(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035978
(43) 공개일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/244 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7007752(분할)
(22) 출원일자(국제) 2010년04월06일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2020-7017470
원출원일자(국제) 2010년04월06일
심사청구일자 2020년07월17일
(85) 번역문제출일자 2022년03월08일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2010/054499
(87) 국제공개번호 WO 2010/115868
국제공개일자 2010년10월14일
(30) 우선권주장
P200900928 2009년04월03일 스페인(ES)

(71) 출원인
인스티튜시오 카탈라나 드 르세르카 아이 에스투디스 아반카츠
스페인 이-08010 바르셀로나 23 패세익 루이스 컴파니스
펀다시오 프리바다 인스티튜트 드인베스티가시오 온콜로지카 데 발 헤브론
스페인 이-08035 바르셀로나 115-117 나자렛 에디피시 셀렉스
펀다시오 호스피탈 유니버시타리 발 드헤브론-인스티튜트 디 레세르카
스페인 이-08035 바르셀로나 에디피시 디 레세르카 패세익 발 드헤브론 119-129
(72) 발명자
세오안 수아레즈, 후안
스페인 이-08035 바르셀로나 피엘. 14 에디피시 마테르노인판틸 119 패세익 발 드헤브론 씨/오 펀다시오 프리바다 인스티튜트 드인베스티가시오 발 드헤브론 (브이에이치아이오)
페누엘라스 프리에토, 실비아
스페인 이-08035 바르셀로나 피엘. 14 에디피시 마테르노인판틸 119 패세익 발 드헤브론 씨/오 펀다시오 프리바다 인스티튜트 드인베스티가시오 발 드헤브론 (브이에이치아이오)
바셀가 토레스, 호세
스페인 이-08035 바르셀로나 피엘. 14 에디피시 마테르노인판틸 119 패세익 발 드헤브론 씨/오 펀다시오 프리바다 인스티튜트 드인베스티가시오 발 드헤브론 (브이에이치아이오)
(74) 대리인
양영준

전체 청구항 수 : 총 1 항

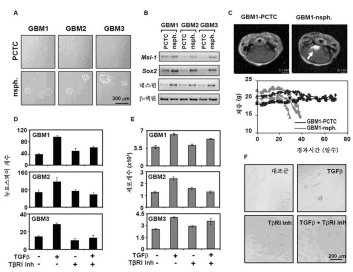
(54) 발명의 명칭 **바람직하지 않은 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 치료제**

(57) 요 약

본 발명은 백혈병 억제 인자가 암, 특히, 신경교종에서 종양 줄기 세포의 자가-재생을 활성화시킬 수 있다는 관찰 결과에 기초하는데, 이는 LIF를 억제하는 것, 및 일반적으로는, IL-6형 시토카인을 억제하는 것이 원치않는 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 치료학상 조성물에 사용될 수 있다는 것을 시사한다. 본 발명은 또한 줄기

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



세포의 증식을 차단/억제시킬 수 있는 화합물을 확인하기 위한 방법, 및 대상체에서 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 진단하기 위한, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓는 대상체의 소인을 결정하기 위한, 또는 상기 종양을 앓는 대상체의 평균 기대 수명을 예측하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 일반적으로 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위해, 더욱 특히, 암 및 종양 줄기 세포의 치료를 위한 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제에 관한 것이다. 유사하게, 상기 질환을 진단하고 환자의 평균 기대 수명을 예측하기 위한 방법 또한 기술한다.

배 경 기 술

[0002] 최근 암에서 줄기 세포-유사 특성을 가진 종양 세포 아집단이 발견되었다. 암 줄기 세포로 지칭되는 상기와 같은 세포 집단이 종양의 발병, 증식 및 재발의 원인이 되는 것으로 간주되며, 이를 통해 가장 효과적인 치료법은 종양 줄기 세포의 구획화로 지향되는 치료법이 될 것이라고 제시되었다. 종양 줄기 세포의 생물학적 성질을 조정하는 분자 특징 및 조절 기전에 관해서는 알려진 바가 거의 없다. 종양 줄기 세포가 중요한 역할을 하는 종양 중 하나는 소위 신경교종 줄기 세포 또는 신경교종 개시 세포 (GIC)라 불리는 신경교종이다.

[0003] GIC는 높은 발암성 잠재능, 그의 자가-재생능, 및 그의 다세포주로의 분화능을 특징으로 한다. 종양 중 줄기 세포-유사 세포의 개수는 그의 자가-재생능에 의해 조절된다. GIC 및 일반적으로, 암 줄기 세포는, 줄기 세포가 2개의 동일한 그의 복제물을 생성하는 수단에 의해, 또는 줄기 세포 복제물 하나와 보다 분화된 세포 하나를 생성하는 수단 (비대칭 분열)에 의해 대칭 및 비대칭 분열을 경험하게 된다. 암 줄기 세포의 자가-재생능은 대칭과 비대칭 분열 사이의 균형에 의해 조절되고, 상기 자가-재생을 조정하는 기전의 탈조절은 대개 종양 발병에 관여할 가능성이 높다.

[0004] 신경교종은 가장 보편적인 원발성 뇌종양이며, 그의 조직학적 성질 및 예후에 따라 4개의 임상 등급으로 분류될 수 있다. IV 등급 신경교종 (다형성 교모세포종)은 고도로 진행성이고, 방사선요법 및 화학요법, 둘 모두에 대해 내성을 띤다. 신경교종의 발생과 진행에 관여하는 분자 기전에 대한 이해에 있어서도 진보가 이루어지기는 했지만, 이러한 유형의 종양의 예후 및 치료는 여전히 효과가 없다. 신경교종에 대한 최선의 치료법은 외과적 개입이다. 그럼에도 불구하고, 외과적 치료법은 보통 약리학상 보조 치료법 또는 방사선요법을 동반한다. 신경교종 치료를 위한 최선의 약물로는 프로카르바진, CCNU (로무스틴) 및 빈크리스틴을 포함하는 배합물 (PCV로 지칭된다), 방사선요법과 함께 병용되는 것인 테모졸로마이드를 포함한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] GIC가 종양의 발병, 증식 및 재발의 원인이 되는 것으로 간주되며, 이는 가장 효과적인 치료법은 신경교종 줄기 세포의 구획화로 지향되는 치료법이 될 것이라는 것을 시사한다. GIC가 제거되지 않는 한, 종양은 근절되지 않을 것이다.

[0006] 그러므로, 현 시점의 기술적 수준에서 공지되어 있는 치료법의 단점을 방지하고, GIC를 효율적으로 제거할 수 있는 대체 치료법을 가지는 것이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0007] 발명의 개요

[0008] 제1 측면에서, 본 발명은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제에 관한 것이다.

[0009] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명에 따른 억제제 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 제약 조성물에 관한 것이다.

[0010] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0011] (i) IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 세포를 IL-6형 시토카인 및 후보 화합물과 접촉시키는 단계, 및

[0012] (ii) 상기 세포의 세포 증식을 차단하는 화합물을 확인하는 단계

[0013] 를 포함하는, IL-6형 시토카인 또는 그의 기능적 등가 변이체에 의해 유도된 종양 세포의 세포 증식을 차단/억제시킬 수 있는 화합물을 확인하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0014] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 생물학적 샘플 중 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함하며, 여기서 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현이 대조군 샘플 중의 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현에 비하여 증가하였다면, 이는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 지시하거나, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 상기 대상체의 소인이 더 크다는 것을 지시하거나, 또는 상기 대상체에게 수행된 치료 요법에 대해 무반응이라는 것을 지시하는 것인, 대상체에서 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 진단하기 위한, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓는 대상체의 소인을 결정하기 위한, 또는 대상체에서 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환의 단계 또는 중증도를 결정하기 위한, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓는 대상체에게 수행되는 치료 요법의 효과를 모니터링하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0015] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 진단하기 위한, 또는 상기 암을 앓는 대상체의 소인을 결정하기 위한, 또는 대상체에서 상기 암의 단계 또는 중증도를 결정하기 위한, 또는 상기 암을 앓는 대상체의 생존 가능성 및/또는 평균 예측 수명 시간을 예측하기 위한, 또한 상기 암을 앓는 대상체에게 수행되는 치료 요법의 효과를 모니터링하기 위한, IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현 수준을 정량하기 위한 시약을 포함하며, 여기서 시약을 통해 상기 유전자, 또는 상기 단백질 또는 그의 기능적 등가 변이체의 발현이 대조군 샘플에 비하여 증가한 것으로 검출되었다면, 이때 상기 대상체는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 상태일 수 있거나, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓을 수 있는 더 큰 소인을 나타내거나, 또는 상기 질환의 더 큰 중증도를 나타내거나, 또는 수행된 치료 요법이 효과가 없는 것인 키트의 용도에 관한 것이다.

발명의 효과

[0016] LIF가 높은 수준으로 발현되는 종양을 앓는 환자에서, LIF는 암 줄기 세포의 조절을 통한 발암성 인자로서 작용할 수 있다. 따라서, 이러한 종양 세트에서는 LIF를 차단하는 것이 이로울 수 있고, LIF는 또한 상기 환자에서 진단 인자 및/또는 예후 인자로서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1. TGFβ가 환자로부터 유래된 GIC의 자가-재생에 대해 미치는 효과. (A) GBM (GBM1, GBM2, GBM3)을 앓는 3명의 상이한 환자의 샘플로부터 생성된 GBM의 PCTC 및 뉴로스피어에 대한 대표 영상. (B) 인간 GBM으로부터 얻은 3개의 샘플의 PCTC 및 뉴로스피어에 대한 RT-PCR 분석에 의해 *무사시-1(Musashi-1)* (*Msi-1*), *Sox2*, *네스틴(Nestin)* 및 *β-액틴*을 결정하였다. (C) GBM1, GBM2 및 GBM3 종양의 샘플로부터 수득된 100,000개의 뉴로스피어 (*nsph.*) 또는 PCTC 세포를 각 경우마다 3마리의 Balbc *nu/nu* 마우스에 두개내로 접종하였다. 각각의 마우스에서 30-40일째에 자기 공명 영상법 (MRI) 연구를 수행하였다. 영상은 GBM1로부터 수득된 뉴로스피어 또는 PCTC 세포를 접종받은 마우스의 예를 나타낸다. 마우스의 체중을 주당 2회씩 결정하였다. 그래프는 GBM1로부터 유래된 세포를 접종받은 마우스를 나타낸다 (D 및 E). 명시된 GBM의 뉴로스피어 세포를 100 pM TGFβ1 및/또는 2 μM TβRI 억제제와 함께 성장 인자의 부재하에서 7일 동안 인큐베이션시키고, 새로 형성된 뉴로스피어의 개수 (D) 및 세포의 총 개수 (E)를 결정하였다. (F) D 및 E에서 설명된 바와 같이 처리된 GBM1 뉴로스피어의 대표 영상.

도 2. GBM1로부터 유래된 뉴로스피어, 및 GBM1로부터 유래된 혈청 중에서 분화된 뉴로스피어 중의 명시된 마커에 대한 면역세포화학법.

도 3. TGFβ가 PCTC 및 GBM 뉴로스피어에서 LIF의 발현을 유도한다. (A) 명시된 GBM (GBM1-11)으로부터 얻은 11개의 샘플의 PCTC 세포를 무혈청 배지 중에서 3시간 동안 100 pM TGFβ1로 처리하거나, 또는 처리하지 않고 그 상태로 남겨두고, qRT-PCR에 의해 LIF의 발현 수준을 결정하였다. *β-액틴*은 내부 정규화 대조군으로서 결정하였다. (B) GBM 뉴로스피어 세포를 A에서와 같이 처리하고, A에서와 같이 qRT-PCR에 의해 LIF의 발현 수준을 결정하였다. (C) GBM 뉴로스피어를 무혈청 배지 중에서 3시간 동안 100 pM TGFβ1 및/또는 2 μM TβRI 억제제와 함께 인큐베이션시키고, A에서와 같이 qRT-PCR에 의해 LIF의 mRNA 수준을 결정하였다. (D) GBM1 뉴로스피어를 무혈청 배지 중에서 3시간 동안 100 pM TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3와 함께 인큐베이션시키고, A에서와 같이 qRT-PCR에 의해 LIF의 mRNA 수준을 결정하였다. (E) 100 pM TGFβ1로 처리한 후 48시간이 경과하였을 때, GBM1 뉴로스피어 중 분비된 LIF 단백질의 수준을 ELISA에 의해 결정하였다.

도 4. TGFβ는 활성화된 Smad 복합체를 통해 *LIF*의 전사를 유도한다. (A) 루시퍼라제 *LIF*의 지시 작제물에 대한 다이어그램. (B) 루시퍼라제 *LIF* (-634/+32), (-276/+32), (-276/+32) mutSBE 또는 (-73/+32)의 지시 작제물로 A172 신경교종 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후 16시간이 경과하였을 때, 세포를 20시간 동안 100 pM TGFβ1로 처리하고, 루시퍼라제 활성에 대해 분석하였다. (C) U373MG 세포를 3시간 동안 100 pM TGFβ1로 처리한 후, 명시된 항체 및 명시된 PCR 프라이머를 사용하여 ChIP 분석법을 수행하였다. (D, E) 명시된 Smad 계열의 명시된 구성원들의 siRNA에 의해 매개되는 침묵화 이후 3시간 동안 100 pM TGFβ1로 처리된 U373MG (D) 또는 GBM 뉴로스피어 (E) 중의 *LIF*의 수준을 qRT-PCR 분석법에 의해 결정하였다. Smad에 대해 특이적인 항체 또는 *Smad4*의 qRT-PCR을 사용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. *β-액틴*은 내부 정규화 대조군으로서 결정하였다.

도 5. TGFβ가 환자로부터 유래된 GBM 뉴로스피어 중 LIF-JAK-STAT 경로를 유도한다. (A) 명시된 기간 동안 20 ng/ml LIF로 처리된 GBM1 샘플의 뉴로스피어를 웨스턴 블롯팅하여 p-STAT3 및 STAT3의 수준을 결정하였다. (B) GBM1 샘플의 뉴로스피어를 15분 동안 20 ng/ml LIF 및/또는 0.5 μM P6으로 처리하고, 웨스턴 블롯팅에 의해 전체 p-STAT3 및 STAT3 수준을 결정하였다. (C) GBM1 샘플의 뉴로스피어를 4시간 동안 EGF 및 FGF의 부재하에서 100 pM TGFβ1 또는 2 μM TβRI 억제제로 처리하고, 웨스턴 블롯팅에 의해 p-STAT3, STAT3, p-Smad2, Smad2 및 α-튜불린의 수준을 결정하였다. (D) GBM1 샘플의 뉴로스피어를 4시간 동안 EGF 및 FGF의 부재하에서 100 pM TGFβ1, 0.5 μM P6 또는 LIF에 대한 차단 항체로 처리하고, 웨스턴 블롯팅에 의해 전체 p-STAT3 및 STAT3의 수준을 결정하였다.

도 6. LIF가 TGFβ에 의한 GIC의 자가-재생 증가를 매개한다. (A, B) GBM1, GBM2 및 GBM3 뉴로스피어 세포를 EGF 및 FGF의 부재하에서 100 pM TGFβ1, 20 ng/ml LIF 및/또는 항-LIF 중화 항체 및 0.5 μM P6으로 처리하고, 새로 형성된 뉴로스피어의 개수 (A) 또는 세포의 총 개수 (B)를 결정하였다. (C) A 및 B에서 설명된 바와 같이 처리된 GBM1 뉴로스피어의 대표 영상.

도 7. TGFβ 및 LIF가 GBM 뉴로스피어의 분화를 방해한다. (A) 7일 동안 성장 인자의 부재하에서 100 pM TGFβ1 또는 20 ng/ml LIF로 처리되고, 마지막 3일 동안은 폴리-L-리신으로 코팅된 슬라이드 상에서 처리된 GBM1로부터 유래된 뉴로스피어 중에서의 명시된 단백질에 대한 면역세포화학법을 수행하였다. (B) 성장 인자의 부재하에서 명시된 처리법으로 처리한 후 7일이 경과하였을 때, GBM1 뉴로스피어 중의 *무사시-1 (Msi-1)*, *Sox2* 및 *네스틴*의 mRNA 수준을 결정하였다. 18S의 RNA 수준을 내부 정규화 대조군으로서 사용하였다.

도 8. TGFβ가 정상적인 인간의 신경전구세포의 자가-재생능에 미치는 효과. (A) 명시된 마커의 면역세포화학법을 인간 신경전구세포 뉴로스피어에서 수행하였다. (B) GBM1 샘플의 뉴로스피어 및 인간 신경전구세포의 뉴로스피어를 3시간 동안 100 pM TGFβ 계열의 명시된 구성원들과 함께 인큐베이션시키고, *LIF*의 mRNA 수준을 결정하였다. (C, D) 정상적인 인간의 신경전구세포의 뉴로스피어 세포를 상기 도 1D에 기술된 바와 동일한 조건하에서 7일 동안 100 pM TGFβ1 또는 20 ng/ml LIF의 존재하에 인큐베이션시키고, 새로 형성된 뉴로스피어의 개수 (C) 및 세포 총 개수 (D)를 결정하였다.

도 9. 인간 신경교종 종양에서의 LIF의 발현. (A) 인간 신경교종 환자로부터 유래된 39개의 샘플 중에서 *LIF*, *TGFβ2*, *무사시-1 (Msi-1)*, *Sox2* 및 *네스틴* 전사체의 발현을 qRT-PCR 분석법에 의해 결정하였다. (B) *LIF*와 *TGFβ2*, *무사시-1 (Msi-1)*, *Sox2* 또는 *네스틴* 간의 상관관계. 스피어만(Spearman) 등위 상관계수 (Rho), 양측 유의 수준. (C) TGFβ는 종양 종괴 내의 줄기 세포-유사 세포 군의 양을 증가시키면서, LIF를 유도시킴으로써 GSC의 자가-재생을 촉진시킨다.

도 10. 신경교종 환자의 LIF mRNA 수준은 평균 기대 수명과 연관이 있다. 로그 순위 검정에 의하면, LIF mRNA 수준이 ≥ 2배 상향조절되어 있는 신경교종 환자의 전반적인 생존은 환자 중 그 나머지 환자들보다 유의적으로

더 낮다는 것을 보여주는 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 곡선 (p = 7.2E-8). 국립 암 연구소(National Cancer Institute)의 뇌 신생물 분자 데이터 저장소 (REMBRANDT: REpository for Molecular BRAin Neoplasia DaTa) 프로그램으로부터 데이터를 입수하였다.

도 11. 교모세포종 (GBM) 환자의 LIF mRNA 수준은 평균 기대 수명과 연관이 있다. 로그 순위 검정에 의하면, LIF mRNA 수준이 ≥ 9배 상향조절되어 있는 GBM 환자의 전반적인 생존은 환자 중 그 나머지 환자들보다 유의적으로 더 낮다는 것을 보여주는 카플란-마이어 곡선 (p = 6.9E-4). 국립 암 연구소의 뇌 신생물 분자 데이터 저장소 (REMBRANDT) 프로그램으로부터 데이터를 입수하였다.

도 12. 특정 종양 유형을 앓는 일부 환자의 LIF 수준은 비정상적으로 높다. 일부 환자 (동그라미)의 LIF 수준은 비정상적으로 높다는 것을 나타낸, 상이한 종양 유형에서의 LIF mRNA 수준. 데이터는 진사피엔스(GeneSapiens)의 생물정보학 팀 (www.genesapiens.org)으로부터 입수하였다. 번호는 하기를 나타낸다: 1) 프리-B 세포 급성 림프모구 백혈병 (B-ALL); 2) 프리-T 세포 급성 림프모구 백혈병 (T-ALL); 3)B 세포 만성 림프성 백혈병 (B-CLL); 4) 급성 골수성 백혈병 (AML); 5) 혈장 세포 백혈병; 6) 골수종; 7) B-세포 림프종; 8)버킷트(Burkitts) 림프종; 9) T-세포 림프종; 10) 연골육종; 11) 골육종; 12) 유잉(Ewings) 육종; 13) 윤활막 육종; 14) 평활근육종; 15) 횡문근육종; 16) 지방육종; 17) 육종, 원인불명 (NOS); 18) 피부, 편평 세포 암종; 19) 흑색종; 20) 신경교종; 21) 신경모세포종; 22) 악성 말초신경초종양 (MPNST); 23) 척색종; 24) 경구 편평 세포 암종; 25) 후두인두 편평 세포 암종; 26) 이하선, 암종; 27) 폐 선암종; 28) 폐, 대세포 암; 29) 폐, 소세포 암; 30) 폐, 편평 세포 암종; 31) 폐, 카르시노이드 종양; 32) 중피종; 33) 식도 선암종; 34) 위 선암종; 35) 위장관 기질 종양 (GIST); 36) 소장, 선암종; 37) 결장직장 암종; 38) 간암; 39) 췌장암; 40) 부신 종양; 41) 갑상선암종; 42) 신 호산성 과립세포종; 43) 신장암; 44) 신장모세포종; 45) 담낭암; 46) 고환, 고환종; 47) 고환, 비-고환종; 48) 전립선 선암종; 49) 유관암; 50) 소엽성 유방암; 51) 수질성 유방암; 52) 다른 유방암; 53) 유방 암종, NOS; 54) 난소, 투명 세포 암종; 55) 난소, 자궁내막유사 암종; 56) 난소, 생식 세포 종양; 57) 난소, 점액암종; 58) 난소, 장액성 난소암종; 59) 난소 선암종, 원인불명 (NOS); 60) 다른 난소 종양; 61) 배막 선암종; 62) 자궁 육종; 63) 자궁 선암종; 64) 자궁 편평 세포 암종; 65) 자궁, 뮐러(Mullerian) 종양; 66) 자궁경부 선암종; 67) 자궁경부 편평 세포 암종; 68) 질/외음부 암종.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 발명의 상세한 설명

[0019] 본 발명의 치료 방법

[0020] 본 발명의 저자는 놀랍게도 IL-6형 시토카인, 더욱 특히, LIF가 TGFβ에 의해 매개되는 JAK-STAT 캐스캐이드의 활성화에 관여하며, 이를 통해 세포 증식 과정을 유도하고 종양 줄기 세포 (암 줄기 세포)의 증가를 유도한다는 것을 발견하게 되었다. 이러한 사실에 기초하여, 본 발명자들은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환, 예를 들어, 암 치료를 위한, 예를 들어, 특히, 높은 활성의 JAK-STAT 신호전달 경로에 의해 유발되는 암 치료를 위한 신규한 치료의 창을 열게 되었는데, 이러한 요법은 IL-6형 시토카인의 사용을 기초로 한다. JAK-STAT 활성화에서 TGFβ의 하류에 있는 요소로서 LIF를 확인하게 됨에 따라 추가로는 상기 JAK-STAT 캐스캐이드를 더욱 효율적으로 억제시킬 수 있는데, 그 이유는 TGFβ에 의해 활성화되는 그의 활성화 뿐만 아니라, 임의의 다른 자극원, 예를 들어, 인터루킨, 에리트로포이에틴, 성장 호르몬, 프로락틴 등에 의한 그의 활성화를 막을 수 있기 때문이다.

[0021] 그러므로, 한 측면에서, 본 발명은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제에 관한 것이다.

[0022] 어떤 이론으로도 제한하고자 하는 것은 아니지만, LIF 및 그의 억제제가 종양 증식에 미치는 효과는 종양 줄기 세포 증식을 촉진시키는 LIF의 능력에 있다고 판단된다. 그러므로, LIF 억제제를 사용한 치료법은 특히 IL-6형 시토카인이 고도로 발현되는 종양, 및 더욱 특히, LIF에 대해 지시될 것이다. 또한, 종양 줄기 세포의 공지의 능력이 화학요법에 대해 내성을 띤다고 가정하면, 화학요법에 대해 내성을 띠는 종양 치료법 또한 관심의 대상이 될 것이다. 마지막으로, 종양 줄기 세포가 재발의 원인이 되는 것처럼 보인다고 가정하면, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 치료하기 위한 LIF 억제제의 사용은 재발 발생을 예방하기 위해 특별히 적합화될 수 있을 것이다.

[0023] 그러므로, 제1 측면에서, 본 발명은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 IL-6형 시토카인의 발현

및/또는 활성의 억제제에 관한 것이다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제를 투여하는 것을 포함하는, 원치 않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환 치료용의 제약 조성물의 제조를 위한 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제에 관한 것이다.

[0026] 본 발명과 관련하여, "IL-6형 시토카인"은 IL-6, IL-11, 백혈병 억제 인자 (LIF), 온코스타틴 M (OSM), 카디오트로핀-1 (CT-1), 섬모 신경 성장 인자 (CNTF) 및 카디오트로핀-유사시토카인 (CLC)을 포함하며, Jak-STAT 신호 전달 경로를 활성화시키는, IL-6 계열의 시토카인 구성원으로서 이해된다. 이러한 시토카인은 당단백질-130 (gp-130) 수용체의 서브유니트 공통 구성 요소인 동일의 수용체 복합체를 공유한다.

[0027] 그러므로, 본 발명의 특정 실시양태에서, IL-6형 시토카인은 LIF, IL-6, IL-11, 온코스타틴 M, 카디오트로핀-1, CNTF 및 CLC로부터 선택된다. 또 다른 보다 특정의 실시양태에서, IL-6형 시토카인은 LIF이다.

[0028] 본 발명과 관련하여, "억제제"는 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 전사 및 번역을 방해하거나 차단할 수 있거나 (즉, 상기 유전자의 발현을 방해하거나 차단할 수 있거나), 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질이 그의 기능 (활성)을 수행하지 못하도록 방해할 수 있거나, 즉, IL-6형 시토카인이 JAK-STAT 신호전달 경로의 활성화를 유도하지 못하도록 방해할 수 있는 임의의 물질 또는 화합물로서 이해된다. 화합물이 IL-6형 시토카인의 억제제인지 여부를 결정하는 분석법은 현 시점의 기술적 수준에서 주지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Mezt S. et al. (J. Biol. Chem, 2007, vol. 282:1238-1248)]에는 IL-6형 시토카인에 감수성인 프로모터의 제어하에 리포터 유전자의 발현을 차단시킬 수 있는 억제제의 능력에 기초한 분석법이 기술되어 있다. LIF에 대한 구체적인 경우에 있어서, 억제제를 확인하는 분석법은 LIF 부재하의 M1 뮤린 골수성 백혈병 세포 분화의 억제 (WO2005/30803), 주르카트(Jurkatt) 세포로부터의 칼슘 방출 자극 억제 (US5980894), IL-6형 시토카인에 의한 STAT-3 인산화 측정 (본 명세서 실시예의 실시예 2, 섹션 2.4 참조) 등을 포함한다.

[0029] 일례로, 본 발명에서 그의 사용에 적합한 LIF 발현 억제제는 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간섭 RNA (siRNA), 촉매성 RNA 또는 특이적 리보자임, 데코이 활성이 있는 RNA, 즉, 유전자 발현에 중요한 인자 (일반적으로 단백질성 인자)에 특이적으로 결합할 수 있는 능력이 있는 RNA 등이 있다. 유사하게, IL-6형 시토카인을 코딩하는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질이 그의 기능을 수행하지 못하도록 방해할 수 있는 억제제는 예를 들어, 상기 단백질의 억제성 펩티드, 그의 기능 수행에 필수적인 단백질의 에피토프, 또는 IL-6형 시토카인 수용체에 대해 특이적으로 유도되는 항체 등이다.

[0030] 그러므로, 본 발명의 특정 실시양태에서, 억제제는 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특이적 리보자임, 항체, 폴리펩티드 및 IL-6형 시토카인 수용체의 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0031] siRNA

[0032] 소형 간섭 RNA, 또는 siRNA는 RNA 간섭에 의해 표적 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 제제이다. siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있거나, 또는 표적 세포 중 생체내에서 합성될 수 있다. siRNA는 전형적으로 길이가 15 내지 40개의 뉴클레오티드로 된 더블 스트랜드 RNA로 구성되고, 1 내지 6개의 뉴클레오티드로 이루어진 3' 및/또는 5' 오버행 영역을 포함할 수 있다. 오버행 영역의 길이는 siRNA 분자의 전체 길이와는 상관이 없다. siRNA는 표적 메신저의 분해 또는 전사 후 침묵화에 의해 작용한다.

[0033] siRNA는 siRNA를 형성하는 역평행 스트랜드가 루프 또는 헤어핀 영역에 의해 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 shRNA (짧은 헤어핀 RNA)로 불릴 수 있다. 이러한 siRNA는 (19 내지 25개의 뉴클레오티드로 이루어진) 짧은 안티센스 서열에 이어 5 내지 9개 사이의 뉴클레오티드로 이루어진 루프 다음으로 센스 스트랜드로 이어지는 화합물이다. shRNA는 플라스미드 또는 바이러스, 특히 레트로바이러스, 및 더욱 특히 레트로바이러스에 의해 코딩될 수 있고, 예를 들어, RNA 폴리머라제 III의 U6 프로모터와 같은 프로모터의 제어하에 있을 수 있다.

[0034] 본 발명의 siRNA는 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 mRNA와, 또는 상기 단백질을 코딩하는 게놈 서열과 실질적으로 상동성이다. "실질적으로 상동성"이라는 것은 siRNA가 RNA 간섭에 의해 표적 mRNA의 분해를 일으킬 수 있도록 상기 siRNA가 상기 표적 mRNA와 충분한 상보성을 띠거나 유사한 서열을 가지는 것으로서 이해된다. 상기 간섭을 일으키는 데 적합한 siRNA로는 RNA에 의해 형성된 siRNA 뿐만 아니라, 예를 들어:

[0035] - 뉴클레오티드 간의 결합이 예를 들어, 포스포티오에이트 결합과 같이 천연적으로 발견되는 것과 다른 것인

siRNA,

[0036] - 작용성 시약, 예를 들어, 형광단과 RNA 스트랜드와의 접합체,

[0037] - 2' 위치의 히드록실에 대해 다른 작용기를 사용하는 변형에 의해 이루어진 RNA 스트랜드 말단, 특히 3' 말단의 변형물,

[0038] - 예를 들어, 2' 위치의 O-알킬화된 잔기, 예를 들어, 2'-O-메틸리보스 p 2'-O-플루오로리보스와 같이 변형된 당을 포함하는 뉴클레오티드,

[0039] - 예를 들어, 할로겐화된 염기 (예를 들어, (예를 들어 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실), 알킬화된 염기 (예를 들어 7-메틸구아노신)와 같이 변형된 염기를 포함하는 뉴클레오티드와 같이, 상이한 화학적 변형을 포함하는 siRNA를 포함한다.

[0040] 본 발명의 siRNA 및 shRNA는 당업자에게 공지되어 있는 일련의 기법을 사용하여 수득될 수 있다. 예를 들어, siRNA는 종래의 DNA/RNA 합성기에서 포스포라미디트로 보호된 리보뉴클레오시드로부터 화학적으로 합성될 수 있다. 별법으로, siRNA는 스트랜드를 코딩하는 영역 또는 siRNA를 코딩하는 스트랜드가 RNA 폴리머라제 III 프로모터의 작동적 제거하에 있는 경우, 플라스미드 또는 바이러스 벡터로부터 재조합 방식으로 제조될 수 있다. 세포에서 다이서(Dicer) RNase가 shRNA를 기능성 siRNA로 프로세싱한다.

[0041] siRNA의 디자인을 위한 기초로서 간주되는 뉴클레오티드 서열 영역은 제한되는 것은 아니며, 이는 (출발 코돈과 종결 코돈 사이의) 코딩 서열 영역을 포함할 수 있거나, 또는 별법으로 바람직하게는 25 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어진 길이를 가지며 출발 코돈에 대해 위치 3'인 임의의 위치에 있는 5' 또는 3' 비번역 영역 서열을 포함할 수 있다. siRNA를 디자인하는 한가지 방법은 $AA(N_{19})TT$ 모티프 (여기서, N은 IL-6형 시토카인을 코딩하는 서열 중의 임의의 뉴클레오티드일 수 있다)를 확인하고, G/C 함량이 높은 것을 선택하는 것을 포함한다. 상기 모티프가 발견되지 않을 경우, $NA(N_{21})$ 모티프 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있다)를 확인할 수 있다.

[0042] 안티센스 올리고뉴클레오티드

[0043] 본 발명의 추가 측면은 발현을 억제시키는, 예를 들어, IL-6형 시토카인을 코딩하는 핵산의 전사 및/또는 번역을 억제시킴으로써 그의 활성을 억제시키고자 하는 것인 단리된 "안티센스" 핵산의 용도에 관한 것이다. 안티센스 핵산은 종래의 염기 상보성에 의해, 또는 예를 들어, 더블 스트랜드 DNA에의 결합인 경우, 이중 나선의 큰 홈(major groove)에서의 특이적인 상호작용을 통해 잠재적인 약물 표적에 결합할 수 있다. 이러한 방법은 당업계에서 일반적으로 사용되는 기법 범위에 관한 것이며, 이는 올리고뉴클레오티드 서열에의 특이적인 결합에 기초한 임의의 방법을 포함한다.

[0044] 본 발명의 안티센스 작제물은 예를 들어, 세포에서 전사되었을 때, 적어도, IL-6형 시토카인을 코딩하는 세포 mRNA의 단일 부분에 대해 상보성인 RNA를 생산하는 것인 발현 플라스미드로서 전달될 수 있다. 별법으로, 안티센스 작제물은 생체외에서 생성되고, 세포내 도입되면 표적 핵산의 mRNA 및/또는 게놈 서열과의 하이브리드화를 통해 발현을 억제시키는 올리고뉴클레오티드 프로브이다. 그러한 올리고뉴클레오티드 프로브는 바람직하게는 내인성 뉴클레아제, 예를 들어, 엑소뉴클레아제 및/또는 엔도뉴클레아제에 대해 내성을 띠는 바, 이에 생체내에서는 안정성을 띠는 변형된 올리고뉴클레오티드이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 사용하기 위한 핵산 분자의 예로는 포스포라미데이트, 포스포티오네이트 및 메틸포스포네이트 DNA 유사체가 있다 (또한, US 특허 문헌 제5,176,996호; 제5,264,564호; 및 제5,256,775호 참조). 안티센스 요법에 유용한 올리고머를 작제하는 일반 접근법은 추가로 예를 들어, 문헌 ([Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988]; 및 [Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988])에 리뷰되어 있다.

[0045] 안티센스 DNA와 관련해서는 예를 들어, 표적 유전자의 -10 내지 +10 사이인 번역 개시 부위로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오티드 영역이 바람직하다. 안티센스 접근법은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 상보성인 올리고뉴클레오티드 (DNA 또는 RNA)를 디자인하는 것을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 mRNA 전사체에 결합함으로써 번역을 방해할 것이다. 절대적인 상보성이 바람직하기는 하지만, 필요한 것은 아니다. 따라서, 더블-스트랜드 안티센스 핵산의 경우, 더블-스트랜드 DNA를 이루는 싱글 스트랜드를 분석할 수 있거나, 또는 트리플-스트랜드 DNA의 형성을 분석할 수 있다. 하이브리드화 능력은 상보성 정도와 안티센스 핵산의 길이, 둘 모두에 의존할 것이다. 일반적으로, 하이브리드화하는 핵산의 길이가 길면 길수록 그를 포함하는 RNA 쌍 형성 오류는 많아지게 되지만, 이는 여전히 안정적인 이중체 (또는 경우에 따라 삼중체)를 형성한다. 당업

자는 하이브리드화된 복합체의 융점을 결정하는 표준 프로세스를 사용함으로써 쌍 형성 오류의 허용가능 정도를 결정할 수 있다.

[0046] mRNA의 5' 말단, 예를 들어, AUG 출발 코돈까지를 포함하는 비-번역 5' 서열에 상보성인 올리고뉴클레오티드는 번역을 억제시키기 위해서는 가능한 효과적으로 작용을 하여야 한다. 그러나, mRNA의 3' 서열에 상보성인 서열 또한 mRNA의 번역을 억제시키는 데 효과적인 것으로 최근에 밝혀졌다 (문헌 [Wagner, Nature 372: 333, 1994]). 그러므로, 유전자의 비-번역, 비-코딩 5' 또는 3' 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드가 상기 mRNA의 번역을 억제시키는 안티센스 접근법에서 사용될 수 있다. mRNA의 비-번역 5' 영역에 상보성인 올리고뉴클레오티드는 AUG 출발 코돈의 상보체를 포함하여야 한다. mRNA의 코딩 영역에 상보성인 올리고뉴클레오티드는 번역 억제제로서의 효과는 덜 하지만, 이 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다. mRNA의 5', 3' 또는 코딩 영역과 하이브리드화하도록 디자인된 경우, 안티센스 핵산은 적어도 6개의 뉴클레오티드로 이루어진 길이어야 하고, 바람직하게는, 약 100개 미만, 더욱 바람직하게는, 약 50, 25, 17 또는 10개 뉴클레오티드 미만의 뉴클레오티드로 이루어진 길이어야 한다.

[0047] 유전자 발현을 억제시킬 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 능력을 정량하는 시험관내 연구를 먼저 수행하는 것이 바람직하다. 이러한 연구에서 안티센스 유전자 억제와 올리고뉴클레오티드의 비-특이적인 생물학적 효과 사이를 구별할 수 있는 대조군을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 연구에서 RNA 또는 표적 단백질 수준을 내부 RNA 또는 단백질 대조군의 것과 비교하는 것 또한 바람직하다. 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수득한 결과를 대조군 올리고뉴클레오티드를 사용하여 얻은 결과와 비교할 수 있다. 대조군 올리고뉴클레오티드의 길이는 분석하고자 하는 올리고뉴클레오티드의 길이와 동일하고, 올리고뉴클레오티드 서열이, 표적 서열과의 특이적인 하이브리드화를 방해하는 데 필요한 정도보다는 크지 않은 정도로 안티센스 서열과 상이한 것이 바람직하다.

[0048] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있거나, 또는 키메라 혼합물 또는 그의 변형된 유도체 또는 변형체, 싱글-스트랜드 또는 더블-스트랜드일 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 분자의 안정성, 하이브리드화 등을 개선시키기 위해 염기 기, 당 기, 또는 포스페이트 골격에서 변형될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, (예를 들어, 이를 숙주 세포 수용체 쪽으로 향하게 만드는) 펩티드, 또는 세포막 (예를 들어, 문헌 ([Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989]; [Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987]; PCT 공개 번호 WO88/09810)를 참조) 또는 혈액-뇌장벽 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO89/10134 참조)을 통한 수송이 보다 용이하게 이루어질 수 있도록 하는 물질, 하이브리드화 유발 절단 물질 (예를 들어, 문헌 [Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988] 참조), 인터컬레이팅 물질 (예를 들어, 문헌 [Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988] 참조)과 같은 다른 결합 기를 포함할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 올리고뉴클레오티드는 또 다른 분자, 예를 들어, 펩티드, 하이브리드화 유발 교차-결합 물질, 케리어 물질, 하이브리드화 유발 절단 물질 등에 접합될 수 있다.

[0049] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 히포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록시티에틸) 우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실큐에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실큐에오신, 5'-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 와이부톡소신, 슈도우라실, 큐에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸 에스테르, 우라실-5-옥시아세트산 (v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필) 우라실, (acp3)w, 및 2,6-디아미노퓨린을 포함하나, 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택되는 변형된 염기 기를 적어도 하나 포함할 수 있다.

[0050] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 2-플루오로아라비노스, 크실룰로스, 및 헥소스를 포함하나, 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택되는 변형된 당 기를 적어도 하나 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 또한 중성 펩티드와 유사한 골격을 포함할 수 있다. 그러한 분자는 펩티드 핵산 (PNA) 올리고머로서 지칭되며, 이는 예를 들어, 문헌 ([Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996], 및 [Eglom et al., Nature 365: 566, 1993])에 기술되어 있다. PNA 올리고머가 가진 장점은 DNA의 중성 골격에 기인하여 본질적으로는 배지의 이온력과는 독립적인 방식으로 상보성 DNA에 결합할 수 있는 그의 능력이다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 포스포티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포라미도티오에이트, 포스포라미데이트, 포스포로디아미데이트, 메틸포스포네이트, 알킬 포스포트리에스테르, 및 포름아세탈 또는 그

의 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 변형된 포스페이트 골격을 적어도 하나 포함한다.

[0051] 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 알파-아노머 올리고뉴클레오티드이다. 알파-아노머 올리고뉴클레오티드는 상보성 RNA와 특이적인 더블-스트랜드 하이브리드를 형성하는데, 여기서, 스트랜드는 전형적인 역평행 방향과는 대조적으로, 서로에 대해 평행하다 (문헌 [Gautier et al., Nucl. Acids Res. 15: 6625-6641, 1987]). 올리고뉴클레오티드는 2'-O-메틸리보뉴클레오티드 (문헌 [Inoue et al., Nucl. Acids Res. 15: 6131-6148, 1987]) 또는 RNA-DNA 키메라 유사체 (문헌 [Inoue et al., FEBS Lett. 215: 327-330, 1987])이다.

[0052] 표적 mRNA 서열의 코딩 영역에 상보성인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있고, 비-번역 전사 영역에 상보성인 것 또한 사용될 수 있다.

[0053] 일부 경우에, 안티센스 농도가 내인성 mRNA의 번역을 억제시키는 데 충분한 농도에 도달하기는 어려울 수 있다. 그러므로, 바람직한 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 강력한 pol III 또는 pol II 프로모터의 제어하에 위치하는 재조합 DNA 작제물을 사용한다. 표적 세포를 형질감염시키기 위해 상기와 같은 작제물을 사용하게 되면 충분한 양의 싱글-스트랜드 RNA의 전사가 이루어지고, 이를 통해 약물의 잠재적인 표적 내인성 전사체와의 상보적인 염기쌍이 형성될 것이며, 이로써 번역은 이루어지지 않을 것이다. 예를 들어, 세포에 의해 포획되고, 안티센스 RNA의 전사를 지시할 수 있도록 벡터가 도입될 수 있다. 그러한 벡터는 에피좀에 남아있거나, 또는 염색체에 통합될 수 있으며, 전사되어 원하는 안티센스 RNA를 생산할 수 있다. 그러한 벡터는 당업계의 재조합 DNA 기술 표준 방법을 사용하여 작제될 수 있다. 벡터는 바이러스 플라스미드, 또는 포유동물 세포에서 복제 및 발현을 위해 사용되는 당업계에 공지된 다른 플라스미드일 수 있다. 안티센스 RNA를 코딩하는 서열의 발현은 포유동물 세포, 바람직하게는, 인간 세포에서 작용을 하는, 당업계에 공지된 임의의 프로모터에 의해 이루어질 수 있다. 상기 프로모터는 유도성 또는 구성적 프로모터일 수 있다. 그러한 프로모터로는 SV40 초기 영역의 프로모터 (문헌 [Bernoist and Chambon, Nature 290: 304-310, 1981]), 라우스 육종 바이러스의 3' 장쇄 반복 말단부에 포함되어 있는 프로모터 (문헌 [Yamamoto et al., Cell 22: 787-797, 1980]), 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터 (문헌 [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1441-1445, 1981]), 메탈로티오네인 유전자 조절 서열 (문헌 [Brinster et al., Nature 296: 39-42, 1982]) 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 플라스미드, 코스미드, YAC 또는 바이러스 벡터 중 임의 유형의 것이 재조합 DNA 작제물을 제조하는 데 사용될 수 있으며, 이는 조직 부위에 직접 도입될 수 있다.

[0054] 별법으로, 표적 유전자의 발현은 상보성 데옥시리보뉴클레오티드 서열을 유전자의 조절 영역 (즉, 프로모터 및/또는 인핸서) 쪽으로 향하게 함으로써 체내 표적 세포 중 유전자의 전사를 방해하여 삼중 나선 구조체를 형성함으로써 발현될 수 있다 (일반적으로, 문헌 ([Helene, AntiCancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991]; [Helene et al., Ann. N.E. Acad. Sci., 660: 27-36, 1992]; 및 [Maher, Bioassays 14(12): 807-15, 1992]) 참조).

[0055] 전사 억제를 위해 삼중 나선을 형성하는 데 사용될 수 있는 핵산 분자로는 싱글-스트랜드가 바람직하고, 이는 데옥시리보뉴클레오티드에 의해 형성된다. 이러한 올리고뉴클레오티드의 염기 조성은 후그스틴(Hoogsteen) 염기쌍 규칙을 통해 삼중 나선의 형성을 증진시켜야 하며, 이는 일반적으로 이중체 스트랜즈 중 상당히 큰 퓨린 또는 피리미딘 섹션이 존재할 것을 필요로 한다. 뉴클레오티드 서열은 피리미딘에 기초할 수 있으며, 이를 통해 생성되는 삼중 나선을 이루는 3개의 회합된 스트랜드를 통해 TAT 및 CGC 삼중체가 형성될 수 있다. 피리미딘이 풍부한 분자는 상기 스트랜드와 평행 방향인 이중체 중 싱글-스트랜드 퓨린이 풍부한 영역에 염기 상보성을 제공한다. 추가로, 퓨린이 풍부한 핵산 분자, 예를 들어, G 잔기 섹션을 포함하는 핵산 분자가 선택될 수 있다. 이러한 분자는 GC 쌍이 풍부한 더블-스트랜드 DNA와 삼중 나선을 형성하게 되는데, 여기서 퓨린 잔기의 대부분은 표적 이중체의 싱글 스트랜드에 위치함으로써 삼중체 중 3개의 스트랜드를 통해 CGC 삼중체가 형성될 것이다.

[0056] 별법으로, 삼중 나선의 형성을 위해 선택될 수 있는 잠재적인 표적 서열은 소위 "헤어핀-형상"이라 불리는 핵산 분자를 생성하면서 증가될 수 있다. 헤어핀-형상의 분자는 교대 5'-3',3'-5' 형태로 합성되며, 이를 통해 이들은 이중체를 이루는 하나의 스트랜드와 제1 염기쌍을 형성한 후, 이어서 나머지 하나와 형성을 하게 되며, 이로써 이중체의 스트랜즈 중에는 상당히 큰 퓨린 및 피리미딘 섹션이 존재할 필요는 없게 된다.

[0057] 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 모르폴린이다. 모르폴린은 천연 핵산 구조체를 다시 디자인하여 얻은 그의 생성물인 합성 분자이다. 전형적으로, 그 길이는 25 염기로서, 이는 표준 핵산 염기쌍 형성에 의해 상보성 RNA 서열에 결합한다. 구조에 관해 말하자면, 모르폴린과 DNA 사이의 차이는, 비록 모르폴린이 표준 핵산 염기를 가지고 있기는 하지만, 이들 염기는 데옥시리보스 환 대신 모르폴린 환에 결합을 하고, 포스페이트 대신 포스포로디아미데이트 기에 의해 결합한다는 점이다. 음이온성 포스페이트를 중성 포스

포로디아미데이트 기로 교체하면 정상적인 생리학적 pH 범위에서 이온화는 생략되어 세포 또는 유기체 중의 모르폴린은 비하전된 분자가 된다. 모르폴린은 키메라 올리고머가 아니며; 모르폴린의 전체 골격은 이러한 변형된 서브유니트로 이루어진다. 비록 모르폴린 스트랜드 및 상보성 DNA 스트랜드의 이종이중체가 세포질 분포를 띠는 양이온성 물질과 함께 사용될 수 있지만, 보다 보편적으로 모르폴린은 싱글-스트랜드 올리고로서 사용된다.

[0058] 다수의 안티센스 구조 유형 (예를 들어, 포스포티오에이트)과 달리, 모르폴린은 그의 표적 RNA 분자를 분해하지 않는다. 대조적으로, 모르폴린은 RNA 중 표적 서열에 결합하고, 다르게는 RNA와 상호작용할 수 있는 분자의 경로에 간단히 배치됨으로써 "입체 장애"에 의해 작용한다. 모르폴린 올리고는 "모펀트" 배아를 생성하면서, 배아, 예를 들어, 난, 제브라피쉬, 아프리카 발톱 개구리(African clawed frog) (제노푸스(Xenopus), 닭, 및 성게의 배아에서 특이적인 mRNA 전사체의 역할을 조사하는 데 보편적으로 사용된다. 적합한 세포질 분포 시스템으로 인해 세포 배양물 중에서는 모르폴린이 효과적이다.

[0059] 모르폴린은 AVI 바이오파마 인코포레이티드(AVI BioPharma Inc.)에 의해 "뉴진스(NeuGenes)"라는 이름으로 약물로서 개발되었다. 이는 마우스에서부터 인간에까지 이르는 범위의 포유동물에서 사용되었으며, 일부는 현재 임상 시험 중에 있다.

[0060] 메신저 RNA (mRNA)의 5' 비-번역 영역에 결합하였을 때, 모르폴린은 5' 캡으로부터 출발 코돈으로의 리보솜 개시 복합체의 진행을 간섭할 수 있다. 이는 표적 전사체의 코딩 영역의 번역이 일어나지 못하도록 방해한다 (이는 소위 유전자 발현을 "침묵화시킨다"라고 불린다). 모르폴린은 단백질의 발현을 침묵화시키는 데 적합하고, 이러한 감소가 세포 또는 유기체를 어떻게 변화시키는지를 습득하는 데 적합한 배지를 제공한다. 일부 모르폴린은 발현을 매우 효과적으로 침묵화시키는 바, 이를 통해 기존의 단백질이 분해된 후에는 표적 단백질이 웨스턴 블롯팅에 의해 검출되지 못한다.

[0061] 모르폴린은 전형적으로는 스플라이싱 지향의 RNPnp 복합체가 프리RNA 나선 중 인트론 경계에서 그의 표적에 결합하지 못하도록 하면서, pre-mRNA의 프로세싱 단계를 간섭할 수 있다. (공여체 측의) U1 결합 또는 (폴리피리미딘 기 및 수용체 부위에서의) U2/U5 결합을 방해하면 변형된 스플라이싱이 일어날 수 있고, 전형적으로는 이로 인해 성숙한 mRNA로부터 엑손이 배제된다. 일부 스플라이싱 표적을 지향하면 인트론이 포함될 수 있는 반면, 잠재 스플라이싱 부위가 활성화되면 부분적인 포함되거나 배제될 수 있다. U11/U12 RNPnp 표적은 또한 차단될 수 있다. 스플라이싱 변형은 역전사효소-중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)에 의해 적절하게 분석될 수 있고, RT-PCR 생성물의 겔 전기영동 후 밴드의 이동으로서 관찰될 수 있다.

[0062] 모르폴린은 또한 miRNA 활성, 리보자임 활성, 인트론 스플라이싱 침묵 요소, 및 스플라이싱 인핸서를 차단시키는 데 사용되었다. U2 및 U12 RNPnp의 기능은 모르폴린으로 억제되었다. 단백질 코딩 영역 내의 "슬리퍼리(slippery)" RNA 서열에 대한 모르폴린은 번역의 리딩 프레임에서의 변화를 유도할 수 있다. 이와 같이 다양한 표적에 대한 모르폴린의 활성은 모르폴린이 단백질 또는 핵산과 mRNA와의 상호작용을 차단하기 위한 범용성 도구로서 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0063] LIF-특이적 안티센스 올리고뉴클레오티드의 예는 문헌 ([Kamohara et al. (Int J Oncol, 2007, 30:977-983)] 및 [Cheng et al. (Biol Reprod, 2004, 70:1270-1276)]))에 기술되어 있다.

[0064] DNA 효소

[0065] 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 발현을 억제시키는 DNA 효소의 용도에 관한 것이다. DNA 효소는 안티센스 및 리보자임 기술, 2가지 모두의 기계론적인 특징들 중 일부를 도입하고 있다. DNA 효소는 안티센스 올리고뉴클레오티드와 유사한 특정의 표적 핵산 서열을 인식할 수 있도록, 그러나, 리보자임과 같이 촉매성을 띠고, 표적 핵산을 특이적으로 절단할 수 있도록 디자인된 것이다.

[0066] 현재 2가지 유형의 DNA 효소가 존재하는데, 이 둘 모두 산토로(Santoro) 및 조이스(Joyce) (예를 들어, 미국 특허 제6,110,462호 참조)에 의해 확인되었다. DNA 효소 10-23은 2개의 아암으로 연결된 루프 구조를 포함한다. 2개의 아암은 특정 표적 핵산 서열을 인식함으로써 특이성을 제공하는 반면, 루프 구조는 생리학적 조건하의 촉매적 기능을 제공한다.

[0067] 간략하면, 표적 핵산을 특이적으로 인식하고 절단하는 이상적인 DNA 효소를 디자인하기 위해서는 당업자는 먼저 독특한 표적 서열을 확인하여야 한다. 이는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 대하여 기술된 것과 동일한 접근법을 사용함으로써 수행될 수 있다. 바람직하게, 독특하거나 또는 실질적으로 독특한 서열에는 대략 18 내지 22개의 뉴클레오티드 중 G/C가 풍부하다. G/C 함량이 높으면 DNA 효소와 표적 서열 간의 상호작용을 더욱 강력하

게 하는 데 도움이 된다.

[0068] DNA 효소 합성시, 상기 효소를 메신저 쪽으로 향하게 지시하는 특이적인 안티센스 인식 서열은 DNA 효소의 2개의 아암을 포함하도록 분할되고, DNA 효소의 루프는 2개의 특이적인 아암 사이에 위치하게 된다.

[0069] DNA 효소를 제조하고 투여하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 제6,110,462호에서 살펴볼 수 있다. 유사하게, 시험관내 또는 생체내에서 DNA 리보자임을 전달하는 방법은 상기에서 상세하게 설명된 바와 같은, RNA 리보자임 전달 방법을 포함한다. 추가로, 안티센스 뉴클레오티드와 같이 DNA 효소도 안정성을 개선시키기 위해, 및 분해에 대한 내성을 개선시키기 위해 임의로 변형될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.

[0070] 본 발명의 안티센스 RNA 및 DNA, 리보자임, iRNA 및 삼중 나선 분자는 당업계에 공지된 임의의 DNA 및 RNA 분자 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 고체상에서의 포스포라미디트의 화학적 합성법과 같이, 현 시점의 기술적 수준에서 주지되어 있는 올리고데옥시리보뉴클레오티드 및 올리고리보뉴클레오티드의 화학적 합성법을 포함한다. 별법으로, 안티센스 RNA 분자를 코딩하는 DNA 서열의 시험관내 및 생체내 전사에 의해 생성될 수 있다. 그러한 DNA 서열은 적합한 RNA 폴리머라제 프로모터, 예를 들어, T7 또는 SP6 폴리머라제 프로모터를 포함하는 매우 광범위한 벡터 내로 도입될 수 있다. 별법으로, 사용되는 프로모터에 따라서 구성적으로 또는 유도적으로 안티센스 RNA를 합성하는 안티센스 cDNA 작제물이 세포주에 안정적으로 도입될 수 있다. 추가로, 세포내 안정성과 반감기를 증가시키기 위한 수단으로서 잘 알려져 있는 여러 가지 변형이 핵산 분자 내로 도입될 수 있다. 가능한 변형으로는 분자의 5' 및/또는 3' 말단에 측면 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 서열의 부가, 또는 올리고데옥시리보뉴클레오티드의 골격에서 포스포디에스테라제보다는 포스포티오에이트 또는 2'-O-메틸 결합 사용을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0071] 리보자임

[0072] 표적 mRNA의 전사체를 촉매적으로 절단할 수 있도록 디자인된 리보자임 분자는 또한 억제시키고자 하는 것이 그의 활성인 IL-6형 시토카인을 코딩하는 mRNA의 번역이 일어나지 못하도록 막기 위해 사용될 수 있다. 리보자임은 특이적인 RNA 절단을 촉매화시킬 수 있는, 효소 활성이 있는 RNA 분자이다 (리뷰를 위해 문헌 [Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994]를 참조). 리보자임의 작용 기전은 리보자임 분자의 상보성 표적 RNA에의 서열-특이적 하이브리드화에 이어, 내부 핵산 가수분해 절단 이벤트로 이어지는 것을 포함한다. 리보자임 분자의 조성은 바람직하게는 표적 mRNA에 상보성인 하나 이상의 서열, 및 mRNA 또는 기능적 등가 서열을 절단하는 역할을 하는 주지의 서열을 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 제5,093,246호를 참조하며, 상기 출원은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다).

[0073] mRNA를 부위-특이적 인식 서열로 절단하는 리보자임을 사용하여 표적 mRNA를 파괴시킬 수 있지만, 해머헤드 리보자임을 사용하는 것이 바람직하다. 해머헤드 리보자임은 표적 mRNA의 것과 상보성 염기쌍을 형성하는 측면 영역에 의해 지배되는 위치에서 mRNA를 절단한다. 바람직하게, 표적 mRNA는 하기 2가지 염기 서열: 5'-UG-3'을 가진다. 해머헤드 리보자임의 작제 및 제조는 당업계에 주지되어 있으며, 이는 문헌 [Haseloff and Gerlach, Nature 334: 585-591, 1988]에 전체적으로 기재되어 있고, PCT 출원 WO89/05852를 참조할 수 있으며, 상기 문헌의 내용은 본원에 참고로 포함된다. 해머헤드 리보자임의 서열은 생체내 절단의 효율을 증가시키기 위해 예를 들어, 전달 RNA (tRNA)와 같은 안정한 RNA에 포매되어 있을 수 있다 (문헌 ([Perriman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 6175-79, 1995]; [of Feyter, and Gaudron, Methods in Molecular Biology, Vol. 74, Chapter 43, "Expressing Ribozymes in Plants", Edited by Turner, P. C, Humana Press Inc., Totowa, N.J.])). 특히, RNA 폴리머라제 III에 의해 매개되는 tRNA와의 융합 리보자임의 발현은 당업계에 주지되어 있다 (문헌 ([Kawasaki et al., Nature 393: 284-9, 1998]; [Kuwabara et al., Nature Biotechnol. 16: 961-5, 1998]; 및 [Kuwabara et al., Mol. Cell. 2: 617-27, 1998]; [Koseki et al., J Virol 73: 1868-77, 1999]; [Kuwabara et al., Proc Natl Acad Sci USA 96: 1886-91, 1999]; [Tanabe et al., Nature 406: 473-4, 2000]) 참조). 전형적으로 표적 cDNA 서열 중에는 해머헤드 리보자임의 잠재적인 절단 부위가 다수 존재한다. 효과는 증가시키고, 비-기능성 mRNA 전사체의 세포내 축적은 최소화시키기 위해 절단 인식 부위가 표적 mRNA의 5' 말단에 인접한 위치에 위치하도록 리보자임을 조작하는 것이 바람직하다. 추가로, 예를 들어 단쇄 및 장쇄 형태의 표적과 같이, 표적의 C-말단 아미노산 도메인의 상이한 부분을 코딩하는 표적 서열에 위치하는 임의의 절단 인식 부위를 사용하면 선택적으로 임의 형태의 표적 쪽으로 향하게 할 수 있고, 이를 통해 표적 유전자 생성물의 형태에 대해 선택적인 효과를 미칠 수 있다.

[0074] 유전자에 대한 리보자임은 반드시 2개의 영역에 대해 상보성인 하이브리드화 영역을 포함하여야 하는데, 여기서 상기 2개의 영역은 각각 표적 mRNA, 예를 들어, 인간 RAP80 단백질 중 어느 것으로 표시되는 서열의 mRNA의 길

이가 적어도 5개, 및 바람직하게는, 각각 길이가 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 인접한 뉴클레오티드인 것이다. 추가로, 리보자임은 코딩 표적 mRNA를 자가촉매적으로 절단할 수 있는 매우 특이적인 엔도뉴클레아제 활성을 가진다. 본 발명은 예를 들어, 치료 약물의 후보 표적 유전자와 같은 표적 유전자를 코딩하는 코딩 mRNA와 하이브리드화함으로써 상기 코딩 mRNA와 하이브리드화하고 그를 절단하여 더 이상은 기능성 폴리펩티드 생성물의 합성을 위해 번역될 수 없도록 하는 리보자임으로 확장된다.

[0075] 본 발명의 조성물에 사용되는 리보자임은 또한 테트라히메나 써모필라(*Tetrahymena thermophila*: IVS, 또는 L19 IVS RNA로 공지)에서 천연적으로 발견되며, 문헌 ([Thomas Cech et al. (Zaug et al., Science 224:574-578, 1984]; [Zaug et al., Science 231: 470-475, 1986]; [Zaug et al., Nature 324: 429-433, 1986]; 국제 특허 출원 공보 번호 WO88/04300 (유니버시티 페턴츠 인코포레이티드(University Patents Inc.)); [Been, et al., Cell 47: 207-216, 1986])에 의해 집중적으로 설명된 바와 엔도리보뉴클리아제 RNA (이하 "체크형(Cech-type) 리보자임"이라 지칭한다)도 포함한다. 체크형 리보자임은 표적 RNA 서열과 하이브리드화하는 8개의 염기쌍을 가진 활성 부위를 갖는데, 추후 여기서, 표적 RNA의 절단이 일어난다. 본 발명은 표적 유전자 또는 핵산 서열 중에 존재하는 8개의 염기쌍을 가진 활성 부위를 가진 표적 서열로서 상기 체크형 리보자임을 포함한다.

[0076] 리보자임은 (예를 들어, 안정성, 가이던스 등을 개선시키기 위해) 변형된 올리고뉴클레오티드에 의해 형성될 수 있고, 생체내에서 표적 유전자를 발현하는 세포로 전달되어야 한다. 바람직한 전달 방법은 형질감염된 세포가 내인성 표적 메신저를 파괴하여 번역을 억제하는 데 충분한 양으로 리보자임을 생산하도록, pol III 또는 pol II의 강력한 구조적 프로모터의 제어하에 리보자임을 "코딩"하는 DNA 작제물을 사용하는 것을 포함한다. 리보자임은 다른 안티센스 분자와 달리, 촉매성을 띠기 때문에, 효과를 내기 위해서는 세포내 농도가 보다 더 낮아야 한다.

[0077] 특정 실시양태에서, 리보자임은 먼저 iRNA에 의해 효과를 감소시키는 데 충분한 서열 부분을 확인함으로써 디자인될 수 있다. 추후 서열의 동일 부분을 리보자임에 도입할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에서, 유전자에 대한 것인 리보자임 또는 iRNA 부분은 실질적으로 표적 핵산, 예를 들어, 인간 RAP80 서열 중 어느 것인 핵산의 적어도 5개, 및 바람직하게는, 6, 7, 8, 9.10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 인접한 뉴클레오티드로 이루어진 것과 동일한 서열이다. 장쇄 스트랜드의 표적 RNA에서는 상당수의 표적 부위에 리보자임이 접근할 수 없는데, 그 이유는 이들이 2차 또는 3차 구조에 숨겨져 있기 때문이다 (문헌 [Birikh et al., Eur J Biochem 245: 1-16, 1997]). 표적 RNA에의 접근성에 관한 문제점을 극복하기 위해, 전형적으로는 컴퓨터가 작성한 2차 구조 예측 방식을 사용하여 싱글-스트랜드일 가능성이 가장 크거나, 또는 "개방형" 구조를 갖게 되는 표적을 확인하다 (문헌 [Jaeger et al., Methods Enzymol 183: 281-306, 1989] 참조). 다른 접근법은 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드 분자를 다수 포함하는, 2차 구조를 예측하는 체계적인 접근법을 이용한 것이다 (문헌 ([Milner et al., Nat Biotechnol 15: 537-41, 1997]; 및 [Patzel and Sczakiel, Nat Biotechnol 16: 64-8, 1998]). 추가로, 미국 특허 제6,251,588호 (그의 내용은 본원에 참고로 포함된다)에는 표적 핵산 서열과 하이브리드화할 수 있는 잠재능을 예측하기 위해 올리고뉴클레오티드 프로브 서열을 평가하는 방법이 기술되어 있다. 본 발명의 방법은 싱글-스트랜드로 예측되는 표적 mRNA 서열의 바람직한 세그먼트를 선별하고, 추가로 본 발명의 iRNA 올리고뉴클레오티드 및 리보자임, 둘 모두를 디자인함에 있어서, 바람직하게는 표적 mRNA의 약 10-20개의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는, 같거나 실제로 동일한 표적 mRNA 서열의 기회적 이용을 위한 상기 방법의 용도를 제공한다 .

[0078] 억제성 펩티드

[0079] 본원에서 사용되는 바, "억제성 펩티드"라는 용어는 IL-6형 시토카인에 결합할 수 있고, 상기 설명된 바와 같이, 그의 활성을 억제시킬 수 있는, 즉, IL-6형 시토카인이 JAK-STAT 신호전달 경로의 활성화를 유도하지 못하도록 방해할 수 있는 펩티드를 의미한다.

[0080] 억제성 펩티드의 예로는 문헌 [White et al. (J.Biol.Chem., 2007, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 104:19357-19362)]에 기술된 폐길화된 LIF 변이체가 있다.

[0081] 시토카인 수용체 결합 억제제

[0082] 본원에서 사용되는 바, "시토카인 수용체 결합 억제제"라는 표현은 IL-6형 시토카인에 대한 친화성을 보이고, 따라서, 시토카인을 격리시킬 수 있으며, 그가 그의 생리학적 수용체에 결합하지 못하도록 방해할 수 있는 임의의 화합물을 나타낸다. 억제성 폴리펩티드는 바람직하게는 가용성 형태의 IL-6형 시토카인 수용체 (소위 데코이 수용체)이다. LIF라는 특정 경우에는, LIF 수용체 또는 LIF 결합 단백질 (LBP)의 가용성 변이체, 천연적으

로 발견되며, 관절 연골 추출물 중에서 프로테오글리칸의 대사에 대하여 LIF가 미치는 효과를 효과적으로 방해할 수 있는 것으로 밝혀진 가용성 형태의 알파 LIF 수용체를 사용할 수 있다 (문헌 [Bell et al., 1997, J. Rheumatol. 24:2394]).

[0083] 억제성 항체

[0084] 본 발명과 관련하여 "억제성 항체"는, IL-6형 시토카인에 또는 상기 IL-6형 시토카인의 수용체에 결합할 수 있고, 상기 IL-6형 시토카인이 JAK-STAT 신호전달 경로의 활성화를 유도하지 못하도록 방해할 수 있는 임의의 항체로서 이해된다. 항체는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법을 사용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 폴리클로날 항체는 억제시키고자 하는 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256: 495)]에 기술되어 있는 바와 같은 방법을 사용함으로써 제조된다. 일단 IL-6형 시토카인 결합능 또는 상기 시토카인의 수용체에 결합할 수 있는 결합능을 가진 항체가 확인되면, 상기 기술된 억제제 확인을 위한 분석법을 사용하여 상기 단백질의 활성을 억제시킬 수 있는 항체가 선별될 것이다 (문헌 [(Metz, 2007 상기 언급한 문헌)]).

[0085] 그러므로, 더욱 특정의 실시양태에서, 항체는 IL-6형 시토카인에 특이적인 억제성 항체, 또는 IL-6형 시토카인 수용체를 차단하는 항체이다.

[0086] LIF에 특이적인 항체는 문헌 (US 5,654,157A, [Kim et al., (J. Immunol. Meth., 156: 9-17, 1992)], [Alphonso et al., (J. Leukocyte Biology (Abstracts of the 28th National Meeting of the Society for Leukocyte Biology, vol. 0, no. SP.2 (1991) (NY, N.E., p. 49) (Mabs D4.16.9, D25.1.4, and D62.3.2)])에 기술되어 있다.

[0087] 본 발명에서, "항체"라는 용어는 광범위하게 해석되어야 하고, 본 발명과 관련해서는 IL-6형 시토카인 또는 상기 IL-6형 시토카인의 수용체인 관심의 대상이 되는 항원을 특이적으로 인식할 수 있는 한, 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 다중특이적 항체 및 그의 단편 (F(ab´)2, Fab) 등을 포함한다. 본 발명과 관련해서 사용될 수 있는 항체의 예로는, 비-제한적인 일례로서, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 재조합 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 완전한 인간 항체 등을 포함한다.

[0088] 폴리클로날 항체는 원래 항원으로 면역화된 동물의 혈청에서 생산되는 항체 분자의 이종성 혼합물이다. 이는 또한 관심의 대상이 되는 항원의 단일 에피토프로 이루어진 펩티드를 가진, 예를 들어, 칼럼 크로마토그래피에 의해 이종성 혼합물로부터 수득된 단일특이적 폴리클로날 항체를 포함한다.

[0089] 모노클로날 항체는 항원의 단일 에피토프에 대해 특이적인 동종성인 항체 군집이다. 이들 모노클로날 항체는 예를 들어, 문헌 ([Koehler and Milstein [Nature, 1975; 256:495-397]] 또는 [Harlow and Lane ["Using Antibodies. A Laboratory Manual" of E. Harlow and D. Lane, Editor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 1998 (ISBN 978-0879695439)]])에 이미 기술되어 있는 종래 기법에 의해 제조될 수 있다.

[0090] 키메라 항체는 상이한 동물 종으로부터 항체의 클로닝 또는 재조합에 의해 작제된 모노클로날 항체이다. 본 발명의 전형적이지만, 비-제한적인 구성에서, 키메라 항체는 일반적으로 항원 인식 및 결합을 위한 부위를 비롯한 가변 단편 (Fv)인 모노클로날 항체의 일부와, 일반적으로 불변 영역 및 인접한 불변 영역을 포함하는 일부인 인간 항체에 상응하는 나머지 다른 한 일부분을 포함한다.

[0091] 완전한 인간 항체는 인간 면역계를 사용하여 또는 인간 면역 세포의 시험관내 면역화에 의해 (애주번트 및 순수한 또는 비-순수한 항원을 포함하거나, 포함하지 않는 유전적 면역화 및 전통적 면역화, 둘 모두를 포함하는 면역화에 의해; 또는 면역계에 항원을 노출시키는 임의의 방법에 의해), 또는 인간 면역 세포로부터 생산된 천연/합성 라이브러리에 의해 트랜스제닉 동물에서 생산된 항체 또는 항체들이다. 이러한 항체는 인간 면역글로불린 유전자가 클로닝되고, 표적 항원 (본 발명에서 상기 항원은 IL-6형 시토카인 또는 상기 IL-6형 시토카인의 수용체이다)으로 면역화된 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 수득되고 선택될 수 있다. 이러한 항체는 파지 디스플레이에 제시된 인간 단일쇄 가변 단편 (scFv) 또는 항원 결합 단편 (Fab)를 선택한 후, 인간 항체에 클로닝하고 이식시킴으로써, 또는 당업자에게 공지된 임의의 다른 생산 및 디스플레이 방법에 의해, 또는 항체 라이브러리의 생성을 위해 양 스트랜드 모두의 가변 단편을 클로닝한 후, 이어서 그의 조합/돌연변이화에 의해 생성된 라이브러리에 의해 수득할 수 있다.

[0092] 인간화된 항체는 그들 자신의 초가변 CDR 영역 대신 인간 항체 중 뮤린 모노클로날 항체의 초가변 상보성 결정

영역 (CDR)의 클로닝 및 이식에 의해 작제된 모노클로날 항체이다.

[0093] 추가로, 본 발명과 관련하여, "항체"라는 용어는 단백질로부터 수득되거나, 또는 재조합 기술에 의해 수득된, 변경된 당화를 가진 변이체 뿐만 아니라, 당화된 또는 비-당화된 항체 단편을 포함하며, 이는 그의 유사성은 더 크도록, 면역원성은 더 작도록 (인간화된 항체), 또는 생물학적 체액 중에서의 안정성은 더 크도록 변형된 것으로서, 본 발명과 관련하여 IL-6형 시토카인이 그의 기능 (활성)을 수행하지 못하도록, 즉, JAK-STAT 신호전달 경로의 활성화를 유도하지 못하도록 방해할 수 있는 능력을 가진, (i) 결합 펩티드에 의해 서로에게 결합된 항체 가변 영역 (scFv), (ii) 시스테인에 의해, 또는 결합 펩티드 및 이황화 결합에 의해 경쇄에 결합된 중쇄의 CH1 불변부 (Fd)를 함께 포함하는 가변 영역 (scFab), (iii) 새로운 변이체, 예를 들어, 단일 중쇄, 또는 (iv) 항체 단편에 대해 이루어진 임의의 변형물로 구성될 수 있다.

[0094] 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 항체는 종래의 유전 공학 또는 재조합 기법, 항체 생산 기법, 생물학적 체액 또는 조직으로부터 추출 및 정제하는 기법, 또는 당업자에게 널리 공지되어 있는, 단백질 및 항체를 수득하는 임의의 다른 종래의 기법에 의해 수득될 수 있다. 항체의 생산 기법에 대한 예시적인 비-제한적 일례로는 인간 면역글로불린 유전자에 대한, 트랜스제닉 동물을 비롯한 동물에서의 면역화 기법, 하이브리도마에 의해 모노클로날 항체 생산, 천연, 합성 또는 관심의 대상이 되는 항원에 면역화된 유기체로부터 유래된 것일 수 있고, 매우 다른 디스플레이 방법 (파지 디스플레이, 리보솜 디스플레이 등)에 의해 선별될 수 있는 항체 라이브러리에 의한 생산, 이어서, 크기, 조성 및 구조가 다른 재조합 항체의 생산을 위해 디자인된 벡터에서 다시 디자인되고 발현될 수 있는 유전 공학 기법이 있다. 항체의 주요 생산 방법 및 정제 방법에 관한 리뷰는 예를 들면, 하기 문헌에서 살펴볼 수 있다:

[0095] ● 문헌 ["Handbook of Therapeutic Antibodies", by S. Duebel. Editor: Wiley-VCH, 2007, Vol: I to III (ISBN 978-3527314539)];

[0096] ● 문헌 ["Antibodies: Volume 1: Production and Purification" by G. Subramanian Ed., Editor: Springer, 1st Ed, 2004 (ISBN 978-0306482458)];

[0097] ● 문헌 ["Antibodies: Volume 2: Novel Technologies and Therapeutic Use", by G. Subramanian Ed., Editor: Springer, first edition, 2004 (ISBN 978-0306483158)];

[0098] ● 문헌 ["Molecular Cloning: a Laboratory manual", by J. Sambrook and D.W. Russel Eds., Publisher: Cold Spring Harbor Laboratory Press, third edition, 2001 (ISBN 978-0879695774)].

[0099] IL-6형 시토카인의 활성을 억제시키는 다른 화합물

[0100] IL-6형 시토카인의 발현을 억제시킬 수 있는 능력을 가진 다른 화합물로는, 그의 생물학적 활성의 변형으로부터 생성된, 단백질에 특이적으로 결합하는 싱글- 또는 더블-스트랜드 D 또는 L 핵산인 압타머 및 스피겔머를 포함한다. 압타머 및 스피겔머의 길이는 15 내지 80개의 뉴클레오티드, 및 바람직하게는 20 내지 50개의 뉴클레오티드로 이루어진 길이이다.

[0101] IL-6형 시토카인에 대해 억제 활성을 가진 폴리펩티드

[0102] 구체적으로, 본 발명과 관련하여 유용할 수 있는 LIF (IL-6형 시토카인)의 길항제는 하기와 같다:

[0103] - LIF 수용체에 대하여 감소된 친화성을 보이거나, 수용체의 쇄들 중 오직 하나에만 결합할 수 있는 수용체 결합 부위에서 돌연변이를 나타내는 LIF 변이체. 상기 돌연변이체의 예로는 하기를 포함한다:

[0104] o 문헌 [Hudson et al. (J.Biol. Chem., 1996, 271:11971-11978)]에 기술되어 있는 돌연변이체,

[0105] o WO05030803에 기술되어 있는 것으로서, Q29A, G124R 및 N128A로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 갖고, LIF 수용체 및 gp130에 대하여 감소된 친화성을 보이는 LIF 변이체. 효능이 높은 LIF의 길항제는 문헌 [Fairlie, W.D. et al. (J.Biol.Chem., 2004, 279:2125-2134)]에 기술되어 있는, MH35-BD/Q29A+G124R을 포함하는 변이체이다.

[0106] o WO9601319에 기술되어 있는 것으로서, 수용체 결합 영역에 하나 이상의 치환을 가진, 구체적으로 인간 LIF의 번호매김에 따라 위치 25-38, 150 내지 160 또는 161 내지 180에 치환을 가진 돌연변이체.

[0107] - 1차 구조를 기반으로 하며, LIF에 결합할 수 있는 능력 및 세포 표면 상의 그의 천연 수용체와의 상호작용이 이루어지지 못하게 방해할 수 있는 능력을 가진 LIF 수용체의 가용성 변이체, 예를 들어, 문헌 [Metz; S. et

al. (J.Biol.Chem., 2008, 283:5985-5995)]에 기술되어 있는 바와 같이, LIF 수용체의 세포외 영역의 일부 및 gp130 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질.

[0108] 본 명세서 도입부에서 제시한 바와 같이, 본 발명자들은 본원에 기술된 본 발명을 사용함으로써 원치않는 세포 증식과 관련된 질환, 예를 들어, 암 치료에서, 특히, 높은 활성의 JAK-STAT 신호전달 경로에 의해 유발되는 암 치료를 위한 신규한 치료의 창을 열었다.

[0109] 본 발명과 관련하여, "원치않는 세포 증식과 관련된 질환"은 암 및 종양의 성장, 진행 및 전이를 포함한다. 본 발명에 기술된 방법에 따라 치료될 수 있는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 예로는 암, 재협착, 동맥경화증, 혈관형성 질환, 섬유증, 피부 질환 및 염증 질환이다.

[0110] 본 발명의 특정 실시양태에서, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환은 암이다.

[0111] "암" 및 "종양"이라는 용어는 탈조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학상 병태에 관한 것이다. 본 발명의 화합물은 유방 종양, 심장 종양, 폐 종양, 소장 종양, 결장 종양, 비장 종양, 신장 종양, 담낭 종양, 두부 종양, 경부 종양, 난소 종양, 전립선 종양, 뇌 종양, 췌장 종양, 피부 종양, 골 종양, 골수 종양, 혈액 종양, 흉선 종양, 자궁 종양, 고환 및 간 종양을 치료하는 데 유용하다. 특히, 본 발명의 화합물을 사용하여 치료할 수 있는 종양으로는 선종, 혈관육종, 성상세포종, 상피 암종, 종자세포종, 교모세포종, 신경교종, 혈관내피종, 혈관육종, 혈종, 간모세포종, 백혈병, 림프종, 수모세포종, 흑색종, 신경모세포종, 골육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종 및 기형종을 포함한다. 특히, 종양/암은 말단 흑자 흑색종, 광선각화증, 선암종, 선낭암종, 선종, 선육종, 선편평 암종, 성상세포 종양, 바르톨린 선(Bartholin gland) 암종, 기저 세포 암종, 기관지선 암종, 모세혈관 카르시노이드, 암종, 암육종, 담관암종, 연골육종, 낭선종, 내배엽동 종양, 자궁내막증식증, 자궁내막 간질 육종, 자궁내막유사 선암종, 뇌실막 육종, 유잉 육종, 초점성 결절성 과증식, 가스트린종, 생식선 종양, 교모세포종, 글루카곤종, 혈관모세포종, 혈관내피종, 혈관종, 간선종, 간선종증, 간세포암종, 인슐린종, 상피내 신생물, 상피내 편평 세포 신생물, 침습성 편평 세포 암종, 대세포 암종, 지방육종, 림프모구 백혈병, 림프성 백혈병, 평활근육종, 흑색종, 악성 흑색종, 악성 중피세포 종양, 신경초 종양, 수모세포종, 수질상피종, 중피종, 점막표피모양 암종, 골수성 백혈병, 신경모세포종, 신경상피 선암종, 결절성 흑색종, 골육종, 난소 암종, 유두상 장액성 선암종, 하수체 종양, 형질세포종, 슈도육종, 폐 모세포종, 신장 세포 암종, 망막모세포종, 횡문근육종, 육종, 장액 암종, 편평 세포 암종, 소세포 암종, 연조직 암종, 소마토스타틴 분비 종양, 편평 암종, 편평 세포 암종, 미분화 암종, 포도막 흑색종, 사마귀모양 암종, 질/외음부 암종, VIP종, 윌름즈 종양(Wilm's tumour)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 더욱더 바람직하게는, 본 발명의 화합물을 사용하여 치료하고자 하는 종양/암으로는 뇌암, 두부경부암, 결장직장 암종, 급성 골수성 백혈병, 프리-B-세포 급성 림프모구 백혈병, 담낭암, 성상세포종, 바람직하게는 II, III 또는 IV 등급 성상세포종, 교모세포종, 바람직하게는 다형성 교모세포종, 소세포 암, 및 비-소세포 암, 바람직하게는 비-소세포 폐암, 전이성 흑색종, 안드로겐-비의존성 전이성 전립선암, 안드로겐-의존성 전이성 전립선암 및 유방암, 바람직하게는 유관암 또는 유방 암종을 포함한다.

[0112] 본 발명의 특정 실시양태에서, 암 또는 암에 존재하는 종양을 형성하는 세포는 높은 수준의 IL-6형 시토카인을 나타내는 것을 특징으로 한다. 본 발명과 관련하여, IL-6형 시토카인 "수준이 높다"라는 것은 시토카인의 농도가 대조군 샘플 중 존재하는 것보다 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 100%, 적어도 110%, 적어도 120%, 적어도 130%, 적어도 140%, 적어도 150% 또는 그 초과인 것만큼 더 크다는 것으로 이해된다.

[0113] 대조군 샘플은 시험 샘플 중의 상기 시토카인의 상대적인 수준을 결정하기 위한 참조로서 사용되는 IL-6형 시토카인의 수준을 가진 샘플로서 이해된다. 기준 샘플은 전형적으로 임상적 관점에서 충분히 입증된 환자, 및 질환을 갖지 않은 환자로부터 수득된다. 상기 샘플에서 바이오마커 농도는 예를 들어, 참조 집단에서의 평균 농도를 결정함으로써 결정될 수 있다. 특정 마커에 대한 참조 농도의 결정시, 샘플 유형의 일부 특징들, 예를 들어, 환자의 연령, 성별, 신체 상태 등을 고려하여야 한다. 예를 들어, 참조 샘플은 집단이 통계학상 유의성을 띨 수 있도록 적어도 2, 적어도 10, 적어도 100 내지 1000명을 초과하는 개체로 이루어진 군의 동일량으로부터 수득할 수 있다.

[0114] IL-6형 시토카인의 농도는 세포내, 간질 간극내 또는 세포내 단백질 및 간질 간극내에서 발견되는 것을 포함하는 추출물에서 결정될 수 있다. IL-6 시토카인 수준은 상기 목적에 적합한 분석법을 사용하여 상기 시토카인의 활성을 측정함으로써, 또는 면역학상 방법을 사용하여 단백질의 양을 측정함으로써, 또는 IL-6형 시토카인에 상

응하는 mRNA를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0115] 또 다른 특정 실시양태에서, 암은 높은 활성의 JAK-STAT 신호전달 경로에 의해 유발되고, 또 다른 더욱더 특정한 실시양태에서는 신경교종이고, 바람직하게는 IV 등급 신경교종이다.

[0116] 앞서 언급된 바와 같이, 본 발명의 억제제는 종양 줄기 세포의 증식을 억제시킬 수 있으며, 이로써, 상기 억제제를 사용하는 것은 줄기 세포의 증식을 억제하는 것이 도움이 되는 질환을 치료하는 데 특히 유용하다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 억제제는 종양 줄기 세포의 자가-재생을 통해 작용한다.

[0117] "동맥경화증"이라는 용어는 동맥벽의 비후화 및 경화에 관한 것이다. 동맥경화증의 구체적인 유형으로는, 대부분의 관상 동맥 질환, 대동맥류 및 다리의 동맥 질환의 원인이 되는 죽상동맥경화증이 있으며, 이는 추가로 뇌혈관 질환에도 기여한다. 정상적인 동맥은 전형적으로 단일층의 내피 세포에 의해 형성된 내부 부분 (내막)을 가진다. 상기 층 상에는 오직 평활근 세포만을 함유하는 이른바 중간층이라 불리는 것이 중첩되어져 있다. 바깥층은 결국 외막이다. 노화가 진행됨에 따라 내막의 폭은 평활근 세포의 유주 및 증식의 결과로서 계속하여 부분적으로는 증가하게 된다. 유사하게는 또한 예를 들어, 확장술로 인해 혈관벽이 손상되었을 때 발생하는 것과 같이, 여러 외상 에피소드 또는 개입의 결과로서 내막의 폭은 증가하게 된다. 본 발명에 사용되는 화합물은 잠재적으로는 내피 세포, 평활근 세포 및 섬유모세포의 증식을 억제시키는 데 유용하다. 따라서, 본 발명에 기술된 랍단형 디테르페노이계 화합물 또한 동맥경화 병태를 치료하는 데 사용될 수 있다. "동맥경화 병태"는 고전적 죽상동맥경화증, 가속 죽상동맥경화증 및 당뇨 및 당뇨사구체경화증으로부터 유발된 혈관 합병증을 비롯한, 내피 및/또는 혈관 평활근 세포의 원치않는 증식을 특징으로 하는 임의의 다른 동맥경화 병태로서 이해된다.

[0118] "재협착"이라는 용어는 관상 동맥을 형성하는 내피 세포에 가해진 기계적 손상에 의해 유발된 성장 인자의 방출 결과로서 세포의 과도한 증식 및 유주를 나타내는 질환으로서 이해된다.

[0119] "혈관형성 질환"은 비정상적인 혈관신생을 나타내는 질환 또는 의학적 병태로서 이해된다. 그러한 질환 또는 병태로는 당뇨 망막병증, 신생 혈관녹내장, 류마티스 관절염 및 일부 암, 예를 들어, 혈관내피종, 혈관종 및 카포시 육종(Kaposi's sarcoma)를 포함한다. 내피 세포 및 혈관 평활근 세포의 증식이 혈관신생의 주요 특징이다. 본 발명에 기술된 화합물은 상기 증식을 억제시키는 데 유용한 바, 이에, 상기 혈관신생에 전반적으로 또는 부분적으로 의존하는 혈관형성 병태의 진행 과정을 억제시키는 데에도 유용하다.

[0120] "섬유증"이라는 용어는 기관 또는 조직에서 섬유성 결합 조직의 형성 또는 과도한 발생에 관한 것이다. 섬유증으로는 예를 들어, 심내막심근 섬유증, 특발성 폐 섬유증, 폐기종, 폐 섬유증 (이는 만성 폐쇄성 폐 질환을 일으킨다), 페로니병(Peyronie's disease), 공피증, 미만성 폐 실질 질환, 켈로이드, 종격 섬유증, 진행성 종괴성 섬유증, 증식성 섬유증, 종양성 섬유증, 간질성 신장 섬유증, 간 섬유증, 수술 흉터 또는 화상을 포함한다.

[0121] "피부 질환"이라는 용어는 임의의 증식성 기능장애와 관련된 세포 증식을 나타내는 피부 질환으로서 이해된다. 이러한 기능장애로는 예를 들어, 켈로이드, 비후 화상 흉터, 지루 각화증, 유두종 바이러스 감염, 액틴 각화증 및 습진을 포함한다.

[0122] "염증 질환"이라는 용어는 임의의 증식성 기능장애와 관련된 세포 증식의 결과로서 염증을 유발하는 질환으로서 이해된다. 이러한 질환으로는 예를 들어, 증식성 사구체신염, 홍반 루푸스, 공피증, 일과성 관절염, 혈전혈관염 및 점액 피부 림프절 증후군을 포함한다.

[0123] 또 다른 측면에서, 본 발명은 제약상 허용되는 담체와 함께 치료 유효량의 본 발명에 따른 억제제를 포함하는, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료를 위한 제약 조성물에 관한 것이다. 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 예는 본 명세서 중 상기에서 언급하였다.

[0124] 본 발명과 관련하여, "치료 유효량"은 원하는 효과를 달성하는 데 필요한, 구체적인 경우에서는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 치료하는 데 필요한 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성을 억제시키는 물질의 양으로서 이해된다. 일반적으로, 투여되는 본 발명에 따른 억제제의 치료 유효량은 다른 인자들 중에서도 치료하고자 하는 개체에 따라, 상기 개체가 앓고 있는 질환의 중증도에 따라, 선택된 제형 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 이유에서, 본 발명에서 언급되는 용량은 당업자에게는 단지 가이드라인으로서만 간주되어야 하며, 당업자는 앞서 언급된 변수에 따라 그 용량을 조정하여야 한다. 그럼에도 불구하고, 본 발명에 따른 억제제는 0.1 내지 1000 mg/kg 체중/일 사이, 바람직하게는 10 mg/kg 체중/일이 포함된 전형적 총 1일량으로 1일 1회 이상, 예를 들면, 1일 1, 2, 3 또는 4회 투여될 수 있다.

[0125] 본 명세서와 관련하여, "치료" 또는 "치료하는"이라는 용어는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환과 관련이 있는 질환, 또는 하나 이상의 증상을 예방, 완화 또는 제거하기 위해 본 발명에 따르 억제제를 투여하는 것을 의미한다. "치료"는 또한 상기 질환의 생리학적 후유증을 예방, 완화 또는 제거하는 것도 포함한다. 본 발명과 관련하여, "완화시키다"라는 용어는 주관적으로 (환자의 느낌 또는 환자에 대한 느낌에 의해) 및 객관적으로 (파라미터 측정에 의해) 치료받는 환자의 상태를 임의로 개선시키는 것을 의미하는 것으로서 이해된다.

[0126] "비히클, 애주번트 및/또는 담체"라는 용어는 활성 성분 투여시 함께 투여되는 분자 실체 또는 물질에 관한 것이다. 그러한 제약상 비히클, 애주번트 또는 담체는 멸균 액체, 예를 들어, 물 및 오일 (석유인 것, 또는 동물, 식물, 또는 합성 기원인 것, 예를 들어, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등 포함), 부형제, 붕해제, 습윤제 또는 희석제일 수 있다. 적합한 제약상 담체는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin]에 기술되어 있다.

[0127] 본 발명과 관련하여, "제약상 허용되는"이라는 용어는 생리학상 내성을 때고, 전형적으로는, 인간에게 투여되었을 때, 알레르기 반응 또는 유사한 부작용, 예를 들어, 위 장애, 어지러움증 등을 유발하지 않는 분자 실체 및 조성물에 관한 것이다. "제약상 허용되는"이라는 용어는 바람직하게 연방 정부 또는 주 정부 규제 기관에 의해 승인을 받았다는 것을 의미하거나, 동물, 및 더욱 특히 인간에서 사용하기 위한 US 약전 또는 일반적으로 인식되는 다른 약전에 포함되어 있는 것을 포함한다는 의미한다.

[0128] IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제 뿐만 아니라, 그를 포함하는 제약 조성물은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료에 유용한 다른 추가 약물과 함께 사용될 수 있다. 상기 추가 약물은 동일한 제약상 조성물의 일부를 형성할 수 있거나, 별법으로 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성에 대한 상기 억제제를 포함하는 제약상 조성물과 동시 투여될 수 있거나, 또는 동시 투여될 수 없는 별도의 조성물 형태로 제공될 수 있다.

[0129] 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료에 유용한 다른 추가 약물의 예로는 알킬화제, 예를 들어, 시클로포스파미드, 카르무스틴, 다우노루비신, 메클로레타민, 클로람부실, 니무스틴, 멜팔란 등; 안트라시클린, 예를 들어, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미톡산트론, 발루비신 등; 탁산 화합물, 예를 들어, 파클리탁셀, 도세탁셀 등; 토포이소머라제 억제제, 예를 들어, 에토포시드, 테니포시드, 톨리포시드, 이리노테칸 등; 뉴클레오티드 유사체 예를 들어, 아자시티딘, 아자티오프린, 카페시타빈, 시타라빈, 독시플루리딘, 플루오로우라실, 젬시타빈, 머캅토퓨린, 메토트렉세이트, 티오구아닌, 프토라푸르 등; 백금-기반 제제, 예를 들어, 카르보플라틴, 시스플라틴, 옥살리플라틴 등; 항신생물제, 예를 들어, 빈크리스틴, 류코보린, 로무스틴, 프로카르바진 등; 호르몬 조절 인자, 예를 들어, 타목시펜, 피나스테라이드, 5-α-리덕타제 억제제 등; 빈카 알카로이드, 예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 빈노렐빈 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적합한 화학요법제는 예를 들어, 문헌 [The Merck Index in CD-ROM, 13th edition]와 같은 문헌에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

[0130] 본 발명의 제약 조성물은 임의의 적합한 투여 경로에 의해, 예를 들어, 경구, 비경우 (예를 들어, 피하, 복강내, 정맥내, 근육내 등), 직장 등을 통해, 전형적으로는 치료하고자 하는 질환의 만성적인 성질에 기인하여 경구 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0131] 경구 경로에 의해 투여되는 제약상 제형의 예시적인 일례로는 정제, 캡슐제, 과립제, 액제, 현탁제 등을 포함하고, 이는 종래의 부형제, 예를 들어, 결합제, 희석제, 붕해제, 활택제, 습윤제 등을 함유할 수 있고, 이는 종래의 방법에 의해 제조될 수 있다. 제약상 조성물은 또한 적합한 제형으로 예를 들어, 멸균 액제, 현탁제, 또는 동결건조된 제품의 형태로서 그의 비경구 투여용으로 적합할 수 있으며; 이러한 경우, 상기 제약 조성물은 적합한 부형제, 예를 들어, 완충액, 시약 등을 포함할 수 있다. 임의 경우에 있어서, 부형제는 선택된 제약상 제형에 따라 선택될 것이다.

[0132] 약물의 상이한 제약상 제형 및 그의 제조 방법에 관한 리뷰는 서적 ["*Tratado de Farmacia Galenica*", by C. Fauli i Trillo, 10th Edition, 1993, Luzan 5, S.A. de Ediciones]에서 살펴볼 수 있다.

[0133] 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 본 발명의 IL-6형 시토카인의 발현 및/또는 활성의 억제제는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간섭 RNA (siRNA), 촉매성 RNA 또는 특이적 리보자임, 데코이 활성이 있는 RNA 등을 포함할 때, 본 발명의 제약 조성물은 유전자 요법에서 그를 사용하기 위한 의도로의 조성물 형태로 제조될 수 있으며; 그에 대한 비-제한적인 일례로, 상기와 같은 경우, 본 발명의 제약 조성물은 상기 뉴클레오티드 서열 또는 상기 서열을 포함하는 유전자 작제물을 포함하는 바이러스성 또는 비-바이러스성 벡터를 포함할 수 있다. 비-제한적인 일례로, 상기 벡터는 예를 들어, 레트로바이러스, 또는 아데노바이러스 등에

기초한 바이러스성 벡터일 수 있거나, 또는 비-바이러스성 벡터, 예를 들어, DNA-리포좀, DNA-중합체, DNA-중합체-리포좀 복합체 등일 수 있다. (문헌 ["Nonviral vectors for Gene Therapy", edited by Huang, Hung and Wagner, Academic Press (1999)] 참조). 상기 벡터는 종래 방법에 의해 인간 또는 동물 체내로 직접 투여될 수 있고, 별법으로, 상기 벡터를 사용하여 생체외에서 세포, 예를 들어, 인간 세포를 비롯한 포유동물 세포를 형질전환, 형질감염, 또는 감염시킨 후, 이를 인간 또는 동물 체내에 이식시켜 원하는 치료학상 효과를 수득할 수 있다. 인간 또는 동물 체내에 투여하기 위해, 상기 세포의 생육성에 부작용을 일으키지 않는 적합한 매질 중의 것으로 상기 세포를 제형화할 것이다.

[0134] 본 발명의 선별 방법

[0135] 본 발명의 저자에 의해 발견되고, 본 명세서에 기술된 연구 결과는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 치료 또는 상기 질환의 진단에 적용될 뿐만 아니라, JAK/STAT 캐스캐이드의 활성화에 LIF가 관여하는 것 또한 IL-6형 시토카인 또는 그의 기능적 등가 변이체에 의해 유도되는 종양 세포의 세포 증식을 차단/억제시킬 수 있는 화합물을 확인하는 선별 방법 개발에 사용될 수 있다.

[0136] 그러므로, 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0137] (i) IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 세포를 IL-6형 시토카인 및 후보 화합물과 접촉시키는 단계, 및

[0138] (ii) 상기 세포의 세포 증식을 차단하는 화합물을 확인하는 단계

[0139] 를 포함하는, IL-6형 시토카인 또는 그의 기능적 등가 변이체에 의해 유도된 종양 세포의 세포 증식을 차단/억제시킬 수 있는 화합물을 확인하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0140] 제1 단계에서, 본 발명의 방법은 IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 세포를 임의의 순도로 후보 화합물의 존재하에서 IL-6형 시토카인과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0141] 본 발명과 관련하여, "세포"는 IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 임의의 세포로서 이해된다. IL-6형 시토카인에 대한 수용체가 발현되고, 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 세포로는 고형 종양으로부터 유래된 세포, 예를 들어, 유방암 세포, 담낭암 세포, 흑색종 세포, 난소암 세포, 췌장암 세포, 전립선암 세포, 결장암 세포, 폐암 세포 등 뿐만 아니라, 액상 종양으로부터 유래된 세포, 예를 들어, 백혈병 및 림프종 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 세포는 신경교종 세포, 바람직하게, 신경교종 개시 세포 (GIC)이다.

[0142] IL-6형 시토카인에 대한 수용체의 예는 문헌 [Auernhammer and Melmed, 2000 (Endocrine reviews, vol. 21(3): 313-345)]에서 살펴볼 수 있으며, 그 예로는 LIF 수용체 (LIFR), 온코스타틴 M 수용체 (OMSR) 등이 있다. 따라서, 연구 대상이 되는 세포로는 고등 진핵 세포, 바람직하게, 포유동물 세포를 포함한다. 바람직하게, 본 발명에 사용되는 세포는 IL-6형 시토카인에 대한 수용체가 구성적으로 발현되는 세포이다. 별법으로, IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 적합하게 발현하는 것으로 발견된 경우이거나, 또는 상기 수용체의 발현을 허용하는 DNA 작제물의 사전 형질감염 이후에는 종래의 세포주 또한 직접 사용될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 세포로는 CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK 293, 3T3, WI38 세포주 등을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 세포는 신경교종 세포, 바람직하게, IV 등급 신경교종 세포이다.

[0143] 본 발명의 선별 방법에 사용되는 세포에서 발현되는 수용체의 유형에 따라, 상응하는 시토카인을 사용하여야 할 필요가 있음을 당업자는 관찰하게 될 것이다. 시토카인은 바람직하게 LIF, IL-6, IL-11, 온코스타틴 M, 카디오트로핀-1, CNTF 및 CLC로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0144] 예를 들어, DMSO 등과 같은, 그의 상호작용에 적합한 용매 중에서 배양물 중에 존재하는, IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 세포를 IL-6형 시토카인 및 후보 화합물과 함께 직접 접촉시키는 단계를 비롯한, 당업자에게 공지된 임의의 방법을 사용하여 세포를 후보 화합물과 접촉시키는 단계를 수행할 수 있다.

[0145] 본 발명에 따라, 세포를 후보 화합물과 "접촉시킨다"라는 것은 후보 화합물을 그의 표적 세포의 근접한 위치로, 세포의 표면상이나 또는 그의 내부로 운반하는 임의의 가능한 방법을 포함한다. 따라서, 후보 화합물이 저분자인 이벤트에서는, 상기 분자를 배양 배지 중에 첨가하는 것도 충분하다. 후보 화합물이 고분자 (예를 들어, 생물학상 중합체, 예를 들어, 핵산, 단백질, 항체, 또는 폴리펩티드)인 이벤트에서는, 상기 분자가 세포 내부에 접근할 수 있도록 하는 수단을 공급하는 것이 필요하다. 후보 분자가 핵산 (예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간섭 RNA (siRNA), 촉매성 RNA 또는 특이적 리보자임, 데코이 활성이 있는 RNA)인 이벤트에서는, DNA 작제물을 도입하는 데 종래의 형질감염 방법이 사용될 수 있다. 후보 화합물이 단백질인 이벤트에서는, 세포를

단백질과 직접 접촉시키는 경우, 및 일단 그 요소가 세포 내부에 존재하게 되면 단백질의 전사/번역을 허용하는 요소와 커플링된 단백질을 코딩하는 핵산과 접촉시키는 경우, 둘 모두로 이루어질 수 있다. 상기 목적을 위해, 앞서 언급된 방법들 중 임의의 방법을 사용하여 세포 내부로 유입될 수 있도록 할 수 있다. 별법으로, 단백질의 세포 내부로의 전위를 촉진시킬 수 있는 펩티드로 변형이 이루어진, 연구하고자 하는 단백질 변이체, 예를 들어, HIV-1 TAT 단백질로부터 유래된 Tat 펩티드, D. 멜라노게스터(*D. melanogaster*) 안테나페디아 단백질의 호메오도메인의 3차 나선, 단순 헤르페스 바이러스 VP22 단백질 및 아르기닌 올리고머와 세포를 접촉시킬 수 있다 (문헌 ([Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci, 21:99-103], [Schwarze, S.R. et al. , 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48], [Lundberg, M et al., 2003, Mol. Therapy 8:143-150], 및 [Snyder, E.L. and Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393])).

[0146] 후보 화합물이 단리된 것인 것보다는, 천연 공급원으로부터 유래된 다소 복합성인 혼합물의 일부를 형성하거나, 화합물로 이루어진 라이브러리인 것이 바람직하다. 본 발명의 방법에 따라 분석될 수 있는 화합물로 이루어진 라이브러리의 예로는 펩티드 및 D-아미노산을 포함하는 펩티드 유사체 또는 비-펩티드 결합을 포함하는 펩티드 둘 모두로 이루어진 라이브리러리, 포스포티오에이트의 비-포스포디에스테르 결합을 포함하는 핵산 또는 펩티드 핵산 유형을 포함하는 핵산으로 이루어진 라이브리러리, 항체로 이루어진 라이브리러리, 당질로 이루어진 라이브리러리, 저분자 화합물, 바람직하게는 유기 분자로 이루어진 라이브리러리, 펩티드 모방체로 이루어진 라이브리러리를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 저분자 유기 화합물로 이루어진 라이브리러리가 사용되는 이벤트에서는 세포 내부로 보다 쉽게 접근할 수 있는 화합물을 포함하도록 상기 라이브러리를 미리 선택할 수 있다. 따라서, 상기 화합물은 결정된 파라미터, 예를 들어, 크기, 친유성, 친수성, 수소 결합 형성능에 기초하여 선택될 수 있다.

[0147] 별법으로, 후보 화합물은 천연 공급원으로부터 수득된 추출물의 일부를 형성할 수 있다. 천연 공급원은 육생, 기생(aerial), 수생 유기체 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 임의 환경으로부터 수득된 동물, 식물일 수 있다.

[0148] 제2 단계에서, 본 발명은 IL-6형 시토카인에 대한 수용체를 발현하는 세포의 세포 증식을 차단하는 화합물을 확인하는 단계를 포함한다. 세포 증식이 차단되었는지 여부를 검출하는 데 적합한 방법의 예로는 하기 방법들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다:

[0149] ● 텔로머라제 활성을 결정하는 방법.

[0150] 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 텔로머라제의 효소 활성을 결정하였다. 예를 들어, 단위 텔로미어 서열로 이루어진 2, 3개 이상의 반복부를 함유하는 특정 반복 서열의 신장 속도를 결정함으로써 텔로머라제 활성은 결정할 수 있다 (문헌 [Yegorov,E.E. et al., 1997, Mol.Biol., 31:130-136]). 상기 활성을 측정하기 위해, 세포질 추출물, 핵 추출물, 세포 용해물 또는 전체 세포를 사용할 수 있다. 텔로머라제 활성에서 "증가"란, 텔로머라제 활성의 절대 수준이 동일 개체의 정상적인 세포와 비교하였을 때 증가된 것이거나, 또는 병태를 앓지 않는 대상체의 정상적인 세포와 비교하였을 때 증가된 것을 의미하는 것으로 이해된다.

[0151] ● 텔로미어의 길이를 결정하는 방법.

[0152] 텔로미어의 길이를 결정하는 방법은 특히 문헌 ([Harley, C. B., et al. (Nature, 1990, 345:458-460)]; [Levy, M. Z.et al., (J. Mol.Biol., 1992, 225:951-960)]; [Lindsey, J.et al., (Mutat. Res., 1991, 256:45-48]) 및 [Allsopp, R. C.et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89:10114-10118])에 당업계에 다수 기술되어 있다. 텔로미어 DNA를 단편화시키지 않는 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 추후에 수득된 단편을 그의 분자량에 의해 분리하고, 텔로미어의 서열에 특이적인 프로브를 사용하여 하이브리드화에 의해 텔로미어를 검출한다.

[0153] ● 세포 증식을 결정하는 방법.

[0154] 문헌 [Harley et al., (Nature, 1990, 345:458-460)]에 기술되어 있는 바와 같이, 세포 복제 시간을 결정하는 방법을 비롯한, 당업자에게 널리 공지되어 있는 방법에 의해 세포 증식을 결정할 수 있다. 세포에서 3중 수소 표지된 우리딘의 도입량을 결정함으로써, 또는 BrdU를 사용하는 비색 분석법에 의해 세포 증식 속도를 결정할 수 있다.

[0155] 본 발명에서, "IL-6형 시토카인의 기능적 등가 변이체"는, 그의 아미노산 서열이 (i) IL-6형 시토카인의 아미노산 서열과 실질적으로 상동성이고, (ii) 상기 IL-6형 시토카인과 동일한 기능을 수행하는 단백질로서 이해된다. 또 다른 특이적인 단백질과 단백질의 기능적 유사성은 발현을 감소시켰을 때 상기 단백질의 활성이 감소되고,

이후 다른 단백질의 서열을 발현시킴으로써 그 활성을 회복시키는 것을 사용하여 간섭 분석법에 의해 결정될 수 있다. 이러한 실험은 특이적인 단백질의 서열에 대해 특이적이고 상보성인 간섭 RNA 서열 및 유도성 프로모터이거나 그렇지 않은 프로모터에 의해 조절되는 다른 단백질에 특이적인 서열을 도입하고 있는 발현 벡터를 사용하여 수행된다.

[0156] 아미노산 서열은 특정 아미노산 서열과 대하여 적어도 70%, 이롭게는 적어도 75%, 전형적으로는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 90%, 더욱더 바람직하게는 적어도 95%, 97%, 98% 또는 99%의 동일성 정도를 가질 때, 상기 특정 아미노산 서열과 실질적으로 상동성인 것이다. 두 아미노산 서열 사이의 동일성 정도는 현 시점의 기술적 수준에서 공지되어 있는 표준 서열 정렬 알고리즘, 예를 들어, BLAST (문헌 [Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10])와 같은 종래 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0157] 중요하지 않은 위치에서 단백질의 관능성에 대한 아미노산의 보존적 치환을 일으키는, IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 뉴클레오티드 서열 중의 돌연변이는 그의 구형인 전반적인 구조 또는 관능성에는 영향을 미치지 않는 진화상 중성인 돌연변이라는 것을 당업자는 이해한다. 상기 변이체는 본 발명의 범주 내 포함된다. 그러한 IL-6형 시토카인과 비교하여 하나 이상의 아미노산의 삽입, 결실, 또는 변형을 가지고, 추가로 상기 시토카인과 동일한 기능을 보존하고 있는 상기 IL-6형 시토카인의 기능적 등가 변이체 또한 본 발명의 범주내 포함된다.

[0158] 그러므로, 본원에서 사용되는 바, "기능적 등가 변이체"라는 용어는 또한 IL-6형 시토카인의 임의의 기능적 등가 단편을 포함한다. "단편"이라는 용어는 단백질의 일부를 포함하는 펩티드에 관한 것이다. 이러한 경우, IL-6형 시토카인의 기능적 등가 단편은 IL-6형 시토카인의 일부를 포함하고, 상기 시토카인과 동일한 기능을 하는 펩티드 또는 단백질이다.

[0159] 본 발명의 진단 방법

[0160] 본 발명의 저자는, IL-6형 시토카인, 더욱 구체적으로 LIF가 JAK-STAT 캐스캐이드의 활성에 관여함으로써, 세포 증식 프로세스와 종양 줄기 세포 (암 줄기 세포)의 증가를 유도한다는 것을 밝혀냈다. 이러한 관찰 결과를 통해 IL-6형 시토카인의 수준을 결정하는 것에 기초하여 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 진하는 진단 방법을 개발할 수 있게 되었다.

[0161] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 생물학적 샘플 중 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현 수준을 정량하는 단계를 포함하며, 여기서 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현이 대조군 샘플 중의 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현에 비하여 증가하였다면, 이는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 지시하거나, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 상기 대상체의 소인이 더 크다는 것을 지시하거나, 또는 상기 대상체에게 수행된 치료 요법에 대해 무반응이라는 것을 지시하는 것인, 대상체에서 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 진단하기 위한, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓는 대상체의 소인을 결정하기 위한, 또는 대상체에서 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환의 단계 또는 중증도를 결정하기 위한, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓는 대상체에게 수행되는 치료 요법의 효과를 모니터링하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0162] 본원에서 사용되는 바, 진단한다는 것은 그에 따라 대상체가 질환을 앓게 될 가능성을 평가하는 것에 관한 것이다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 그러한 것이 바람직하기는 하지만, 상기와 같은 평가가 보통 진단받는 대상체들 100% 모두에 대하여 정확할 수는 없다. 그러나, 상기 용어는 대상체 중 통계학상 유의적인 일부가 질환을 앓거나, 또는 그에 대한 소인을 가지는 것으로 확인할 수 있어야 하는 것을 필요로 한다. 당업자는 간단하게는 예를 들어, 신뢰 구간 결정, p-값 결정, 스튜던츠 t-검정(Student's t-test), 맨-휘트니 검정(Mann-Whitney test) 등과 같은, 수개의 주지 통계학적 평가 도구를 사용함으로써 일부가 통계학상 유의적인지 여부를 결정할 수 있다. 문헌 [Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983]에서 상세한 설명을 살펴볼 수 있다. 바람직한 신뢰 구간은 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%이다. p-값은 0.2, 0.1, 0.05인 것이 바람직하다.

[0163] 본원에서 사용되는 바, "소인"이라는 용어는 대상체에서 상기 언급한 질환, 또는 상기 언급한 질환의 증상들 중 어느 것 또는 다른 진단학상 기준도 여전히 발생하지 않은 상태이지만, 추후에 특정의 가능성을 가지고 그러한

질환이 발생될 수 있다는 것을 의미한다. 상기 가능성은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환의 발병에 대한 통계학적 가능성과는 통계학상 상이할 것이다. 원치않는 세포 증식과 관련된 질환이 발생할 수 있는 가능성은 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 100%의 소인인 것으로 진단되는 것이 바람직하다. 소인 진단은 종종 대상체에서 질환이 발병될 수 있는 가능성에 대한 예후 또는 예측으로 언급될 수 있다.

[0164] 본 발명과 관련하여, "대조군 샘플"은 본 발명에서 사용되는 유전자 및 단백질의 발현 수준의 변동을 결정하는데 사용되는 참조 샘플로서 이해된다. 한 실시양태에서, 참조 값은 건강한 개체로부터 수득된 조직 샘플을 사용하여 제공된 신호로부터 수득된다. 바람직하게는, 여러 명의 건강한 개체의 동일한 조직으로부터 샘플을 채취하고, 이를 조합하여 샘플 중 mRNA 또는 폴리펩티드의 양이 집단에서의 상기 분자에 대한 평균값을 반영하도록 한다.

[0165] IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 정량하는 것은 상기 유전자의 전사로부터 얻은 RNA (mRNA)로부터, 또는 별법으로, 상기 유전자의 상보성 DNA (cDNA)로부터 수행될 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법은 전체 RNA를 수득하고자 하는 목적을 위해 추출하는 단계를 수행하는 것을 포함하며, 이는 종래 기법에 의해 수행될 수 있다 (문헌 ([Chomczynski et al., Anal. Biochem., 1987, 162:156]; [Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532]).

[0166] 사실상, 본 발명과 관련하여 IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자에 의해 코딩된 mRNA, 또는 그의 상응하는 cDNA을 검출하고, 그의 수준을 정량하기 위해 임의의 종래 방법을 사용할 수 있다. 비-제한적인 일례로, 상기 유전자에 의해 코딩된 mRNA의 수준은 종래 방법에 의해, 예를 들어, mRNA의 증폭, 상기 mRNA의 증폭 생성물의 정량화를 포함하는 방법, 예를 들어, 전기영동 및 염색에 의해 정량화될 수 있거나, 또는 별법으로, 노던 블롯 및 관심의 대상인 되는 유전자의 mRNA 또는 그의 상응하는 cDNA에 대해 특이적인 프로브 사용, S1 뉴클레아제를 사용한 지도화, RT-LCR, 하이브리드화, 마이그로어레이 등, 바람직하게는, 프로브 및 프라이머로 이루어진 적합한 세트를 사용하는 실시간 정량적 PCR에 의해 정량화될 수 있다. 유사하게, IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자에 의해 코딩되는 상기 mRNA에 상응하는 cDNA의 수준은 또한 종래의 기법을 사용함으로써 정량화될 수 있다; 이러한 경우, 본 발명의 방법은 상응하는 mRNA의 역전사 (RT)에 의해 상응하는 cDNA를 합성하는 단계, 및 상기 cDNA의 증폭 생성물을 정량하는 단계를 포함한다. 발현 수준을 정량하는 종래 방법은 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.E., Vol. 1-3]에서 살펴볼 수 있다.

[0167] 따라서, 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 정량하는 것은 상기 유전자의 메신저 RNA (mRNA), 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보성 DNA (cDNA), 상기 cDNA의 단편, 또는 그의 혼합물을 정량하는 것을 포함한다.

[0168] 또 다른 특정 실시양태에서, IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 정량하는 것은 정량적 중합효소 연쇄 반응에 의해 수행된다.

[0169] 추가로, 본 발명을 실행하기 위해서 IL-6형 시토카인을 코딩하는 상기 유전자, 즉, IL-6, IL-11, 백혈병 억제 인자 (LIF), 온코스타틴 M (OSM), 카디오트로핀-1 (CT-I), 섬모 신경 성장 인자 (CNTF) 또는 카디오트로핀-유사 시토카인 (CLC)을 코딩하는 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 수준 또한 정량할 수 있다.

[0170] 당업자가 이해하고 있는 바와 같이, 단백질의 발현 수준은 임의의 종래 방법에 의해 정량할 수 있다. 비-제한적인 일례로, 단백질 수준은 예를 들어, 상기 단백질 (또는 항원 결정기를 함유하는 그의 단편)에 결합할 수 있는 능력을 가진 항체를 사용한 후, 형성된 복합체를 정량함으로써 정량될 수 있다. 이러한 분석법에서 사용되는 항체는 표지될 수 있거나, 또는 표지되지 않을 수 있다. 사용될 수 있는 마커의 예시적인 일례로는 방사성 동위원소, 효소, 형광단, 화학 발광성 물질, 효소 기질 또는 보조 인자, 효소 억제제, 입자, 염료 등을 포함한다. 비-표지된 항체 (1차 항체) 및 표지된 항체 (2차 항체)를 사용하는 것으로서 본 발명에서 사용될 수 있는 매우 다양한 분석법이 공지되어 있으며; 이러한 기법으로는 웨스턴 블롯, ELISA (효소-결합 면역흡착 분석법), RIA (방사면역측정법), 경쟁적 EIA (경쟁적 효소 면역측정법), DAS-ELISA (이중-항체 샌드위치 ELISA), 면역세포화학 및 면역조직화학적 기법, 특이적인 항체를 포함하는 단백질의 바이오칩 또는 마이크로어레이를 사용하는 것에 기반한 기법 또는 예를 들어, 딥 스틱과 같은 포맷으로 콜로이드성 침전에 기반한 분석법을 포함한다. 단백질을 검출하고 정량하는 다른 방법으로는 친화성 크로마토그래피 기법, 리간드 결합 분석법 등을 포함한다. 또 다른 특정 실시양태에서, 단백질 수준을 정량하는 것은 웨스턴 블롯, 면역조직화학법 또는 ELISA에 의해 수

행한다.

[0171] 또 다른 바람직한 실시양태에서, IL-6형 시토카인의 발현 수준을 결정하는 것은 상기 단백질의 활성을 결정함에 의해서 수행될 수 있는데, 이는 일반적으로는 고도한 발현 수준으로 인해 샘플 중 상기 단백질의 특이적인 활성이 보다 높게 나타나기 때문이다. IL-6형 시토카인의 활성을 결정하는 분석법은 본 발명의 치료 방법과 관련하여 앞서 기술된 바 있다.

[0172] 그의 수준이 원치않는 세포 증식의 마커로서 사용될 수 있는 것인 IL-6형 시토카인은 본 명세서에서 앞서 기술된 바 있으며, 이는 본 발명의 방법에 적용될 수 있다. 유사하게, 본 발명의 진단 방법은 상기 정의된 원치않는 세포 증식과 관련된 질환들 중 어느 것에 적용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환은 암, 바람직하게는, IL-6형 시토카인 수준이 높거나, JAK-STAT 신호전달 경로의 활성이 높은 암이다.

[0173] 본 발명의 방법을 실행하는 것은 연구하고자 하는 대상체로부터 생물학적 샘플을 수득하는 것을 포함한다. 상기 샘플의 비-제한적인 일례로는 상이한 유형의 생물학적 체액, 예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 복수, 대변, 소변 및 타액 뿐만 아니라, 조직 샘플을 포함한다. 생물학적 체액 샘플은 조직 샘플과 같이 임의의 종래 방법에 의해 수득할 수 있으며; 일례로, 상기 조직 샘플은 외과적 절제술에 의해 수득된 생검 샘플일 수 있다.

[0174] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 진단하기 위한, 또는 상기 암을 앓는 대상체의 소인을 결정하기 위한, 또는 대상체에서 상기 암의 단계 또는 중증도를 결정하기 위한, 또는 상기 암을 앓는 대상체에게 수행되는 치료 요법의 효과를 모니터링하기 위한, IL-6형 시토카인을 코딩하는 유전자, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 상기 단백질의 기능적 등가 변이체의 발현 수준을 정량하기 위한 시약을 포함하며, 여기서 시약을 통해 상기 유전자, 또는 상기 단백질 또는 그의 기능적 등가 변이체의 발현이 대조군 샘플에 비하여 증가한 것으로 검출되었다면, 이때 상기 대상체는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 상태일 수 있거나, 또는 원치않는 세포 증식과 관련된 상기 질환을 앓을 수 있는 더 큰 소인을 나타내거나, 또는 상기 질환의 더 큰 중증도를 나타내거나, 또는 수행된 치료 요법이 효과가 없는 것인 키트의 용도에 관한 것이다.

[0175] 키트의 용도를 정의함에 있어 사용되는 모든 용어 및 표현은 본 발명의 다른 측면 및 본 발명의 특정 실시양태를 위해서 앞서 기술되어 있고 설명된 바 있으며, 이는 또한 본원에 기술된 키트의 용도에도 또한 적용될 수 있다.

[0176] 맞춤식 치료 요법을 디자인하는 방법 및 IL-6 억제제에 기반한 요법으로부터 도움을 받을 수 있는 환자를 선별하는 방법

[0177] IL-6 계열에 속하는 시토카인, 및 더욱 특히, LIF의 억제제가 종양 세포의 증식을 억제시켰다는 것을 본 발명의 저자는 밝혀냈다. 유사하게, 상기 시토카인의 수준이 매우 높은 종양이 존재한다는 것 또한 관찰하였으며, 이를 통해 본 발명자들은 IL-6 억제제를 사용하는 것에 기반한 요법은 IL-6형 시토카인이 고수준으로 존재하는 환자를 위한 치료에 특히 이로울 수 있다고 제안하였다.

[0178] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0179] (a) 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 환자에서 IL-6형 시토카인의 발현 수준을 정량하는 단계, 및

[0180] (b) 상기 발현 수준을 대조군 수준과 비교하는 단계

[0181] 를 포함하며, 여기서 상기 환자에서의 IL-6형 시토카인의 발현 수준이 대조군 값보다 클 경우, IL-6형 시토카인의 억제제를 상기 환자에게 투여하는 것인, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 환자를 위한 맞춤식 치료 요법을 디자인하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0182] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0183] (a) 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 환자에서 IL-6형 시토카인의 발현 수준을 정량하는 단계, 및

[0184] (b) 상기 발현 수준을 대조군 수준과 비교하는 단계

[0185] 를 포함하며, 여기서 상기 환자에서의 IL-6형 시토카인의 발현 수준이 대조군 값보다 클 경우, 상기 환자를 IL-6형 시토카인의 억제제를 사용하는 치료를 받도록 선택하는 것인, IL-6형 시토카인의 억제제로 치료하고자 하는, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 환자를 선별하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0186] 상기 둘 모두의 측면에서, 바람직한 실시양태는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환이 원치않는 줄기 세포 증식

과 관련된 것이다.

[0187] 바람직한 실시양태에서, IL-6형 시토카인의 억제제는 siRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특이적 리보자임, 항체 및 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 억제제는 바람직하게는 항체, 및 더욱 바람직하게는, 상기 IL-6형 시토카인에 대해 특이적인 억제성 항체, 또는 IL-6형 시토카인 수용체를 차단하는 항체이다.

[0188] 환자의 선별에, 또는 맞춤식 치료 요법을 디자인하는 데에서 마커로서 사용될 수 있는 IL-6형 시토카인은 상기에 상세하게 기술되어 있으며, 이는 LIF, IL-6, IL-11, 온코스타틴 M, 카디오트로핀-1, CNTF 및 CLC로부터 선택된다.

[0189] 원치않는 세포 증식을 나타내는 질환은 상기 기술되어 있는 것이다. 바람직한 실시양태에서, 원치않는 세포 증식을 나타내는 상기 질환은 암이다. 더욱더 바람직하게는, 상기 암은 높은 활성의 JAK-STAT 신호전달 경로에 의해 유발된다.

[0190] 바람직한 실시양태에서, 상기 암은 하기 중 하나이다: 신경교종, 프리-B 세포 급성 림프모구 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 결장직장 암종, 담낭암, 유관암 또는 유방 암종. 더욱더 바람직하게는, 상기 신경교종은 IV 등급 신경교종이다.

[0191] 본 발명의 예측 방법

[0192] 또 다른 측면에서, 본 발명은 원치않는 세포 증식과 관련된 질환을 앓는 환자의 평균 기대 수명을 예측하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 예를 들어, 신경교종인 경우, 보다 높은 LIF 발현 수준을 보이는 환자에 대한 평균 기대 수명이 대조군 환자에 비해 단축되어 있다는 관찰 결과 (도 12)에 기초하여 이루어진다.

[0193] 본 방법은

[0194] (a) 상기 환자에서 IL-6형 시토카인의 발현 수준을 정량하는 단계, 및

[0195] (b) 상기 발현 수준을 대조군 수준과 비교하는 단계

[0196] 를 포함하며, 여기서 상기 환자에서의 IL-6형 시토카인의 발현 수준이 동일한 질환을 앓는 대조군 환자의 값보다 클 경우, 상기 환자가 대조군보다 더 짧은 기대 수명을 가질 가능성이 있다고 보는 것에 기초한다.

[0197] 더욱 구체적인 측면에서, IL-6형 시토카인의 농도는 예측 목적으로 위해, 즉, 상기 질환을 앓는 개체의 평균 기대 수명을 예측하기 위해 측정될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 종양 환자의 IL-6형 시토카인의 농도는 동일한 IL-6형 시토카인의 참조 농도와 비교한다. 참조 환자군은 전형적으로 문서상으로 충분한 증거가 증명되어 있고, 동일한 질환을 앓는 환자로 구성된다. 예를 들어, 참조 샘플은 상기 질환을 앓는 환자 집단이 통계학상 유의성을 띨 수 있도록 적어도 2, 적어도 10, 적어도 100 내지 1000명을 초과하는 개체로 이루어진 군의 동일량으로부터 수득할 수 있다. 참조군은 하기 중 하나 이상으로 구성될 수 있다:

[0198] a) 상기 질환을 앓는 모든 환자;

[0199] b) IL-6형 시토카인의 수준이 유의적으로 상향조절되지는 않았지만, 상기 질환을 앓는 모든 환자;

[0200] c) IL-6형 시토카인의 수준이 유의적으로 하향조절된, 상기 질환을 앓는 모든 환자.

[0201] IL-6형 시토카인의 농도는 세포내, 간질 간극내 또는 세포내 단백질 및 간질 간극내에서 발견되는 것을 포함하는 추출물에서 결정될 수 있다. IL-6 시토카인 수준은 상기 목적에 적합한 분석법을 사용하여 상기 시토카인의 활성을 측정함으로써, 또는 면역학상 방법을 사용하여 단백질의 양을 측정함으로써, 또는 IL-6형 시토카인에 상응하는 mRNA를 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0202] 이러한 측면에서, 바람직한 실시양태는 원치않는 세포 증식과 관련된 질환이다. 더욱 특정의 실시양태에서, 원치않는 세포 증식과 관련된 질환은 암이다. 더욱더 바람직하게, 암 유형은 상기 암 환자의 아집단에서 IL-6형 시토카인의 수준이 비정상적으로 높은 것과 관련된 것이다. 더욱 특정의 실시양태에서, 암은 하기 중 하나이다: 백혈병, 신경교종, 결장직장 암종, 담낭암, 유방암. 더욱 특정의 실시양태에서, 백혈병은 프리-B 세포 급성 림프모구 백혈병 또는 급성 골수성 백혈병이고, 유방암은 유관암 또는 유방 암종이다.

[0203] 예측 목적으로 환자를 시험하는 데 있어 마커로서 사용될 수 있는 IL-6형 시토카인은 상기에서 상세하게 기술된 바 있고, 이는 LIF, IL-6, IL-11, 온코스타틴 M, 카디오트로핀-1, CNTF 및 CLC로부터 선택된다.

[0204] 통계학상 방법을 통해 IL-6형 시토카인의 수준에 기초하여 환자의 평균 기대 수명을 예측할 수 있을 것이다.

[0205] 본 발명은 하기 실시예에 의해 하기에서 설명될 것이며, 실시예는 단지 그의 예시적이며 비-제한적인 일례로서만 간주되어야 한다.

[0206] 실시예 1

[0207] 1. 물질 및 방법

[0208] 1.1 세포주 및 1차 세포 배양물

[0209] U373MG 및 A172 세포는 J. 리치(J. Rich) 및 D. 비그너(D. Bigner)로부터 기증받았고, 10% 우태아 혈청 (FBS)을 포함하는 DMEM 중에서 배양하였다. 종양 세포의 1차 배양물 (PCTC) 및 GBM 뉴로스피어를 문헌 ([Bruna et al., (2007) Cancer Cell 11, 147-160]; [Gunther et al., (2008) Oncogene. May 1;27(20):2897-909])에 기술되어 있는 바와 같이 생성하였다. 간략하면, 외과적 절제술을 수행한 후 30분이 결과하였을 때 종양 샘플을 프로세싱하였다. 일정한 속도로 왕성하게 교반시키면서 분쇄된 인간 신경교종 샘플 조각을 37℃에서 2시간 동안 PBS 중 200 U/ml 콜라게나제 I (시그마(Sigma)) 및 500 U/ml의 DNase I (시그마)로 분해시켰다. 각 세포의 현탁액을 70 μm 세포 필터 (BD 팔콘(BD Falcon))를 통해 여과하고, PBS로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 재현탁시킨 후, PCTC의 경우에는 10% FBS를 포함하는 DMEM 중에서 배양하거나, 또는 GBM 뉴로스피어의 경우에는 뉴로스피어 배지 중에서 배양하였다. 자발적 유산 이후에 수집된 (수태 후 12-16주 경과된) 인간 배아 대뇌 피질 조직으로부터 정상적인 인간 신경전구세포의 뉴로스피어를 생성하였다. 샘플을 프로세싱하고, 문헌 [Poltavtseva et al. (2002) Brain Res Dev Brain Res 134, 149-154]에 기술된 바와 같이, 배양하였다. 뉴로스피어 배지는 B27 (기브코(Gibco)), L-글루타민 (기브코), 페니실린/스트렙토마이신, 및 성장 인자 (20 ng/mL EGF 및 20 ng/mL FGF-2 (페프로테크(Peprotech)))로 보충된 뉴로베이살(neurobasal) 배지 (기브코)로 구성되었다.

[0210] 인간 신경교종 및 인간 배아 조직 샘플은 발 데브론(Vall d'Hebron) 병원으로부터 입수하였다. 임상 프로토콜은 발 데브론 병원의 윤리위원회 (CEIC)로부터 승인을 받았으며, 대상체 모두로부터 동의서도 받았다.

[0211] 1.2 플라스미드 및 시약

[0212] pGL2-기초 루시퍼라제 벡터로 클로닝된 인간 LIF 프로모터의 -634/+32 영역을 증폭시키기 위해 U373MG의 게놈 DNA를 사용하였다. 작제물 (-634/+32)을 분해하여 결실 작제물 (-267/+32), 및 (-73/+32)을 생성하였다. 작제물 (-267/+32) 중 위치 -183 bp 및 -184 bp에 점 돌연변이 2개를 도입하여 Smad 결합 요소 (SBE)를 차단하고, 작제물 (-267/+32) mutSBE를 생성하였다. TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3 (R&D 시스템즈(R&D Systems)), TβRI 억제제 (SB431542, 토크리스(Tocris)), LIF (케미콘(Chemicon)), LIF에 대한 중화 항체 (R&D), JAK 억제제 (테트라시클릭 피리돈 6 (P6) 칼바이오켐(Calbiochem)), Smad2, Smad3 및 Smad4를 표적으로 하는 SMART siRNA의 조립체 (다마콘(Dharmacon)), 및 대조군 siRNA siGlo (다마콘)를 명시된 농도대로 사용하였다. 웨스턴 블롯팅을 위해 p-Smad2, Smad2, p-STAT3 (p-Tyr705) 및 전체 STAT3에 대해 특이적인 항체 (셀 시그날링(Cell Signalling)) Smad2, Smad3 및 Smad4에 대해 특이적인 항체 (문헌 [Hata et al., (2000) Cell 100, 229-240])를 사용하였다.

[0213] 1.3 면역세포화학법, ELISA 및 크로마틴 면역침강법

[0214] 하기 항체: 항-네스틴 (케미콘), 항-GFAP (Dako), 항-TuJ1 (케미콘), 항-O4 (케미콘), 항-Sox2 (케미콘), 항-α-튜불린 (시그마)을 사용하여 문헌 [Geshwind et al., 2001]에 기술되어 있는 바와 같이 뉴로스피어 및 분화된 뉴로스피어의 면역세포화학법을 수행하였다. 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI)을 사용하여 핵을 대비 염색시켰다.

[0215] 배지에 분비된 LIF 단백질의 수준을 정량적으로 결정하기 위해 제조사의 설명서에 따라서 인간 LIF ELISA 키트 (R&D 시스템즈)를 사용하였다. 명시된 바와 같이 처리한 후 48시간이 경과하였을 때, 사전에 혈청이 제거된 U373MG 세포 또는 GBM 뉴로스피어의 상등액을 수집하였다. 부유 세포는 버리고, 아미콘 울트라-4 PLCC 울트라셀-PL(Amicon Ultra-4 PLCC Ultracel-PL) 5 kDa 막 (밀리포어(Millipore))을 사용하여 5 mL의 상등액을 최종 부피 200 ㎕로 농축시켰다.

[0216] 문헌 [Bruna et al., 상기 언급한 문헌]에 기술되어 있는 바와 같이, 크로마틴 면역침강법을 수행하였다. LIF 프로모터의 근위부 프라이머 및 원위부 프라이머 시리즈가 각각 (-410/-165) 및 (-4534/-4293) 영역을 커버하였

다.

[0217] 1.4 자가-재생 분석법

[0218] 96-웰 플레이트의 웰에 동일한 개수의 세포를 매우 낮은 밀도로 시딩하여 뉴로스피어의 자가-재생을 평가하였다. 성장 인자의 부재하에 세포를 명시된 화합물로 처리하고, 배양물 중에서 7일이 경과한 후 새로 형성된 뉴로스피어의 총 개수를 계수하였다 (문헌 ([Lee et al. (2008) Cancer cell 13, 69-80]; [Reynolds and Weiss, (1996) Dev Biol 175, 1-13]; [Seaberg and van der Kooy, (2002) J Neurosci 22, 1784-1793])).

[0219] 1.5 실시간 정량적 PCR

[0220] 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)로부터 입수한 택맨(Taqman) 프로브를 사용하여 제조사의 권고에 따라 qRT-PCR을 수행하였다. ABI 7000 서열 검출기 (퍼킨 엘머(Perkin Elmer))에서 반응을 수행하고, DDCt 방법에 의해 계산된, 대조군 샘플 또는 처음 정량된 샘플에 대한 변화 배수로서 결과를 표시하였다. 18S 또는 β-액틴의 리보솜 유니트를 내부 정규화 대조군으로서 사용하였다.

[0221] 1.6 루시퍼라제 분석법

[0222] 리포펙트아민(Lipofectamine) 2000 (인비트로겐(Invitrogen))을 사용하여 LIF 프로모터의 상이한 지시 작제물과, 정규화 대조군으로서의 레닐라 루시퍼라제 (프로메가(Promega))의 플라스미드 pRL-TK로 A172 세포를 일시적으로 형질감염시켰다.

[0223] 1.7 두개내 종양 분석법

[0224] 7주령된 Balbc nu/nu 암컷 마우스 (찰스 리버 라보라토리즈(Charles River Laboratories)) 뇌의 우반구의 선조체 (1 mm 전방, 1.8 mm 외측 (정수리 기준), 및 3.0 mm 실질내)에 세포를 명시된 양으로 정위적인 방식으로 접종하였다. 마우스가 신경 증상을 보이거나, 상당한 체중 감소가 일어났을 때, 마우스를 희생시켰다. 아반스 (AVANCE) 400 시스템 (브루커(Bruker))을 사용하여 계면에 존재하는 9.4T 수직 자석 중에서 자기 공명 영상법 (MRI)에 의해 연구를 수행하였다. 마우스를 크실라진/케타민으로 마취시킨 상태하에서 체중 1 kg당 0.25 mmol Gd의 용량으로 MRI 조영제인 가돌리늄 디에틸렌트리아민 펜타아세트산을 정맥 주사하여 마우스에 투여하고, 18 라디오 주파수 코일 (내경, 35 mm)에 놓았다. 3개의 수직축 상에서 로컬라이저를 통해 영상을 촬영한 후, 마우스의 뇌 전체에 대한 영상을 획득하였다.

[0225] 1.8 통계학적 분석

[0226] *LIF*와 *TGFβ2*, *무사시-1*, *Sox2* 및 *네스틴* 간의 관계를 분석하기 위해 스피어만 상관관계 시험을 사용하였다. 그래프 상의 데이터는 평균 ± s.d.로 제시되어 있다.

[0227] 실시예 1

[0228] TGFβ가 환자로부터 유래된 GIC의 자가-재생을 유도한다

[0229] TGFβ가 GIC (신경교종 개시 세포)의 자가-재생능에 대해 미치는 효과를 연구하기 위하여, 외과적으로 제거된 인간 GBM (다형성 교모세포종) 샘플로부터 세포를 수득하였다. 동일의 종양 샘플로부터, 한편에서는 혈청의 존재하에서 종양 세포의 1차 배양물 (PCTC)을 생성하였고, 동시에, EGF 및 FGF의 존재하에 무혈청 배지 중에서 종양 세포를 배양하였다. 문헌 ([Galli et al. (2004) Cancer Res 64, 7011-7021]; [Gunther et al., 상기 언급한 문헌]; [Lee et al., (2006) Cancer cell 9, 391-403]; [Singh et al. (2003) Cancer Res 63, 5821-5828])에 기술되어 있는 바와 같이, EGF 및 FGF로 보충된 무혈청 배지 중에서 배양된 세포는 비-부착성 다세포 스피어 (뉴로스피어)를 빠르게 생성하였다 (도 1A). 종양 샘플로부터 생성된 뉴로스피어는 신경전구세포 세포 마커인 *무사시-1*, *Sox2* 및 *네스틴*을 고수준으로 발현하였고 (도 1B), 혈청 존재하에서 배양된 경우에는, 다계통 분화를 경험하여 GFAP (성상세포 마커), Tuj-1 (뉴론 마커), 및 O4 (희소돌기아교세포 마커)의 발현이 이루어졌다 (도 2). 추가로, 종양으로부터 유래된 뉴로스피어는 PCTC와 비교하여 발암성이 매우 컸다. 면역이 저하된 마우스의 뇌에 뉴로스피어 및 PCTC의 세포를 정위 이식하였다. 자기 공명 영상법 (MRI)에 의해 종양 성장을 평가하고, 마우스의 체중을 모니터링하였다. 접종 후 30-60일이 경과하였을 때, 뉴로스피어 세포는 종양을 생성하였고, 이로 인해 극심한 체중 감소가 일어난 반면, 모든 경우에서 같은 시간 간격 동안 PCTC에서는 종양 성장이 이루어지지 않았다 (도 1C). 따라서, 인간 GBM 샘플로부터 생성된 뉴로스피어는 신경전구세포 세포 마커를 발현하였고, 다계통 분화능을 보였으며, 매우 큰 발암성을 나타내었다. 이러한 모든 특징은, 환자로부터 유래된 GBM로부터 얻은 뉴로스피어에는 GIC가 풍부하다는 것을 시사하였다.

[0230] 뉴로스피어를 생성하는 GIC의 능력에 기초하여 잘 기술되어 있는 프로토콜에 따라 TGFβ가 GIC의 자가-재생능에 미치는 효과를 평가하기로 결정하였다 (문헌 [Reynolds and Weiss, 1996, Dev Biol. 175:1-13]; [Seaberg and van der Kooy, 2002, J Neurosci 22:1784-1793])). 환자로부터 유래된 뉴로스피어를 개별 세포로 해리시키고, TGFβ로 처리하거나, 또는 성장 인자의 부재하에서 7일 동안 처리하지 않고 그 상태로 남겨두고, 새로 형성된 뉴로스피어 및 세포의 총 개수를 계수하였다. 이러한 프로토콜에 따라, TGFβ가 3명의 상이한 환자로부터 유래된 GIC의 자가-재생능에 미치는 효과를 평가하였다. TGFβ로 처리하자 뉴로스피어의 개수는 현저하게 증가하였고, 세포의 총 개수도 현저하게 증가하였다 (도 1D, 1E, 1F). TGFβ I 수용체 억제제 (TβRI)를 TGFβ와 동일한 시간에 첨가하였을 때에는 상기와 같은 효과는 차단되었다. 단리된 TβRI 억제제는 어떤 유의적인 효과도 없었다 (도 1D, 1E, 1F). 이러한 결과는, TGFβ 경로가 GIC의 자가-재생을 증가시켰다는 것을 보여주었다

[0231] 실시예 2

[0232] TGFβ가 인간 GBM의 세포에서 LIF의 발현을 유도한다

[0233] TGFβ가 GIC에 미치는 효과를 담당하는 분자 기전에 대해 조사하기로 결정하였다. GIC의 자가-재생 조절에 관여할 수 있는, GBM 세포 중의 TGFβ에 대한 유전자 반응을 조사하였다. 이전 연구 (문헌 [Bruna et al., 2007])에서는 TGFβ 및/또는 TβRI 억제제로 처리된 U373MG 신경교종 세포주에서 트랜스크립톰 분석을 수행하였다. *LIF*도 TβRI의 활성에 의존하는, U373MG 중의 TGFβ에 대한 63개의 유전자 반응 중 하나였다. LIF-LIFR/gp130-JAK-STAT 신호전달 경로는 배아 줄기 세포 (문헌 ([Niwa et al., 1998, Genes Dev, 12: 2048-2060]; [Williams et al., 1988, Nature, 336:684-687])), 및 신경전구세포 세포 (문헌 [Bauer and Paterson, 2006, J Neurosci, 26:12089-12099]; [Molne et al., 2000, J Neurosci Res, 59:301-311]; [Wright et al., 2003, J. Neurochem, 86:179-195])) 둘 모두에서의 줄기 세포의 자가-재생과 관련이 있었고, TGFβ가 GIC에 미치는 효과를 LIF가 매개할 것이라고 가정하였다. 환자로부터 유래된 종양 세포에서 TGFβ에 의해 매개되는 LIF 전사체의 유도가 관찰되는지 여부를 먼저 결정하였다. 11개의 상이한 인간 GBM로부터 유래된 PCTC 패널을 3시간 동안 TGFβ로 처리하고, LIF mRNA 수준을 결정하였다. 분석된 모든 PCTC에서 TGFβ가 LIF를 유도하였다 (도 3A). 이러한 결과는 TGFβ에 의한 LIF 유도가 대부분의 인간 GBM에서 발생하는 공통된 현상이라는 것을 시사하였다. 추가로, TGFβ는 환자로부터 유래된 뉴로스피어에서 LIF 전사체를 유도할 수 있었으며 (도 3B), 이러한 효과는 TβRI의 활성에 의존하는데, 그 이유는 TGFβ에 의한 LIF의 유도가 TβRI 억제제의 존재하에서는 차단되었기 때문이다 (도 3C). TGFβ 계열 중 3개의 구성원 (TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3)은 환자로부터 유래된 뉴로스피어에서 LIF를 유도할 수 있었고 (도 3D), 조절된 뉴로스피어 배지 중에서 ELISA에 의해 측정한 바, 예상대로, TGFβ에 의한 LIF 전사체의 유도는 LIF 단백질의 분지를 증가시켰다 (도 3E).

[0234] 실시예 3

[0235] TGFβ는 LIF 프로모터에 결합하는 활성화된 Smad 복합체를 통해 LIF 발현을 유도한다

[0236] TGFβ에 의한 *LIF*의 전사 조절을 연구하기 위해, pGL2-기초 리포터 작제물에 인간 *LIF* 프로모터를 클로닝하였다. TGFβ는 U373MG 세포 중 *LIF* 프로모터의 -634/+32 및 -276/+32 영역을 포함하는 리포터 작제물을 트랜스활성화시킬 수 있었다. *LIF* 프로모터의 -73/+32 단편은 TGFβ에 대한 전사 반응을 상실하였는데, 이는 TGFβ에 대한 반응 요소가 -276/-73 영역 중에 포함되어 있음을 시사한다 (도 4A, 4B). 이러한 영역은 SP1 결합 부위에 인접하게 위치하는 단일 Smad 결합 요소 (SBE, 5'GTCT-3')를 포함한다 (도 4A). SBE를 돌연변이화시키고, TGFβ에 대한 반응이 제거되었음을 관찰하게 되었는데 (도 4B), 이는 활성화된 Smad 복합체가 *LIF* 프로모터 중 근위부의 SBE에 결합함으로써 전사를 유도한다는 것을 시사한다. 크로마틴 면역침강법 (ChIP) 분석법을 수행함으로써 내인성 Smad2는, TGFβ로 처리된 세포 중 전사 개시 부위로부터 4 kb 떨어져 있는 상류 쪽의 원위부 영역이 아닌 *LIF* 프로모터의 근위부 영역에 결합한다는 것을 관찰하게 되었다 (도 4C). 마지막으로, Smad가 TGFβ에 의한 LIF의 발현 유도에 관여한다는 것을 보여주기 위해, Smad2, Smad3, Smad2 및 3 둘 모두, 및 Smad4는 간섭 RNA를 사용하여 침묵화시켰다. Smad2 및 Smad3, 또는 Smad4가 감소하였을 때, TGFβ에 의한 LIF의 유도는 감소하였는데, 이는 TGFβ에 대한 *LIF*의 전사 반응을 위해서는 활성화된 Smad 복합체가 필요하다는 것을 시사한다 (도 4D). Smad2 및 Smad3이 상기 프로세스에 풍부하게 존재하는데, 이는 각 Smad의 침묵화가 개별적으로는 TGFβ에 의해 유도되는 LIF 수준에 유의적인 영향을 미치지 않기 때문이다 (도 4D). 예상대로, 환자로부터 유래된 뉴로스피어에서 TGFβ에 의한 LIF의 유도는 또한 Smad에 의존하였다. 인간 GBM에서 Smad4의 침묵화가 TGFβ에 대한 LIF의 반응을 취소시켰다 (도 4E).

[0237] 실시예 4

[0238] TGFβ가 환자로부터 유래된 뉴로스피어 중 LIF 유도를 통해 JK-STAT 경로를 유도한다.

[0239] LIF 신호전달 경로가 GBM 뉴로스피어에서 기능성인지 여부를 구별하기 위해, 뉴로스피어를 재조합 LIF로 처리하고, LIF 수용체 복합체의 하류 기질인 STAT3의 인산화 수준을 결정하였다. 재조합 LIF가 STAT3의 인산화를 빠르게 유도하였는데, 이는 환자로부터 유래된 뉴로스피어가 기능성 LIF 수용체 복합체를 발현하였다는 것을 시사한다 (도 5A). 추가로, 약리학상 JAK-특이, 테트라시클릭 피리돈 6 (P6)의 존재에 의해 p-STAT3은 유도되지 못했다 (문헌 ([Pedranzini et al., 2006, Cancer Res, 66: 9714-9721]; [Thompson et al., 2002, Bioorg Med Chem Lett, 12:1219-1223])) (도 5B). 흥미롭게도, TGFβ가 GBM 뉴로스피어에서 STAT3의 인산화를 유도하였고, TβRI 억제제는 상기 효과를 방해하였다 (도 5C). LIF가 TGFβ에 의한 p-STAT3의 유도를 매개하는지 여부를 평가하기로 결정하였다. 이러한 목적을 위해, LIF에 대한 중화 항체를 사용하여 분비된 LIF가 TGFβ로 처리된 세포에 미치는 효과를 특이적으로 차단시켰다. LIF의 중화 항체의 존재가 TGFβ에 의한 p-STAT3의 유도를 감소시켰다. 추가로, TGFβ로 처리된 세포에서 p-STAT3의 수준은 P6 처리에 의해 억제되었다 (도 5D). 이러한 결과는 TGFβ가 자가 분비/주변 분비 루프에 의해 작용하는 LIF 분비의 유도를 통해 환자로부터 유래된 뉴로스피어에서 JAK-STAT 경로를 활성화시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0240] 실시예 5

[0241] LIF가 TGFβ에 의한 GIC의 자가-재생 유도를 매개한다

[0242] LIF 및 JAK-STAT가 TGFβ에 의한 GIC의 자가-재생 증가를 유도하는지 여부를 평가하기로 결정하였다. 이러한 목적을 위해, LIF 및 P6에 대한 중화 항체를 사용하여 분비된 LIF가 TGFβ로 처리된 세포에 미치는 효과를 특이적으로 차단하였다. 뉴로스피어를 개별 세포로 해리시키고, TGFβ, 재조합 LIF, 항-LIF 항체 및/또는 P6으로 처리하였다. 새로 형성된 뉴로스피어 및 세포의 총 개수를 계수하였다. 재조합 LIF는 새로 형성된 뉴로스피어의 양 뿐만 아니라, 세포의 총 개수도 증가시켰는데, 이는 LIF가 GIC의 자가-재생을 유도한다는 것을 시사한다 (도 6A, 6B, 6C). LIF의 중화 항체로 처리하자 TGFβ에 의한 GIC의 자가-재생 유도는 감소하였다. 추가로, P6은 TGFβ가 GIC의 자가-재생에 미치는 효과를 억제시켰는데, 이는 TGFβ가 자가-재생에 미치는 효과가 JAK의 활성에 의존하였다는 것을 시사한다 (도 6A, 6B, 6C). 전체적으로 볼 때, TGFβ가 LIF-JAK-STAT 경로를 통해 환자로부터 유래된 GIC의 자가-재생능을 유도하였다는 것이 본 데이터를 통해 밝혀졌다.

[0243] 실시예 6

[0244] TGFβ가 LIF를 통해 GIC의 분화를 방해한다

[0245] 성장 인자의 부재하에서 성장시키고, 폴리-L-리신으로 코팅된 플레이트 중에 시딩된 GBM으로부터 유래된 뉴로스피어는 신경전구세포 마커인 무사시-1, Sox2 및 네스틴의 발현 상실과, 배양 플레이트에의 부착을 구별하는 경향이 있다. TGFβ 및 LIF가 이러한 분화 과정에 미치는 효과를 평가하기로 결정하였다. 뉴로스피어를 EGF 또는 FGF의 부재하에 7일 동안 TGFβ 또는 LIF 존재하에서 배양한 후, 신경전구세포 마커인 무사시-1, Sox2 및 네스틴의 수준을 결정하기 위해 면역조직화학적 염색법 및 qRT-PCR 분석법을 수행하고자 프로세싱하였다. 구형의 구조를 유지하면서 배양 플레이트에는 덜 부착된다는 점에서 TGFβ 또는 LIF로 처리된 뉴로스피어는 형태학적인 면에서 대조군 세포와 상이하였다. 추가로, 면역조직화학적 분석법에 의해 검출되고 (도 7A), qRT-PCR에 의해 정량된 바 (도 7B), TGFβ 또는 LIF로 처리된 세포는 무사시-1, Sox2 및 네스틴의 발현을 유지시켰다. 이는 TGFβ 및 LIF가 GIC의 자가-재생을 조절할 뿐만 아니라, GIC의 분화를 방해하는 데에도 관여하는 인자라는 것을 시사하였다.

[0246] 실시예 7

[0247] TGFβ 및 LIF가 정상적인 인간 신경전구세포에 미치는 효과

[0248] 이러한 데이터는 TGFβ 및 LIF가 GIC의 자가-재생 및 분화를 조절하였다는 것을 시사하였다. 이러한 효과는 종양 세포에 대해 특이적인지 여부, 또는 이러한 효과가 정상적인 신경전구세포 세포에도 또한 존재하는지 여부를 평가하기로 결정하였다. 이러한 의문을 해소하기 위하여, (수태 후 12-16주 경과된) 인간 태아 대뇌 피질 샘플로부터 신경전구세포 세포를 수득하였다. 앞서 기술된 바와 같이 (문헌 ([Carpenter et al., 1999, Exp Neurol, 158: 265-278]; [Poltavtseva et al., 2002, Brain Res Dev Brain Res, 134: 149-154]; [Wright et al., 2003, J Neurochem, 86: 179-195])), 인간 신경전구세포는 EGF 및 FGF로 보충된 무혈청 배지에서 성장시켰을 때에는 뉴로스피어를 생성하였고, 이들 뉴로스피어는 GBM 뉴로스피어와 유사하게 무사시-1, Sox2 및 네스틴을 발현하였다 (도 8A). 먼저, 정상적인 인간 신경전구세포에서 TGFβ가 LIF를 유도하는지 여부를 결정하였

다. 정상적인 뉴로스피어는 GBM 뉴로스피어와 비교하여 TGFβ1, TGFβ2 또는 TGFβ3에 대한 반응으로 LIF를 유도하지 못했다 (도 8B). 추가로, TGFβ는 마우스 배아로부터 수득한 마우스 신경전구세포에서, 또는 성체 마우스의 뇌실하 영역으로부터 수득한 마우스 신경전구세포에서 LIF를 유도하지 못했다 (데이터는 나타내지 않음). 이는 TGFβ에 의한 LIF의 유도는 GBM 뉴로스피어에 특이적이라는 것을 시사하였다. 예상대로, TGFβ는 LIF를 유도하지 못했기 때문에, TGFβ는 정상적인 신경전구세포의 자가-재생능을 증가시키지 못했고, TGFβ 처리에 의해 신경전구세포 뉴로스피어의 개수 및 크기는 증가하지 못했다. 사실상, TGFβ로 처리된 뉴로스피어는 크기가 더 작았고, 세포의 총 개수는 TGFβ의 존재로 인해 감소하였다 (도 8C, 8D). 한편, 이전 논문(문헌 ([Bauer and Patterson, 2006]; [Wright et al., 2003]))에 따르면, LIF는 새로 형성된 뉴로스피어의 개수 및 크기 뿐만 아니라, 세포의 총 개수도 증가시켰다 (도 8C, 8D). 따라서, LIF는 GBM 및 정상적인 뉴로스피어에서의 자가-재생에 대하여 동일한 효과를 가진다. 대조적으로, TGFβ가 신경전구세포에서 정상적인 LIF를 유도하는 데는 능력이 없기 때문에 정상적인 및 종양 뉴로스피어의 자가-재생능에 대해 미치는 TGFβ의 효과에 있어서는 차이가 있었다.

[0249] 실시예 8

[0250] 인간 신경교종에서 LIF의 발현은 TGFβ2 및 신경전구세포 마커와 상관관계가 있다

[0251] LIF가 인간 신경교종에서 발현되는지 여부를 평가하기 위하여 39개의 신경교종으로 이루어진 패널에서 LIF의 수준을 분석하였다. LIF가 39개의 신경교종 중 17개에서 발현되었고, 39개의 신경교종 중 4-6개에서는 고도로 발현된 것이 관찰되었는데 (도 9A), 이는 대다수의 인간 신경교종이 LIF를 발현하였다는 것을 시사한다. LIF는 TGFβ에 의해 유도되고, 이전 연구에서는 TGFβ2는 신경교종에서 관찰되는 고도의 TGFβ 활성을 담당한다는 것이 밝혀졌는 바 (문헌 [Bruna et al., 2007, 상기 언급한 문헌]), TGFβ2가 LIF의 발현에 관여하는지 여부를 평가하였다. 실제로, 신경교종 패널에서 LIF 수준은 TGFβ2와 상관관계가 있었고, 이는 추가로 TGFβ2가 인간 신경교종에서 LIF의 유도를 담당한다는 것을 입증한다 (도 9A, B). LIF가 GIC의 자가-재생을 촉진시킬 경우, 이러한 유형의 세포군에는 LIF를 고수준으로 발현하는 종양이 풍부하게 존재하여야 한다. 이러한 가설을 시험하기 위해 LIF 수준을 GIC/신경전구세포 마커의 발현과 비교하였다. LIF 수준은 무사시-1 및 네스틴의 발현과는 상관관계가 있었지만, Sox2와는 무관하였는데 (도 9A, B), 이는 LIF가 GIC의 자가-재생을 촉진시키고, 종양 종괴 중에 존재하는 GIC 군을 증가시킨다는 것을 시사한다.

[0252] 실시예 9

[0253] 신경교종 또는 교모세포종을 앓는 환자의 전반적인 기대 수명은 보다 더 짧다.

[0254] 모든 신경교종 환자의 아집단에서, LIF 수준은 ≥ 2배로 상향조절되어 있다. 설정 기간 동안에 걸쳐 상기 환자의 생존 가능성은 대조군 환자와 비교하여 유의적으로 감소하였다. 예를 들어, 1,000일 경과 후 생존 가능성은 모든 신경교종 환자와 비교하였을 때에는 대략 50%로 감소하였고, LIF 수준이 ≥ 2배로 상향조절되지 않은 신경교종 환자와 비교하였을 때에는 대략 35% 감소하였다 (도 10). 국립 암 연구소의 뇌 신생물 분자 데이터 저장소 (REMBRANDT) 프로그램으로부터 데이터를 입수하였다.

[0255] 모든 신경교종 환자의 아집단에서, LIF 수준은 ≥ 9배 상향조절되어 있다. 설정 기간 동안에 걸쳐 상기 환자의 생존 가능성은 대조군 환자와 비교하여 유의적으로 감소하였다. 예를 들어, 500일 경과 후 생존 가능성은 모든 신경교종 환자와 비교하였을 때에는 대략 50%로 감소하였다 (도 11). 국립 암 연구소의 뇌 신생물 분자 데이터 저장소 (REMBRANDT) 프로그램으로부터 데이터를 입수하였다.

[0256] 실시예 10

[0257] 각종 유형의 종양에서 LIF mRNA 수준은 비정상적으로 높다

[0258] LIF mRNA의 수준이 비정상적으로 높은 것으로 제시되는 바와 같이, 특정 종양 유형을 앓는 일부 환자의 LIF 수준은 비정상적으로 높다 (도 12). 데이터는 진사피엔스의 생물정보학 팀 (www.genesapiens.org)으로부터 입수하였다.

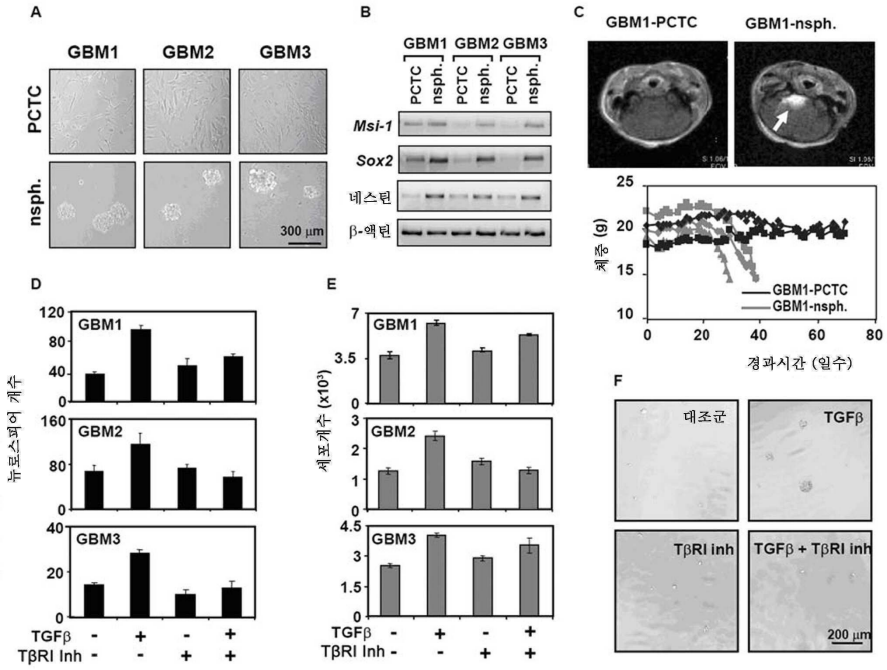
[0259] 이는 LIF가 상이한 유형의 종양의 진행 과정에서 선택적인 이점을 제공할 수 있다는 것을 시사한다. 시험된 환자 중 ≥ 10의 LIF mRNA 수준이 이 오류 막대보다 큰 경우인 종양 유형은 사전-B 세포 급성 림프성 백혈병 (B-ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 신경교종, 폐 선암종, 결장직장 암종, 담낭암, 유관암 및 유방 암종이다.

[0260] LIF가 높은 수준으로 발현되는 종양을 앓는 환자에서, LIF는 암 줄기 세포의 조절을 통한 발암성 인자로서 작용

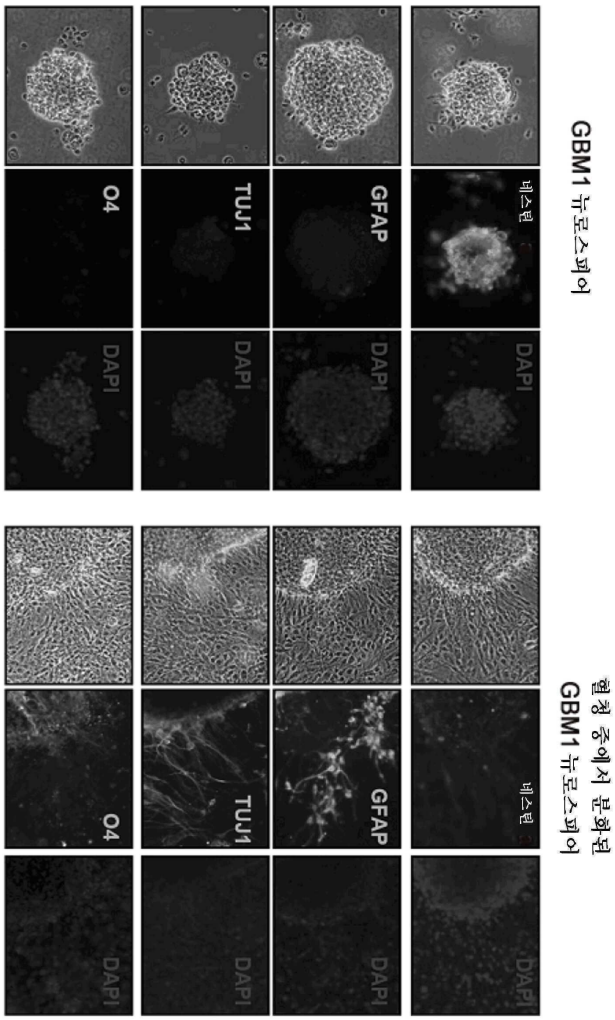
할 수 있다. 따라서, 이러한 종양 세트에서는 LIF를 차단하는 것이 이로울 수 있고, LIF는 또한 상기 환자에서 진단 인자 및/또는 예후 인자로서 사용될 수 있다.

도면

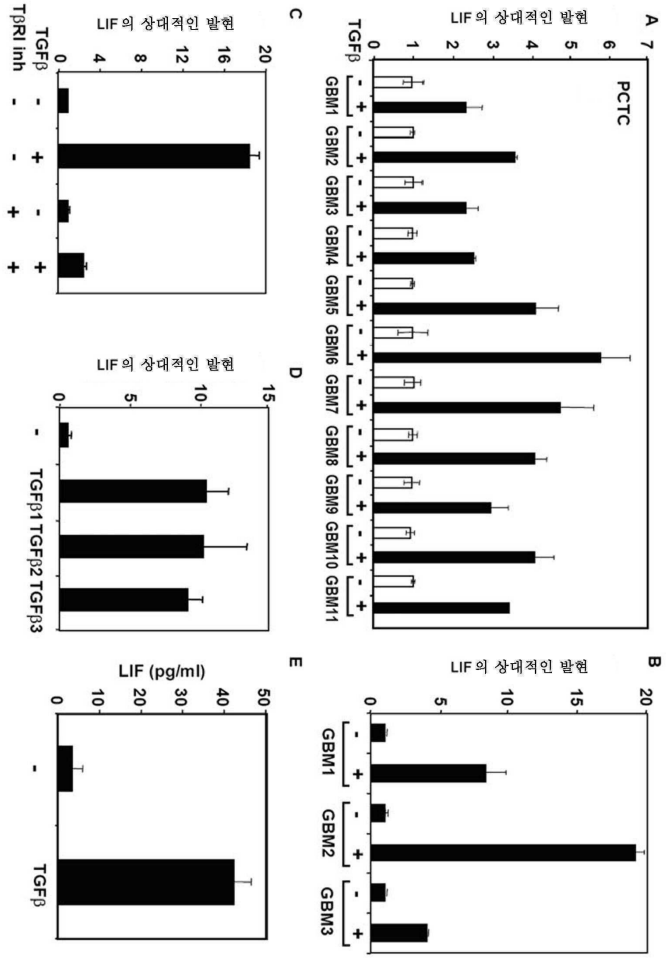
도면1



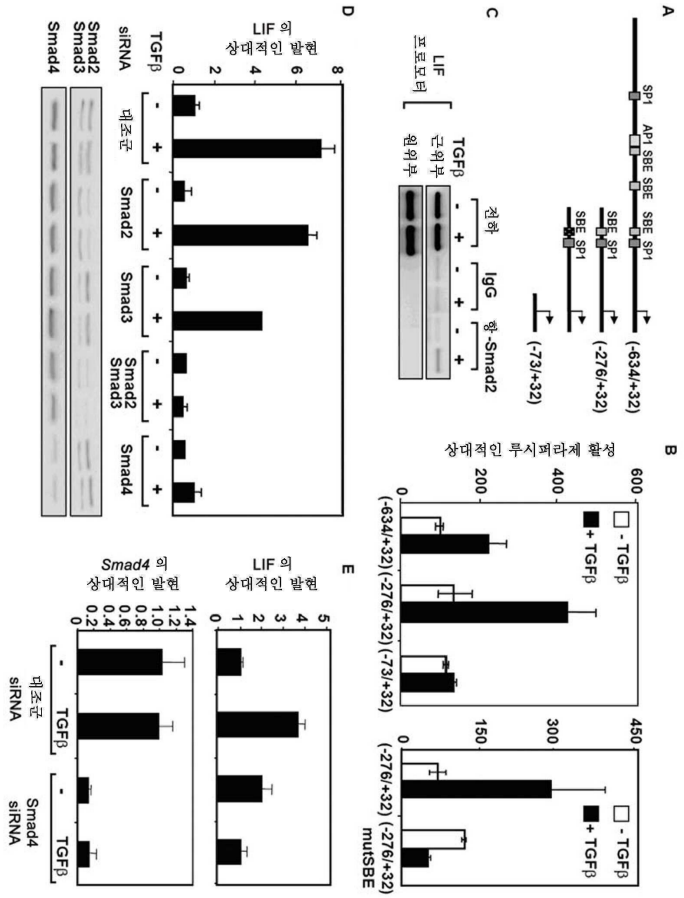
도면2


GBM1 뉴로스피어
네스틴
GFAP
TUJ1
O4
DAPI
혈청 중에서 분화된
GBM1 뉴로스피어
네스틴
GFAP
TUJ1
O4
DAPI

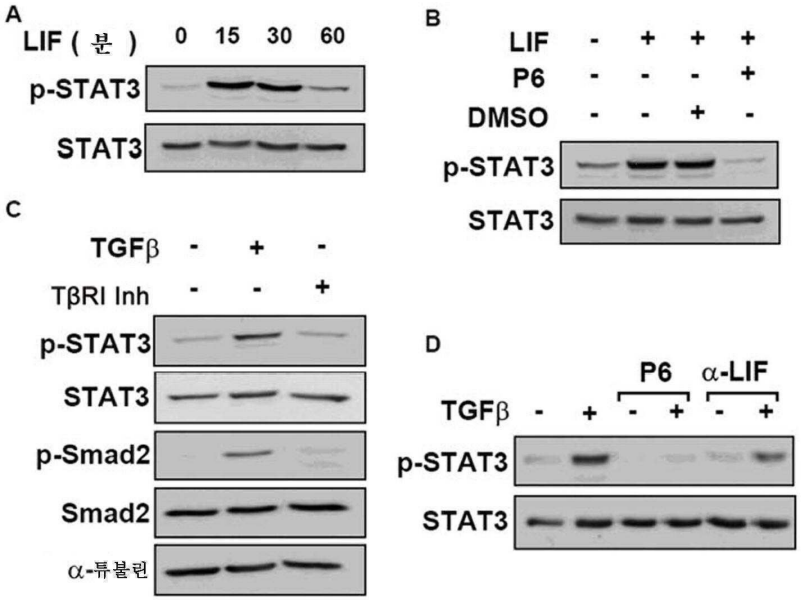
도면3


A
LIF의 상대적인 발현
PCTC
TGFβ
GBM1 GBM2 GBM3 GBM4 GBM5 GBM6 GBM7 GBM8 GBM9 GBM10 GBM11
B
LIF의 상대적인 발현
GBM1 GBM2 GBM3
C
LIF의 상대적인 발현
TGFβ
TβRI inh
D
LIF의 상대적인 발현
TGFβ1 TGFβ2 TGFβ3
E
LIF (pg/ml)
TGFβ

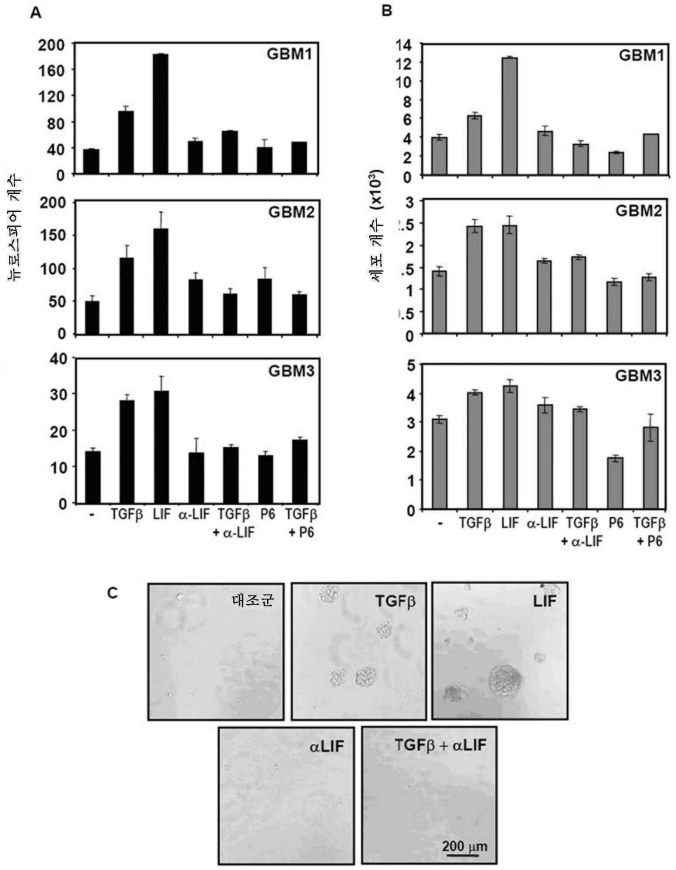
도면4


A
SP1
AP1 SBE SBE
SBE SP1 SBE SP1
SBE SP1
(-634/+32)
(-276/+32)
(-73/+32)
B
상대적인 루시퍼라제 활성
- TGFβ
+ TGFβ
(-634/+32)
(-276/+32)
(-73/+32)
mutSBE
C
LIF 프로모터
TGFβ
근위부
원위부
전하
IgG
항-Smad2
D
LIF 의 상대적인 발현
siRNA
대조군
Smad2
Smad3
Smad2 Smad3
Smad4
E
Smad4 의 상대적인 발현
LIF 의 상대적인 발현
대조군 siRNA
Smad4 siRNA
TGFβ

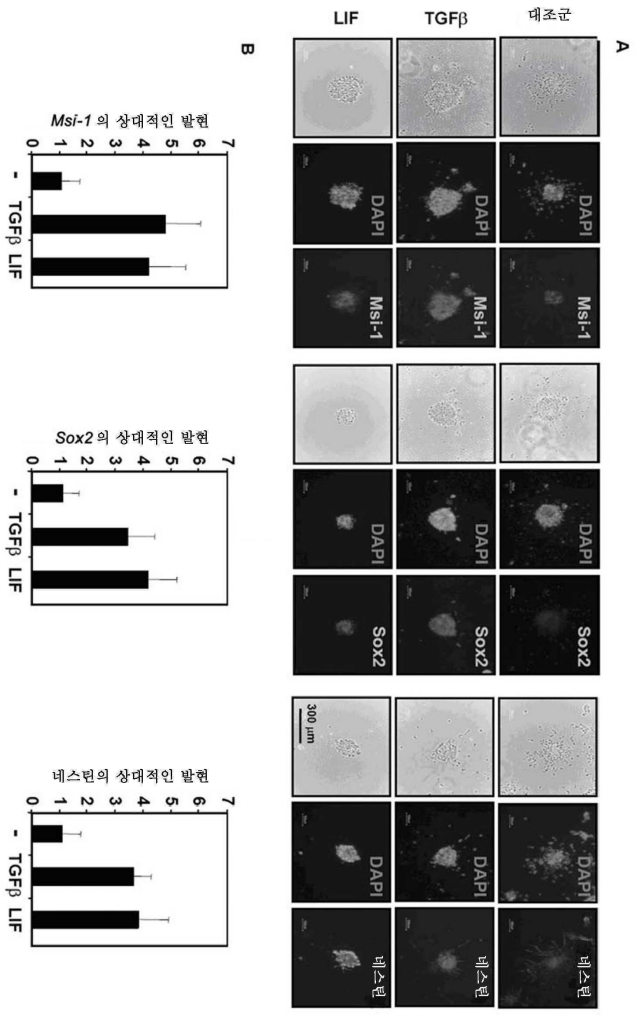
도면5


A
LIF (분)
0 15 30 60
p-STAT3
STAT3
B
LIF
P6
DMSO
p-STAT3
STAT3
C
TGFβ
TβRI Inh
p-STAT3
STAT3
p-Smad2
Smad2
α-튜불린
D
P6
α-LIF
TGFβ
p-STAT3
STAT3

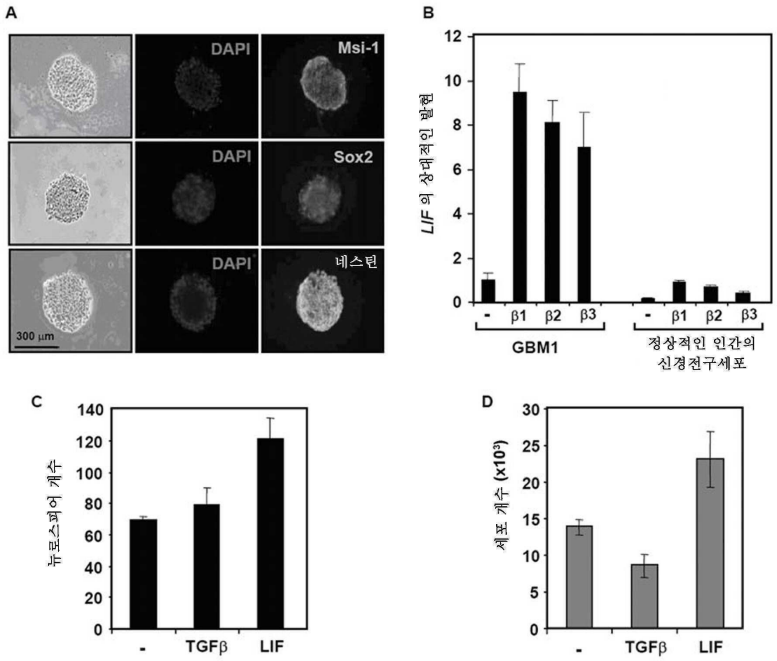
도면6


A
B
GBM1
GBM2
GBM3
뉴로스피어 개수
세포 개수 (x10³)
- TGFβ LIF α-LIF TGFβ + α-LIF P6 TGFβ + P6
C
대조군
TGFβ
LIF
αLIF
TGFβ + αLIF
200 μm

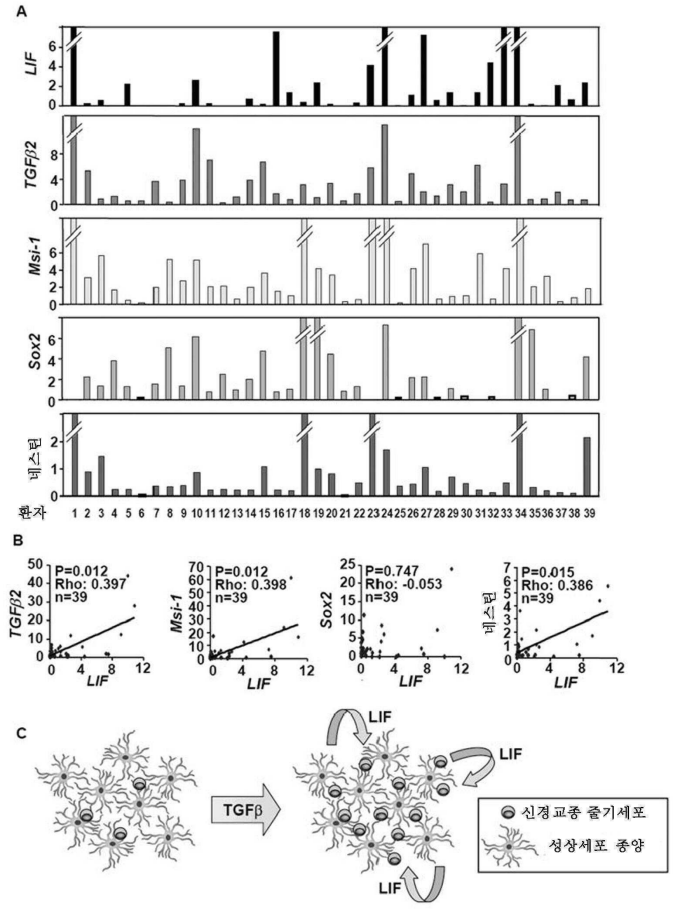
도면7


A
대조군
TGFβ
LIF
DAPI
Msi-1
Sox2
네스틴
300 μm
B
Msi-1 의 상대적인 발현
Sox2 의 상대적인 발현
네스틴의 상대적인 발현
0
1
2
3
4
5
6
7
-
TGFβ
LIF

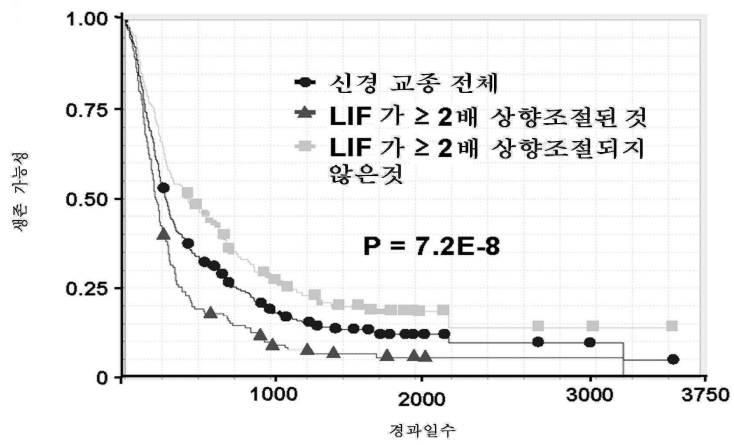
도면8


A
DAPI
Msi-1
DAPI
Sox2
DAPI
네스틴
300 μm
B
LIF 의 상대적인 발현
12
10
8
6
4
2
0
-
β1
β2
β3
GBM1
정상적인 인간의
신경전구세포
C
뉴로스피어 개수
140
120
100
80
60
40
20
0
-
TGFβ
LIF
D
세포 개수 (x10³)
30
25
20
15
10
5
0
-
TGFβ
LIF

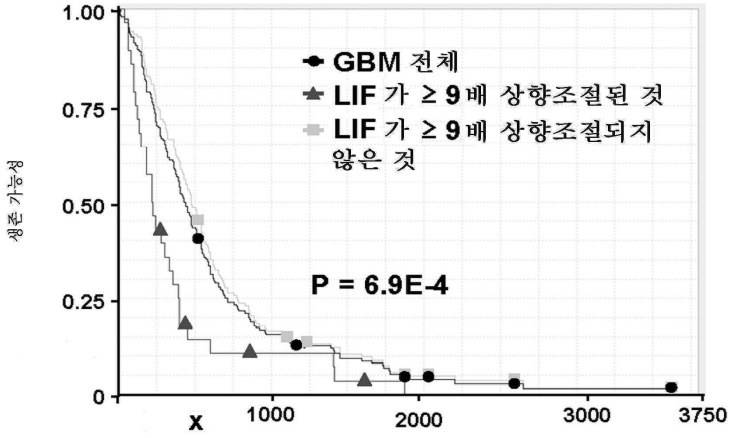
도면9


A
LIF
TGFβ2
Msi-1
Sox2
네스틴
환자
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
B
TGFβ2
P=0.012
Rho: 0.397
n=39
Msi-1
P=0.012
Rho: 0.398
n=39
Sox2
P=0.747
Rho: -0.053
n=39
네스틴
P=0.015
Rho: 0.386
n=39
LIF
C
TGFβ
LIF
LIF
LIF
신경교종 줄기세포
성상세포 종양

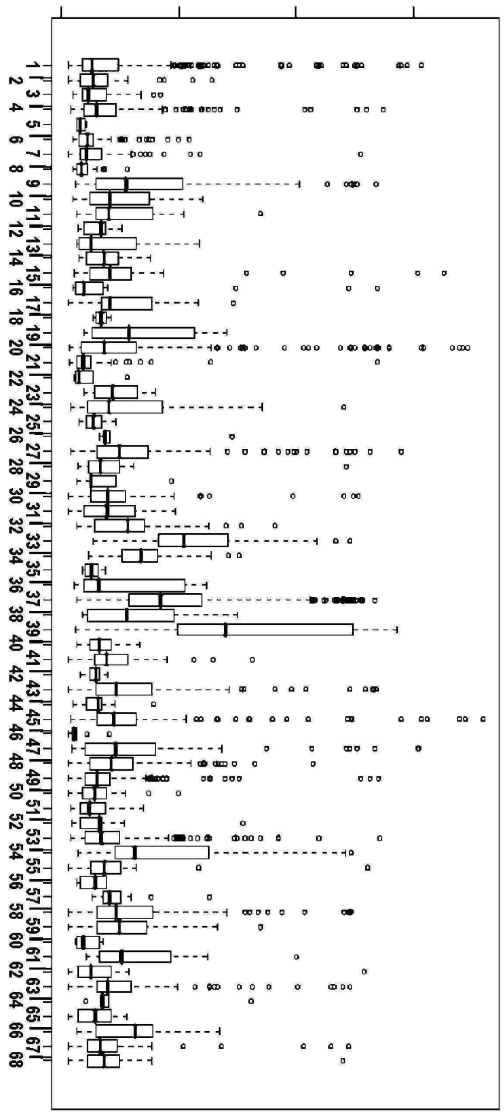
도면10


1.00
0.75
0.50
0.25
0
생존 가능성
1000
2000
3000
3750
경과일수
신경 교종 전체
LIF 가 ≥ 2배 상향조절된 것
LIF 가 ≥ 2배 상향조절되지 않은것
P = 7.2E-8

도면11


1.00
0.75
0.50
0.25
0
생존 가능성
X
1000
2000
3000
3750
GBM 전체
LIF 가 ≥ 9배 상향조절된 것
LIF 가 ≥ 9배 상향조절되지 않은 것
P = 6.9E-4

도면12


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68