase)의 활성을 갖는 BCR-ABL 융합 단백질이 생성된다. BCR-ABL 티로신 키나아제는 비정상적인 세포 분열을 유도한다.

[0008] 필라델피아 염색체는 CML의 원인 단백질인 Bcr-Abl 융합 단백질을 형성하고 지속적으로 활성화한다. 90% 이상의 만성 골수성 백혈병(CML) 환자에서 비정상적인

- [0009] Bcr-Abl 단백질이 발현되며, Bcr-Abl의 지속적인 활성화는 백혈병을 더욱 촉진한다.
- [0010] 만성 골수성 백혈병의 치료약물로서 이마티닙(Imatinib)은 글리벡으로 상품화되어 판매되고 있으나, 최근 글리벡에 내성을 갖는 다양한 돌연변이종이 보고되고 있다.
- [0011] 게이트키퍼(gatekeeper) 돌연변이종으로 알려진 T315I는 글리벡은 물론이고, 2세대 Bcr-Abl 억제제로 알려진 니로티닙(Nilotinib), 다사티닙(Dasatinib), 닐로티닙(Bosutinib) 등으로도 치료되지 않는다.
- [0012] 한편, 만성 골수성 백혈병은 3단계를 거쳐 병의 악성도가 증가된다고 알려진다.
- [0013] 만성 골수성 백혈병은 만성기, 가속기, 급성기로 분류할 수 있고, 급성기(blast crisis CML; bc-CML)의 경우 약물저항성이 매우 높고 병의 진행이 급격히 진행되어 생존률이 매우 낮다.
- [0014] 한편, 급성 골수성 백혈병(AML)의 경우 CML과 달리 90% 이상의 AML 환자들이 미분화 세포 상에 FLT3 발현을 나타낸다.
- [0015] 약30-40%의 AML 환자들이 FLT3의 활성화 돌연변이를 가지고 있음이 알려져 있으며, FLT3 돌연변이는 AML 환자들 의 가장 공통된 돌연변이이다.
- [0016] 이와 같이 CML 및 AML은 발생 기작이 상호 대응하지 않으므로, 상이한 약물이 처방되고 있으며 상호 교차하여 약물이 사용되고 있지 않다.
- [0017] 본 발명자들은 약물 내성으로 인해 치료되지 않는 CML을 치료하기 위한 다양한 방법을 연구하던 중 CML의 악성도가 증가함에 따라 FLT3 mRNA 발현이 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, 약물 내성으로 인해 생존율이 매우 낮은 급성기 CML 환자의 치료를 위한 새로운 타겟을 제시하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0019] (특허문헌 0001) 1. 국제특허출원 제PCT/US2010/028129호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0020] 본 발명은 만성 골수성 백혈병에 있어서 FLT3 및 약물 내성 간의 상호 연관성을 명확하게 규명하고, 약물 내성으로 인해 치료가 어려운 CML에 대한 근본적인 치료 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명의 일 측면에 따르면, FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물이 제공된다.
- [0023] 일 실시예에 있어서, 상기 FLT3 억제제는 포나티닙(Ponatinib), 퀴자티닙(Quizartinib), 미도스타우린(Midostaurin), 도비티닙(Dovitinib), 아뮤바티닙(Amuvatinib), 탄듀티닙(Tandutinib), 소라페닙(Sorafenib), 길테리티닙(Gilteritinib), 크레놀라닙(crenolanib) 및 파크리티닙(Pacritinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제일 수 있다.
- [0024] 일 실시예에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병(CML)은 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML)일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, FLT3 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0026] 일 실시예에 있어서, 상기 FLT3 억제제는 포나티닙(Ponatinib), 퀴자티닙(Quizartinib), 미도스타우린

(Midostaurin), 도비티닙(Dovitinib), 아뮤바티닙(Amuvatinib), 탄듀티닙(Tandutinib), 소라페닙(Sorafenib), 길테리티닙(Gilteritinib), 크레놀라닙(crenolanib) 및 파크리티닙(Pacritinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제일 수 있다.

- [0027] 일 실시예에서, 상기 FLT3 억제제는 티로신 키나아제(Tyrosine kinase) 억제제와 병용 투여될 수 있다
- [0028] 일 실시예에 있어서, 상기 티로신 키나아제 억제제는 이마티닙(Imatinib), 다사티닙(Dasatinib), 닐로티닙(Nilotinib), 보수티닙(Bosutinib), 및 포나티닙(ponatinib)으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있다.
- [0029] 일 실시예에 있어서, 상기 만성 골수성 백혈병(CML)은 약물 내성(drug tolerance)일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 다음의 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물의 스크리닝 방법이 제공된다:
- [0031] (a) FLT3를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시료 내 FLT3의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계, 상기 FLT3의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험 제제는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물로 판정한다.
- [0032] 본 발명의 다른 측면에 따르면, FLT3 단백질을 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)에 대한 예방 또는 치료용 조성물의 반응성 예측용 조성물이 제공된다.
- [0033] 본 발명의 다른 측면에 따르면, FLT3 단백질을 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML) 진단용 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명은 FLT3의 분자적 기작에 대한 명확한 이해를 바탕으로 효과적으로 CML 환자의 약물 내성을 억제하는 방법을 제공하며, 만성 골수성 백혈병에 대한 치료, 진단 또는 그 연구 등에 유용하게 활용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1 은 만성 골수성 백혈병의 진행에 따른 FLT3 및 TAZ mRNA 발현 변화를 측정한 것이다.
- 도 2는 CML 모방 세포에서 FLT3 및 약물 내성 간의 연관성을 규명한 것이다.
- 도 3은 CML 모방 세포에서 약물 내성에 따른 FLT3 및 TAZ 단백질의 발현량을 측정한 것이다.
- 도 4 및 5는 약물 내성을 획득한 CML 모방 세포에서 FLT3 억제제(퀴자티닙) 및/또는 CML 치료제 처리에 따른 세포 사멸 효과를 관찰한 것이다.
- 도 6 및 7은 약물 내성을 획득한 CML 모방 세포에서 FLT3 억제제(미도스타우린) 및/또는 CML 치료제 처리에 따른 세포 사멸 효과를 관찰한 것이다.
- 도 8은 FLT3 억제제의 약물 내성 억제 및 세포사멸 활성 시험 결과를 나타낸 그림으로, 포나티닙, 퀴자티닙(도 8a), 미도스타우린, 소라페닙(도 8b), 길테리티닙, 크레놀라닙(도 8c)에 의한 K562 세포의 사멸효과를 각각 보여준다.
- 도 9는 FLT3의 하위 조절인자인 JAK, STAT3, TAZ, TEAD 및 CD36에 대한 저해제의 약물 내성 억제 및 세포사멸 활성을 조사한 결과로서, JAK 억제제(도 9a), STAT3 억제제(도 9b), TAZ 억제제(도 9c), TEAD 억제제(도 9d) 및 CD36 억제제(도 9e)를 이마티닙과 함께 FLT3 형질 전환 K562 세포에 처리한 뒤 MTT 어세이를 수행한 결과를 각각 보여준다.
- 도 10은 FLT3의 하위 조절인자인 JAK, STAT3, TAZ, TEAD 및 CD36에 대한 저해제의 약물 내성 억제 및 세포사멸 활성을 조사한 결과로서, JAK 억제제(도 10a), STAT3 억제제(도 10b), TEAD 억제제(도 10c), TAZ 억제제(도

10d) 및 CD36 억제제(도 10e)를 이마티닙 없이 FLT3 형질 전환 K562 세포에 단독 처리한 뒤 MTT 어세이를 수행한 결과를 각각 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0039] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0040] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.
- [0041] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0042] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0043] 본 발명의 일 측면은 FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3) 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물을 제공한다.
- [0044] 상기 만성 골수성 백혈병(CML)은 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML)일 수 있다.
- [0045] 상기 “급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML)”는 만성 골수성 백혈병의 진행 경과 단계로 급성기 만성 골수성 백혈병은 만성기, 가속기, 급성기로 진행될 수 있다. 급성기는 급성 백혈병과 유사한 경과를 거치며, 만성기에서 급성기로 이행되는 시기는 수년에서 10년 이상으로 개인차가 있으나 75~80%에서 2.5~3년 후 급성기로 진행되는 것으로 알려져 있다.
- [0046] 상기 급성기 만성 골수성 백혈병은 정상 또는 만성기(CP) GMP에서 보이지 않는 특징인 획득된 자가 재생 능력을 갖는 과립구 대식세포 전구세포(granulocyte macrophage progenitor)-유사 세포들(GMP)의 모집단의 확장에 의해 특징지어질 수 있다.
- [0047] 상기 급성기(bc-CML)에는 약물 내성이 매우 높고 질병의 경과가 급격히 진행되어 종래 CML 치료제에 의한 치료가 어려웠으나, 본 발명자들은 FLT3 억제제를 처리함으로써 상기 약물 내성을 현저히 완화시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0048] 상기 “FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3)” 리간드는 다중 조혈계의 전개에 영향을 미치는 사이토카인의 일종이다. 상기 효과는 FLT3 수용체에 FLT3L이 결합함으로써 발생하고, 조혈모세포 및 전구세포에서 발현되는 수용체 타이로신 키나아제(RTK)인 STK-1과 태아 간 키나아제-2(flk-2)의 관계로 설명될 수 있다.
- [0049] 상기 FLT3 유전자는 정상적인 조혈과정에서 세포의 증식, 분화 및 고사에 중요한 역할을 수행하는 멤브레인-스패닝 클래스 III RTK(membrane-spanning class III RTK)를 암호화한다.
- [0050] 상기 FLT3 리간드는 골수 기질세포 및 다른 세포에 의해 발현되고 다른 성장인자와 상승적으로 작용하여 줄기세포, 전구세포, 수지상세포 및 자연살상세포의 증식을 자극할 수 있다.
- [0051] 정상 골수에서 FLT3의 발현은 초기 전구세포에 한정되어 있으나, 혈액암에서는 FLT3가 높은 수준으로 발현되거나 FLT3의 돌연변이로 인하여 FLT3 수용체 및 분자 경로의 하류가 제어 불능한 양상으로 유도될 수 있다.
- [0052] 급성 골수성 백혈병(AML)은 성인 백혈병의 대다수를 차지하며, 어린이 백혈병의 15 내지 20%를 차지한다.
- [0053] 상기 급성 골수성 백혈병(AML)의 경우 CML과 달리 환자의 30%가 FLT3 단백질의 돌연변이에 의해 암이 유발되며, 90% 이상의 AML 환자들에서 미분화 세포 상에 FLT3 발현을 나타낸다.
- [0054] 현재 키나아제 영역의 점 돌연변이 또는 야생형 수용체의 과발현이 질병의 원인임을 제시하는 강력한 증거는 없으나, FLT3 발현은 질병의 진행에 기여하는 것으로 보고되고 있으며, 전임상 및 임상적 증거의 축적을 바탕으로

다수의 FLT3 억제제가 개발되어 현재 전임상 및 임상 시험을 통해 평가되고 있다.

- [0055] 따라서, 상기 FLT3 활성을 억제하는 약물이 AML 치료를 위해 개발되어 현재 임상시험 단계에 있으나, CML의 치료에 있어서 사용되거나 FLT3 및 약물 내성 간의 관련성은 알려진 바 없다.
- [0056] 본 발명자들은 만성 골수성 백혈병 환자의 단계별 mRNA 발현량을 분석한 결과 AML에서만 발현하는 것으로 보고된 FLT3가 CML의 경과에 따라 급격히 증가하는 것을 확인하였으며, CML에서 FLT3를 새로운 항암 약물 타겟으로 활용하고자 하였다.
- [0057] 상기 “약물 내성”은 특정한 약물에 내성을 갖고 있거나, 또는 장기적으로 특정 약물을 투여할 때 암세포가 약물에 대한 저항성을 획득하여 약물에 의한 항암효과가 구현되지 않는 현상을 의미한다.
- [0058] 상기 “만성 골수성 백혈병(CML)”는 골수에서 골수 세포가 증가되어 조절되지 않는 성장 및 과도한 백혈구의 축적에 의해 야기하는 혈액학적 줄기세포 질환을 의미하는 것으로, 필라델피아 염색체를 가진 조혈모세포의 골수 내 비정상적인 증식에 의해 발생하는 질환을 포함한다.
- [0059] 상기 “억제제”는 상기 FLT3의 발현을 억제하거나 활성을 저하시켜 상기 FLT3 단백질이 관여하는 생물학적 경로를 차단하거나 지연시키는 물질을 의미할 수 있다.
- [0060] 상기 FLT3 억제제는 상기 FLT3와 상호 작용하여 활성을 억제할 수 있으면 족하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, aptamer, siRNA, shRNA, microRNA, 저해 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 “항체”는 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함하는 것이고, 신규한 항체 외에 이미 당해 기술분야에서 공지된 항체들도 포함할 수 있다. 상기 항체는 FLT3 단백질을 특이적으로 인식하는 결합의 특성을 갖는 한, 2개의 중쇄와 2개의 경쇄의 전체 길이를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체의 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv일 수 있다.
- [0062] 상기 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성될 수 있다. 상기 siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자 치료 방법으로 제공될 수 있다.
- [0063] 상기 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 상기 siRNA 말단 구조는 표적 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의해 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 또는 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다.
- [0064] 상기 점착 말단 구조는 3' 말단 돌출한 구조와 5' 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 또한 상기 siRNA는 표적 유전자의 발현 억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 한쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예컨대, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA 분자)를 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 siRNA 말단 구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중 사슬 RNA 일반의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스텝 루프형 구조일 수도 있다.
- [0066] 상기 siRNA는 그 자체로 폴리뉴클레오타이드 페어링을 갖는 완전한 형태, 즉 시험관 내에서 siRNA를 직접 합성한 두 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태이거나, 생체 내에 투여된 후 이러한 형태를 갖도록 하나의 단일쇄 올리고 뉴클레오타이드 단편과 이의 역방향(reverse) 상보물이 스페이서에 의해 분리된 단일쇄 폴리뉴클레오타이드로부터 유도될 수 있는 형태, 예컨대 상기 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 감염(infection) 과정을 거쳐 세포 안으로 도입되는 형태일 수 있다.
- [0067] 상기 “shRNA”는 siRNA의 고가의 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로 RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노 바이러스, 렌티 바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 이를 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있으며, 상기 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer or Rnase III에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 목적 유전자의 사

일련성을 유도할 수 있다.

- [0068] 일 실시예에 있어서, 상기 FLT3 억제제는 소분자 화합물일 수 있고, 예컨대 퀴자티닙(Quizartinib), 미도스타우린(Midostaurin), 도비티닙(Dovitinib), 아뮤바티닙(Amuvatinib), 탄듀티닙(Tandutinib), 길테리티닙(Gilteritinib), 및 파크리티닙(Pacritinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 상기 “퀴자티닙(AC220)”은 FLT3를 차단하는 억제제로서 경구 액상제(liquid oral form)로 설계되었으며, 미국 제약사 엠벳 바이오사이언스가 개발 중인 급성 골수성 백혈병 선두 후보물질이다.
- [0071] 본 발명의 다른 측면은 FLT3 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0072] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a)질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b)질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c)질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 FLT3 억제제는 만성 골수성 백혈병, 구체적으로는 급성기 만성 골수성 백혈병에서 고발현되는 FLT3를 억제함으로써 약물 저항성을 개선할 뿐 아니라 질환의 급격한 진행을 둔화시킴으로써 골수세포와 백혈구의 과다 증식으로 유발되었던 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 만성 골수성 백혈병의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 만성 골수성 백혈병에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0073] 본 명세서에서, 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0074] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다. 조성물의 “치료적 유효량”은 조성물을 투여하고자 하는 대상체에게 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 추출물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다. 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0076] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 티로신 키나아제(Tyrosine kinase) 억제제와 병용 투여된다. 병용투여는 하나의 단일 제형에 FLT3 억제제와 티로신 키나아제 억제제가 모두 포함된 복합제로, 또는 각각의 약제학적 조성물에 별도로 포함된 채로 동시에 투여되거나 또는 임의의 순서로 적절한 시간 차를 두고 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0077] 상기 “티로신 키나아제(Tyrosine kinase)”는 ATP의 인산기를 단백질의 티로신 잔기에 전달할 수 있는 단백질로서, 세포 활성화, 예컨대 세포 분열을 조절하는 신호를 전달하는데 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0078] 상기 티로신 키나아제는 Bcr-Abl 티로신 키나아제일 수 있다. 상기 Bcr-Abl 티로신 키나아제는 사람의 9번 염색체 및 22번 염색체의 전위(t(9;22)(q34;q11))로 인해, 9번 염색체의 ABL 유전자 및 2번 염색체의 BCR 유전자가 융합된 BCR-ABL 융합 유전자로부터 생성될 수 있다.
- [0079] 상기 “티로신 키나아제 억제제(tyrosine kinase inhibitor)”는 티로신 키나아제를 억제하는 활성을 가지는 약물일 수 있고, 예컨대 Bcr-Abl 티로신 키나아제 억제제일 수 있다.
- [0080] 구체적으로, 상기 티로신 키나아제 억제제는 이마티닙(Imatinib), 다사티닙(Dasatinib), 닐로티닙(Nilotinib), 보수티닙(Bosutinib), 및 포나티닙(ponatinib)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 억제제일 수 있으나, 티로신 키나아제를 억제하여 만성 골수성 백혈병의 치료에 사용될 수 있다면 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 상기 약학적 조성물은 경구적 전달, 비경구적 전달의 형태로 투여될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예컨대, 상기 약학적 조성물은 경구 투여, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강 내 투여, 경막 내 투여가 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0082] 상기 FLT3 활성 억제제는 적절한 투여 형태를 제공하도록 적합한 양의 약학적으로 허용되는 비히클 또는 담체와 함께 제형화 될 수 있으며, 약학 조성물의 제조에 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 또한, 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화 하여 사용할 수 있다.
- [0085] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 들깨오일 유래의 알파-리놀렌산과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 또는 젤라틴 등을 혼합하여 조제할 수 있다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0086] 상기 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 사용될 수 있으며, 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0087] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 사용될 수 있다. 상기 비수성용제, 현탁제는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르가 사용될 수 있다. 상기 좌제의 기제는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴이 사용될 수 있다.
- [0088] 상기 FLT3 활성 억제제를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양이 대상체에 투여될 수 있다.
- [0089] “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0090] 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 바람직하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 다른 측면은 다음의 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0093] (a) FLT3를 발현하는 세포를 포함하는 생물학적 시료에 시험 제제를 접촉시키는 단계; (b) 상기 시료 내 FLT3의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계, 상기 FLT3의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험 제제는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물로 판정한다.
- [0094] 상기 “접촉”은 통상적인 의미로서, 2개 이상의 제제(예: 2개의 폴리펩티드)를 결합(combine)시키거나, 제제와 세포(예: 단백질과 세포)를 결합시키는 것을 의미할 수 있다.
- [0095] 예컨대, 시험관(test tube) 또는 다른 컨테이너(container)에서 2개 이상의 제제를 결합시키거나 시험 제제와 세포 또는 세포 용해물과 시험 제제를 결합시킬 수 있으며, 2개의 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 세포 내에서 공동발현(coexpresion)시킴으로써 세포 또는 세포 용해물에서 2개의 폴리펩티드를 접촉시킬 수 있다.
- [0096] 상기 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, FLT3를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0097] 상기 “제제(agent)” 또는 “시험 제제(test agent)”는 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 단백질, 폴리펩티

드, 소유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 등을 포함할 수 있으며, 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 상기 제제, 물질 및 화합물은 상호 교환적(interchangeably)으로 사용할 수 있다.

- [0098] 상기 스크리닝 방법은 당업계에 공지된 다양한 생화학적 및 분자생물학적 기술을 이용할 수 있다[Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y., Second(1998) and Third(2000) Editions; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York(1987-1999)]. 예컨대, 상기 스크리닝 방법은 시험관 내 단백질-단백질 결합 어세이(시험관 내 풀다운 어세이), EMSA, 단백질 결합을 위한 면역 어세이, 기능적 어세이(인산화 어세이 등), 효모-2 하이브리드 어세이, 비면역침전 어세이, 면역침전 웨스턴 블랏 어세이, 면역-공동-위치화 어세이 등 당업계에 공지된 다양한 방법으로 수행될 수 있다.
- [0099] 상기 스크리닝에 사용되는 화합물은 치료효과를 보유한 저분자량의 화합물일 수 있다. 예컨대, 상기 저분자량의 화합물은 중량이 400Da, 600Da 또는 800Da과 같이 약 1000Da 내외일 수 있다. 상기 화합물은 목적에 따라 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 개수도 수십개부터 수백만개까지 상이할 수 있다.
- [0100] 상기 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이드로퀴논, 바이아릴, 카보 사이클 및 폴리사이클 화합물(예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클(예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0101] 또한, 상기 스크리닝 방법에는 바이올로지스가 사용될 수 있다. 상기 바이올로지스는 세포 또는 바이오 분자를 일컫는 것으로, 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체 내 및 생체 외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 의미한다.
- [0102] 상기 바이오분자는 단독으로 또는 다른 바이오분자 또는 세포와 조합되어 사용될 수 있다. 상기 바이오분자는 예컨대, 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체, 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질을 포함할 수 있다.
- [0103] 상기 스크리닝 방법에 사용되는 세포의 종류 및 농도와 시험물질의 양 및 종류 등은 사용하는 구체적인 실험 방법 및 시험 제제의 종류에 따라 상이해질 수 있으며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있다. 실험결과 시험 제제와 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 시험물질의 존재하에서 FLT3의 발현량 또는 활성을 감소시키는 물질을 후보 물질로 선별할 수 있다.
- [0104] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 FLT3에 의해 유도되는 약물 저항성이 유의하게 억제되어 CML의 치료 효율이 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 FLT3의 발현량 또는 FLT3의 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 활성 또는 발현량이 상기 대조군과 비교하여 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80%감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소 또는 45% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0105] 1차적으로 상기 시험 제제가 FLT3의 생물학적 활성을 조절하는 능력이 있는지 어세이할 수 있다. 구체적으로, 상기 1차 어세이는 시험 제제의 존재 하에서 분리된 FLT3의 생물학적 활성을 분석하여 상기 폴리펩티드의 생물학적 활성을 조절하는 조절 제제(modulating agent)를 규명할 수 있다.
- [0106] 상기 1차 어세이는 FLT3의 여러 생물학적 활성에 대한 조절이 어세이될 수 있다. 예컨대, 시험 제제는 FLT3의 발현 수준, 예컨대, 전사 또는 번역을 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다. 또한 상기 시험 제제는 FLT3의 세포 내 수준 또는 안정성, 예컨대 번역 후 수식(post-translational modification) 또는 가수분해를 조절하는 활성이 있는지 어세이될 수 있다.
- [0107] 상기 1차 어세이를 통해 FLT3의 생물학적 활성과 관련된 조절 제제를 규명한 후, 상기 시험 제제가 만성 골수성 백혈병의 약물 내성을 개선할 수 있는지 2차적으로 시험할 수 있다.
- [0108] 상기 1차 및 2차 어세이는 변하지 않은(intact) FLT3 및 이의 단편, 아날로그, 또는 기능적 동등물을 사용할 수 있다. 상기 어세이에 사용될 수 있는 단편은 일반적으로 FLT3의 생물학적 활성을 하나 이상 보유할 수 있다.

- [0109] 또한, 상기 단편 또는 아날로그를 포함하는 융합 단백질이 시험 체제를 위한 스크리닝에 사용될 수 있다. 상기 FLT3의 기능적 동등물은 아미노산 결실, 삽입, 또는 치환을 포함하나 FLT3와 동일한 생체활성을 보유하는 것이므로 본 발명의 스크리닝 방법을 실시하는데 사용될 수 있다.
- [0110] 당업계에 통상적으로 실시되고 있는 다양한 어세이들이 FLT3를 조절하는 체제를 확인하는데 사용될 수 있다. 바람직하게, 상기 체제는 세포 기반 어세이 시스템(cell based assay system)으로 스크리닝될 수 있다. 예컨대, 스크리닝하기 위한 전형적인 세포 기반 어세이(즉, 2차 어세이)에서, 시험 체제의 존재 하에서 리포터 유전자 활성화(예: 효소 활성)를 측정하고, 이를 시험 체제의 부재 하에서의 리포터 유전자의 활성화와 비교할 수 있다.
- [0111] 상기 리포터 유전자는 당업계에 공지된 임의의 검출 가능한 폴리펩티드(반응 또는 리포터 폴리펩티드), 예컨대, 형광 또는 인광(phosphorescence)에 의해 검출 가능한 폴리펩티드나 그것이 보유하고 있는 효소 활성화에 의해 검출 가능한 폴리펩티드를 암호화할 수 있다. 검출 가능한 반응 폴리펩티드(detectable response polypeptide)는 루시페라제, 알파-글루루로니다제(glucuronidase), 알파-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, 녹색 형광 단백질, 강화된 녹색 형광 단백질 및 인간 분비된 알칼린 인산화 효소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0112] 상기 세포 기반 어세이에서, 시험 체제(예: 펩티드 또는 폴리펩티드)는 숙주 세포 내에 존재하는 다른 벡터에 의해 발현될 수 있다. 어떤 방법에서는, 시험 체제의 라이브러리가 상기 벡터의 라이브러리(예: cDNA 라이브러리)에 의해 암호화될 수 있다. 상기 라이브러리는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있으며 (Sambrook et al. and Ausubel et al., supra), 또는 다양한 상업적인 출처로부터 획득할 수 있다.
- [0113] 상기 세포-기반 어세이 이외에, 비-세포 기반 방법에 의해서도 스크리닝될 수 있다. 상기 방법은, 예컨대, 모빌리티 쉬프트 DNA 결합 어세이(mobility shift DNA-binding assays), 메틸화 및 우라실 간섭 어세이(methylation and uracil interference assays), DNase 및 히드록시 라디칼 풋프린팅 분석(DNase and hydroxyl radical footprinting analysis), 형광 편광(fluorescence polarization) 및 UV 교차결합(crosslinking) 또는 화학적 가교제(cross-linkers)를 포함할 수 있다. 일반적인 개요는 Ausubel 등의 문헌에 개시되어 있다 (Ausubel et al., supra, chapter 12, DNA-Protein Interaction).
- [0114] 핵산 및 DNA/RNA 결합 단백질을 포함하는 공동-결합된 단백질(coassociating protein)을 분리하는 기술은 절단 가능한 가교제 디티오비스(dithiobis; succinimidylpropionate) 및 3,3'-디티오비스(sulfosuccinimidylpropionate)를 포함하는 UV 교차 결합 또는 화학적 가교제를 포함할 수 있다(McLaughlin, Am. J. Hum. Genet., 1996; Tang, 1996; Lingner, 1996; Chodosh, 1986).
- [0116] 본 발명의 다른 측면은 FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 체제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)에 대한 예방 또는 치료용 조성물의 반응성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0117] 본 명세서에서 용어 “예방 또는 치료용 조성물의 반응성”은 해당 조성물이 아직 CML로 확진되지 않은 정상인에게 예방적 유효량으로 투여되었을 때 생체 내에서 CML의 발병을 억제하는 작용을 하는 정도(예방적 반응성) 또는 CML 환자에게 치료적 유효량으로 투여되었을 때 생체 내에서 질환 또는 증상의 발전을 억제, 경감 또는 제거하는 작용을 하는 정도(치료적 반응성)를 의미한다.
- [0118] 본 명세서에서 용어 “반응성 예측용 조성물”은 대상체의 CML 예방 또는 치료용 조성물에 대한 반응성을 예측하기 위해 FLT3 단백질 또는 이의 유전자의 발현량 측정수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “반응성 예측용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [0120] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 FLT3 단백질의 발현량을 측정하는 체제는 상기 FLT3 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머이다.
- [0121] 본 발명에 따르면, 본 발명의 FLT3 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 개체의 약물 반응성을 분석하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0122] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32}

및 S³⁵)로 표지된 항체가 이용될 수 있다. 본 발명에서 GCN5 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.

[0123] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.

[0124] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 강도를 분석함으로써, 약물 반응성을 예측할 수 있다. 즉, 개체의 시료에서 FLT3 단백질에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우에는 약물에 대한 반응성이 낮은(혹은 저항성이 있는) 것으로 판단된다.

[0125] 본 발명은 항체 대신 FLT3 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med*. 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0127] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 FLT3 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.

[0128] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0129] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0130] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.

[0131] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 FLT3 코딩 유전자의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0132] 프라이머는, 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

- [0133] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 FLT3 코딩 유전자의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3’-말단 또는 5’-말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0134] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [0135] 본 발명의 다른 측면은 FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML) 진단용 조성물을 제공한다.
- [0136] FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재 생략한다.
- [0137] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는 지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 AML에서만 발현되는 것으로 보고된 FLT3가 CML에서도 경과에 따라 증가하고, 특히 급성기(blast crisis)에 이르면 FLT3가 현저히 고발현되어 이의 발현량이 bc-CML에 대한 신뢰도 높은 진단 마커로 기능할 수 있음을 새로이 발견하였다. 따라서, 용어 “급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML) 진단”은 “만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML)의 중증도(severity) 진단”으로 표현될 수도 있다.
- [0138] 본 발명의 구성 중 “반응성 예측용 조성물” 또는 “진단용 조성물”을 언급하면서 사용되는 용어 “고발현” 또는 “발현의 증가”는 CML 약물에 대한 내성을 가지지 않은 대조군 또는 bc-CML에 걸리지 않은 대조군에 비해 FLT3 발현량이 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 발현량이 상기 대조군과 비교하여 약 10% 이상 증가, 약 20% 이상 증가, 약 30% 이상 증가, 약 40% 이상 증가, 약 50% 이상 증가, 또는 약 60% 이상 증가한 경우를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다.
- [0139] 본 발명의 다른 측면은 JAK(Janus kinase), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), TEAD(Transcriptional enhancer factor domain) 및 CD36로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제용 조성물을 제공한다.
- [0140] 본 발명의 다른 측면은 JAK(Janus kinase), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), TEAD(Transcriptional enhancer factor domain) 및 CD36로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0141] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 FLT3의 발현 억제를 통해 만성 골수성 백혈병, 구체적으로는 급성기 만성 골수성 백혈병의 약물 저항성이 개선되면서 질환의 급격한 진행이 둔화됨을 관찰하였기 때문에, FLT3의 하위 단계 인자를 억제할 경우에도 유사한 치료적 효과를 거둘 수 있는지를 조사하였다. 그 결과, 하기 실시예에서 보는 바와 같이, JAK, STAT3, TAZ, TEAD 및 CD36을 각각 AZD1480, C188-9, 베르테포르핀, 플루페남산 및 설폰-N-숙시니미딜 올레이트를 이용하여 저해시킨 경우 FLT3 억제제와 마찬가지로 세포 사멸 효과를 현저히 강화시키며 약물 내성을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 이들 억제제는 FLT3 억제제와 더불어 효율적인 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료용 조성물 또는 이러한 조성물에 대한 내성 억제용 조성물로 이용될 수 있다.
- [0142] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 억제제들을 포함하는 조성물은 티로신 키나아제(Tyrosine kinase) 억제제와 병용 투여된다. 병용투여는 하나의 단일 제형에 두 가지 유효성분이 모두 포함된 복합제로, 또는 각각의 약제학적 조성물에 별도로 포함된 채로 동시에 투여되거나 또는 임의의 순서로 적절한 시간 차를 두고 순차적으로 투여될 수 있다.

- [0144] 본 발명의 다른 측면은 대상체에 FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3) 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제 방법을 제공한다.
- [0145] 본 발명의 다른 측면은 대상체에 FLT3(FMS-like tyrosine kinase 3) 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0146] 본 발명의 다른 측면은 대상체의 FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 대상체의 만성 골수성 백혈병(CML)에 대한 예방 또는 치료용 조성물의 반응성 예측방법을 제공한다.
- [0147] 본 발명의 다른 측면은 대상체의 FLT3 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 급성기 만성 골수성 백혈병(blast crisis CML; bc-CML) 진단방법을 제공한다.
- [0148] 본 발명의 다른 측면은 JAK(Janus kinase), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), TEAD(Transcriptional enhancer factor domain) 및 CD36로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병(CML)의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 내성 억제 방법을 제공한다.
- [0149] 본 발명의 다른 측면은 JAK(Janus kinase), STAT3(Signal transducer and activator of transcription 3), TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), TEAD(Transcriptional enhancer factor domain) 및 CD36로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 단백질에 대한 억제제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 만성 골수성 백혈병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0150] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0152] 실험예 1 : mRNA 및 단백질 발현 측정

- [0153] 종래 보고된 연구결과를 참조하여 만성 골수성 백혈병 환자들의 FLT3 및 TAZ mRNA의 단계별 발현 양상을 분석하였다(Radich JP et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 21;103(8):2794-2499 (2006)).
- [0154] 도 1을 참조하면, 만성 골수성 백혈병은 만성기(chronic phase), 가속기(accelerated phase), 급성기(blast crisis)로 진행되며, 단계가 진행에 따라 FLT3 및 TAZ mRNA 발현량이 급격하게 증가하였다.
- [0155] 상기 결과는 CML이 진행됨에 따라 급격하게 증가하는 약물 내성과 FLT3 간의 밀접한 연관성을 시사한다.

[0157] 실험예 2 : 약물 내성 시험

- [0158] 만성 골수성 백혈병의 급성기를 모사하는 FLT3 형질 전환 K562 세포(ATCC, CCL-243)를 통해 약물 내성 시험을 수행하였다. 사용된 약물 및 항체의 구입처는 다음과 같다: 이마티닙(Imatinib, Selleckchem, cat#S2475), 닐로티닙(Nilotinib, Selleckchem, cat#S1033), 다사티닙(dasatinib, Santa cruz, CAS 302962-49-8), 항-TAZ 항체(Santa cruz, cat#sc-101199), 항-FLT3 항체(Cell signaling, cat#3462), 항-GAPDH 항체(Santa cruz, cat#sc-32233).
- [0159] FLT3 형질 전환 K562 세포를 구축한 후 17일 동안 3종의 만성 골수성 백혈병 항암제를 투여하고 생존 세포를 정량하였다(표 1).

표 1

[0160] FLT3 형질 전환 K562 세포의 생존 세포 수

구분		cell number (x 10 ⁵)						
Treatment	K562	0일	5일	9일	11일	13일	15일	17일
STI 1uM	WT	1	0.485	0.058	0.52	0.175	0	0
	FLT3	1	1.013	1.905	1.82	2.14	3.17	14.3
Dasatinib 1uM	WT	1	0.8075	0.35	0.47	0	0	0

	FLT3	1	1.57	2.87	2.23	2.26	1.76	9.33
Nilotinib 10nM	WT	1	0.9675	0.23	0.76	0.09	0	0
	FLT3	1	2.0975	1.38	2.64	2.84	4.52	17.1

- [0161] 도 2를 참조하면, K562 야생형(WT) 세포는 약물에 대한 저항성이 없어 항암
- [0162] 제 처리에 의해 모든 세포가 사멸하였다. 반면, FLT3 형질 전환 K562 세포는 항암제 처리에도 불구하고 강한 약물 내성으로 인해 다수가 생존하였다.
- [0163] 또한, 웨스턴 블랏을 통해 TAZ 및 FLT3의 발현량을 측정하였다.
- [0164] 도 3을 참조하면, K562 야생형(WT)의 경우 TAZ 및 FLT3가 발현되지 않았으나, FLT3 형질 전환 K562 세포에서 FLT3 및 TAZ의 발현이 현저하게 증가하였으며, 약물 내성을 획득하였을 때 FLT3 및 TAZ의 발현은 더욱 증가하였다.
- [0165] 상기 결과는 FLT3가 만성 골수성 백혈병에서 약물 내성을 유발하는 중요한 인자이며, FLT3 및 TAZ의 발현이 약물 내성과 밀접하게 연관되어 있음을 시사한다.
- [0166] 즉, FLT3는 TAZ의 발현을 유도하고, TAZ의 발현이 증가함으로써 세포가 약물 내성을 획득할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0168] 실험예 3 : 약물 내성 억제 활성 시험

- [0169] AML 치료제로 사용되는 FLT3 억제제가 만성 골수성 백혈병(CML)에서 항암 활성이 있는지 평가하였다.
- [0170] FLT3 형질 전환 K562 세포에서 3종의 약물(이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙)에 대한 저항성을 가지는 세포를 구축하고 FLT3 억제제의 효과를 확인하였다.
- [0171] 도 4 및 5를 참조하면, FLT3 억제제인 퀴자티닙(AC220)을 단독으로 처리하거나, CML 치료제(이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙)를 단독으로 처리한 경우 세포가 거의 사멸되지 않았으나, FLT3 억제제인 퀴자티닙과 CML 치료제를 병용 처리한 경우 모든 저항성 세포가 사멸하였다.
- [0172] 도 6 및 7을 참조하면, FLT3 억제제인 미도스타우린(Midostaurin)을 단독으로 처리하거나, CML 치료제(이마티닙, 다사티닙, 닐로티닙)를 단독으로 처리한 경우 세포가 거의 사멸되지 않았으나, FLT3 억제제인 미도스타우린과 CML 치료제를 병용 처리한 경우 저항성 세포가 효과적으로 사멸하였다.
- [0173] 특히, FLT3 억제제 및 FLT3 억제제를 병용 처리하였을 때 TAZ 전사조절인자의 발현이 억제되었으며, 이로 인해 약물 내성이 상실된 것으로 판단되었다.
- [0174] 상기 결과는 FLT3 억제제가 만성 골수성 백혈병에 대한 직접적인 치료 효과를 나타내지는 않으나, CML 세포의 약물 내성을 완화 또는 상실시킬 수 있음을 시사한다.

[0176] 실험예 4 : FLT3 억제제의 약물 내성 억제 활성 시험

- [0177] 퀴자티닙 외에도 FLT3 저해제가 동등한 약물 내성 억제 효과를 가지는지 시험하고자, 항-FLT3 항체, siRNA, 및 도비티닙, 아뮤바티닙, 탄두티닙, 길테리티닙, 파크리티닙을 이용하여 상기 실험을 반복 수행하였다.
- [0178] 실험 결과, 상기 각 저해제들은 상기 실험 결과와 미차가 있으나, 유사하거나 동등한 약물 내성 관련성을 나타내었다.
- [0179] 상기 결과는 FLT3가 CML에 있어서 직접적으로 약물 내성과 연관되며, FLT3 활성 또는 발현을 억제시킬 수 있는 수단이라면 CML의 약물 내성 차단에 활용될 수 있음을 시사한다.

[0181] 실험예 5 : FLT3 억제제의 약물 내성 및 세포사멸 활성 시험

- [0182] 퀴자티닙을 포함한 FLT3 저해제가 동등 또는 유사한 약물 내성 억제 및 세포사멸 효과를 가지는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 포나티닙(Ponatinib, Selleckchem, cat#S1490), 퀴자티닙(Quzaritinib, Selleckchem,

cat#S1526), 미도스타우린(Midostaurin, Cayman, cat#20685-11-2), 소라페닙(Sorafenib, Cayman, cat#284461-73-0), 길터리티닙(Gilteritinib, Cayman, cat#1254053-43-4), 크레놀라닙(crenolanib, Cayman, cat#670220-88-9)을 이용하여 이마티닙과의 병용 투여 효과를 MTT 어세이로 확인하였다.

[0183] 상기 실험에 3에서 구축한 이마티닙(Imatinib, Selleckchem, cat#S2475) 저항성을 가진 FLT3 형질전환 K562세포를 12웰 세포배양 플레이트(Falcon, cat#353043)에 각 웰 당 5×10^4 개/ml의 밀도로 분주하였다. 사용된 배지는 FBS(Gibco) 10% 함유 DMEM 배지(Hyclone)이며, 약물을 처리하지 않은 대조군 웰, 이마티닙 1 μ M을 처리한 웰, 이마티닙 1 μ M과 FLT3 저해제를 병용 처리한 웰로 나누었다. FLT3 저해제의 농도는 다음과 같다: 포나티닙, 퀴자티닙, 길터리티닙, 크레놀라닙은 5nM; 미도스타우린 100nM, 소라페닙은 1 μ M. 그 후 5일 뒤에 세포 성장 키트(cell proliferation kit, Roche)에 포함되어 있는 MTT 라벨링 용액(MTT labeling Reagent)을 각 웰에 100 μ l를 2시간 동안 투여한 뒤 용화제 용액(solubilization solution)을 1ml 처리한 후 24시간 뒤에 멀티플레이트 리더를 이용하여 540nm의 파장을 확인하였다(도 8). 도 8에서 보는 바와 같이, 실험에 사용한 모든 FLT3 억제제는 이마티닙과 병용처리 하였을 때 실험에 3과 마찬가지로 현저히 증가된 세포사멸 효과를 보였고, 이마티닙 단독 처리만으로는 FLT3 과발현 K562 세포를 사멸시키지 못하였다.

[0185] 실험예 6 : FLT3 하위 단계 인자에 대한 저해제의 약물 내성 억제 및 세포사멸 활성 실험

[0186] 퀴자티닙 실험을 통해 규명한 만성 골수성 백혈병의 FLT3-JAK-STAT3- TAZ-TEAD-CD36 신호전달은 약물 저항성을 증가시키는 역할을 한다. 이에, 본 발명자들은 이러한 신호전달 체계에서 FLT3의 하위 단계 인자인 JAK-STAT3-TAZ-TEAD-CD36를 억제할 경우 상기 실험에 3과 마찬가지로 약물 내성 억제 및 세포사멸 효과를 나타내는지를 확인하기 위해 각 단계의 저해제를 이용하여 MTT 어세이를 수행하였다.

[0187] 각 단계의 저해제는 JAK 저해제인 AZD1480(Selleckem, cat#S2162), STAT3 저해제인 C188-9(Selleckem, cat#S8605), TAZ 저해제인 베르테포르핀(Verteporfin, Selleckem, cat#S1786), TEAD 저해제인 플루페남산(Flufenamic acid, Selleckem, cat#S4268), CD36 저해제인 설폰-N-숙시니미딜 올레이트(Cayman, cat#11211)을 각각 사용하였으며, 상기 실험에 5와 동일한 방법으로 플레이트에 실험에 3에서 구축한 세포를 분주한 뒤, 저해제를 처리하지 않은 대조군 웰, 이마티닙(1, 2, 3 μ M)을 처리한 웰, 이마티닙(1 μ M)과 AZD1480(1, 3, 10 μ M)을 처리한 웰, 이마티닙(1 μ M)과 C188-9(0.3, 1, 3 μ M)을 처리한 웰, 이마티닙(1 μ M)과 베르테포르핀(0.3, 1, 3 μ M)을 처리한 웰, 이마티닙(1 μ M)과 플루페남산(0.1, 0.2, 0.3M)을 처리한 웰, 이마티닙(1 μ M)과 설폰-N-숙시니미딜 올레이트(0.1, 0.3, 0.5M)를 처리한 웰로 나누었다. 그 후 4일 동안 각각의 저해제를 처리한 후 실험에 5와 동일한 방법으로 MTT 어세이를 진행한 후 멀티플레이트 리더를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다(도 9).

[0188] 도 9에서 보는 바와 같이, 모든 하위 단계 저해제(AZD1480, C188-9, 베르테포르핀, 플루페남산, 설폰-N-숙시니미딜 올레이트) 역시 FLT3 억제제와 마찬가지로 이마티닙과 병용처리시 세포 사멸 효과를 현저히 강화시키며 약물 내성을 억제하는 것을 확인하였다.

[0190] 실험예 7 : FLT3 하위 단계 인자에 대한 저해제의 단독 처리시 약물 내성 억제 및 세포사멸 활성 실험

[0191] 실험예 6을 통해 JAK, STAT3, TAZ, TEAD 또는 CD36의 억제제와 이마티닙을 병용 처리할 경우 약물 내성 억제 및 세포 사멸 효과를 보이는 것을 확인하였으므로, 본 발명자들은 이들 억제제를 단독으로 처리하여도 만성 골수성 백혈병의 예방 및 치료에 유의한 효과를 발휘하는지를 확인하기 위해 각 단계의 저해제 단독 처리 후 MTT 어세이를 수행하였다.

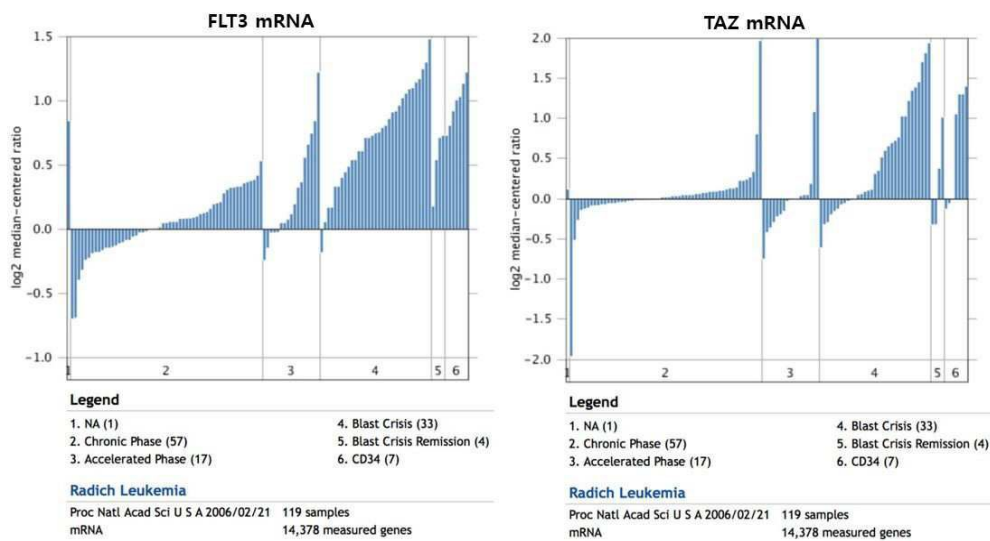
[0192] 각 단계의 저해제는 실험예 6에서 사용한 동일한 약물들을 적용하였으며, 실험예 5와 같은 조건으로 세포를 12웰 플레이트에 분주한 뒤 각 저해제를 농도별로 3일 동안 이마티닙 없이 단독 처리하였다. 여기서 사용된 약물의 농도는 다음과 같다: AZD1480(3, 10, 30 μ M), C188-9(10, 30, 50 μ M), 베르테포르핀(1, 3, 5 μ M), 플루페남산(0.1, 0.3, 1 μ M), 설폰-N-숙시니미딜 올레이트(0.3, 0.5, 1M). 단독 처리 후 3일 뒤 실험예 5에 사용되었던 세포 성장 키트와 멀티 플레이트 리더를 이용하여 540nm의 파장을 확인하였다(도 10). 도 10에서 보는 바와 같이 실험에서 사용한 모든 FLT3 하위 단계 억제제는 단독 처리에서도 FLT3 과발현 만성 골수성 백혈병 세포를 마찬가지로 사멸 효과를 상당히 강화시켰으며 약물 내성을 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 억제제들은 치료 보조제 또는 약물 내성 억제제 뿐 아니라, 그 자체로 CML에 대한 독립된 약리효과를 가지는 예방 또는 치

료용 조성물이 될 수 있다.

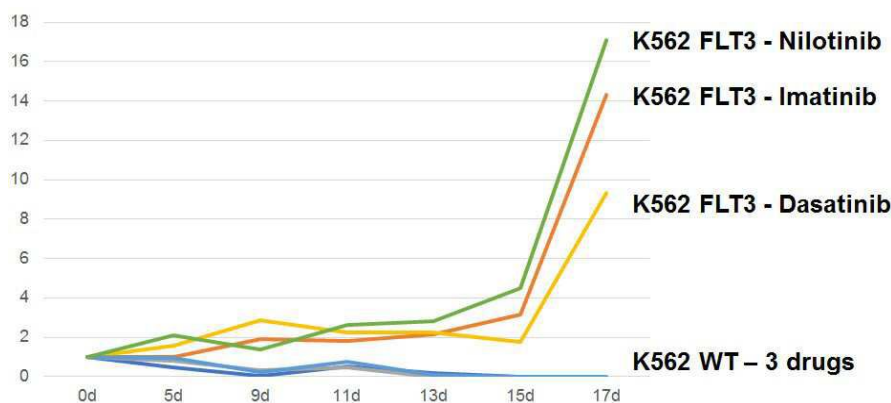
- [0194] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0195] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

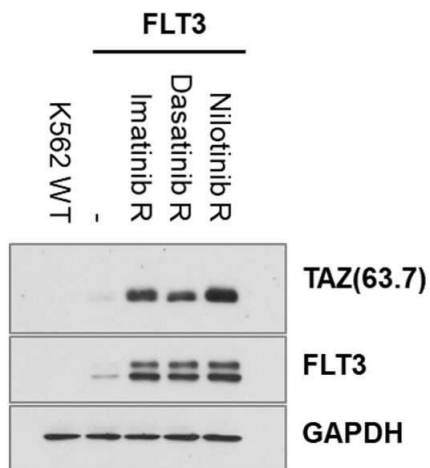
도면1



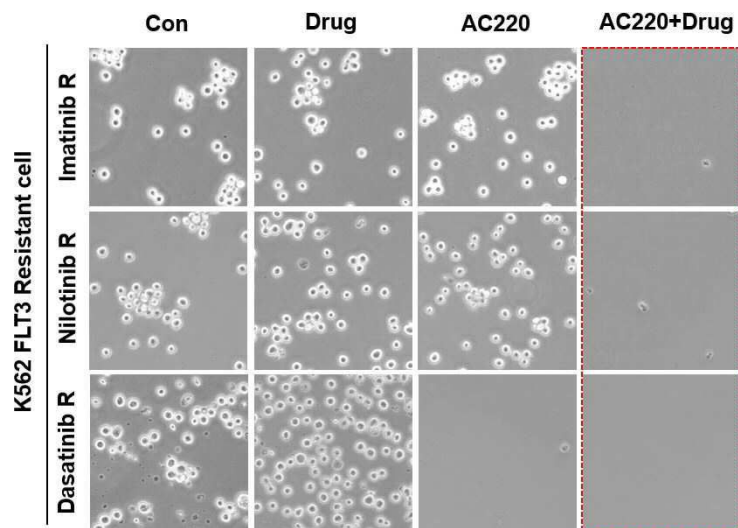
도면2



도면3



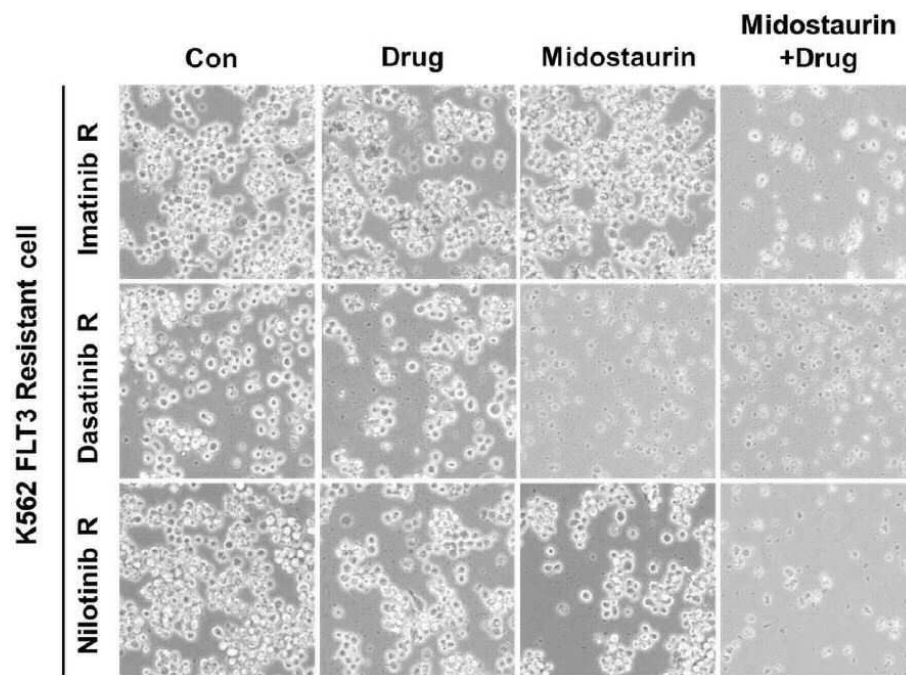
도면4



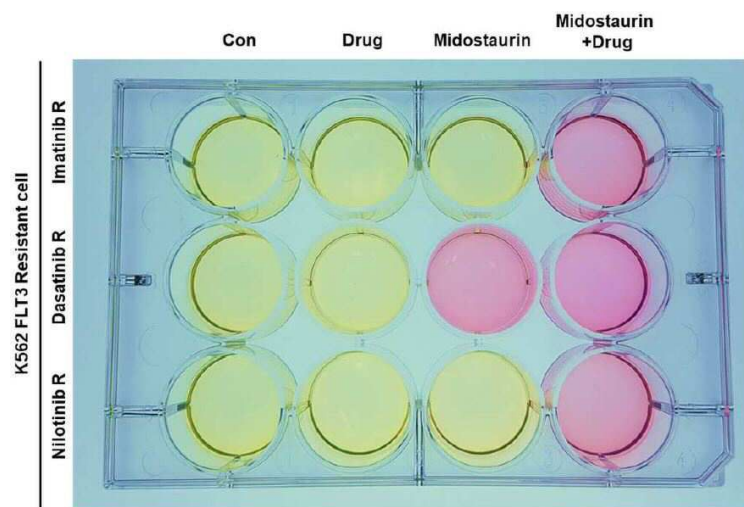
도면5



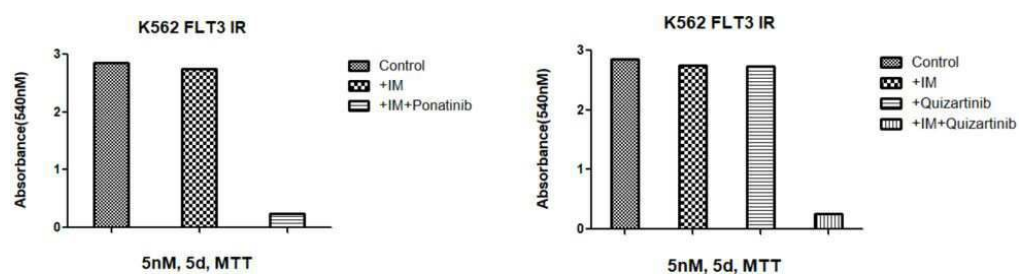
도면6



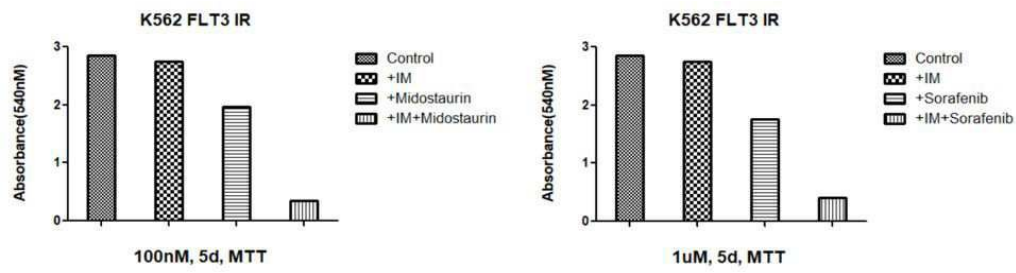
도면7



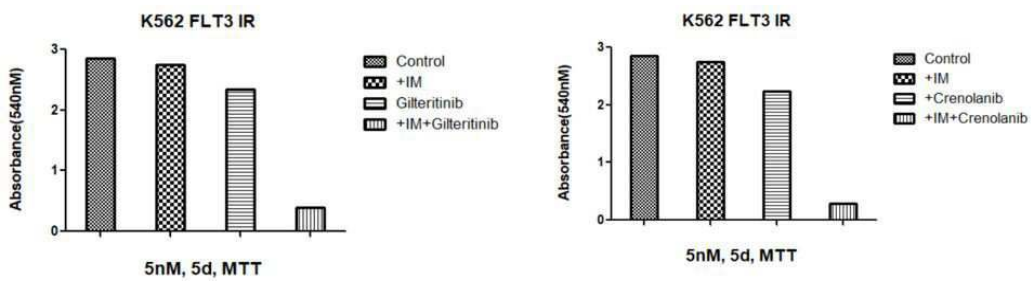
도면8a



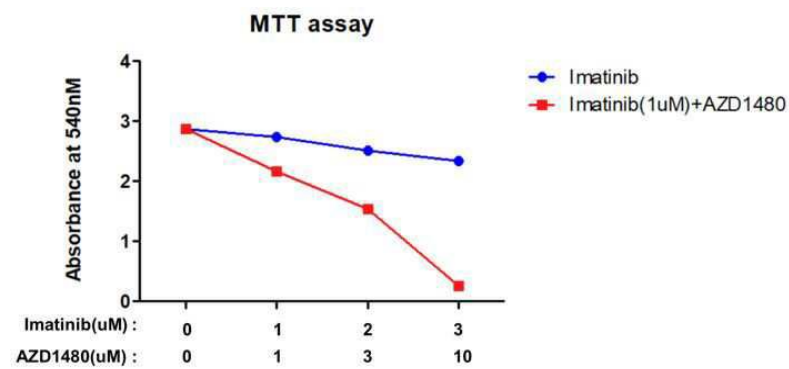
도면8b



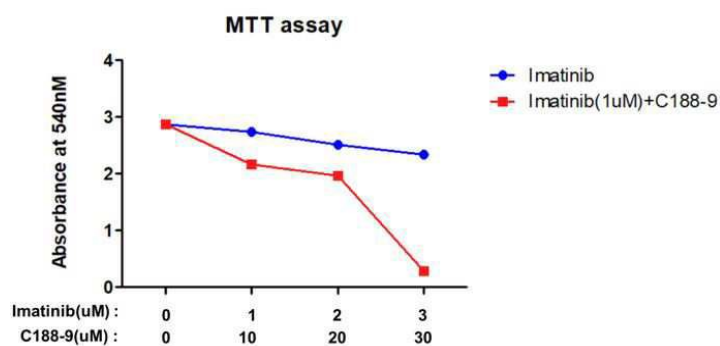
도면8c



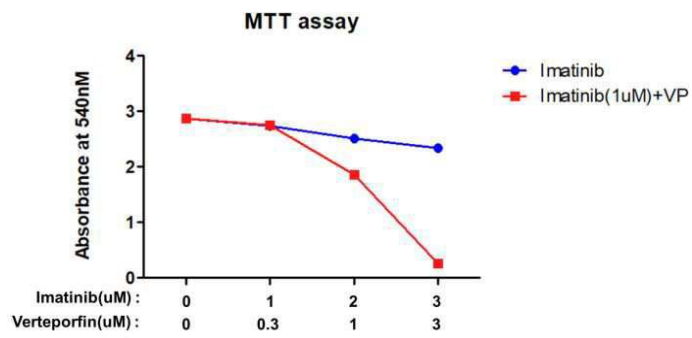
도면9a



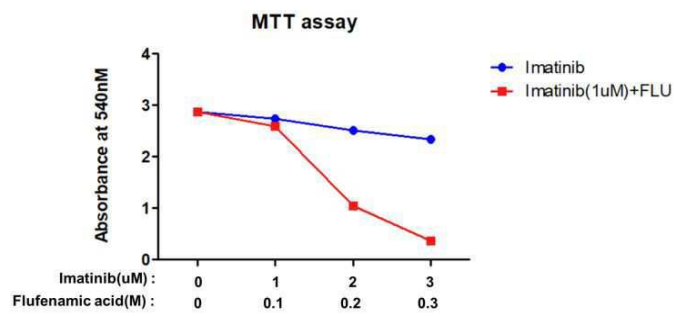
도면9b



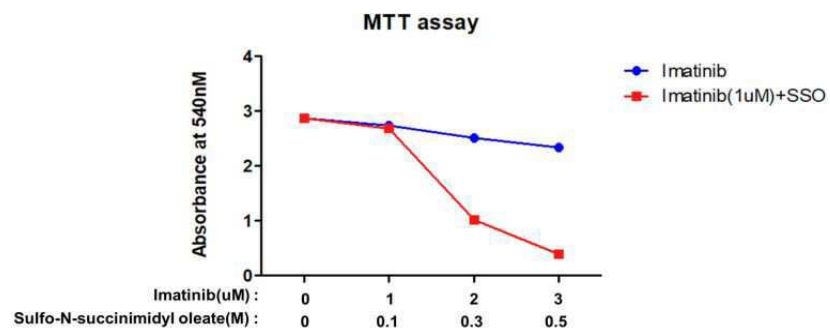
도면9c



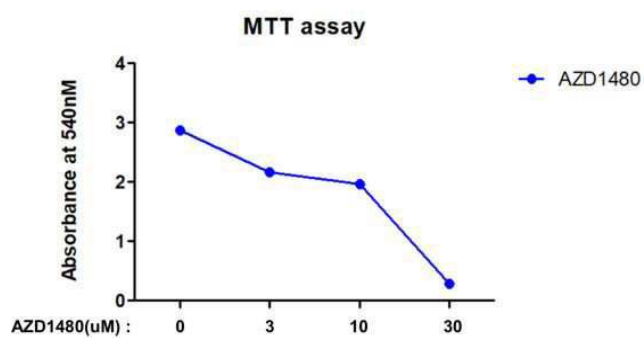
도면9d



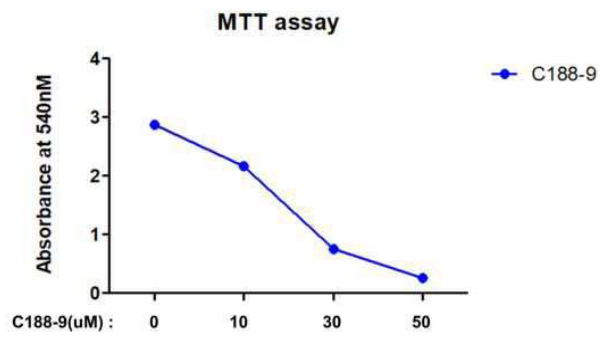
도면9e



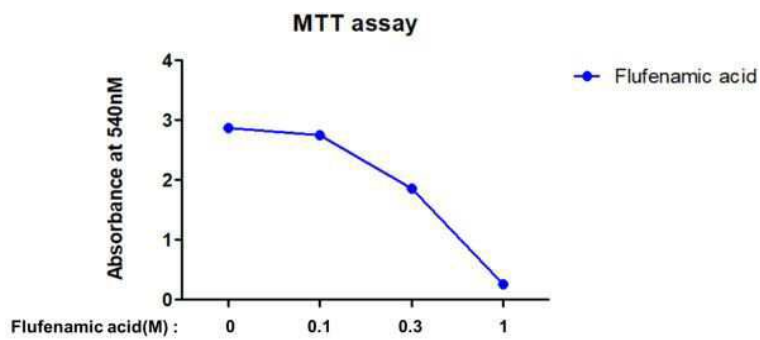
도면10a



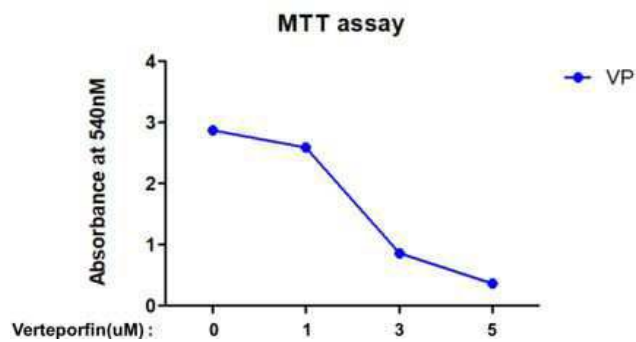
도면10b



도면10c



도면10d



도면10e

