



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0078784
(43) 공개일자 2025년06월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) A61K 31/4245 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
A61K 31/4245 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0060296
(22) 출원일자 2024년05월08일
심사청구일자 2024년05월08일
- (30) 우선권주장
1020230165209 2023년11월24일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(주)휴먼스케이프
서울특별시 강남구 봉은사로82길 21 (삼성동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자
이범희
서울특별시 송파구 올림픽로 525, 104동 1605호
김소영
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 아산생명과학
연구원
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인더웨이브

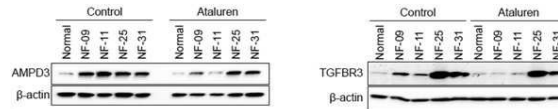
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 AMPD3를 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물 및 AMPD3 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

AMPD3를 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물 및 AMPD3 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 조성물은 신경섬유종증 환자에서 치료제 감수성에 대한 유용한 진단 마커로써 활용도가 높을 뿐만 아니라, 신경섬유종증(NF1)의 새로운 치료 타겟으로 할 수 있다는 장점을 갖는다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
G01N 33/57407 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/118 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

장민후

서울특별시 강남구 봉은사로86길 6, 레베쌍트빌딩
 601호

(72) 발명자

도효상

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 아산생명과학
 연구원

허선희

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 아산생명과학
 연구원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465039212
과제번호	HR21C0198030023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원육성
연구과제명	치료표적 발굴 특화 인공지능 기반의 개방형 신약개발 지원
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

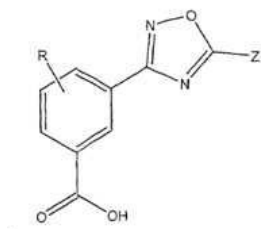
AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1) 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

신경섬유종증 치료제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물:

[화학식 1]



상기 식에서

Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

R은 수소 또는 할로젠이다.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 3-[5-(2-플루오로-페닐)-[1,2,4]옥사디아졸-3-일]-벤조산인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 신경섬유종증은 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 바이오마커 조성물은 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 기재된 바이오마커 조성물을 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 키트.

청구항 9

개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 AMPD3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 정보를 제공하는 방법은 TGFBR3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 것인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 AMPD3 발현 저해제는 AMPD3의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 AMPD3 활성 저해제는 AMPD3의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앵타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

청구항 14

청구항 11에 있어서,

상기 약학 조성물은 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 발현 저해제는 TGFBR3의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

청구항 16

청구항 14에 있어서,

상기 활성 저해제는 TGFBR3의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앵타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

청구항 17

AMPD3의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 키트.

청구항 18

청구항 17에 있어서,

상기 키트는 TGFBR3의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 더 포함하는 것인, 신경섬유종증 예방 또는 치료용 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] AMPD3를 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물 및 AMPD3 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 제1형 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1)은 1882년 Fredrich von Recklin-ghausen이 처음 기술하였으며, 말초신경을 따라 종양을 형성하는 상염색체 우성유전 질환으로 약 3,500명 중 1명의 비율로 발생한다. 종양은 신경이 있는 신체 어느 부위에나 발생할 수 있고, 그 수가 한 개 이상으로 생기는 다발성이기 때문에 '신경섬유종증'이라고 한다.
- [0003] 주된 증상은 신경이 있는 곳이면 어디서나 발생하는 신경섬유종(neurofibroma)과 밀크 커피색 반점(cafe-au-lait spots), 홍채 결절(Lisch nodules), 시신경교종(optic pathway glioma), 척추측만(scoliosis), 경골형성 이상(tibial dysplasia), 총상신경섬유종(plexiform neurofibroma; PN), 교뇌신경교종(pontine glioma) 등이 있다.
- [0004] 제1형 신경섬유종증은 NF1 유전자의 돌연변이에 의해 발병하며, 환자의 약 50%는 유전이 아닌 자연발생적인 돌연변이에 의해 발생한다. NF1 유전자는 염색체 17q11.2에 위치하며, 350 kb의 genomic DNA, 57개의 엑손(exon)으로 구성되어 있고, mRNA는 11~13 Kb 정도이다. 종양억제유전자(tumor suppress gene) NF1은 320 kDa의 세포질에 존재하는 뉴로파이브로민(neurofibromin) 단백질을 암호화하는데, 아미노산 1125-1537 부위에 종양유전자(oncogene) Ras 신호를 하향 조절하는 GTPase-activating protein(GAP)-related domain(GRD) 영역을 가지고 있다. GAP는 Ras의 intrinsic GTPase를 자극하여 활성화 형태인 Ras-GTP에서 Ras-GDP 불활성화 형태로 전환시킴으로써 Ras의 활성을 조절한다. Ras에 의해 암호화되는 Ras 단백질은 신경능선세포와 내피세포 모두에서 발현되고, 그 신호는 여러 가지 하위 신호전달 경로로 전달된다. 따라서 뉴로파이브로민(neurofibromin)의 손실 혹은 기능이상(dysfunction)은 RAS의 과잉 활성화 및 축적에 의해 제1형 신경섬유종증이 발병하고, 환자의 약 20%에서는 생명을 위협하는 심한 합병증이 야기된다.
- [0005] 신경섬유종증 환자의 약 8-13%에서는 악성화가 나타나 예측이 불가능하고 심한 임상적 증상을 야기하지만 그 유전성으로 인하여 근본적인 치료가 불가능하다. 신경섬유종증으로 악성화가 전개된 경우, 종양의 절제 등의 대증요법만이 유일한 치료법이나, 종양의 위치에 따라 수술이 불가능한 경우가 많아 암의 진행 시기에 관계없이 신경섬유종증의 발생은 환자의 생명과 직결된다.
- [0006] 제1형 신경섬유종증의 임상적 표현형의 다양성과 악성화 과정에 대한 정확한 기전은 현재까지 명확하게 밝혀진 바가 없다. 대표적인 치료방법으로 방사선 요법, 외과적 수술 절제, 세포 독성약 등이 사용되고 있으나 장기간

의 효과는 미비하여 새로운 접근법을 이용한 새로운 치료 표적 및 후보 물질이 필요한 실정이다.

[0007] 이에, 제1형 신경섬유종증(NF1)의 치료제 감수성을 예측할 수 있는 진단 마커 및 신경섬유종증의 새로운 치료 표적을 발굴하고, 상기 치료 표적 저해제(inhibitor)가 새로운 신경섬유종증 치료제로써의 활용가능성을 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 일 양상은 AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1) 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 다른 양상은 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 다른 양상은 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 AMPD3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및/또는 TGFBR3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하는, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 다른 양상은 AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor) 및/또는 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] AMPD3의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor) 및/또는 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 일 양상은 AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 신경섬유종증(Neurofibromatosis Type1, NF1) 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0015] 본 명세서의 용어, "AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase)"는 AMP에서 inosine monophosphate (IMP)로 deamination시키는 효소로서, 퓨린계의 energy metabolism 조절에 관여하는 것을 의미한다. 상기 AMPD3는 GTP synthesis을 조절하는 것으로 알려져 있으며, 이는 active Ras의 소스로써 GTP-bound RAS의 활성을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 AMPD3는 활성 형태의 RAS(GTP 결합 RAS)의 자원인 GTP의 합성을 촉진하므로 AMPD3는 뉴로파이브로민(neurofibromin) 활성에 직간접적으로 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 과발현된 AMPD는 과활성 RAS와 연관되어 MEK-ERK 신호 전달 경로를 조절하는 뉴로파이브로민(neurofibromin)의 항암 활성을 억제하는 반면, AMPD3 억제는 뉴로파이브로민 발현을 회복시켜 항암 활성을 나타낸다. 또한 상기 AMPD3는 Gastrointestinal stromal tumors (GIST)에서 receptor tyrosine kinase(KIT)와 positive correlation이 있어 종양 악성화에 관여하는 것으로도 알려져 있다.

[0016] 본 명세서의 용어 "감수성(susceptibility)"은 개개의 신경섬유종증 환자에 대하여 특정 약물이 치료 효과를 나타내는지 여부를 의미한다. 신경섬유종증 치료에 유효한 것으로 인정되고 있는 종류의 치료제라도, 개개의 환자에 따라 효과를 나타내는 경우와 효과를 나타내지 않는 경우가 있는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 개개의 환자의 신경섬유종증에 대해 치료제가 효과를 나타내는지 여부를 치료제에 대한 감수성이라고 할 수 있다.

[0017] 본 명세서의 용어 "진단"은 병리학적 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하며, 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는지 여부를 판정 및 특정 질환에 걸린 한 개체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다.

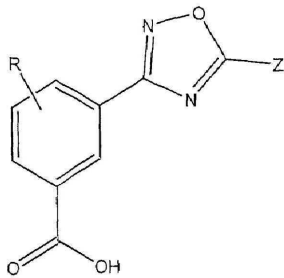
[0018] 본 명세서의 용어 "바이오마커"는 동반진단(Companion Diagnosis) 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 샘플에서 환자의 특정 약물 치료에 대한 반응성을 미리 예측할 수 있는 물질을 의미한다. 정상 개체로부터 수득한 생물학

적 샘플에 비하여 신경섬유종증 환자에서 채취한 생물학적 샘플에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예를 들어, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(예를 들어, 단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있다.

[0019] 일 구체예에서, 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커는 AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase) 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자일 수 있다. 이의 발현 수준이 정상대조군에 비해 높으면 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단될 수 있으며, 반대로 이의 발현 수준이 낮은 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단될 수 있다.

[0020] 상기 신경섬유종증 치료제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염인, 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물일 수 있다:

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 상기 식에서

[0024] Z는 할로젠, 하이드록실, 치환되거나 비치환된 알킬, 치환되거나 비치환된 알콕시, 치환되거나 비치환된 아릴, 치환되거나 비치환된 헤테로아릴, 치환되거나 비치환된 사이클로알킬, 치환되거나 비치환된 헤테로사이클, 또는 치환되거나 비치환된 헤테로사이클로알킬이고;

[0025] R은 수소 또는 할로젠이다.

[0026] 용어 "할로젠"은 다른 언급이 없으면 F, Cl, Br 또는 I를 의미한다.

[0027] 용어 "하이드록실"은 다른 언급이 없으면 한 개의 수소 원자와 한 개의 산소 원자로 이루어진 일가의 원자단으로, 화학식 -OH를 갖는 기를 의미한다.

[0028] 용어 "알킬"은, 달리 명시되지 않는 한, 선형 또는 분지형의 포화된 탄화수소 잔기를 의미한다. 예를 들어, "C1-10 알킬"은 1 내지 10개 탄소로 골격이 이루어진 알킬을 의미한다. 구체적으로 C1-10 알킬은 메틸, 에틸, n-프로필, i-프로필, n-부틸, i-부틸, t-부틸, n-펜틸, i-펜틸, t-펜틸, sec-펜틸, 네오펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실 등을 포함할 수 있다.

[0029] 용어 "알콕시"는, 달리 명시되지 않는 한, 앞에 정의한 알킬기가 산소 원자를 통하여 모 화합물에 부착되어 있는, 화학식 -O-알킬을 갖는 기를 의미한다. 알콕시기의 알킬 부분은 1 내지 20개의 탄소원자(즉, C1-C20 알콕시), 1 내지 12개의 탄소원자(즉, C1-C12 알콕시), 또는 1 내지 6개의 탄소원자(즉, C1-C6 알콕시)를 가질 수 있다. 적합한 알콕시기의 예로는 메톡시(-O-CH₃ 또는 -OMe), 에톡시(-OCH₂CH₃ 또는 -OEt), t-부톡시(-O-C(CH₃)₃ 또는 -O-tBu) 등이 있다.

[0030] 용어 "아릴"은 모 방향족 고리 시스템의 6개의 탄소원자로부터 1개의 수소 원자가 제거되어 유도되는 방향족 탄화수소 라디칼을 의미한다. 예를 들면, 아릴기는 6 내지 20개의 탄소원자, 6 내지 14개의 탄소원자, 또는 6 내지 12개의 탄소원자를 가질 수 있다.

[0031] 용어 "사이클로알킬"은 고리 중에 탄소원자만을 포함하는 포화 모노사이클 또는 폴리-사이클을 지칭한다. 사이클로알킬은, 모노사이클로서는 3 내지 7개의 탄소원자를, 바이사이클로알킬로서는 7 내지 12 탄소원자를, 폴리-사이클로서는 최대 약 20개의 탄소원자를 가질 수 있다.

[0032] 용어 "헤테로사이클"은 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 방향성 또는 비방향성의 고리를 의미하며, 포화되거나 불포화될 수 있고, 단일고리 또는 다중고리일 수 있다. 예를 들어 "4 내지 10원의 헤테로사이클"은 헤테로원자 및 탄소원자를 포함하여 총 4 내지 10개의 원자로 골격이 이루어진 헤테로사이클을 의미한다. 구체적으로 4 내지 10원의 헤테로사이클은 아제티딘, 디아제티딘, 피롤리딘, 피롤, 이미다졸리딘, 이미다졸, 피라졸리딘, 피라

졸, 옥사졸리딘, 옥사졸, 이속사졸리딘, 이속사졸, 티아졸리딘, 티아졸, 이소티아졸리딘, 이소티아졸, 피페리딘, 피리딘, 피페라진, 디아진, 모폴린, 티오모폴린, 아제판, 디아제판 등을 포함할 수 있다.

[0033] 용어 "헤테로아릴"은 고리 내에 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 방향족 헤테로사이클릴을 지칭한다. 헤테로아릴의 비제한적인 예로는 피리디닐, 피롤릴, 옥사졸릴, 인돌릴, 이소인돌릴, 퓨리닐, 퓨라닐, 티에닐, 벤조퓨라닐, 벤조티오펜, 카바졸릴, 이미다졸릴, 티아졸릴, 이속사졸릴, 피라졸릴, 이소티아졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 피리다질, 피리미딜, 피라질(이들은 고리에 하나 이상의 치환기를 가질 수 있음) 등이 있다.

[0034] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 고리 내에 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 비방향족 헤테로사이클릴을 지칭한다. 헤테로사이클로알킬은 이중 결합의 존재로 인해 고리가 방향성(Aromatic)을 갖지 않는 범위에서 고리 내에 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합 또는 탄소-헤테로원자 이중 결합을 가질 수 있다. 헤테로사이클로알킬의 비제한적인 예로는 아제티딘일, 아지리딘일, 피롤리딘일, 피페리딘일, 피페라진일, 호모피페라진일, 모폴리노, 티오모폴리노, 테트라히드로퓨란일, 테트라히드로티오펜일, 테트라히드로피란일, 피란일(이들은 고리에 하나 이상의 치환기를 가질 수 있음) 등이 있다.

[0035] 용어 "헤테로원자"는 탄소(C) 이외의 원자를 의미하며, 구체적으로 질소(N), 산소(O) 또는 황(S) 원자일 수 있다.

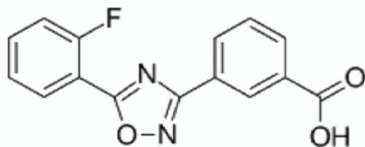
[0036] 용어 "치환"은, 지정된 원자 상의 원자가(Valence)를 초과하지 않으면서 이러한 치환으로부터 화학적으로 안정한 화합물이 되도록, 분자 구조체 내의 수소 원자를 치환기로 대체하는 것을 지칭한다. 예를 들어, "그룹 A가 치환기 B로 치환"된다는 것은, 그룹 A의 골격을 구성하는 탄소 등의 원자에 결합된 수소 원자가 치환기 B로 대체되어, 그룹 A와 치환기 B가 공유 결합을 형성함을 의미할 수 있다.

[0037] 상기 Z는 Z가 p-톨릴; (4-클로로메틸-페닐); (2-클로로-피리딘-3-일); (2-플루오로-페닐); (3,4-디플루오로-페닐); (4-메톡시-페닐); 벤조[1,3]디옥솔-일; (4-에틸-페닐); o-톨릴; (2-클로로-페닐); (3-메틸-티오펜-2-일); 벤조[b]티오펜-2-일; (3-플루오로-페닐); (4-tert-부틸-페닐); (2-메톡시-페닐); (2, 디플루오로-페닐); 티오펜-2-일; (2,4-디플루오로-페닐); (3-클로로-페닐); m-톨릴; (4-트리플루오로메틸-페닐); (4-플루오로-페닐); (3-메톡시-페닐); 페닐; (2,6-디플루오로-페닐); (2, 디메틸-푸란-3-일); (4-피롤-1-일-페닐); (3-디메틸아미노-페닐); 비페닐-4-일; (4-디메틸아미노-페닐); 벤조[1,2,5]옥사디아졸-일; m-톨릴; (2-트리플루오로메틸-페닐); (6-클로로-피리딘-3-일); (3, 비스-트리플루오로메틸-페닐); 푸란-2-일; (4-니트로-페닐); (3,4-디메톡시-페닐); (3-트리플루오로메톡시-페닐); 나프탈렌-1-일; 시클로헥실; 피리딘-3-일; 피리딘-4-일; 시클로펜틸; 시클로프로필; (4-펜틸옥시-페닐); (3,4,트리메톡시-페닐); (4-이소부틸-페닐); 시클로부틸; (1-아세틸-피페리딘-4-일); 이소옥사졸-일; [2-클로로-6-플루오로-페닐]-메틸-이소옥사졸-4-일 또는 [2-클로로-페닐]-메틸-이소옥사졸-4-일일 수 있다. 구체적으로, 상기 Z는 (2-플루오로-페닐); (3,4-디플루오로-페닐); (2-클로로-페닐); (3-플루오로-페닐); (2,5-디플루오로-페닐); (2,4-디플루오로-페닐); (3-클로로-페닐); (4-플루오로-페닐); 또는 (2,6-디플루오로-페닐)일 수 있다.

[0038] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 조기 종결 코돈(premature stop codons)을 read-through할 수 있다.

[0039] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 3-[5-(2-플루오로-페닐)-[1,2,4]옥사디아졸-3-일]-벤조산일 수 있다. 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:

[0040] [화학식 2]



[0041]

[0042] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 아탈루렌(Ataluren), PCT124 또는 트랜스라나(Translarna)라고도 불리우며, 조기 종결 코돈(premature stop codons)을 read-through하는 것으로 알려져 있다.

[0043] 상기 신경섬유종증 치료제는 상기 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 인간에 대한 독성이 낮아야 하며, 모(母) 화합물의 생물학적 활성 및 물리화학적 특성에 임의의 부정적인 영향을 주지 않아야 한다.

[0044] 예를 들어, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 알칼리금속염(나트륨염 등) 또는 알칼리토금속염(칼륨염 등)일

수 있다. 상기 알칼리금속염 또는 알칼리토금속염은, 예를 들어 상기 화합물을 과량의 알칼리금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 미용해된 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발 및 건조시켜 얻을 수 있다.

[0045] 또한, 상기 화합물은 키랄 탄소 중심을 가질 수 있으며, 이에 따라 R 또는 S 이성질체, 라세미 화합물, 개개의 거울상 이성질체 또는 혼합물, 개개의 부분입체 이성질체 또는 혼합물 형태로 존재할 수 있으며, 이러한 모든 입체 이성질체 및 이들의 혼합물이 본 발명의 범주에 속할 수 있다.

[0046] 또한, 상기 화합물은 상기 화합물의 수화물 및 용매화물을 포함할 수 있다. 상기 수화물 및 용매화물은 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있으며, 무독성 및 수용성인 것이 바람직하다. 특히, 바람직하게는 상기 수화물 및 용매화물은 각각 물 및 알코올성 용매(특히, 에탄올 등)의 1 내지 5개의 분자가 결합된 것일 수 있다.

[0047] 상기 AMPD3단백질의 발현 수준 측정은 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 상기 단백질의 존재 여부와 그 단백질의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다.

[0048] 상기 "단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제"는 모노클로날(monoclonal) 항체, 폴리클로날(polyclonal) 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드(ligand), PNA(peptide nucleic acid), 압타머(aptamer) 및 나노파티클(nanoparticle)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사선면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(immunoprecipitation assay), 면역조직화학적 분석(immunohistochemical analysis), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS(Fluorescence activated cell sorter), 단백질 칩(protein chip), 2차원 전기영동분석, 단백질 질량 분석, 액상 크로마토그래피-질량분석(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS), LC-MS/MS(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry), MALDI-TOF(Matrix Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석, SELDI-TOF(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) 분석 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준의 측정은 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측하기 위하여 개체의 생물학적 샘플에서 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 존재 여부와 그 유전자의 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 유전자의 양을 확인하는 것이다.

[0051] 상기 "단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제"는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머(primer) 쌍, 프로브(probe) 및 안티센스 뉴클레오타이드(antisense nucleotide)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), RNase 보호 분석법(RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 상기 신경섬유종증은 NF1 유전자에 종결 코돈 돌연변이를 가지는 것일 수 있다.

[0054] 본 명세서의 용어 "종결 코돈 돌연변이(stop codon mutation)"은 돌연변이에 의하여 염기서열의 일부가 종결 코돈인 UAG, UAA, UGA 중의 하나가 되어 폴리펩타이드의 합성이 중단되는 것을 의미한다.

[0055] 상기 종결 코돈 돌연변이는 DNA 염기가 다른 염기와 치환되는 점 돌연변이(point mutation) 중 하나인 넌센스 돌연변이(nonsense mutation) 또는 구조이동 돌연변이(Frameshift mutation)에 의한 것일 수 있다.

[0056] 상기 "넌센스 돌연변이(nonsense mutation)"는 DNA 염기서열이 단백질로 전환될 때, 염기서열의 일부가 정지코돈(UAG, UAA, UGA 중 하나)으로 전환되어 더 이상 단백질의 합성이 이루어지지 않는 돌연변이를 의미한다.

[0057] 상기 "구조이동 돌연변이(Frameshift mutation)"는 DNA 염기서열에 1개 또는 2개 또는 3의 배수가 아닌 수의 뉴클레오타이드의 삽입(insert) 또는 결실(deletion)이 되는 변이로 인하여 유전자의 전사, 번역 과정을 거쳐 생성되는 단백질의 아미노산 배열은 크게 달라지는 돌연변이를 의미한다.

[0058] 일 구현예에서, 상기 종결 코돈 돌연변이는 i) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 5242번째 염기인 시티딘(C)이 티

민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 1748번째 아미노산인 아르기닌(Arg, R)이 종결코돈으로 전환, ii) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 2560번째 염기인 시티딘(C)이 티민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 854번째 아미노산인 글루타민(Gln, Q)이 종결코돈으로 전환, iii) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 6792번째 염기인 시티딘(C)이 아데닌(A)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 2264번째 아미노산인 티로신(Tyr, Y)이 종결코돈으로 전환, iv) NF1 유전자의 DNA 염기서열에서 3565번째 염기인 시티딘(C)이 티민(T)으로 치환되면서 NF1 단백질을 구성하는 1189번째 아미노산인 글루타민(Gln, Q)이 종결코돈으로 전환된 것일 수 있다.

- [0059] 다른 구현예에서, 상기 바이오마커 조성물은 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0060] 본 명세서의 용어, "TGFBR3(TGF-beta receptor 3)"는 TGF-beta 신호전달체계의 조절인자 중 하나이며, TGF-베타 수용체 슈퍼패밀리 구성원과 공동 수용체로 기능하는 막 프로테오글리칸을 의미한다. 상기 TGFBR3는 colon cancer 및 triple-negative breast cancer progression에 관여하는 것으로 알려져 있으며, TGF-beta 신호에 반응하는 NF1+/- fibroblast는 Ras-c-abl 신호전달경로가 과활성됨으로써 세포증식 및 콜라겐 형성이 증가하여 신경섬유종의 phenotype을 보인다고 알려져 있다.
- [0061] 용어, "감수성", "바이오마커", "신경섬유종증 치료제" 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제", "단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제", "종결 코돈 돌연변이(stop codon mutation)" 등은 전술한 바와 같다.
- [0062] 일 양상은 상기 바이오마커 조성물을 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 키트를 제공한다.
- [0063] 상기 키트는 개체로부터 분리된 생물학적 샘플을 이용하여 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측할 수 있다. 구체적으로는, 상기 키트는 개체로부터 채취한 섬유아세포를 이용하여 상기 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성을 예측할 수 있다.
- [0064] 상기 키트에는 상기 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 제제뿐만 아니라, 면역학적 분석에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.
- [0065] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 해당 기술분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0066] 상기 바이오마커 조성물에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0067] 또 다른 양상은, 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 AMPD3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0068] 또 다른 양상은, TGFBR3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 더 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0069] 상기 방법은 AMPD3 및/또는 TGFBR3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준이 정상 개체로부터 수득한 생물학적 샘플에서 측정된 발현 수준과 유사하거나 보다 감소한 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 높은 것으로 판단하고, 반대로 이의 발현 수준이 높은 경우에 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성이 낮은 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0070] 용어 "생물학적 샘플"은 일 양상에 따른 AMPD3 및/또는 TGFBR3 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 개체로부터 수득한 모든 샘플을 의미한다.
- [0071] 상기 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액, 객담, 뇌척수액, 세포, 세포 배양액, 조직 추출물 또는 종양 조직일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 구체적으로는, 상기 생물학적 샘플은 개체로부터 채취한 섬유아세포 또는 혈액일 수 있다. 상기 생물학적 샘플은 해당 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법으로 처리하여 준비될 수 있다.

- [0072] 또 다른 양상은, AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase)의 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0073] 본 명세서의 용어 "AMPD3(Adenosine monophosphate deaminase) 발현 또는 활성 저해제(inhibitor)"는 AMPD3 유전자 또는 단백질에 직접 결합하거나, AMPD3의 리간드에 결합하거나 또는 AMPD3와 이의 리간드에 결합하는 것을 저해하는 것일 수 있다. 이를 통해 AMPD3의 발현 또는 활성을 억제하거나 저해할 수 있으며, 종국적으로 종양의 성장을 저해하거나 사멸시킬 수 있다. AMPD3저해제 효능은 예를 들어, 50% (반-최대 억제제 농도 또는 IC₅₀)에서 AMPD3 저해제 농도에 의해 측정될 수 있다.
- [0074] 상기 리간드(ligand)는 생물학적 목적을 수행하기 위해 수용체 단백질 등의 생체 분자에 결합하여 복합체를 형성하는 물질을 의미하며, 기질(substrate), 활성제(activator), 신호전달 지질(signaling lipid), 신경전달물질(neurotransmitter) 등을 포함한다.
- [0075] 상기 "저해제(inhibitor)"는 "억제제"와 상호교환적으로 사용될 수 있으며, "저해" 또한 "억제"와 상호교환적으로 사용될 수 있다. 상기 "저해" 또는 "억제"는 폴리펩티드의 활성, 결합 또는 발현 감소를 지칭한다.
- [0076] 본 명세서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 암을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 명세서의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 암이 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.
- [0077] 일 구체예에 따르면, 상기 AMPD3 발현 저해제는 AMPD3의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0078] 본 명세서의 용어, "발현 저해"는 유전자 전사의 억제 및 단백질로의 번역 억제를 포함한다. 또한, 유전자 발현이 완전히 정지된 것뿐만 아니라 발현이 감소된 것도 포함된다.
- [0079] 본 명세서에서 용어, "안티센스 핵산"은 특정 mRNA의 서열에 대해 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 단편 또는 유도체를 의미하며, mRNA의 서열에 상보적으로 결합 또는 혼성화하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용할 수 있다.
- [0080] 본 명세서에서 용어, "siRNA(small interfering RNA)"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통해 RNAi(RNA interference)를 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 갖는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 갖는 안티센스 RNA 가닥을 포함한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 유전자 녹다운 방법 또는 유전자치료 방법 등에 사용될 수 있다.
- [0081] 본 명세서에서 용어, "shRNA(short hairpin RNA)"는 단일가닥 RNA로서 수소결합에 의해 이중가닥 부분을 형성하는 줄기(stem) 부분과 고리 형태를 띠는 루프(loop) 부분으로 구분되는 RNA를 의미한다. 다이서(Dicer) 등의 단백질에 의해 프로세싱되어 siRNA로 변환되고 siRNA와 동일한 기능을 수행할 수 있다.
- [0082] 본 명세서에서 용어, "miRNA(microRNA)"는 표적 RNA의 분해를 촉진시키거나 또는 이들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 의미한다.
- [0083] 본 명세서에서 용어, "리보자임(ribozyme)"은 특정 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성될 수 있다.
- [0084] 상기 AMPD3의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임 등은 AMPD3 및/또는 PDL3 리간드의 전사(transcription), 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 번역(translation) 등 다른 임의의 AMPD3 및/또는 PDK3의 리간드의 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.
- [0085] 일 구체예에 따르면, 상기 AMPD3 활성 저해제는 AMPD3의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앵타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 약학 조성물일 수 있다.
- [0086] 본 명세서에서 용어, "특이적"은 세포 내에서 다른 단백질에 영향을 미치지 않고 목적 단백질에만 결합하는 능력을 의미한다.
- [0087] 본 명세서에서 용어, "펩티드"는 단백질을 구성하는 작은 단위로서, 2개 이상의 아미노산이 펩티드 결합을 통해

연결된 구조를 가지고 있는 화합물을 의미한다.

- [0088] 본 명세서에서 용어, "펩티드 미메틱스(Peptide Minetics)"는 생체 분자의 구조와 기능을 모방하거나 개선하여 만들어진 인공적인 펩티드 분자를 의미한다. 상기 펩티드 미메틱스는 기존의 펩티드 분자와 비슷한 구조를 가지지만, 몇 가지 키워드를 변경하거나 추가함으로써 생체 내에서의 안정성, 생물활성, 특이성 등을 향상시킨 것을 포함한다.
- [0089] 본 명세서에서 용어, "융합 단백질(Chimeric protein)"은 단백질에 한 개 이상의 다른 단백질의 유전자를 연결시킨 후 발현시키는 인공 재조합 단백질을 의미한다.
- [0090] 본 명세서에서 용어, "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 의미한다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 상기 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, 예를 들어 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 또는 Fv 등일 수 있다. 또한 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한 상기 항체는 당 업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다.
- [0091] 본 명세서에서 용어, "애포타머 (Aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미한다.
- [0092] 본 명세서의 용어, "항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)"는 표적 특이성을 지닌 항체에 링커(linker)를 통해 특정 약리기전을 갖는 저분자 약물을 탑재한 형태를 가지는 물질을 의미한다.
- [0093] 상기 AMPD3의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 애포타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate) 등은 PDK3의 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.
- [0094] 일 구체예에 있어서, 상기 AMPD3 저해제를 포함하는 약학 조성물은 TGFBR3(TGF-beta receptor 3)의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하거나 병용투여되는 것일 수 있다.
- [0095] 본 명세서의 용어, "투여"는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법 및 전달 시스템 중 임의의 것을 사용하여 조성물을 대상체에게 물리적으로 도입하는 것을 의미한다.
- [0096] 본 명세서의 용어, "병용투여"는 두 개 이상의 약물 또는 치료 방법을 동시에 사용하여 질환을 치료하거나 관리하는 것을 의미한다. 상기 병용투여는 상기 AMPD3 발현 또는 활성 저해제와 TGFBR3의 발현 또는 활성 저해제를 동시에(simultaneous), 동반하여(concurrent), 순차적으로, 연속적으로, 교대로 또는 별도로 투여하는 것일 수 있다.
- [0097] 상기 동시(simultaneous) 투여는 실질적으로 동일 시간에 투여하는 것을 포함한다. 이러한 형태의 투여는 또한 "공동적(concomitant)" 투여로서 지칭될 수 있다. 상기 동반(concurrent) 투여는 활성제를 동일한 일반적인 기간내에, 예를 들어, 동일 날짜(들)에 투여하는 것을 포함하지만, 반드시 동시에 투여하는 것은 아니다. 상기 교대적 투여는, 특정 기간 동안, 예를 들어, 수일 또는 일주일 동안 하나의 체제를 투여한 후, 후속 기간 동안, 예를 들어, 수일 또는 일주일 동안 나머지 체제를 투여하고, 이어서 1 이상의 주기 동안 상기 패턴을 반복하는 것을 포함한다. 상기 순차적 또는 연속적 투여는 1 이상의 용량을 사용하여 제1 기간 동안(예를 들어, 수일 또는 일주일 동안) 하나의 체제를 투여한 후, 1 이상의 용량을 사용하여 제2 및/또는 추가 기간 동안(예를 들어, 수일 또는 일주일 동안) 나머지 체제(들)을 투여하는 것을 포함한다. 반드시 규칙적인 순서에 따르지 않고 치료 기간 동안 상이한 날에 활성제를 투여하는 것을 포함하는 중복 스케줄도 사용할 수 있다. 예를 들어, 사용되는 체제 및 대상의 상태에 따라 이러한 일반적인 지침에 대한 변형이 사용될 수 있다.
- [0098] 일 구체예에 있어서, 상기 발현 저해제는 TGFBR3의 DNA 또는 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA 및 리보자임으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0099] 일 구체예에 있어서, 상기 활성 저해제는 TGFBR3의 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 애포타머 및 항체-약물 복합체(ADC; Antibody Drug Conjugate)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0100] 상기 신경섬유종증, 저해제, 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 애포타머 및 항체-약물 복합체(ADC) 등의 정의는 전술한 바와 같다.

- [0101] 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 저해제(inhibitor) 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0102] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 유효성분 외에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로솔, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0103] 본 발명에 따른 약학 조성물은 AMPD3 또는 이의 리간드의 저해제를 유효량으로 포함하여, 신경섬유종증의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0104] 상기 유효량은 "치료 유효량" 또는 "예방 유효량"일 수 있다. 상기 "치료 유효량"은 약물 또는 치료제가 단독으로 또는 다른 치료제와 조합되어 사용되는 경우, 질환 증상의 중증도 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 지속기간의 증가, 또는 질환 고통으로 인한 손상 또는 장애의 방지를 나타낼 수 있는 임의의 양을 의미한다. 상기 "예방 유효량"은 개체에서 암의 발생 또는 재발을 억제하는 임의의 양을 의미한다. 상기 유효량의 수준은 대상체의 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소 등에 따라 결정될 수 있다.
- [0105] 상기 "대상체"는 인간 또는 임의의 비인간 동물을 포함하며, 상기 비인간 동물은 척추동물, 예컨대 영장류, 개, 소, 말, 돼지, 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 기니피그 등일 수 있다. 본 명세서에서, 상기 "대상체"는 "개체" 및 "환자"와 상호교환적으로 사용된다.
- [0107] 다른 양상은 AMPD3 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [0108] 일 구체예에 있어서, 상기 키트는 TGFBR3의 발현 또는 활성 저해제를 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0109] 상기 신경섬유종증, 저해제, 안티센스 핵산, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임, 펩티드, 펩티드 미메틱스, 융합 단백질, 항체, 앵타머 및 항체-약물 복합체(ADC) 등의 정의는 전술한 바와 같다.

발명의 효과

- [0110] AMPD3를 포함하는 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측용 바이오마커 조성물 및 AMPD3 저해제를 포함하는 신경섬유종증 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 일 양상에 따른 조성물은 신경섬유종증 환자에서 치료제 감수성에 대한 유용한 진단 마커로써 활용도가 높을 뿐만 아니라, 신경섬유종증(NF1)의 새로운 치료 타겟으로 할 수 있다는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0111] 도 1은 정상대조군과 NF1환자 세포에서의 유전자 발현 패턴을 분석한 결과이다: 도 1a는 Differential expressed gene (DEG) 분석을 통해 정상 대조군과 NF1 환자의 세포에서 유전자의 다른 발현 패턴을 나타낸 것이고, 도 1b는 정상 대조군과 NF1 환자의 세포에서 발현 증가 또는 발현 감소한 유전자를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 정상대조군과 신경섬유종증 1형 환자들의 유전자 또는 단백질의 기능 및 이들이 속하는 생물학적 경로를 분석한 결과이다: 도 2a는 Gene ontology (GO)분석 결과이고, 도 2b는 KEGG pathway 분석 결과이다.

도 3은 Ataluren 약물에 반응하여 NF1 단백질의 full-length가 만들어지는 샘플과 그렇지 않은 샘플을 확인한 결과이다.

도 4는 Ataluren 약물에 반응있는 샘플 (NF-09, NF-11)과 반응없는 샘플 (NF-25, NF-31)에서의 ERK 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 Ataluren 약물에 반응있는 그룹(NF-09, NF-11)과 반응없는 그룹(NF-25, NF-31)의 Transcriptome을 Heatmap으로 나타낸 것이다.

도 6은 NF1 환자 또는 정상대조군 fibroblast에서 ataluren 약물 처리 전과 후에서의 mRNA 발현을 Reverse transcription-quantitative PCR로 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 NF1환자 fibroblast에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양을 western blot으로 확인한 결과이다.

도 8은 정상대조군 및 NF1 환자들의 혈액 plasma 샘플에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양을 western blot으로 확인한 결과이다.

도 9는 정상 세포주 및 총상 신경섬유종(PN) 세포주, 악성 말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3 단백질 발현양을 측정한 결과를 나타낸 사진이다.

도 10은 AMPD3 특이적인 siRNA 및 NF1 특이적인 siRNA를 처리한 Schwann 세포주에서 AMPD3 및 NF1의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 표 2의 siRNA를 이용하여 형질감염시킨 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3 단백질 수준 및 phospho-ERK(p-ERK) 단백질수준을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 12는 AMPD3 유전자의 siRNA를 처리한 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존율을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 AMPD3유전자의 siRNA를 처리한 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 apoptosis의 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0112] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0114] 실시예 1. 신경섬유종증 환자 중 NF1 유전자에 종결 코돈 변이가 존재하는 환자의 선별

[0115] 신경섬유종증 환자로부터 추출한 DNA를 대상으로 신경섬유종증의 원인 유전자인 NF1 유전자를 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 증폭한 후 생어 염기서열 분석(sanger sequencing)을 수행하였다. 분석 결과를 기반으로, NF1 유전자에 종결 코돈 변이가 존재하는 22명의 환자를 선별하였다. 선별된 환자의 NF1 유전자에 존재하는 종결 코돈 변이 정보는 하기 표 1에 기재한 바와 같다.

표 1

[0116]

ID	Mutation of NF1	
NF-08	c.7759G>T	p.Glu2587Ter
NF-09	c.5424C>T	p.Arg1748Ter
NF-10	c.1381C>T	p.Arg461Ter
NF-11	c.2560C>T	p.Gln854Ter
NF-13	c.7039G>T	p.Glu2347Ter
NF-14	c.4537C>T	p.Arg1513Ter
NF-19	c.4084C>T	p.Arg1362Ter
NF-20	c.4243G>T	p.Glu1415Ter
NF-21	c.3916C>T	p.Arg1306Ter
NF-22	c.1381C>T	p.Arg461Ter
NF-23	c.4537C>T	p.Arg1513Ter
NF-24	c.3763C>T	p.Gln1255Ter

NF-25	c.6792C>A	p.Tyr2264Ter
NF-26	c.3978T>G	p.Leu993Ter
NF-27	c.2953C>T	p.Gln985Ter
NF-28	c.1797G>A	p.Trp599Ter
NF-29	c.6792C>A	p.Tyr2264Ter
NF-30	c.3916C>T	p.Arg1306Ter
NF-31	c.3565C>T	p.Gln1189Ter
NF-32	c.1904del	p.Pro635Leufs*53
NF-33	c.2382T>A	p.Tyr794Ter
NF-34	c.7486C>T	p.Arg2496Ter

실시예 2. 정상대조군(Normal)과 신경섬유종증 1형 환자들의 Transcriptome 분석

2.1 Differential expressed gene (DEG) 분석

정상대조군(Normal)과 실시예1의 신경섬유종증 1형 환자들 중 NF-09, NF-11, NF-25, NF-31의 Transcriptome을 이용하여 Differential expressed gene (DEG) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 정상대조군과 NF1환자들의 섬유아세포 각각의 transcriptome를 얻어 StringTie 프로그램을 통해 transcript 어셈블리를 진행하였다. 각 샘플의 발현량을 FPKM(Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) 값으로 분석하였다. 샘플간 비교에 있어 relative log expression (RLE)으로 정규화 과정을 거친 후, DESeq2 R library를 이용하여 통계분석을 진행하였다.

상기 DEG 분석을 통해 정상대조군과 NF1환자 세포에서 유전자가 다른 발현 패턴을 보임을 확인하였다.

그 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1은 정상대조군과 NF1환자 세포에서의 유전자 발현 패턴을 분석한 결과이다: 도 1a는 Differential expressed gene (DEG) 분석을 통해 정상 대조군과 NF1 환자의 세포에서 유전자의 다른 발현 패턴을 나타낸 것이고, 도 1b는 정상 대조군과 NF1 환자의 세포에서 발현 증가 또는 발현 감소한 유전자를 나타낸 그래프이다.

도 1a에서 노란색에서 파란색까지의 색상 스케일은 $\log_2$ (배수 변화) 값이 큰 것에서 작은 것까지 나타낸다. 도 1b에서는 정상대조군과 비교하여 NF1 환자의 세포에서 발현 증가 또는 발현 감소한 유전자(Differentially Expressed Genes, DEGs)의 유의성을 y축에 대비 배수 변화를 x축에 나타내었다.

도1에 나타난 바와 같이, 정상대조군과 NF1 환자의 유전자 발현 패턴이 다를 확인하였고, 정상대조군과 대비하여 NF1 환자의 세포에서 530개의 유전자들은 발현 증가하였고, 243개의 유전자들은 발현이 감소하였음을 확인하였다.

2.2 Gene ontology (GO)분석 및 KEGG pathway 분석

정상대조군(Normal)과 실시예1의 신경섬유종증 1형 환자들 중 NF-09, NF-11, NF-25, NF-31의 Transcriptome을 이용하여 Gene ontology (GO)분석 및 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG) pathway 분석을 수행하였다. 구체적으로, 실시예2.1의 방법으로 정상대조군 샘플대비 각 NF1 환자의 섬유아세포인 NF-09, NF-11, NF-25, NF-31의 Log2 fold change 값을 비교하여, 통계적으로 유의한 유전자 리스트에 대해 g:Profiler tool (<http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>)를 기반으로 Gene ontology (GO) 분석을 진행하였다. 또한 그 유전자 리스트에 대해 DAVID데이터베이스를 통해 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>), KEGG pathway를 분석하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

도 2는 정상대조군과 신경섬유종증 1형 환자들의 유전자 또는 단백질의 기능 및 이들이 속하는 생물학적 경로를 분석한 결과이다: 도 2a는 Gene ontology (GO)분석 결과이고, 도 2b는 KEGG pathway 분석 결과이다. 통계적 유의성은 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 로 표시하였다.

도 2에 나타난 바와 같이, 상기 분석을 통해, 정상대조군 샘플(정상 섬유아세포)과 비교하여, NF1환자의 섬유아세포에서 Ras-MAPK 신호전달경로 뿐만 아니라 PI3K-AKT 신호전달, Wnt 신호경로에 관여하는 유전자들이 차별적으로 발현됨을 확인하였다.

[0132] 실시예 3. 신경섬유종증 1형 환자의 신경섬유종증 치료제반응성 측정

[0133] 3.1 신경섬유종증 치료제 반응성에 의한 구분

[0134] 실시예 1의 신경섬유종증 1형 환자의 피부섬유아세포 중, 조기 종결코돈을 readthrough하는 Ataluren 약물에 반응하여 NF1 단백질(Neurofibromin)의 full-length가 만들어지는 샘플과 그렇지 않은 샘플로 두 그룹으로 구분하였다.

[0135] 구체적으로, 정상대조군과 신경섬유종증 1형 환자의 피부섬유아세포에서 Ataluren 약물 처리 전과 후 샘플들을 RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하고, 이 단백질을 8% SDS-PAGE 겔에 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮긴 후, 5% BSA로 Blocking하였다. 이 membrane에 Neurofibromin의 C-terminus을 인지하는 일차항체로 반응시킨 후 세척하였고, Horseradish peroxidase가 달려있는 이차항체를 이용하여 반응시킨 후 세척하였다. ECL 시약을 이용하여 단백질양을 CHEMI-DOC 이미지 시스템을 이용하여 분석하였다.

[0136] 도 3은 Ataluren 약물에 반응하여 NF1 단백질의 full-length가 만들어지는 샘플과 그렇지 않은 샘플을 확인한 결과이다.

[0137] Ataluren 약물에 의해 NF1 단백질(Neurofibromin)이 Normal과 비슷한 수준으로 단백질이 만들어지는 샘플 (NF-09, NF-11)과 약물반응이 없는 샘플 (NF-25, NF-31)으로 구분하였다.

[0138] 3.2 회복된 Neurofibromin의 기능을 확인

[0139] Ataluren 약물에 반응있는 샘플 (NF-09, NF-11)과 반응없는 샘플 (NF-25, NF-31)에서의 ERK 활성을 측정함으로써 회복된 Neurofibromin의 기능을 확인하였다.

[0140] 구체적으로, 정상대조군과 신경섬유종증 1형 환자의 피부섬유아세포에서 Ataluren 약물 처리 전과 후 샘플들을 RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하고, 이 단백질을 10.5% SDS-PAGE 겔에 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮긴 후, 5% BSA로 Blocking하였다. 이 membrane에 phospho-ERK1/2(T202/Y204) 또는 ERK1/2을 인지하는 일차항체로 반응시킨 후 세척하였고, Horseradish peroxidase가 달려있는 이차항체를 이용하여 반응시킨 후 세척하였다. ECL 시약을 이용하여 단백질양을 CHEMI-DOC 이미지 시스템을 이용하여 분석하였다.

[0141] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0142] 도 4는 Ataluren 약물에 반응있는 샘플 (NF-09, NF-11)과 반응없는 샘플 (NF-25, NF-31)에서의 ERK 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0143] 도 4에 나타난 바와 같이, Ataluren 약물에 반응있는 샘플 (NF-09, NF-11)에서 회복된 Neurofibromin의 기능을 확인하였다.

[0145] 실시예 4. 신경섬유종증 치료제에 대한 감수성 예측 바이오마커 발굴4.1 신경섬유종증 치료제에 의해 발현양의 차이를 보이는 잠재적인 biomarker 후보군 선별

[0146] Ataluren 약물에 반응있는 그룹(NF-09, NF-11)과 반응없는 그룹(NF-25, NF-31)에서의 Transcriptome을 분석하기 위해 Heatmap을 작성하였다. 상기 Heatmap은 도 5에 나타내었다.

[0147] 도 5는 Ataluren 약물에 반응있는 그룹(NF-09, NF-11)과 반응없는 그룹(NF-25, NF-31)의 Transcriptome을 Heatmap으로 나타낸 것이다.

[0148] 도 5의 Heatmap 데이터를 분석하여 ataluren 약물에 반응있는 그룹(NF-09, NF-11)에서만 통계적으로 유의미하게 유전자 발현 패턴의 차이를 보이는 후보군들을 선별하였다.

[0149] NF1 환자 또는 정상대조군 fibroblast에서 ataluren 약물 처리 전과 후에서 상기 선별한 후보군들의 mRNA 발현을 Reverse transcription-quantitative PCR로 다시 한번 확인하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0150] 도 6에 나타난 바와 같이, ataluren 약물에 반응있는 그룹(NF-09, NF-11)에서만 통계적으로 유의미하게 유전자 발현 패턴의 차이를 보이는 후보군들 중에서 neurofibromin(NF1)과 기능적으로 연관되어 있고, 세포외기질로 secretion 됨에 따라, 환자의 혈액(혈장)이나 소변에서 검출될 수 있는 AMPD3와 TGFBR3를 잠재적인 신경섬유종

증 치료제에 대한 감수성 예측biomarker 후보로 선별하였다.

[0151] **4.2 선별된 NF1환자의 섬유아세포에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양 확인**

[0152] 정상인과 실시예 1에서 선별된 신경섬유종증 환자의 피부 섬유아세포에서 다음과 같은 방법으로 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 확인하였다.

[0153] 구체적으로, 정상대조군과 신경섬유종증 1형 환자의 피부섬유아세포에서 Ataluren 약물 처리 전과 후 샘플들을 RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 추출하고, 이 단백질을 10.5% SDS-PAGE 젤에 전기영동하였다. Nitrocellulose membrane으로 단백질을 옮긴 후, 5% BSA로 Blocking하였다. 이 membrane에 특정 단백질(AMPD3 또는 TGFBR3)을 인지하는 일차항체로 반응시킨 후 세척하였고, Horseradish peroxidase가 달려있는 이차항체를 이용하여 반응시킨 후 세척하였다. ECL 시약을 이용하여 단백질량을 CHEMI-DOC 이미지 시스템을 이용하여 분석하였다.

[0154] 도 7은 NF1환자 fibroblast에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양을 western blot으로 확인한 결과이다.

[0155] 도 7에 나타난 바와 같이, 약물처리 전(control), 정상대조군에 비해 NF1환자의 fibroblast (NF-09, NF-11, NF-25, NF-31)에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현이 증가되어 있음을 확인하였다.

[0156] 또한, 약물(Ataluren)처리 후, 약물에 반응있는 그룹 (NF-09, NF-11)과 반응없는 그룹 (NF-25, NF-31)을 비교해보면, 반응있는 그룹에서만 AMPD3와 TGFBR3 발현양이 감소하는 것을 확인하였다. 즉, NF1이 회복됨에 따라 AMPD3 및 TGFBR3 발현감소를 확인하였다.

[0157] 이는 환자샘플에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현 수준으로 NF1 치료모니터링이 가능함을 의미한다.

[0159] **실시예 5. 신경섬유종증(NF1)의 새로운 치료 표적 발굴**

[0160] **5.1 선별된 NF1환자의 혈액 plasma샘플에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양 확인**

[0161] 정상인과 신경섬유종증 1형 환자의 혈액 plasma 샘플에서 실시예 4.2의 방법으로 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양을 웨스턴 블랏(Western blot)으로 확인하였다.

[0162] 도 8은 정상대조군 및 NF1 환자들의 혈액 plasma 샘플에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 발현양을 western blot으로 확인한 결과이다.

[0163] 도8에 나타난 바와 같이, 정상대조군에 비해 NF1 환자샘플에서 AMPD3와 TGFBR3 단백질 수준이 높게 나타남을 확인하였다.

[0164] 이는 환자 특이적으로 NF1 치료모니터링에 활용가능성이 높음을 의미한다.

[0165] **5.2 정상 세포주 및 3종의 신경섬유종 세포주에서 AMPD3 단백질 발현양 확인**

[0166] 4종의 인간 Schwann 세포주(정상 세포주 및 신경섬유종 세포주)에서 AMPD3의 발현을 확인하였다. 구체적으로, 정상 세포주, 종상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성 말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3 단백질 발현양을 비교하였다. 정상 세포주는 ipn02.3(*NF1*^{+/+})를, 종상 신경섬유종(PN) 세포주는 ipNF95.6(*NF1*^{-/-})를, 말초신경초종(MPNST) 세포주는 sNF02.2(*NF1*^{+/-}) 및 sNF96.2(*NF1*^{-/-})를 사용하였다. 말초신경초종 세포주 중에 sNF96.2(*NF1*^{-/-})가 sNF02.2(*NF1*^{+/-})가 악성화가 심화된 것이다. 상기 세포주에서 AMPD3 단백질 발현양을 확인한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0167] 도 9는 정상 세포주 및 종상 신경섬유종(PN) 세포주, 악성 말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3 단백질 발현양을 측정된 결과를 나타난 사진이다.

[0168] 도 9에 나타난 바와 같이, AMPD3의 단백질 수준은 정상 세포주에서 보다 NF1 관련 신경섬유종 세포주에서 현저히 높음을 확인하였다. 특히, NF1 관련 악성화가 심화됨에 따라 AMPD3 발현이 증가하고, ERK 활성이 증가함을 확인하였다.

[0169] 이는 AMPD3의 발현량이 정상 세포주에서 보다 신경섬유종(PN) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 유의미하게 증가한 것으로, AMPD3가 NF1 관련 신경섬유종의 새로운 치료 표적으로서의 가능성이 있음을 의미한다.

[0171] 실시예 6. 신경섬유종증(NF1)의 새로운 치료 표적 확인

[0172] 6.1 siRNA를 이용한 표적 유전자의 녹다운(knockdown)

[0173] AMPD3의 항암 효과를 평가하기 위해, AMPD3 특이적인 siRNA 및 NF1 특이적인 siRNA를 디자인하여 녹다운(knockdown) 실험을 진행하였다.

[0174] 구체적으로, 실시예 4의 정상 Schwann 세포주, 종상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성 말초신경초종(MPNST) 세포주를 6웰 플레이트(SPL)에 시딩하고 Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, USA)을 이용하여, 50nM의 합성 siRNA duplex (siAMPD3, siNF1) 또는 siRNA control duplex (Bioneer, Republic of Korea)로 형질감염시켰다. 상기 합성 siRNA duplex의 서열은 표 2에 나타내었다.

표 2

[0175]	AMPD3 siRNAs	Sense strand	5' -GUUCAGCCUUAUGAGAUUUAA-3'	서열번호 1
		Anti-sense strand	5' -AACAUUCUAGAAGGCUGAAAU-3'	서열번호 2
	NF1 siRNAs	Sense strand	5' -GAAGGUUGCGCAGUUAGCAGUUA-3'	서열번호 3
		Anti-sense strand	5' -ACUGCUAACUGCGCAACCUUAU-3'	서열번호 4

[0176] 6.2 siRNA로 형질감염된 세포에서 표적 유전자의 mRNA 발현량 감소 확인

[0177] 표적 유전자의 발현이 성공적으로 녹다운되었는지 확인하기 위해, 상기 표 2에 나타낸 siRNA 로 형질감염된 Schwann 세포주에서 정량적 PCR을 이용하여 AMPD3, NF1의 상대적인 mRNA 발현량을 측정하였다.

[0178] 구체적으로, 상기 siRNA로 형질감염된 세포들을 수집하여 TRIzol 시약을 이용하여 RNA를 추출한 후, oligo dT(12-18) 프라이머(Invitrogen), random hexamer (Invitrogen) 및 SuperScript III 역전사 효소(Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA에 SYBR green 시약을 이용하여 Quantitative PCR 시스템으로 특정 유전자를 증폭하여 분석하였다. 표적 유전자의 상대적 mRNA 발현은 GAPDH의 발현으로 정규화하였다.

[0179] 도 10은 AMPD3 특이적인 siRNA 및 NF1 특이적인 siRNA를 처리한 Schwann 세포주에서 AMPD3 및 NF1의 mRNA 발현량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0180] 도 10에 나타낸 바와 같이, siRNA를 처리하지 않은 control군에 비하여 AMPD3 및 NF1유전자의 siRNA를 처리한 군에서 AMPD3 및 NF1의 mRNA 발현량이 감소한 것을 확인하였다. 이는 표 2나타낸 siRNA가 AMPD3 및 NF1유전자의 발현을 효과적으로 저해하는 것을 의미한다.

[0182] 실시예 7. siRNA로 형질감염된 세포에서 AMPD3의 발현감소에 따른 항암효과 확인

[0183] 7.1 종상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3단백질 및 phospho-ERK(p-ERK) 단백질 수준 확인.

[0184] 실시예 6.1의 방법으로 siRNA를 이용하여 형질감염시킨 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3 단백질 수준 및 phospho-ERK(p-ERK) 단백질수준을 웨스턴 블롯팅으로 확인하였다. phospho-ERK(p-ERK) 단백질수준의 측정을 통하여 MEK-ERK 신호전달경로의 활성을 확인할 수 있다.

[0185] 도 11은 표 2의 siRNA를 이용하여 형질감염시킨 정상 Schwann 세포주, 종상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 AMPD3 단백질 수준 및 phospho-ERK(p-ERK) 단백질수준을 웨스턴 블롯팅으로 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

[0186] 도 11에 나타난 바와 같이, AMPD3 단백질 발현양이 감소하면 ERK 활성이 감소함을 확인하였다. 또한, 정상 세포주에 NF1 siRNA를 처리하였을 때가 대조군(siControl을 처리한 경우)에 비해, AMPD3 단백질 발현양이 증가하고, p-ERK 단백질 수준도 증가함을 확인하였다.

[0187] 이는 AMPD3의 siRNA를 처리하여 AMPD3 단백질 발현양이 감소하면 ERK 활성이 감소하여 신경섬유종의 항암효과가 나타남을 의미하고, NF1과 AMPD3는 음의 상관관계 (anti-correlation)를 가지는 것을 의미한다.

[0188] 7.2 세포생존율 감소 확인

[0189] 실시예 6.1의 방법으로 정상 Schwann 세포주(ipn02.3), 종상 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경

초종(MPNST) 세포주(NF02.2, 및 sNF96.2)에 AMPD3에 대한 siRNA를 처리하고 72시간 후, 세포 생존을 측정할 수 있는 CCK-8 assay를 수행하였다.

[0190] 구체적으로, 상기 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주를 96-well plate에 심고, 각각 AMPD3 siRNA를 처리하여 72시간 후, CCK-8 assay 시약(Dojindo Molecular Technology, Japan) 10 μ L를 각 well에 넣고 3시간 동안 37°C 인큐베이터 안에서 반응시킨 후, microplate reader로 450 nm 흡광도를 측정하였다. 측정된 값으로 계산하여 세포 생존율을 분석하였다.

[0191] 도 12는 AMPD3 유전자의 siRNA를 처리한 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존율을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

[0192] 도 12에 나타낸 바와 같이, AMPD3 유전자에 대한 siRNA를 처리한 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존율이 AMPD3 siRNA를 처리하지 않은 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주의 세포 생존율에 비하여 감소한 것을 확인하였다.

[0193] 구체적으로, 정상 세포주에서는 AMPD3 siRNA 처리 유무에 따른 세포 생존율에 변함이 없었으나, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서는 AMPD3 siRNA 처리한 경우 최대 50% 세포수가 감소한 것을 확인하였다.

[0194] 또한, AMPD3 유전자에 대한 siRNA를 처리한 경우, 악성말초신경초종(MPNST) 세포주 중 그 악성의 정도가 더 심한 sNF96.2의 세포 생존율이 더욱 감소함을 확인하였다.

[0195] 이는 AMPD3가 siRNA처리로 그 발현량이 저해되는 경우, 총상 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(NF02.2 및 sNF96.2)에서 통계적으로 유의미하게 항암효과가 나타남을 의미한다.

[0196] 7.3 apoptosis 활성 증가 확인

[0197] 정상 Schwann 세포주(ipn02.3), 세포주 총상 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(NF02.2 및 sNF96.2)에 실시예 6.1의 방법으로 AMPD3 유전자에 대한 siRNA를 처리하고 72시간 후, apoptosis의 활성을 확인할 수 있는 caspase 3/7 assay를 수행하였다.

[0198] 구체적으로, 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종 세포주 및 MPNST세포주를 불투명하고 하얀 96-well plate에 심고, 각각의 siRNA를 처리하여 72시간 후, Promega사의 caspase 3/7-glo 시약 50 μ L를 각 well에 넣고 30분 동안 반응시켰다. 이러한 형광물질을 탐지할 수 있는 luminometer를 이용하여 caspase 3/7의 수준을 측정하였다. 측정된 값으로 계산하여 apoptosis의 활성을 평가하였다.

[0199] 도 13은 AMPD3의 siRNA를 처리한 정상 Schwann 세포주, 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에서 apoptosis의 활성을 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.

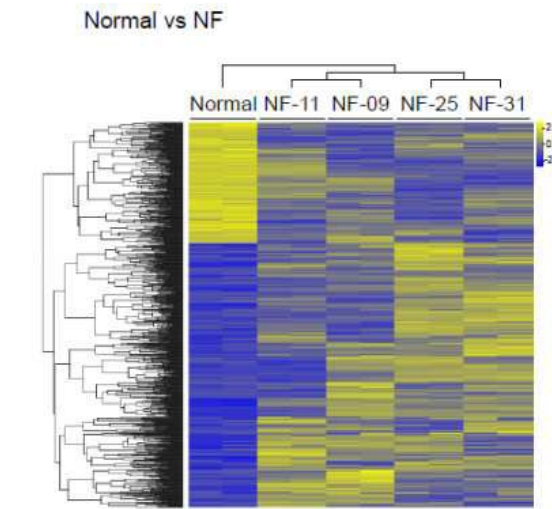
[0200] 도 13에 나타낸 바와 같이, 정상 세포주에서는 AMPD3 siRNA 처리 유무에 따른 apoptosis 활성에 변함이 없었으나, AMPD3에 대한 siRNA를 처리한 총상 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)의 apoptosis의 활성이 siRNA를 처리하지 않은 총상 신경섬유종(PN) 세포주 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(control)의 apoptosis의 활성에 비하여 증가함을 확인하였다.

[0201] 또한, 상기 악성말초신경초종(MPNST) 세포주에 AMPD3 유전자에 대한 siRNA를 처리한 경우, 악성말초신경초종(MPNST) 세포주 중 그 악성의 정도가 더 심한 sNF96.2 세포주에서 apoptosis의 활성이 더욱 증가함을 확인하였다.

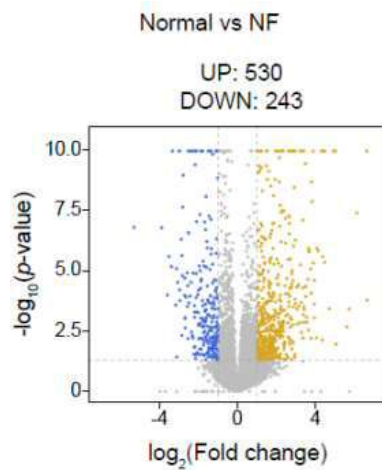
[0202] 이는 AMPD3유전자가 siRNA처리로 그 발현량이 저해되는 경우, 총상 신경섬유종(PN) 세포주(ipNF95.6) 및 악성말초신경초종(MPNST) 세포주(sNF02.2, sNF96.2)에서 통계적으로 유의미하게 항암효과가 나타남을 의미한다. 특히 악성말초신경초종(MPNST) 세포주 중에서는 악성도가 더 심화된 sNF96.2 세포주에서 더욱 효과적인 항암 효과가 나타남을 의미한다.

도면

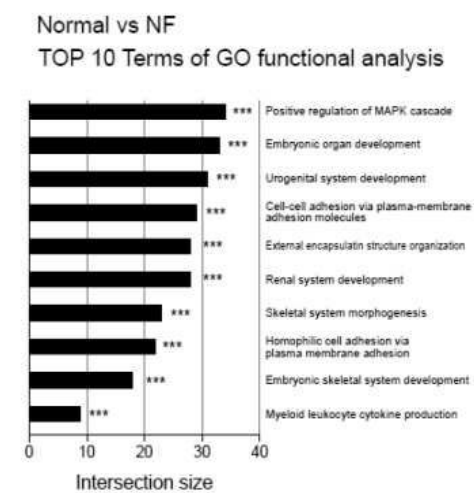
도면1a



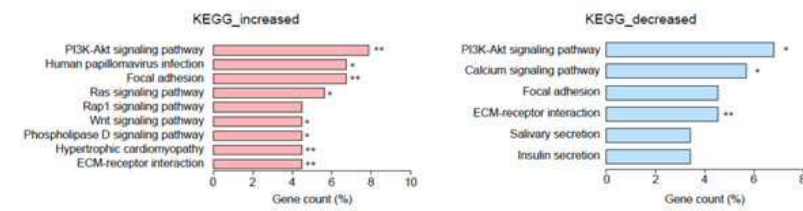
도면1b



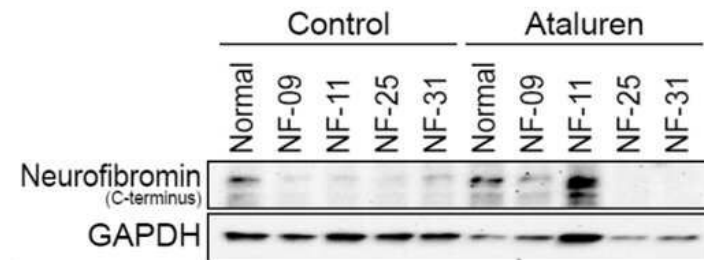
도면2a



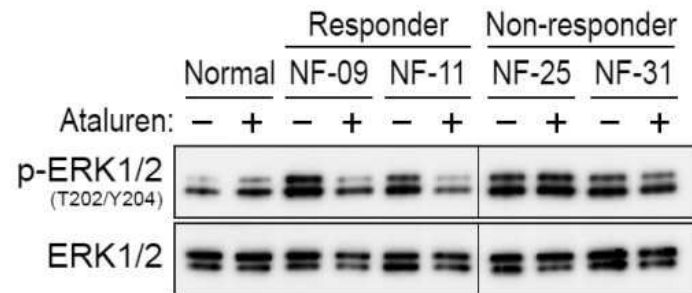
도면2b



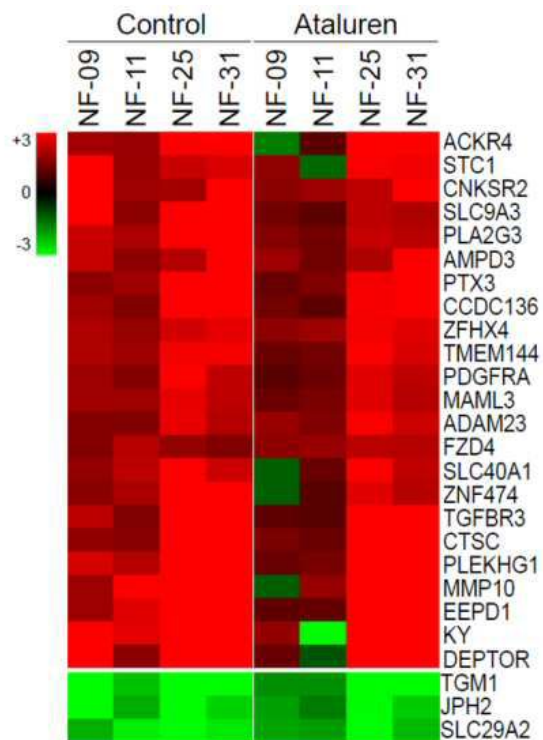
도면3



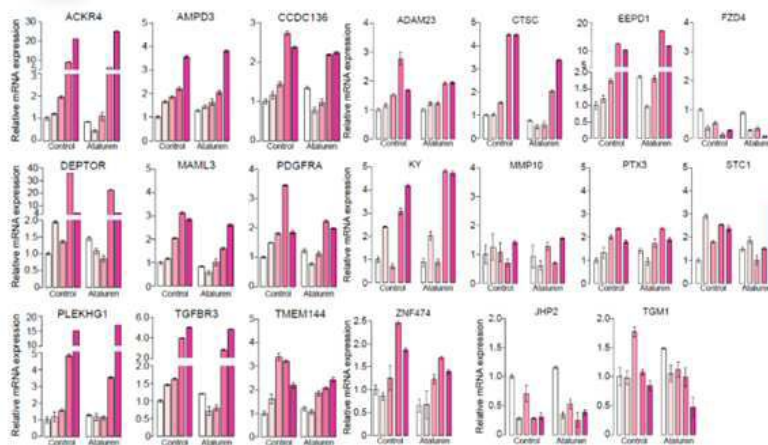
도면4



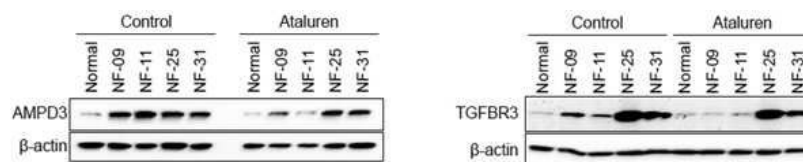
도면5



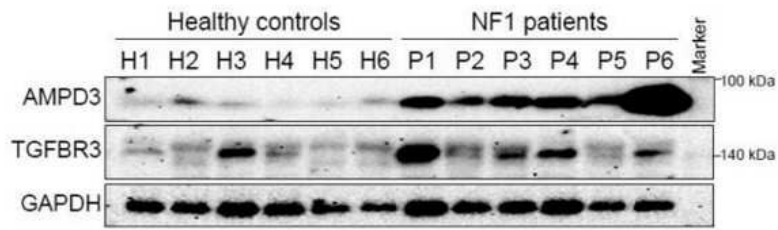
도면6



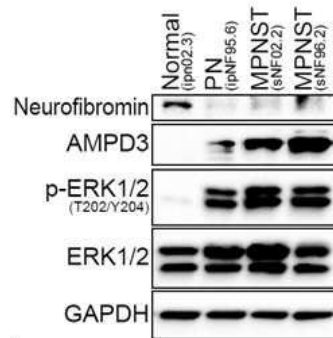
도면7



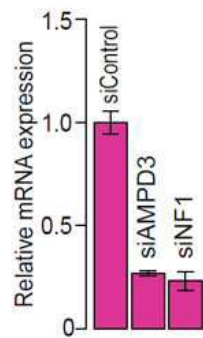
도면8



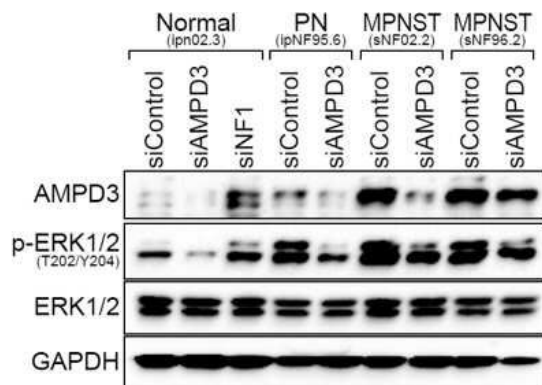
도면9



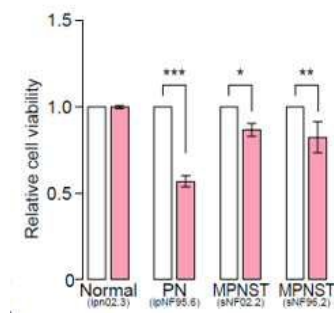
도면10



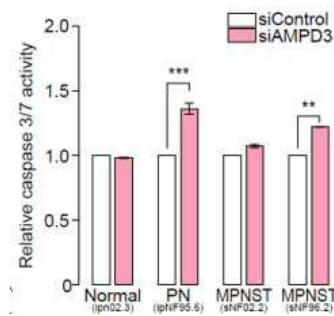
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.