(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0105468
(43) 공개일자 2024년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2022.01)
C12Q 2561/101 (2019.08)
(21) 출원번호 10-2024-7020263
(22) 출원일자(국제) 2022년11월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년06월18일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/082762
(87) 국제공개번호 WO 2023/094365
국제공개일자 2023년06월01일
(30) 우선권주장
102021000029558 2021년11월23일 이탈리아(IT)

(71) 출원인
이탈파마코 에스.피.에이.
이탈리아 밀라노 20126 비알레 풀비오 테스티 330
(72) 발명자
포사티 지안루카
이탈리아 아이-20146 밀라노 (엠아이) 22 비아 코스탄자
리파몬티 키아라
이탈리아 아이-20900 몬자 (엠비) 35 비아 게라치
스테인퀼러 크리스티앙
이탈리아 아이-00128 로마 (알엠) 11 비아 이. 바시레
(74) 대리인
김태헌

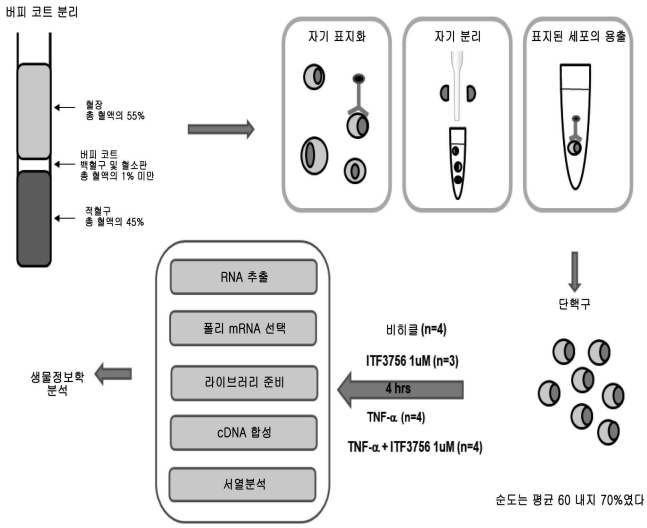
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **RNA 바이오마커 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 암에 걸린 환자의 임상 치료 동안 화합물 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드와 같은 히스톤 데아세틸라제 6(HDAC6)의 억제제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 정의하는 데 사용될 수 있는 mRNA 바이오마커에 기초한 방법에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 화합물 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1 H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드와 같은 HDAC6 저해제의 임상 효능을 평가하기 위한 방법에서 "유전자 발현 시그니처"로서 인간 단핵구에서 특정 바이오마커의 유전자 발현의 변이를 분석하는 것을 지칭한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가하기 위한 방법:

a) 환자의 생물학적 샘플에서 HDAC6 저해제에 의해 조절되고 CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD206/MRC1, MMP9, NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SLC27a1, ADA, CD276, CD40 또는 IRF6 유전자로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA 바이오마커의 발현 수준을 결정하는 단계;

b) 상기 발현 수준을 참조 샘플의 발현 수준과 비교하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성이 암에 걸린 환자의 치료 동안 또는 치료 후에 평가되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자를 치료학적 치료에 반응성 또는 무반응성으로 분류하는 단계 c)를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 환자를 치료학적 치료에 반응성 또는 무반응성으로 분류하는 단계가 적어도 하나의 RNA 바이오마커의 발현 값이 역치 발현 값보다 높은지 또는 낮은지 여부에 기반하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내 또는 생체외 방법인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, RNA 바이오마커 NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SCL27a1, CD40 또는 IRF6의 발현 수준이 HDAC6 저해제에 의해 상향조절되고, RNA 바이오마커 CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD206/MRC1, ADA, CD276 또는 MMP9의 발현 수준이 HDAC6 저해제에 의해 하향조절되는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 RNA 바이오마커 STAB1, CD84, CD206/MRC1, MMP9, CD163, CD40 및 IRF6의 발현 수준이 평가되고, 바람직하게는 적어도 RNA 바이오마커 MMP9, CD40 및 IRF6의 발현 수준이 평가되는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, HDAC6 저해제가 투바신, 투바스타틴, 넥스트라스타트, ACY-1215, ACY-738, ACY-1083, KA2507, T518, SW100 또는 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1 H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드(ITF3756)로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 HDAC6 저해제가 화합물 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1 H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 조직 샘플 또는 체액이고, 바람직하게는 상기 조직 샘플이 종양 생검 또는 혈액 세포이고; 바람직하게는 상기 체액이 혈액, 혈청 또는 혈장인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 적어도 하나의 RNA 바이오마커의 발현 수준이 RNA 서열분석, 정량적 RT-PCR, 디지털 PCR, Affymetrix 마이크로어레이, 맞춤형 마이크로어레이 또는 나노스트링 기술에 의해 검출되는, 방법.

청구항 11

제3항에 있어서, 상기 암이 부신피질 암종, 항문암, 성상세포종, 피부기저세포 암종, 방광암, 뇌종양, 유방암, 원인불명의 원발성 암종, 심장종양, 자궁경부암, 담관암종, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 안구내 흑색종, 나팔관암, 담낭암, 위암, 위장관 유암종(Gastrointestinal Carcinoid Tumor), 위장관 기질 종양(Gastrointestinal Stromal Tumors: GIST), 생식세포종양, 고환암, 두경부암, 간세포 암종, 섬세포종양, 췌장 신경내분비종양, 랑게르한스세포 조직구증(Langerhans Cell Histiocytosis), 백혈병, 폐암(비소세포, 소세포, 흉막폐모세포종, 및 기관지 종양), 흑색종, 메르켈세포 암종(Merkel Cell Carcinoma), 중피종, NUT 유전자 변화를 동반한 정중선 암종(Midline Tract Carcinoma With NUT Gene Changes), 다발성 내분비 종양 증후군(Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome), 다발성 골수종/형질세포종양, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 신경모세포종, 난소암, 췌장암, 부신경절종(Paraganglioma), 부갑상선암, 음경암, 갈색세포종(Pheochromocytoma), 뇌하수체종양, 원발성 복막암, 전립선암, 신세포암, 망막모세포종, 육종, 피부의 편평세포 암종, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신우(Renal Pelvis) 및 요관의 이행 세포암, 자궁암, 질암, 혈관종양, 외음부암 또는 윌름스 종양(Wilms Tumor)으로부터 선택되고; 바람직하게는, 상기 암이 흑색종, 신세포암, 비소세포폐암 또는 대장암으로부터 선택되는, 방법.

청구항 12

HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가하는 데 사용하기 위한 키트로서, 다중 웰 플레이트 및 제1항에 따른 RNA 바이오마커 중 적어도 하나의 발현 수준을 결정하기 위한 적합한 프라이머 및/또는 프로브를 포함하는, 키트.

발명의 설명

배 경 기 술

[0001] 진핵 세포의 유전 물질은 DNA와 단백질로 이루어진 염색질로 불리는 복잡하고 역동적인 구조로 구성되어 있다. 염색질의 주요 단백질 구성요소는 핵 내 염색체 압축의 첫 번째 수준인 염색질의 구조 단위인 뉴클레오솜을 형성하는 DNA와 상호작용하는 기본 단백질인 히스톤이다. 기본 히스톤 잔기와 DNA의 산성 인산염 골격 사이의 상호작용은 뉴클레오솜 압축과 복제 및 전사를 조절하는 분자 복합체의 접근성을 결정하는 데 중요하다. 이러한 상호작용은 주로 메틸화, 인산화, 유비퀴틴화 및 아세틸화와 같은 핵심 히스톤의 N-말단 서열의 여러 번역 후 변형에 의해 영향을 받는다. 히스톤 N-말단 라이신 잔기의 탈아세틸화는 양전하를 운반함으로써 DNA에 함유된 음전하와 상호작용하는 아민 기의 양성자화를 가능하게 한다. 이러한 상호작용으로 염색질이 보다 조밀한 상태가 되어 유전자 발현이 침묵하게 된다.

[0002] 반대로, 동일한 잔기의 아세틸화는 이온 결합 형성을 방지하여 덜 조밀한 형태의 염색질을 초래하여 DNA 노출을 늘리고 유전자 전사를 활성화하는 거대분자 복합체와의 상호작용을 허용한다.

[0003] 이러한 물리화학적 결과 외에도, 번역 후 변형된 잔기는 또한 메틸화 또는 아세틸화 마크를 인식하고 억제 또는 활성화된 염색질 상태의 안정화에 관여하는 "리더" 단백질을 함유하는 브로모도메인 또는 염색체도메인에 의해 특이적으로 인식된다.

[0004] 히스톤 아세틸화의 정도는 히스톤 아세틸 트랜스퍼라제(HAT) 및 히스톤 데아세틸라제(HDAC)의 두 부류의 효소의 활성 균형에 의해 조절된다. 이러한 섬세한 균형의 변화는 암, 신경 장애, 염증, 및 자가면역 질환을 포함한 다양한 인간 질환에서 흔히 발견되는 세포 항상성의 손실을 초래할 수 있다.

[0005] 히스톤 데아세틸라제는 히스톤 N-말단 라이신 잔기의 아민 기의 탈아세틸화를 촉매하기 때문에 그렇게 분류되었다. 라이신 히스톤 꼬리에 대한 이러한 효소 활성은 "라이터(*writer*)"로 불리는 HAT 효소와 달리 "이레이저(*eraser*)"로 더 분류된다. 그 후, 이들 효소의 활성이 N-아세틸-라이신을 함유하는 HAT 효소의 비히스톤 단백질 기질에도 발휘되기 때문에 이들 효소의 기질이 다수 존재한다는 것이 밝혀졌다. 이들 기질은 전사 인자, DNA 복

구 효소 및 기타 많은 핵 및 세포질 단백질을 포함한다.

[0006] 인간 HDAC 계열은 18개의 효소로 이루어져 있으며, 아연-의존성 HDAC와 시르투인(부류 III)으로도 알려진 NAD-의존성 HDAC의 두 군으로 나뉜다. 아연-의존성 HDAC는 4가지 부류로 더 분류된다: 1) 주로 핵에 위치한 유비쿼터스 동종효소인 HDAC1, 2, 3 및 8을 포함한 부류 I; 2) 핵과 세포질 모두에 위치한 동종효소인 HDAC4, 5, 7 및 9를 포함한 부류 IIa; 3) 주로 세포질에 위치한 HDAC6 및 HDAC10을 포함한 부류 IIb 및 4) HDAC11만 포함한 부류 IV. 부류 I HDAC와 달리, 부류 IIa와 어느 정도 IIb는 조직 특이적 발현을 가지고 있다.

[0007] 유전자 발현을 조절하고 히스톤과 전사 인자에 작용함으로써 이들 효소는 수많은 세포 기능에 관여한다는 것이 분명하다. 또한, 이들 효소는 수많은 단백질 기질에 작용하여 신호 전달 및 세포골격 재배열과 같은 다른 많은 과정에 관여한다.

[0008] 지난 20년 동안 여러 HDAC 억제제가 개발되었으며 5개의 분자(보리노스타트(Vorinostat), 로미뎁신(Romidepsin), 벨리노스타트(Belinostat), 파노비노스타트(Panobinostat) 및 치다마이드(Chidamide))가 인간의 암 치료용으로 승인되었다. 이들 모든 분자는 정상 조직에서도 역할을 하는 여러 HDAC 하위유형을 억제한다. 따라서, 치료 잠재력은 혈소판 감소증, 위장관 독성 또는 피로와 같은 독성에 의해 제한된다.

[0009] 따라서, 과학계의 관심은 더 나은 약리학적 능력을 가진 분자를 개발하는 것을 목표로 개별 HDAC 이소형에 대한 선택적 억제제의 합성 및 연구에 집중되었다.

[0010] 특정 HDAC 이소형, 특히 HDAC6에 대한 선택적 저해제는 증식성 장애 및 단백질 축적, 면역체계 장애, 호흡기, 신경학적 및 신경퇴행성 질환, 예컨대 뇌졸중, 헌팅턴병, ALS 및 알츠하이머병과 관련된 병리를 치료하는 데 특히 유용할 수 있다. HDAC6은 상이한 촉매 활성 및 아마도 상이한 생물학적 역할을 갖는 2개의 활성 부위의 존재와 같은 몇 가지 독특하고 구별되는 특징을 가진 Zn-의존성 히스톤 데아세틸라제 계열의 구성원이다. HDAC6 기질에는 α-튜불린, Hsp90(열 충격 단백질 90), 코르탁틴, β-카테닌이 포함된다.

[0011] HDAC6에 의한 이들 단백질의 아세틸화 상태의 조정은 면역 반응(Wang et al., Nat. Rev. Drug Disc. (2009), 8(12), 969-981; Kalin JH et al. J. Med. Chem. (2012), 55, 639-651; de Zoeten EF et al. Mol. Cell. Biol. (2011), 31(10), 2066-2078), 세포 이동 및 세포-세포 상호작용을 포함한 미세소관 역학의 조절(Aldana-Masangkay et al., J Biomed. Biotechnol. (2011), ID 875824), 및 미스폴딩 단백질의 분해와 같은 몇 가지 중요한 과정과 연관되어 있다. HDAC6은 대부분의 신체 조직에서 구성적으로 발현되며 핵 구획에서도 활성을 발휘하지만 세포질 국소화가 널리 퍼져 있다. HDAC6 활성은 암, 신경병증, 호흡기 질환 및 자가면역 병리와 같은 병리에서 변경된다(Li, T., Zhang, C., Hassan, S., Liu, X., Song, F., Chen, K., Zhang, W., and Yang, J. (2018). Histone deacetylase 6 in cancer. Journal of Hematology & Oncology 11, 111); Prior, R., Van Helleputte, L., Klingl, Y.E., and Van Den Bosch, L. (2018). HDAC6 as a potential therapeutic target for peripheral nerve disorders. Expert Opinion on Therapeutic Targets 22, 993-1007).

[0012] 암과 관련하여, HDAC6은 면역 세포와 종양 세포에서 PD-L1의 발현을 조절함으로써 항종양 면역 반응을 조절하는 종양 미세환경 기능의 핵심 조절자로 인식되어 왔다. HDAC6은 또한 특히 다양한 유형의 백혈병(Fiskus et al., Blood (2008), 112(7), 2896-2905; Rodriguez-Gonzales, Blood (2008), 112(11), abstract 1923) 및 다발성 골수종(Hideshima et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2005), 102(24), 8567-8572)과 같은 혈액학적 종양에서 종양단백질의 발현을 조절하는 데 관여한다. HDAC6에 의한 α-튜불린 아세틸화의 조절은 세포 운동성이 중요한 역할을 하는 전이 개사와 관련이 있을 수 있다(Sakamoto et al., J. Biomed. Biotechnol. (2011), 875824).

[0013] 또한, 용량-제한 독성을 겪는 비선택적 HDAC 저해제를 사용한 전임상 및 임상 관찰과 완전히 대조적으로, HDAC6 저해제는 어떠한 명백한 독성 징후도 보이지 않는다. 또한, HDAC6 녹아웃 마우스는 생존 가능하고 정상적으로 발달하며 병리학적 변화의 명백한 징후가 없다. 이는 다른 HDAC 하위 유형의 발현을 제거할 때 관찰되는 것과는 대조적이다.

[0014] 결론적으로, HDAC6의 선택적 저해제는 내약성이 매우 우수하면서도 상당한 치료 잠재력을 가질 가능성이 있다.

[0015] WO2018/189340에는 특히 효과적인 HDAC6 저해제인 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드가 개시되어 있는데, 이는 항종양 면역 반응을 조정하는 데 현저하게 활성이 있는 것으로 밝혀졌다. HDAC6 저해제의 알려진 탁월한 내약성을 유지하면서, 이러한 분자는 래트, 마우스 및 개(1000 mg/kg)에서 내약성이 우수했으며, 이는 인간에서도 내약성이 우수한 것임을 시사한다.

[0016] 이러한 가설은 HDAC6 저해제인 Ricolinostat 및 KA2507을 사용하여 얻은 임상 데이터에 의해 환자에서 내약성이

매우 우수한 것으로 나타나 더욱 뒷받침되고 있다(Amengual JE et al. Oncologist (2021) 3:184-e366; Tsimberidou AM et al. Clin Cancer Res (2021) 27:3584-3594).

[0017] 약물로는 매우 바람직하지만, 독성 부작용이 없다는 점은 임상 개발에 어려움을 준다.

[0018] 일반적으로 종양학 1상 임상 프로토콜은 최대 허용 용량에 도달할 때까지 용량 증량을 계획한다. 코호트는 일반적으로 이러한 용량 수준에서 확장되며 권장되는 2상 용량은 내약성, PK 및 효능의 초기 징후에 대한 정보로부터 파생된다. 어떠한 독성 부작용도 없는 경우, 용량 정의하기 위해 다른 매개변수를 사용해야 한다.

[0019] 바이오마커는 생물학적 유효 용량을 정의하는 데 매우 도움이 될 수 있다.

[0020] US2015/176076에는 miRNA(서열번호 1-23), mRNA(서열번호 24-25) 및 소형 비코딩 RNA(서열번호 26-27)로부터 선택되는 HDAC6 바이오마커 RNA에 특이적으로 결합하는 검출제를 포함하는, 다발성 골수종을 앓고 있는 대상체에서 히스톤 데아세틸라제 6 저해제(HDAC6)의 치료 효능을 결정하기 위한 키트가 개시되어 있다. 단백질을 암호화하는 유일한 mRNA 서열은 호모 사피엔스 저산소증 유도 인자 1 서브유닛 알파(*HIF1A*), 전사체 변이체 2 mRNA에 해당하는 서열번호 24 및 호모 사피엔스 단백질 티로신 포스파타제 수용체 유형 U(protein tyrosine phosphatase receptor type U: *PTPRU*), 전사체 변이체 2 mRNA에 해당하는 서열번호 25이다.

[0021] HDAC6 저해제의 경우, 튜불린 아세틸화 수준의 증가를 판독값으로 사용할 수 있다. 예를 들어, HDAC6 저해제를 투여받은 환자는 약물 투여 후 다양한 시점에서 채혈을 받게 될 것이며 아세틸 튜불린은 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 PBMC에서 결정될 수 있다. 비교적 간단하지만 이러한 방법은 정성적 또는 반정량적이며 항종양 활성과 직접적인 관계가 없는 약동학 마커를 측정한다.

발명의 내용

[0022] 따라서, HDAC6 저해제, 보다 특히 화합물 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1 H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드의 약리학적 활성 용량을 평가하는 데 사용할 수 있는 환자 샘플에서 평가 가능한 생물학적 마커를 기반으로 하는 정량적 방법이 필요하다.

[0023] 정의

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 기타 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 해당 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖도록 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에 정의되어 있으며; 따라서, 본원에 그러한 정의를 포함시키는 것은 해당 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0025] "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)" 및 "함유하는(containing)"이라는 용어는 개방형 용어("포함하지만 이에 제한되지 않음"을 의미)로 이해되어야 하며, "로 본질적으로 이루어진다", "로 본질적으로 이루어진", "로 이루어진다" 또는 "로 이루어진"과 같은 용어를 뒷받침하는 것으로도 간주되어야 한다.

[0026] "로 본질적으로 이루어진다", "로 본질적으로 이루어진"이라는 용어는 반폐쇄형 용어로 이해되어야 하며, 이는 본 발명의 신규한 특성에 영향을 미치는 다른 성분이 포함되지 않음을 의미한다(따라서, 선택적인 부형제가 포함될 수 있음).

[0027] "로 이루어진다", "로 이루어진"이라는 용어는 폐쇄형 용어로 이해되어야 한다.

[0028] 본원에서 "유전자 발현 시그니처"라는 용어는 바이오마커로서 사용되는 여러 mRNA 또는 RNA(즉, 전사체)의 조합으로부터 유래된 발현 패턴을 지칭한다.

[0029] 본 발명에 따르면, "RNA 바이오마커의 발현 수준"이라는 용어는 특정 유전자(바이오마커)의 RNA 또는 mRNA를 검출 및/또는 정량화하는 것, 예컨대 대조군과 비교하여 RNA 또는 mRNA의 과발현 또는 과소발현을 결정 및/또는 정량하는 것; 샘플에서 RNA 또는 mRNA의 존재 또는 부재를 결정하는 것; RNA의 서열을 결정하는 것; RNA의 임의의 변형을 결정하거나 RNA의 임의의 돌연변이 또는 변이를 검출하는 것을 지칭한다. RNA 수준은 존재 또는 부재, 대조군보다 크거나 작은 것으로 결정될 수 있거나, 마이크로리터당 RNA 카피와 같이 RNA 양에 대한 수치가 주어질 수 있다. RNA의 발현 수준은 절대적 정량화 또는 상대적 정량화에 의해 정량화될 수 있다. 절대적 정량화는 하나 이상의 표적 핵산의 알려진 농도(들)를 포함시키고 (예를 들어, 표준 곡선의 생성을 통해) 알려진 표적 핵산과 미지의 혼성화 강도를 참조함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 상대적 정량화는 2개 이상의 유

전자 간 또는 처리/미처리 간의 혼성화 신호를 비교하여 혼성화 강도와 암시적으로 전사 수준의 변화를 정량화할 수 있다.

[0030] 본원에서 용어 "*바이오마커*"(생물학적 마커의 약어)는 생물학적 지표(예를 들어, 전사체, 즉 mRNA) 및/또는 일부 생물학적 상태(state) 또는 상태(condition)의 측정치를 지칭한다.

[0031] 본 발명에 따르면, 암에 걸린 환자는 치료제와 접촉하지 않았을 때의 성장과 비교하여, 치료제와의 접촉의 결과로 종양 크기 또는 암의 성장 속도가 억제되는 경우, 치료제에 "반응"하는 것이다. 암의 성장은 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 종양의 크기 또는 해당 종양 유형에 적합한 종양 마커의 발현을 측정한다.

[0032] 암에 걸린 환자는 치료제와의 접촉이 없을 때의 성장과 비교할 때 치료제와의 접촉의 결과로 종양 크기 또는 암의 성장 속도가 억제되지 않거나 매우 낮은 정도로 억제되는 경우 치료제에 "*무반응*"한다. 상기 언급한 바와 같이, 암의 성장은 예를 들어, 종양의 크기 또는 해당 종양 유형에 적절한 종양 마커의 발현을 측정하는 다양한 방법으로 측정될 수 있다.

[0033] 치료제에 무반응이라는 특징은 매우 가변적이며, 다양한 암은 다양한 조건 하에서 주어진 치료제에 대해 다양한 수준의 "무반응성"을 나타낸다. 또한, 무반응성의 측정은 환자의 삶의 질 및 전이의 정도와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 종양의 성장 크기 이상의 추가 기준을 사용하여 평가할 수 있다.

[0034] 본 발명에 따르면, 용어 "상향 조절", "상향 조절된", "과발현" 및 이의 임의의 변형은 건강한 사람 또는 정상인으로부터 유래한 유사한 생물학적 샘플에서 전형적으로 검출되는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위)보다 큰 생물학적 샘플에서의 바이오마커의 값 또는 수준을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 특정 질환의 다양한 단계에서 검출될 수 있는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위)보다 큰 생물학적 샘플에서의 바이오마커의 값 또는 수준을 지칭할 수 있다.

[0035] 본 발명에 따르면, 용어 "하향 조절", "하향 조절된", "과소 발현", "과소 발현된" 및 이들의 임의의 변형은 건강한 사람 또는 정상인으로부터 유래한 유사한 생물학적 샘플에서 전형적으로 검출되는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위)보다 작은 생물학적 샘플에서의 바이오마커의 값 또는 수준을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 특정 질환의 다양한 단계에서 검출될 수 있는 바이오마커의 값 또는 수준(또는 값 또는 수준의 범위)보다 작은 생물학적 샘플에서의 바이오마커의 값 또는 수준을 지칭할 수 있다.

[0036] 또한, 과발현 또는 과소발현된 바이오마커는 또한 개인의 정상적인 과정 또는 질환이나 기타 병태의 부재를 나타내거나 그 징후인 바이마커의 "정상" 발현 수준 또는 값과 비교하여 "차등적으로 발현되는" 것으로 또는 "차등적인 수준" 또는 "차등적인 값"을 갖는 것으로 지칭될 수 있다. 따라서, 바이오마커의 "차등적인 발현"은 또한 바이오마커의 "정상" 발현 수준으로부터의 변이로 지칭될 수 있다.

[0037] 본 발명에 따르면, HDAC6 저해제의 "*생물학적 활성*"이라는 용어는 본 발명에 기재된 임의의 유전자의 발현의 조정/변이를 지칭한다.

[0038] 본 발명에 따르면, "*유효 용량*"이라는 용어는 환자의 암 치료에 효과적인 것으로 간주될 수 있는 HDAC6 저해제의 용량을 지칭한다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1. RNAseq에 의해 유전자 발현 데이터를 얻기 위해 수행된 실험 절차의 계획.

도 2. 샘플 대 샘플 거리 분석(2A) 및 주성분 분석(2B).

도 3a 및 3b. 벤 다이어그램은 특정 처리에 의해 선택적으로 또는 일반적으로 상향 조절되는 유전자의 수를 나타낸다. 목록을 벤 다이어그램(Venn's diagrams)과 비교하기 위한 대화형 도구(interactive tool)인 문헌(Oliveros, J.C.(2007-2015) Venny)의 도구로 생성되었다. https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html.

도 4. 정제된 인간 단핵구를 표시된 대로 처리하고, CD274/PD-L1의 발현을 RNAseq 데이터로부터 분석하였다.

도 5a, 5b 및 5c. 인간 단핵구는 ITF3756 처리 시 CD84의 발현을 하향 조절한다(A). CD84 도시적 구조(B) 및 면역 세포 발현(C).

도 6. ITF3756은 TNF-α와 유사한 정도로 RANK/TNFRSF11a의 강력한 하향 조절을 유도한다.

도 7a 및 7b. ITF3756은 인간 단핵구에서 CXCL2 (A) 및 CXCL3 (B)의 발현을 감소시켰다.

도 8. ITF3756은 단독으로 그리고 TNF-α와 조합하여 STAB1 유전자의 발현을 강력하게 하향 조정한다.

도 9. ITF3756은 단독으로 그리고 TNF-α와 조합하여 NBEAL2의 발현을 증가시킨다.

도 10. ITF3756은 LTBP4의 발현을 상향 조절한다.

도 11. 인간 단핵구에서 FATP1/SLC27A1의 발현에 대한 ITF3756의 효과 및 FATP1/SLC27A1 발현에 대한 ITF3756과 TNF-α의 반대 효과를 나타낸다.

도 12. ITF3756만이 IRF6 발현 조정을 유도한 반면 TNF-α 또는 조합은 효과가 없었음을 나타낸다.

도 13. ITF3756은 단독으로 그리고 TNF-α의 존재 하에서 명백하게 상승적인 방식으로 ANXA6 유전자 발현을 상향 조절한다.

도 14. ITF3756은 CD40 유전자 발현을 상향 조절하고, TNF-a와 조합하면 TNF-α 단독으로 유도되는 CD40 발현의 상향 조절을 약간 증가시킨다.

도 15. M2 대식세포 마커 CD163은 ITF3756, 단독에 의해 그리고 TNF-α의 존재 하에서 하향 조정된다.

도 16. M2 대식세포 마커 CD204/MSR1은 ITF3756, 단독에 의해 하향 조정되고, TNF-α의 존재 하에서 강하게 하향 조정된다.

도 17. M2 대식세포 마커 CD206/MRC1은 ITF3756, 단독에 의해 그리고 TNF-α의 존재 하에서 강하게 하향 조정된다.

도 18. M2 대식세포 마커 MMP9는 ITF3756에 의해 하향 조정된다. 세포를 TNF-α 또는 ITF3756 + TNF-α로 처리했을 때 처리되지 않은 대조군과 비교하여 조정이 관찰되지 않았다.

도 19. M2 대식세포 마커 ADA는 ITF3756에 의해 하향 조정된다. TNF-α 및 조합은 ADA 유전자 발현의 상향 조절을 유도한다.

도 20a 및 20b. 1 μM ITF3756으로 처리된 PBMC에서 STAB1 및 IRF6 유전자의 조정을 나타낸다. A. STAB1의 하향 조정. B. IRF6의 상향 조절.

도 21a 및 21b. ITF3756이 생체 내에서 지속적인 튜불린 아세틸화를 유도한다는 것을 나타낸다. A. 아세틸 튜불린 및 튜불린 밴드를 나타내는 웨스턴 블롯. B. 밴드 강도를 정량화하여 총 튜불린 함량에 대해 정규화된 튜불린 아세틸화의 배수 증가를 계산하였다.

도 22a, 22b, 22c, 22d 및 22e. 종양 보유 동물은 ITF3756 처리에 다르게 반응한다. ITF3756으로 처리된 동물은 세 가지 상이한 그룹으로 분류될 수 있다. A. 비히클 그룹과 비교한 ITF3756 그룹(종양 부피의 평균값 ± SEM). 패널 B. C. D 및 E는 표시된 4개 그룹의 연구 동안 단일 동물에 대한 종양 부피의 변화를 보여준다.

도 23a, 23b, 23c, 23d 및 23e. 종양 보유 동물은 항 PD-1 처리에 다르게 반응한다. 항 PD-1로 처리된 동물은 세 가지 상이한 그룹으로 분류될 수 있다. A, 비히클 및 이소형 대조군과 비교한 항 PD-1 그룹(종양 부피의 평균값 ± SEM). 패널 B, C, D, E는 표시된 4개 그룹의 연구 동안 단일 동물에 대한 종양 부피의 변화를 도시한다.

도 24a, 24b 및 24c. 종양 미세환경에서의 MMP9 하향 조절은 반응자 마우스와 상관관계가 있다. ITF3756으로 처리된 CT26 보유마우스는 비반응자에 비해 MMP9 발현이 통계적으로 유의하게 감소하였다(B). 이러한 상관관계는 모든 동물이 고려되는 경우(A) 또는 항 PD-1로 처리된 동물이 고려되는 경우(C) 존재하지 않는다.

도 25a, 25b 및 25c. 종양 미세환경에서의 IRF6 상향 조절은 반응자 마우스와 상관관계가 있다. ITF3756으로 처리된 반응자 마우스는 비반응자에 비해 IRF6의 현저한 발현 상향 조절을 나타낸다(B). 이러한 상관관계는 모든 동물이 고려되는 경우(A) 또는 항 PD-1로 처리된 동물이 고려되는 경우(C) 존재하지 않는다.

도 26a, 26b 및 26c. 종양 미세환경에서 CD40의 상향 조절은 반응자 마우스와 상관관계가 있다. ITF3756으로 처리된 반응 마우스는 비반응자 마우스(B)에 비해 CD40 발현이 통계적으로 유의하게 상향 조절되었다. 이러한 상관관계는 모든 동물이 고려되는 경우(A) 또는 항 PD-1로 처리된 동물이 고려되는 경우(C) 존재하지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명자들은 놀랍게도 우리의 선택적 HDAC6 저해제인 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드(ITF3756으로도 불림)가 염증촉진 자극에 의해 활성화된 골수 세포에서 다양한 유전자의 발현을 상향 및/또는 하향 조정할 수 있으며, 자극되지 않은 인간 단핵구와 TNF-α 처리된 인간 단핵구 둘 모두에서 유전자 발현에 더 광범위한 영향을 미칠 수 있음을 발견하였다.

[0041] 특히, TNF-α로 자극된 인간 단핵구는 PD-L1 유전자를 강력하게 상향 조절하고, PD-L1의 표면 발현과 이러한 상향 조절은 ITF3756에 의해 억제되는 것으로 관찰되었다.

[0042] 또한, 실험 섹션에서 보고된 시험관내 데이터는 ITF3756을 사용한 인간 단핵구의 처리가 NBEAL2, FATP1/SCL27A1, LTBP4, CD40, ANXA6 및 IRF6 유전자의 발현을 상향 조절하고 CD84, CD276, RANK/TNFRSF11a, CXCL2, CXCL3, CD163, CD204/MSR1, CD206/MRC1, ADA, MMP9 및 STAB1 유전자의 발현을 하향 조절한다는 것을 입증한다.

[0043] 따라서, 본 발명자들에 의해 얻어진 결과는 HDAC6 저해제에 의해, 보다 구체적으로 분자 ITF3756에 의해 직접 조정될 수 있고, 이러한 부류의 분자의 임상 개발에 가장 중요한 유전자 발현 시그니처로 사용될 수 있는 "유전자 발현 시그니처"로도 불리는 유전자 패널의 식별로 이어졌다.

[0044] 또한, 상기 데이터는 생체내에서 얻은 실험 데이터로부터도 확인되었으며, 여기서 CT26 보유 동물에서 ITF3656 처리군의 반응자 동물과 상관관계가 있는 MMP9 유전자의 현저한 하향 조절과 IRF6 및 CD40 유전자의 상향 조절이 관찰되어, 상기 유전자의 발현 수준이 처리된 동물에서 HDAC6의 억제제의 효과와 밀접하게 관련되어 있음을 입증한다.

[0045] 따라서, 본 발명의 실시양태는 하기 단계를 포함하는, HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가하는 방법이다:

[0046] a) 생물학적 샘플에서 HDAC6 저해제에 의해 조정되고 CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD206/MRC1, MMP9, NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SLC27a1, ADA, CD276, CD40 또는 IRF6 유전자로부터 선택되는 적어도 하나의 RNA 바이오마커의 발현 수준을 결정하는 단계;

[0047] b) 상기 발현 수준을 참조 샘플의 발현 수준과 비교하는 단계.

[0048] 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 방법은 암에 걸린 환자의 임상 치료 동안 HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가한다.

[0049] 추가의 바람직한 실시양태에서, 상기 방법은 암에 걸린 환자의 임상 치료 후 HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가한다. 이는 치료 후 환자의 상태를 평가하는 데 유용할 수 있다.

[0050] 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다.

[0051] 바람직하게는, 상기 참조 샘플은 HDAC 억제제로 처리되지 않은 건강한 대상체 표본, HDAC 억제제로 처리되지 않은 암에 걸린 대상체, 또는 HDAC 억제제로 처리 시작 시(t=0) 대상체로부터 유래된다.

[0052] 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 HDAC 억제제는 투바신, 투바스타틴, 넥스트라스타트, ACY-1215, ACY-738, ACY-1083, KA2507, T518, SW100 또는 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드(ITF3756)로부터 선택되고, 바람직하게는 상기 HDAC 저해제는 화합물 N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1 H-테트라졸-1-일)메틸)벤즈아미드이다.

[0053] 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 방법은 대상체를 임상 치료에 반응성 또는 무반응성으로 분류하는 단계 c)를 추가로 포함한다.

[0054] 바람직하게는, 암에 걸린 환자는 적어도 하나의 RNA 바이오마커의 발현 값이 역치 발현 값보다 높은지 또는 낮은지 여부에 기반하여, 임상 치료에 반응성 또는 무반응성으로 분류된다.

[0055] 하나의 예시적인 실시양태에서, 역치 발현 값 초과의 샘플 발현 값은 항암 치료에 반응할 환자를 나타낸다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 역치 발현 값 미만의 샘플 발현 값은 항암 치료에 반응하지 않는 환자를 나타낸다.

[0056] 또 다른 예시적인 실시양태에서, 역치 발현 값 초과의 샘플 발현 값은 항암 치료적 치료에 반응하지 않을 환자를 나타낸다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 역치 발현 값 미만의 샘플 발현 값은 항암 치료에 반응할 환자를 나타낸다.

[0057] 예를 들어, MMP9의 하향 조절과 IRF6 및 CD40의 상향 조절이 반응자 동물과 상관관계가 있음을 실시예에서 입증되었다.

[0058] 추가의 예시적인 실시양태에서, 역치 발현 값 미만의 샘플 발현 값은 환자가 암 유형을 가지고 있거나, 암 유형이 발병할 위험이 있거나, HDAC6 저해제에 반응하지 않음을 나타낸다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 역치 발현 값 초과의 샘플 발현 값은 환자가 암 유형을 가지고 있거나, 암 유형이 발병할 위험이 있거나, HDAC6 저해제에 반응하는 것을 나타낸다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 역치 점수 초과의 샘플 발현 점수는 환자가 양호한 임상 예후를 갖는 암 하위 유형을 가지고 있음을 나타낸다. 또 다른 예시적인 실시양태에서, 역치 점수 미만의 샘플 발현 점수는 임상 예후가 불량한 암 하위 유형을 갖는 환자를 나타낸다.

[0059] 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 방법에서, 바이오마커 NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SCL27a1, CD40 또는 IRF6의 발현 수준은 HDAC6 저해제에 의해 상향 조절되고, RNA 바이오마커 CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD206/MRC1, ADA, CD276 또는 MMP9의 발현 수준은 HDAC6 저해제에 의해 하향 조절된다.

[0060] 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 방법에서, 적어도 RNA 바이오마커 STAB1, CD84, CD206/MRC1, MMP9, CD163, CD40 및 IRF6의 발현 수준을 평가하고, 바람직하게는 적어도 RNA 바이오마커 MMP9, CD40 및 IRF6의 발현 수준을 평가한다.

[0061] 추가의 바람직한 실시양태에 따르면, 상기 암은 부신피질 암종, 항문암, 성상세포종, 피부기저세포 암종, 방광암, 뇌종양, 유방암, 원인불명의 원발성 암종, 심장종양, 자궁경부암, 담관암종, 대장암, 자궁내막암, 식도암, 안구내 흑색종, 나팔관암, 담낭암, 위암, 위장관 유암종(Gastrointestinal Carcinoid Tumor), 위장관 기질 종양(Gastrointestinal Stromal Tumors: GIST), 생식세포종양, 고환암, 두경부암, 간세포 암종, 섬세포종양, 췌장 신경내분비종양, 랑게르한스세포 조직구증(Langerhans Cell Histiocytosis), 백혈병, 폐암(비소세포, 소세포, 흉막폐모세포종, 및 기관지 종양), 흑색종, 메르켈세포 암종(Merkel Cell Carcinoma), 중피종, NUT 유전자 변화를 동반한 정중선 암종(Midline Tract Carcinoma With NUT Gene Changes), 다발성 내분비 종양 증후군(Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome), 다발성 골수종/형질세포종양, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 신경모세포종, 난소암, 췌장암, 부신경절종(Paraganglioma), 부갑상선암, 음경암, 갈색세포종(Pheochromocytoma), 뇌하수체종양, 원발성 복막암, 전립선암, 신세포암, 망막모세포종, 육종, 피부의 편평세포 암종, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 신우(Renal Pelvis) 및 요관의 이행 세포암, 자궁암, 질암, 혈관종양, 외음부암 및 윌름스 종양(Wilms Tumor)으로부터 선택된다.

[0062] 바람직하게는, 상기 암은 흑색종, 신세포암, 비소세포폐암 또는 대장암으로부터 선택된다.

[0063] 바람직하게는, 생물학적 샘플은 조직 샘플 또는 체액이고, 바람직하게는 상기 조직 샘플은 종양 생검 또는 혈액 세포이고; 바람직하게는 상기 체액은 혈액, 혈청 또는 혈장이다.

[0064] 보다 바람직하게는, 상기 혈액 세포는 단핵구 또는 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell)(PBMC)이다.

[0065] 본 발명에 따르면, 상기 단핵구는 암에 걸린 환자로부터 또는 단핵구의 세포 배양물이 HDAC6 저해제로 처리된 시험관내 플레이트에 의해 단리될 수 있다.

[0066] 바람직한 실시양태에 따르면, 바이오마커는 RNA 전사체이다. 본원에 사용된 바와 같이, "RNA 전사체"는 메신저 RNA(mRNA), 대안적으로 스플라이싱된 mRNA, 리보솜 RNA(rRNA), 전달 RNA(tRNA), 소형 핵 RNA(snRNA) 및 안티센스 RNA를 포함하는 코딩 및 비코딩 RNA를 모두 지칭한다. 생물학적 샘플에서 mRNA를 측정하는 것은 생물학적 샘플에서 해당 단백질 및 유전자의 수준을 검출하기 위한 대리물로서 사용될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 임의의 바이오마커 또는 바이오마커 패널은 또한 적절한 RNA를 검출함으로써 검출될 수 있다.

[0067] 바람직한 실시양태에 따르면, 단계 a)에서 바이오마커의 발현 수준은 RNA 서열분석, 정량적 RT-PCR(qRT-PCR), 디지털 PCR, Affymetrix 마이크로어레이, 맞춤형 마이크로어레이 또는 나노스트링 기술에 의해 검출된다.

[0068] 바이오마커 발현 프로파일링의 방법에는 정량적 PCR, NGS, 노던 블롯, 서던 블롯, 마이크로어레이, SAGE, 또는 특이적 바이오마커의 RNA, mRNA 또는 단백질 수준을 측정할 수 있는 다른 기술이 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0069] 주어진 샘플에 대한 전체 발현 데이터는 다양한 양의 출발 물질, 다양한 추출 및 증폭 반응 효율을 보정하기 위

해 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 정규화될 수 있다.

[0070] 바람직한 실시양태에 따르면, 본 발명의 방법의 a) 단계는 하기 하위 단계로 이루어진다:

[0071] (i) PBMC 및/또는 단핵구를 단리하는 단계;

[0072] (ii) RNA 샘플을 추출하는 단계;

[0073] (iii) CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD40, CD206/MCR1, MMP9, NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SLC27a1, ADA, CD276 및 IRF6 유전자로부터 선택된 적어도 하나의 RNA 바이오마커를 정량화하는 단계;

[0074] (iv) 정량화된 RNA 바이오마커의 생물정보학 분석에 의해 상이하게 발현된 바이오마커를 평가하는 단계;

[0075] (v) 지점 (iv)에서 얻은 결과를 반응자 또는 비반응자 환자와 연관시키는 단계.

[0076] 본 발명의 추가 실시양태는 HDAC6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가하기 위한 키트로서, 다중-웰 플레이트 및 검출될 RNA 바이오마커 각각의 발현 수준을 결정하기 위한 적합한 프라이머 및/또는 프로브를 포함한다.

[0077] 바람직하게는 상기 RNA 바이오마커는 CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD40, CD206/MCR1, MMP9, NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SLC27a1, ADA, CD276 및 IRF6 유전자로부터 선택된다.

[0078] 추가의 바람직한 실시양태는 HDCA6 저해제의 유효 용량 및/또는 생물학적 활성을 평가하는 데 사용하기 위한 키트로서, 다중-웰 플레이트 및 CD84, RANK/TNFRSF11a, CXCL3, CXCL2, STAB1, CD163, CD204/MSR1, CD40, CD206/MCR1, MMP9, NBEAL2, LTBP4, ANXA6, FATP1/SLC27a1, ADA, CD276 및 IRF6 유전자로부터 선택된 RNA 바이오마커 중 적어도 하나의 발현 수준을 결정하기 위한 적합한 프라이머 및/또는 프로브를 포함한다.

[0079] **실시예**

[0080] **재료 및 방법**

[0081] **단핵구 정제 및 TNF-α 활성화**

[0082] 실험에 사용된 PBMC는 Ficoll-Hypaque 구배(Biochrom)를 통해 분리된 건강한 기증자(모든 샘플은 수혈에 필요한 전염성 질환에 대해 음성으로 테스트됨)의 Buffy Coats에서 얻었다.

[0083] 단핵구는 제조업체의 지시에 따라 범 단핵구 단리 키트(Pan Monocyte Isolation kit)(Milteny)를 사용하여 100 x 10^6 PBMC로부터 음성 선택에 의해 정제하였다. 범 단핵구 단리 키트에 의해 손상되지 않은 단핵구가 인간 PBMC로부터 단리되고 전형($CD14^{++}CD16^{-}$), 비전형($CD14^{+}CD16^{++}$) 및 중간형($CD14^{++}CD16^{+}$) 단핵구가 동시에 농축된다. T 세포, NK 세포, B 세포, 수지상 세포 및 호염기구와 같은 비단핵구는 비오틴-접합 항체 및 항비오틴 마이크로비드의 칵테일을 사용하여 간접적으로 자기적으로 표지된다. 간단히 말해서, 400 μL의 완충액(PBS 1X, 0,5% BSA 및 2 M EDTA), 100 μL의 FcR 차단 시약 및 100 μL의 비오틴-항체 칵테일을 PBMC에 첨가하고, 미리 PBS로 300xg으로 5분 동안 원심분리하여 세척하고, 혼합한 다음, 냉장고(2 내지 8℃)에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 300 μL의 완충액 및 200 μL의 항-비오틴 마이크로비드를 세포에 첨가하고, 혼합하고, 냉장고에서 10분 동안 더 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후 세포는 후속 자기 세포 분리에 의해 처리되었다. 세포 현탁액을 컬럼에 적용하고, 농축된 단핵구를 나타내는 표지되지 않은 세포를 함유하는 통과액(flow-through)을 수집하였다. 정제된 단핵구를 300xg로 5분 동안 원심분리하여 완충액으로 세척하고, PBS로 계수하였다. 정제된 단핵구(1,0 x 10^6/ml)를 1 ml 최종 부피의 완전 배지(RPMI(Biochrom), FCS 10% 및 페니실린/스트렙토마이신 1x(Sigma))의 12웰 플레이트에서 ITF3756 1 μM 또는 DMSO(0.005%)로 2시간 동안 전처리하였다. 이어서, 세포를 TNF-α(100 ng/mL, Peprotech)로 4시간 동안 자극하거나 자극하지 않았다. ITF3756 및 TNF-α와 함께 인큐베이션한 후, 세포를 수집하고, PBS로 300xg로 5분 동안 원심분리하여 세척하고, -80℃에서 보관하였다.

[0084] 샘플을 벤치에서 2분 동안 해동하고 제조업체의 지침에 따라 Trizol 시약(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 간단히 말해서, Trizol 시약(5 내지 10 x 10^6개 세포당 0,75 ml Trizol)을 샘플에 첨가하고, 샘플을 실온(RT)에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 클로로포름(0.75 mL Trizol당 150 μL)을 샘플에 첨가하고, RT에서 3분의 인큐베이션 후, 샘플을 4℃에서 14분 동안 12000xg로 원심분리하였다. 원심분리 후, 혼합물은 3개의 상으로 분리되고 RNA는 수성 상에 남아 있다. 각 샘플에 대해 수성상을 제거하고,

새 튜브에 넣고, 이소프로판올(0,75 ml의 트리졸당 0.375 ml)을 각 튜브에 첨가하였다. 샘플을 냉장고(2 내지 8℃)에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 샘플을 4℃에서 12000xg로 10분 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하고, 75% 에탄올(0,75 ml의 트리졸 0.75 ml)을 샘플에 첨가하였다. 샘플을 4℃에서 7500xg로 5분 동안 원심분리하고, 상층액은 버렸다. RNA를 벤치에서 5 내지 10분 동안 공기 건조시켰다. 이어서, RNA 샘플을 물(10 내지 50 μL)에 재현탁시켰다.

[0085] RNA 농도는 NanoDrop 1000 분광광도계(Thermo Scientific)를 사용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 결정되었다. 또한, 280에서 흡광도를 측정하여 RNA 오염 정도를 추정하는 것도 가능하다. 260 nm/280 nm의 흡광도 비율을 통해 단백질 오염을 식별할 수 있다. 260 nm/280 nm 흡광도 비율이 대략 2인 경우, 샘플은 충분히 순수한 것으로 간주되었다.

[0086] 추출된 RNA의 무결성은 Agilent RNA 6000 Pico 키트(Agilent Technologies)와 함께 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기(Agilent Technologies)를 사용하여 모세관 전기영동으로 평가하였다. 이 시스템을 사용하면 농도가 알려진 고순도 RNA 래더(RNA ladder)를 기준으로 사용하여 최대 12개의 샘플을 동시에 분석할 수 있다. 프로토콜에는 70℃에서 2분 동안 모든 샘플과 RNA 래더의 변성 단계와 형광 인터컬레이터가 포함된 실행 겔로 칩을 준비하는 단계가 포함된다. RNA 분자는 삽입 분자와 결합하고 전기영동에 의해 분리된 분자의 형광은 기기에 의해 검출된다.

[0087] 겔은 550 μL의 RNA 겔 매트릭스를 스핀 필터(키트에 의해 제공)에 피펫팅하여 제조하였다. RT에서 1500xg로 10분 동안 원심분리한 후, 여과된 겔의 65 μL의 분취액을 제조하였다. RNA 염료 농축액을 실온에서 30분 동안 평형화한 다음, 볼텍싱하고, 회전시키고, 1 μL의 염료를 여과된 겔의 65 μL의 분취액에 첨가하였다. 겔-염료 혼합물을 혼합하고, RT에서 13000xg로 10분 동안 원심분리하였다. 새로운 RNA 칩을 칩 프라이밍 스테이션에 놓고, 9 μL의 겔-염료 혼합물을 할당된 웰에 피펫팅하고, 플런저에 의해 칩에 분배하였다. 5 μL의 RNA 마커를 11개의 샘플 웰 모두와 래더 웰에 첨가하였다. 이어서, 래더 웰 내의 1 μL의 래더와 11개의 샘플 웰 각각에 있는 1 μL의 샘플을 칩에 첨가하였다. 칩은 2400 rpm에서 1분 동안 볼텍싱하고, 5분 이내에 Agilent 2100 Bioanalyzer 기기에서 실행하였다.

[0088] 소프트웨어를 사용하면 rRNA 28S/rRNA 18S 비율의 함수로 각 샘플에 1에서 10까지의 값을 할당하는 알고리즘을 기반으로 계산된 RNA 수량 지수(RQI)를 평가하여 각 샘플에 대한 순도 추정치를 얻을 수 있다. 이 지수가 7.5 이상이면 샘플은 순도가 높은 것으로 간주된다.

[0089] **RNAseq**

[0090] RNA 서열 데이터를 생성하기 위해 수행된 실험 절차의 계획은 도 1에 표시되어 있다.

[0091] **RNA 추출**

[0092] RNA 샘플의 양과 무결성/순도를 결정하기 위해, 먼저 RNA 6000 LabChip® 키트(Agilent#5067-1511)를 사용하여 Agilent Technologies 2100 Bioanalyze로 대조 확인을 수행하였다. 생체분석기는 미세유체 칩, 겔 충전 채널의 전압 유도 크기 분리 및 소형 규모의 레이저 유도 형광(LIF) 검출의 조합을 기반으로 하는 생체분석 장치이다.

[0093] RNA 무결성 번호(RNA Integrity Number: RIN) 소프트웨어 알고리즘을 사용하면 1에서 10까지의 번호 매기기 시스템을 기반으로 전체 RNA를 분류할 수 있다(1은 가장 분해되고 10은 가장 손상되지 않음). RIN이 7,5 미만인 모든 샘플은 폐기되었으며 나머지 샘플은 라이브러리 준비 및 서열분석을 위해 처리되었다.

[0094] **PolyA mRNA 선택**

[0095] mRNA는 TruSeq RNA 샘플 준비 매뉴얼(Illumina # 15015050)에 제안된 대로 2 라운드의 정제(양성 선택)를 사용하여 폴리-T 올리고-부착 자기 비드를 사용하여 200 ng의 총 RNA로부터 단리하였다.

[0096] **라이브러리 준비 및 cDNA 합성**

[0097] 정제된 샘플은 TruSeq RNA-Seq v2 라이브러리 준비 키트를 사용하여 처리하였다. 간단히 말해서, 화학적 단편화는 Illumina 독점 단편화 완충액에서 고온에서 2가 양이온을 사용하여 수행되었다. 첫 번째 가닥 cDNA는 무작위 올리고뉴클레오티드 및 SuperScript II(Invitrogen# 18064-014)를 사용하여 합성하였다. 두 번째 가닥은 DNA 폴리머라제 I 및 RNase H를 사용하여 연속적으로 수행하였다. 단편의 크기 선택을 가능하게 하는 Agencourt AMPure XP 비드 정제(Beckman#A63882) 후, 엑소뉴클레아제/폴리머라제 활성을 통해 돌출부를 무딘 말단으로 전환한 다음, 효소를 제거하였다. DNA 단편을 3' 말단에서 아데닐화한 다음, Illumina TruSeq PE 어댑터 인덱싱된

올리고뉴클레오티드를 결찰하고, 이중 정제하고, PCR 반응에서 Illumina PCR 프라이머 칵테일을 사용하여 선택적으로 농축하였다. PCR 라이브러리 제품은 AMPure XP 비드로 정제하였으며, 품질은 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer에서 Agilent DNA 1000 검정(Agilent#5067-1504)를 사용하여 확인하고, dsDNA 광범위 분석 키트(Thermo Fisher Scientific#Q32850)와 함께 Qubit 2.0 형광계를 사용하여 정량화하였다. 인덱싱된 개별 라이브러리를 풀링하여 각 샘플에 대한 등몰 농도를 얻은 다음, 클러스터 생성을 위해 처리하였다.

[0098] **서열분석**

[0099] 풀링된 라이브러리는 cBot 시스템(Illumina) 및 TruSeq PE 클러스터 생성 키트 v3(Illumina# PE-401-3001)을 사용하여 단일 엔드 플로우 셀(Single End Flow Cell)에 로딩되었다. TruSeq 기술은 독점적인 가역적 터미네이터 기반 방법 5(2021년 3월 1일)를 사용하여 대규모 병렬 서열분석을 지원하며, 이 방법은 단일 염기가 성장하는 DNA 가닥에 통합되어 검출을 가능하게 한다. 실행이 끝날 때 TruSeq SBS v3 시약(Illumina# FC-401-3001)을 사용하여 HiSeq2500 기기(Illumina)에서 ~30 M의 75 bp 단일 말단 판독이 생성되었다. 마지막으로, 역다중화된 FASTQ 파일은 Illumina 파이프라인데이터 분석에 따라 생성되었다.

[0100] **생물정보학 분석**

[0101] 품질이 낮은 말단과 어댑터는 TrimGalore http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/를 사용하여 단일 말단 판독으로부터 트리밍되었다. 전사체 풍부도는 Kallisto(Bray et al, 2016)로 추정되었으며 차등 발현(DE) 유전자는 DeSeq2 R 패키지(Love et al, 2014)를 사용하여 확인되었으며 FDR 보정된 p-값은 0.05 미만이었다.

[0102] **정량적 실시간 PCR**

[0103] 재료 및 방법

[0104] **테스트 항목**

식별	ITF3756
로트/배치 번호	9
순도	>95%
분자식	$C_{13}H_{11}N_5O_2S$
분자량	301.32 g/mol
만료/재시험 날짜	11/2021
보관 조건	-20 °C
공급처 및 제조사	Italfarmaco SpA
특별 취급 주의사항	연구를 수행하는 모든 직원의 일반적인 보호(마스크, 장갑 및 안경)

[0105]

[0106] **테스트 항목 작업 용액**

[0107] 테스트 항목을 DMSO에 용해시키고 필요한 최종 농도까지 적절한 배지에 희석하였다.

[0108] **실험적 설계**

[0109] 본 발명의 실현 가능성을 확장하기 위해, 17개 유전자의 mRNA 발현을 조절하는 ITF3756의 잠재력도 PBMC에서 테스트하였다. 유전자 발현은 처리된 세포와 비히클 처리된 세포에서 상기 유전자의 발현을 비교하여 결정하였다.

[0110] **테스트 항목을 이용한 PBMC 처리**

[0111] PBMC를 1 x 10^6개 세포/ml의 밀도로 RPMI 1640 배지(Dutch modified, ThermoFisher)에 재현탁시켰다. 세포를 6웰 플레이트(Corning)에 웰당 3 ml를 플레이팅하였다. 세포를 0.25, 0.5, 1 및 2 μM의 4가지 농도에서 ITF3576으로 처리하였다. 각 처리 농도는 실험적 삼중 테스트를 위해 3개의 웰에서 반복하였다. 비히클(DMSO

0.05%) 처리된 세포를 동일한 밀도 및 부피로 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 처리 종료 시, 전체 RNA 추출을 위해 배양 세포를 수집하였다.

[0112] **RNA 추출 및 역전사(retro-transcription)**

[0113] 테스트 화합물로 처리한 후, PBMC를 6웰 플레이트에서 꺼내어 15 ml 튜브(Falcon)에 수집하였다. 웰을 1 ml의 PBS pH 7.4(ThermoFisher)로 1회 세척하고, 세척량을 수집된 세포 현탁액에 첨가하였다. 셀 현탁액을 1500 rpm에서 10분 동안 원심분리하였다. 상층액을 버리고 RNeasy 미니 키트(Qiagen)로부터 350 μl의 용해 완충액을 세포 펠릿에 첨가하였다. 용해된 세포를 위아래로 10회 피펫팅하여 세포 잔해물을 분산시켰다. 이어서, DNase 단계를 포함한 RNeasy Mini 키트 프로토콜과 같이 RNA 추출 절차를 수행하였다.

[0114] RNA 농도는 Nano Drop 1000 분광광도계를 사용하여 결정하였다. RNA를 16 μl의 부피로 50 ng/ul로 뉴클레아제가 없는 물(Ambion)로 희석하였다. Superscript VILO IV 시약(Invitrogen)을 아래에 나타낸 바와 같이 RNA에 첨가하였다.

[0115] [표 1] 증폭을 위해 96웰 플레이트의 웰에 첨가된 시약

[0116]

	부피/웰 (μL)
Superscript VILO IV	4
cDNA (50 ng/uL)	16
총 부피	20

[0117] 역전사 반응은 iCycler iQTM(Bio-Rad) 기기의 96웰 플레이트에서 다음 열 주기로 수행되었다: 25℃에서 10분, 50℃에서 10분, 그리고 85℃에서 5분. 이어서, 20 μl의 생성된 cDNA를 40 μl의 TE 완충액(Invitrogen)을 사용하여 13.3 ng/μl의 최종 이론적 농도로 희석하였다.

[0118] **유전자 발현 검출**

[0119] TaqMan 20x 유전자 발현 검정 시약(Applied Biosystems)은 유전자 전사체 검출에 사용되었으며 표 2에 나타낸다.

[0120] [표 2] qPCR에 사용되는 TaqMan 검정의 특징

유전자명	검정명	스팬 엑손	앰플리콘 길이 (bp)
NBEAL2	Hs01035331_g1	있음	73
SLC27A1	Hs01587911_m1	있음	120
LTBP4	Hs00943217_m1	있음	61
ANXA6	Hs01049082_m1	있음	68
IRF6	Hs00196213_m1	있음	93
STAB1	Hs00248439_m1	있음	79
CD84	Hs01547121_m1	있음	75
CD276/B7-H3	Hs00987207_m1	있음	65
RANK/TNFRSF11A	Hs00921372_m1	있음	75
CXCL2	Hs00601974_m1	있음	100
CXCL3	Hs00171061-m1	있음	99
PD-L1/CD274	Hs00204257_m1	있음	77
CD206/MRC1	Hs02832367_g1	있음	81
CD204/MSR1	Hs00234007_m1	있음	63
CD163	Hs00174705_m1	있음	72
ADA	Hs01110947_m1	있음	76
MMP-9	Hs00957555_m1	있음	79
하우스키핑 유전자			
UBC	Hs00824723_m1	있음	71
B2M	Hs99999907_m1	있음	75
HPRT1	Hs99999909_m1	있음	100

[0121]

[0122] 실시간 PCR은 CFX 96 Touch 실시간 PCR 검출기 시스템(Bio-Rad)에 연결된 CFX C1000TM 터치 열 순환기를 사용하여 수행하였다. qPCR 반응은 AmpliTaq Gold® DNA 폴리머라제를 함유한 Universal Master Mix 시약(적용됨)을 사용하여 96웰 플레이트(Hard Shell PCR 플레이트 Bio-Rad)에서 수행하였다. 40 ng의 주형에 해당하는 3 μl의 cDNA를 아래에 나타낸 바와 같이 총 15 μl의 부피의 PCR 반응 시약에 첨가하였다:

[0123] 역치 주기(Ct) 값을 보고하는 자동 Excel 보고서는 원시 데이터 수집을 위해 내보내진 후 발현식 조정 계산을 위해 설명되었다.

[0124] **데이터 획득**

[0125] mRNA 발현 조절 수준은 처리된 샘플과 처리되지 않은 샘플의 mRNA 수준을 비교하여 평가하였다. 모든 데이터는 해당 샘플에서 3개의 하우스키핑 유전자(참조 유전자: UBC, B2M 및 HPRT1)의 평균 발현 신호에 대해 정규화되었다.

[0126] 테스트 항목의 변조 전위를 결정하기 위해 "$2^{-\triangle\triangle CT}$" 방법을 사용하였다.

[0127] $2^{-\Delta\Delta CT}$는 각 처리 조건 및 각 표적에 대해 단일 복제물로 계산되었다.

[0128] -△△Ct = - (△Ct, 처리 - △Ct, 미처리)

[0129] △Ct, 처리 = Ct TARGET 처리됨 - Ct REFERENCE 처리

[0130] △Ct, 미처리 = Ct TARGET 미처리 - Ct REFERENCE 미처리

[0131] Ct TARGET 미처리는 3회의 미처리 복제물의 평균으로 의도된다.

[0132] Ct REFERENCE 처리는 3개의 하우스키핑 유전자에 대한 단일 복제물의 평균값으로 의도된다.

[0133] Ct REFERENCE 미처리는 모든 비처리 복제물에 대한 3개의 하우스키핑 유전자에 대한 Ct 값의 평균으로 의도된다.

[0134] 1 미만(하향 조정된)의 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값을 나타내는 처리된 샘플의 경우, 배수 조정 값은 미처리 대조군 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값(1에 해당, 조정 없음)과 처리된 샘플 2-ΔΔCT 값 사이의 비율로 보고되었으며, 하향 조정을 설명하기 위해 빼기 기호를 추가하였다.

[0135] $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값이 1 초과이면 상향 조정이 발생한다. 배수 조정 값은 미처리 대조군 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값(1에 해당, 조정 없음)과 처리된 샘플 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 값 사이의 비율로 보고되었다.

[0136] **컴퓨터 시스템**

[0137] 이 연구에서 데이터를 획득하고 정량화하기 위해 사용된 컴퓨터 시스템에는 하기 시스템이 포함되었다.

[0138] 시스템 명칭 기능

[0139] Spylog v 1.1 냉장고 및 냉동고용 전자 온도 모니터링 시스템. 공급업체: AHSI.

[0140] CFX 96 터치 실시간 PCR 검출기 시스템. 공급업체: Bio-Rad Laboratories

[0141] NanoDrop 1000 분광광도계. 공급업체: ThermoFisher

[0142] iCycler iQTM 열 순환기. 공급업체: Bio-Rad Laboratories

[0143] **통계 분석**

[0144] 모든 데이터는 표준 편차± 평균으로 제공되었으며 실험 삼중의 평균이었다. 그룹 간의 통계적 평가(처리 샘플 대 미처리 샘플)는 양측 검정 스튜던트 t-테스트(two-tailed Student's t-test)를 사용하여 수행되었다.

[0145] 그래프에서 역치선은 +/-0.7의 비히클 처리 대조군(1)으로부터의 편차에 해당한다(0.7은 모든 샘플에 대한 하우스키핑 유전자에 대한 배수 변화의 표준 편차(SD)의 3배를 나타냄).

[0146] ** P값 < 0.05, * P값 < 0.1

[0147] **5. 참조**

[0148] 1. 실시간 정량 PCR 및 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 사용한 상대 유전자 발현 데이터 분석. K J Livak et al, Methods 25, 402-408 (2001)

[0149] **결과**

[0150] **RNAseq**

[0151] 단핵구를 4시간 배양한 후, RNAseq 분석은 ITF3756으로 처리된 샘플에서 padj < 0.05인 차등적으로 발현된 수백 개의 유전자가 확인되었음을 보여주며, TNF-α 처리 및 ITF3756 + TNF-α의 조합은 padj < 0.05인 조절을 일으키지 않을 수 있다.

[0152] 표 3은 표시된 그룹에서 각 처리 대 비히클 처리 대조군(don)에 대한 상향 및 하향 조정된 유전자의 수를 보여준다.

[0153] [표 3] 단핵구 처리에 따라 조정되는 유전자의 수

[0154]

	상향 조절된 유전자	하향 조절된 유전자
ITF3756/don	1499	1503
ITF3756_TNFα/don	2282	2329
TNFα/don	1563	1688

[0155] 샘플 대 샘플 거리 및 주성분 분석(각각 도 2a 및 2b)은 처리에 따라 4개의 뚜렷한 집단을 식별할 수 있음을 나

타내었다. 이는 처리에 따른 다양한 집단 및 샘플의 클러스터링에서 명확하게 상이한 유전자 발현을 나타낸다. 전반적으로, 두 분석 모두 상이한 처리에 대해 동질적인 반응을 나타낸다. 기증자마다 상이한 반응이 예상되기 때문에 이는 주목할 만하다.

[0156] 이어서, 본 발명자들은 TNF-α, ITF3756 및 ITF3756 + TNF-α에 의해 선택적으로 상향 또는 하향 조정된 유전자를 식별한다. 도 3a 및 3b는 각각 대조군에 비해 상향 조절되거나 하향 조절되는 유전자에 대한 벤 다이어그램을 나타낸다.

[0157] 다이어그램은 ITF3756에 의해 특이적으로 상향 조절되는 유전자가 537개이고 특이적으로 하향 조절되는 유전자가 386개임을 나타낸다. 본 발명자들은 이들 유전자로부터 특히 관심을 가졌는데, 그 유전자들로부터 ITF3756에 대한 특이적인 시그니처를 식별할 수 있었기 때문이다.

[0158] 본 발명자들은 먼저 PD-L1(CD274)의 발현을 분석하여 TNF-α에 의해 유도된 상향 조절과 ITF3756에 의한 억제를 검증하였다. 도 4는 ITF3756이 TNF-α + ITF3756으로 처리된 세포에서 PD-L1 유전자 발현의 강력한 하향 조절(59%)을 유도했음을 나타낸다.

[0159] 이어서, 본 발명자들은 상향 또는 하향 조정된 유전자 중에서 ITF3756의 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있는 유전자를 검색하였다. 표 4에는 본 발명자들이 선택한 유전자가 요약되어 있다.

[0160] [표 4] ITF3756의 생물학적 활성에 영향을 미칠 수 있는 선택된 상향 및 하향 조정된 유전자.

[0161]

상향 조절된 유전자	하향 조절된 유전자	TNF-α에 따라 하향 조절됨
NBEAL2	CD84	CD274 (PD-L1)
SLC27A1	CD276	
LTBP4	RANK/TNFRSF11a	
ANXA6	CXCL2	
IRF6	CXCL3	
CD40	STAB1	

[0162] 본 발명자들의 실험은 ITF3756이 도 5a에 나타낸 바와 같이 CD84의 발현을 강력하게 하향 조절한다는 것을 명확하게 보여준다. ITF3756 1 μM로 처리된 인간 단핵구는 CD84의 발현을 하향 조절하며, 이러한 하향 조절은 TNF-α와 같은 염증촉진 자극의 존재 하에서 더욱 강화된다. 도 5b 및 5c는 각각 CD84의 개략적인 구조와 면역 세포 발현을 나타낸다. RANK(TNFRSF11A) 및 RANKL(TNFRSF11)은 TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원이다. RANK는 종양 미세환경에서 암세포, 상피세포, 대식세포 등 다양한 세포 유형에서 발현될 수 있다. RANKL과의 상호작용은 종양 세포의 증식 및 세포 이동, 혈관 신생 및 대식세포 동원 및 M2 분화를 초래한다. ITF3756은 단핵구에서 RANK의 강력한 하향 조절을 유도하며(도 6 참조) M2/전종양 대식세포 분화의 억제 가능성을 시사한다. 이는 ITF3756의 존재 하에서 시험관내 분화에서 M1 대식세포의 증가를 나타내는 본 발명자들의 데이터와 일치한다. 또한, 세포를 TNF-α 및 ITF3756으로 처리하면 RANK/TNFRSF11a의 하향 조절이 단일 처리에 비해 증가하는 것을 관찰할 수 있다.

[0163] 케모카인은 정맥을 통해 혈액에서 조직으로 또는 그 반대로 세포가 이동하는 데 중요한 역할을 하는 화학유인성 사이토카인 계열이다. CXCL2 및 CXCL3은 단핵구 MDSC의 동원 및 생성에 관여하는 두 가지 케모카인이며, 이들의 억제는 mo-MDSC 생성을 감소시키고 숙주 면역-감시를 개선하는 것으로 제안되었다(Shi et al., 2018). 도 7a에 나타낸 바와 같이, ITF3756은 CXCL2의 발현을 감소시키고 TNF에 의해 유도된 상향 조절을 되돌려 정상 발현 수준을 확립한다.

[0164] CXCL3은 인간 단핵구 유래 수지상 세포의 분화와 기능에 영향을 미쳐 골수 유래 억제 세포(MDSC)와 유사한 표현형으로 밀어내는 또 다른 케모카인이다. 또한, MDSC 자체는 KRAS-돌연변이 대장암에 설명된 바와 같이 종양 미세환경으로의 이동을 촉진하는 CXCL3에 의해 활성화될 수 있는 CXCR2 수용체를 발현한다(Liao et al., (2019) Cancer Cell 35:559-572). 도 7b에서 나타낸 바와 같이, ITF3756은 이러한 케모카인 CXCL3의 발현을 감소시켰

다.

[0165] RANK 발현에 대한 효과와 함께 두 케모카인에 대한 활성은 ITF3756이 억제 골수 세포의 표현형과 관련된 유전자의 발현을 하향 조절한다는 것을 시사한다.

[0166] 클레버-1/스타빌린-1로도 알려진 STAB1은 대식세포와 단핵구의 면역억제성 표현형에서 염증촉진 표현형으로의 표현형 변화와 관련된 또 다른 중요한 유전자이다. STAB1은 ITF3756에 의해 강력하게 하향 조절되며 TNF-α의 존재 하에서 상승적으로 감소된다(도 8).

[0167] ITF3756에 의해 상향 조절되는 유전자 중에서, 본 발명자들은 과립 발달과 관련된 BEACH 도메인 함유 단백질인 NBEAL2(도 9)와 세포외 공간에 저장되는 동안 TGF-α 활성화를 잠복 상태로 유지함으로써 TGF-α 활성화를 조절하는 형질전환 성장 인자 베타(TGFB1, TGFB2 및 TGFB3)의 핵심 조절자인 LTBP4를 선택하였다. LTBP4 유전자는 TNF-α에 의해 2배 하향 조절된다(도 10 참조).

[0168] 본 발명자들의 결과는 ITF3756이 이러한 하향 조절에 대응하지만, 그 효과는 추가 상향 조절 없이 정상적인 수준의 제어를 회복하는 것임을 보여준다.

[0169] 도 11은 FATP1/SLC27A1의 발현에 대한 ITF3756의 효과를 나타낸다. 이러한 유전자는 대식세포의 염증촉진 반응에 관여하므로(Nishiyama et al. (2018) International Immunopharmacology 55, 205-215) 대식세포에 의해 매개되는 염증촉진, 항종양 반응에 관여하는 유전자가 된다. ITF3756은 TNF-α에 비해 이러한 유전자에 반대 영향을 미치며, 이 둘을 조합하여 세포를 처리하면 유전자의 기본 발현이 유지된다.

[0170] 골수 세포에서 염증촉진 효과를 매개하는 역할을 할 수 있는 또 다른 유전자는 인터페론 조절 인자 6(IRF6)으로, 이는 고도로 보존된 나선-회전-나선 DNA 결합 도메인과 덜 보존된 단백질 결합 도메인을 공유하는 9개의 전사 인자 계열에 속한다. 대부분의 IRF는 바이러스 감염 후 인터페론의 발현을 조절한다. 다른 IRF 구성원은 ITF3756에 의해 조절되지만, IRF6에는 유전자 발현의 더 강한 변화가 작용한다.

[0171] 도 12는 ITF3756만이 IRF6 발현 조정을 유도한 반면 TNF-α 또는 그 조합이 효과가 없었음을 나타낸다.

[0172] Annexin 6(AnxA6)은 ITF3756 처리 시 강력한 상향 조절을 나타내는 또 다른 유전자이다. TNF-α의 존재 하에서 상향 조절은 도 13에 나타낸 바와 같이 더욱 강력하고 아마도 상승적인 효과가 있을 것이다.

[0173] CD40은 TNF 수용체 슈퍼패밀리의 구성원이며, 단핵구/대식세포 및 수지상 세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 발현된다. 천연 리간드 CD40L에 의한 결합은 T 세포 활성화 및 항종양 대식세포의 유도를 초래한다. 항종양 면역 반응의 유도를 위한 CD40-CD40L 축의 활성화는 여러 가지 방법으로 접근되어 왔으며, 가장 최근에는 작용성 항 CD40 항체를 사용하고 있다. 생물학적 효과와 임상 반응은 MTD 아래에서 관찰되었다. 또한, 부작용은 임상 환경에서 쉽게 관리할 수 있는 것으로 보인다. ITF3756에 의해 얻어진 CD40 유전자 발현의 유도(도 14)는 이것이 시험관내 및 생체내에서 모두에서 화합물을 사용하여 관찰된 전반적인 항종양 면역 자극에 기여할 수 있음을 시사한다.

[0174] 표 3에 나타난 바와 같이, 다수의 유전자가 ITF3756에 의해 조절되었다. 이들 중 일부는 종양 관련 대식세포(tumor associated macrophage: TAM)의 특정 마커로 확인되었다. 이러한 분석은 단핵구에서 수행되었지만, 이러한 유전자의 조정은 인간 종양의 세포 질량의 큰 비율(최대 50%)을 구성할 수 있는 주요 선천 면역 세포인 TAM의 발달에 영향을 미칠 수 있다. TAM은 매우 이질적이며, 상주하는 조직 특이적 대식세포와 화학 유인물질 구배를 통해 순환계로부터 동원된 단핵구로부터 발생할 수 있다. 암의 유형, 병기 및 종양 내 이질성은 TAM 집단에 큰 영향을 미친다. 대부분의 TAM은 원발성 종양 성장과 전이성 확산을 지원하기 위해 종양 미세환경에 의해 프로그래밍된다. 그럼에도 불구하고, 종양 미세환경은 TAM에 영향을 미쳐 종양의 성장과 전이를 제한할 수 있다(Larionova et al., 2020). M2 표현형을 가진 종양 촉진 대식세포는 특이적 마커를 발현하며, 그 중 일부는 표 5에 나타낸 바와 같이 ITF3756으로 처리된 단핵구에서 강력하게 하향 조절되며, 이는 단핵구가 종양 조직에 동원되면 항종양 표현형의 유도가 가능한 의미를 뒷받침한다.

[0175] [표 5] 인간 단핵구에서 ITF3756에 의해 하향 조절되는 M2-관련 유전자.

M2 마커	배수 변화
CD163	- 4
CD204/MSR1	- 2.6
CD206/MRC1	- 13.3
MMP9	- 3.6
STAB1(스타빌린-1/클레버-1)	- 14
ADA	- 1.9

[0176]

[0177] 도 8(스타빌린-1) 및 도 15 내지 도 19는 TNF-α 및 TNF-α+ITF3756의 조합에 의해 발휘된 조절을 포함하는 표 5의 유전자의 조절을 나타낸다.

[0178] **ITF3756은 PBMC에서 유전자 조절 활성을 발휘한다**

[0179] 말초 혈액 단핵 세포는 단핵구에 비해 더 간단하고 빠른 방법으로 단리할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 정량적 실시간 PCR을 사용하여 이러한 세포 집단에 대한 ITF3756의 유전자 조절 활성을 테스트하였다.

[0180] 결과는 이러한 접근법을 사용하여 얻은 결과가 단핵구 및 RNAseq로 얻은 결과와 일치함을 나타낸다. 도 20은 ITF3756에 의해 각각 하향 조정되고 상향 조절된 2개의 예시적인 유전자, STAB1(도 20a) 및 IRF6(도 20b)에 대해 얻은 결과를 나타낸다.

[0181] **종양 미세환경에서 전사체의 생체외 유전자 발현은 IRF6, MMP9 및 CD40을 항종양 반응과 관련된 바이오마커로 식별하였다.**

[0182] **재료 및 방법**

[0183] **축산**

[0184] **환경 적응**

[0185] 동물을 실험실 환경에 적응시키기 위해 동물 수령과 처리 시작 사이에 최소 14일의 적응 기간이 허용되었다.

[0186] **주거(housing)**

[0187] 마우스를 강철로 된 격자 덮개와 분쇄 및 멸균된 먼지가 없는 짚 속대(bedding cob)의 톱밥으로 된 침대가 있는 마크롤론 케이지(26.7 x 20.7 x h 14 cm)(4-5마리 마우스/케이지) 내부에 수용하였다. 식단 및 물 공급: 식수는 자유롭게 공급되었다. 각 마우스에게 연구 기간에 걸쳐 매일 완전한 펠릿 마우스 식단(4RF21, Mucedola)을 제공하였다.

[0188] **환경 조건**

[0189] 온도 및 습도를 일정하게 유지하면서 명암 주기 하에서 동물을 사육하였다. 동물실의 매개변수는 다음과 같이 평가하였다: 22 ± 2℃ 온도, 55 ± 10% 상대 습도, 시간당 약 15 내지 20회의 여과된 공기 변화 및 인공 조명의 12시간 일주기(circadian cycle), 오전 7시-오후 7시.

[0190] **환경 적응**

[0191] 동물을 실험실 환경에 적응시키기 위해 동물 수령과 처리 시작 사이에 최소 14일의 적응 기간이 허용되었다.

[0192] ITF3756 (N-하이드록시-4-((5-(티오펜-2-일)-1H테트라졸릴1일)메틸)벤즈아미드). ITF3756은 Italfarmaco SpA의 의약 화학부에 의해 합성하였다. ITF3756, 배치 8은 분말로서 DMSO에 용해시키고 -20℃에서 보관하였다.

[0193] **약리학적 치료**

[0194] [표 6] 사용된 ITF3756 및 약리학적 치료

식별	ITF3756 배치 8
제형 유형	비히클 내 용액
용량 농도	5 mg/ml
제조 지침	적절한 양의 시험 화합물을 칭량하고 DMSO 중 100 mg/mL 의 용액을 만든다. 이러한 용액을 H2O/PEG 1:1 로 희석하여 시험 항목의 필요한 투여량 (5 mg/ml 용액)에 도달한다. 자기 교반 하에서 보관한다.
제조 빈도	시험 제형을 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	실온
공급처 및 제조사	Italfarmaco SpA
투여량 및 경로	복강내 주사로 10 mg/kg
치료 일정	10 일(월요일)부터 20 일까지 1 일 1 회. 토요일과 일요일에는 약물 투여가 이루어지지 않았다. 총 8 회 투여
부피	10 mL/kg (50 mg/kg). 개별 용량 부피는 투여 당일 기록된 체중을 기준으로 계산되었다.

[0195]

[0196] [표 7] 사용된 항 PD-1 항체 및 약리학적 치료

식별	항 마우스 PD-1
로트/배치 번호	735019O1 및 786520N1B
제형 유형	PBS 중 용액
투여량 및 경로	복강내 주사로 10 mg/kg
치료 일정	10 일(월요일)부터 20 일까지 격일. 토요일과 일요일에는 약물 투여가 이루어지지 않았다. 총 5 회 투여
제조 지침	7.7 mg/mL(로트. 735019O1) 또는 8.31 mg/mL(로트. 786520N1B)의 용액을 사용할 준비가 되었다. 이어서, 목표 농도로 PBS 에 희석한다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	+ 4°C, 빛으로부터 보호됨
공급처 및 제조사	BioXCell

[0197]

[0198] [표 8] 사용된 이소형 항체 및 약리학적 치료

식별	래트 IgG2b 이소형 대조군
로트/배치 번호	707119D1
제형 유형	의약품 제제
투여량 및 경로	복강내 주사로 10 mg/kg
치료 일정	10 일(월요일)부터 20 일까지 격일. 토요일과 일요일에는 약물 투여가 이루어지지 않았다. 총 5 회 투여
제조 지침	9.16 mg/mL 의 용액을 사용할 준비가 되었다. 이어서, 목표 농도로 PBS 에 희석한다.
제조 빈도	시험 제형은 투여 당일에 제조하였다
보관 조건	+ 4°C, 빛으로부터 보호됨
공급처 및 제조사	BioXCell

[0199]

[0200] **연구 설계**

[0201] 성체 BALB/c 마우스에 1 x 10^6 CT26 종양 세포(인산염 완충 식염수로 100 μl로 희석)를 s.c. 주사하고 종양 부피가 75 내지 100 mm^3에 도달했을 때 항-PD1 또는 ITF3756으로 처리하여 RNAseq에 의한 종양 미세환경의 유전자 조절을 탐색하였다. ITF3756은 PD-1/PD-L1 축에 작용하기 때문에 이러한 접근법을 통해 두 처리 모두에 특이적이고 공통적인 유전자를 식별할 수 있다. 전체 일정은 표 9에 설명되어 있다.

[0202] [표 9] 전체 처리 일정

그룹	마우스	주입 s.c. CT26	처리	빈도	주의
1	5	+	미처리		
2	5	+	ITF3756	월요일에서 금요일까지+ 월요일에서 수요일까지 8 회 투여	50 mpk os; 마지막 처리 1 시간 후 희생시킴
3	5	+	ITF3756	상동	50 mpk os; 마지막 처리 4 시간 후 희생시킴
4	5	+	ITF3756	상동	50 mpk os; 마지막 처리 18 시간 후 희생시킴
5	5	+	ITF3756	상동	50 mpk os; 마지막 처리 24 시간 후 희생시킴
6	5	+	비히클	상동	마지막 처리 4 시간 후 희생시킴
7	5	+	항-PD1	월요일-수요일-금요일 + 월요일-수요일) 5 회 투여	10 mpk ip; 마지막 처리 1 시간 후 희생시킴
8	5	+	항-PD1	상동	10 mpk ip; 마지막 처리 4 시간 후 희생시킴
9	5	+	항-PD1	상동	10 mpk ip; 마지막 처리 18 시간 후 희생시킴
10	5	+	항-PD1	상동	10 mpk ip; 마지막 처리 24 시간 후 희생시킴
11	5	+	이소형 AB	상동	10 mpk ip; 마지막 처리 4 시간 후 희생시킴

[0203]

[0204] **면역블로팅 분석**

[0205] 전체 세포 추출물은 프로테아제 및 프로테아제 억제제(Roche, Germany)가 보충된 Triton 완충액(50 mM Tris-HCl ph 7.5, 250 mM NaCl, 50 mM NaF, 1 mM EDTA pH 8, 0.1% Triton)로 마우스 비장을 용해하여 얻었다. 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, PVDF 막으로 옮기고, PBS-T(인산염-완충 식염수 및 5% 무지방 분유를 함유하는 0.1% Tween-20)로 실온(RT)에서 1시간 동안 차단하였다. 1차 항체와의 인큐베이션은 RT에서 2시간 동안 수행하였으며, 이후 적절한 호스래디시 퍼옥시다제-접합 2차 항체와 인큐베이션하였다. 검출은 ECL 웨스턴 블롯 시약(Western Blot Reagent)(Amerscham)을 사용하여 수행하였다. 사용된 항체는 마우스 항아세틸화 튜불린(Sigma, T6793), 마우스 항튜불린(Sigma, T6074), 염소 항-마우스 IgG(H + L)-HRP 접합체(Bio-Rad, 1706516)였다.

[0206] 밀도측정 분석은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0207] **RNAseq**

[0208] RNA는 Qiagen 추출 키트를 사용하여 급속 냉동 종양에서 추출하고 -80℃에서 보관하였다. 초고처리량 서열분석을 위해 DNA 단편의 말단에서 짧은 판독값을 얻는 쌍 말단 서열분석을 선택하였다. 추가 분석에 앞서, 서열분석 데이터에 대한 품질 검사를 수행하였다. 모든 샘플은 75개의 뉴클레오티드 길이(7 5 nt x 2) 서열을 포함한다.

[0209] RNA-Seq 분석 파이프라인에는 여러 단계가 포함된다:

[0210] 1. 판독값의 품질 관리,

[0211] 2. 낮은 품질의 판독값 제거

[0212] 3. 스프라이싱된 정렬을 판독.

[0213] 4. 전사체 발현 정량 분석

[0214] **판독값의 품질 관리**

[0215] 품질 관리는 통계를 기반으로 원시 데이터 서열분석의 품질을 확인하고 문제가 발생할 수 있는 영역에 대한 정보를 제공하는 그래프와 표를 반환하는 데 사용되는 방법이다.

[0216] 이러한 단계를 수행하기 위해, 본 발명자들은 고처리량 서열 데이터용 도구, 즉 http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc에서 사용 가능한 FastQC 도구를 사용하였다. FastQC 도구는 원시 데이터 서열분석에 대한 정보를 시각화할 수 있는 html 보고서를 반환한다. 품질 값의 계산은 이력 "phred 점수"를 기반으로 수행된다.

[0217] phred 점수(q)의 품질 값은 수학적 척도를 사용하여 염기(들)의 잘못된 식별에 대한 추정 확률을 로그 척도로 변환한다.

[0218] $q = -10 * \log10 (s)$.

[0219] 염기를 0.1(10%), 0.01(1%) 및 0.001(0.1%)로 잘못 식별할 확률은 각각 10, 20 및 30의 phred 점수(q 또는 Q) 값을 생성한다.

[0220] FastQC 도구는 요약 판단(통과(녹색 기호), 경고(주황색 기호), 실패(빨간색 기호))를 제공한다. phred 점수는 QC 보고서의 "Per Base Sequence Quality" 모듈에 반환된다.

[0221] **낮은 품질의 판독값 제거**

[0222] Phred 품질 점수가 낮은 판독값을 필터링하기 위해 NGSQCTool 키트 도구를 사용하였다.

[0223] **판독값 정렬**

[0224] 샘플은 쌍을 이루는 판독값을 위한 표준 매개변수와 함께 생물정보학 도구 STAR(버전 2.4.0d)를 사용하여 참조 Mus Musculus 게놈(mm10)[4]에 매핑되었다. 참조 트랙은 Refseq에서 얻은 어셈블리 mm10이었다. 아래 표는 각 샘플에 대해 매핑된 판독값의 백분율을 나타낸다. 모든 샘플에서 평균 매핑 비율은 93% 초과였고 리보솜 함량은 1% 미만이었다.

[0225] **전사체 발현 정량화**

[0226] 서열화된 각 샘플에 대해 발현된 전사체의 정량화는 Cufflinks를 사용하여 수행되었다. Cufflinks에 사용되는 측정 단위는 FPKM(백만 개 매핑된 판독값당 전사체의 킬로베이스당 단편)이며 이는 RNA 풀에 있는 전사체/유전자의 상대적 풍부도 측정하는 것을 의미한다. Differential Expression에 직접 사용하기 위한 것은 아니지만 사람이 판독할 수 있도록 설계되었으며 수백만 개의 판독값 및 유전자 길이와 같은 주요 기술적 교란 요인을 고려한다.

[0227] **반응자와 비반응자의 식별**

[0228] 반응자와 비반응자는 20일차의 종양 부피를 기준으로 선택되었다. 처리 시작 시(10일차) 종양의 부피는 평균 약 75 mm^3였다. 이러한 종양 부피 값을 기반으로, 본 발명자들은 하기 기준에 따라 동물을 분류하였다.

[0229] · 종양 부피가 75 mm^3 이하인 동물은 반응자(R)로 간주되었다.

[0230] · 종양 부피가 75 mm^3 초과인 동물은 비반응자(NR)로 간주되었다.

[0231] 처리에 관계없이 R 및 NR과 연관될 수 있는 유전자를 식별하기 위해 모든 R 및 NR(처리되지 않은 동물 포함)을 고려하였다.

[0232] ITF3756에 의해 조절되는 특이적 유전자를 식별하기 위해, 종양 반응과의 가능한 상관관계를 확인하기 위해 이 그룹 및 해당 비히클 대조군의 모든 동물을 고려하였다.

[0233] 항-PD-1 치료에 의해 조절되는 특이적 유전자를 식별하기 위해, 종양 반응과의 가능한 상관관계를 식별하기 위해 이 그룹과 이소형 대조군의 모든 동물을 고려하였다.

[0234] RNAseq 데이터의 총 개수를 사용하여 R과 NR 사이의 유전자 발현을 비교하였다.

[0235] 통계적 유의성은 GraphPad 소프트웨어(버전 9)를 사용한 짝을 이루지 않은 t-테스트에 의해 결정되었으며, p-값 ≤0.05는 유의한 것으로 간주되었다.

[0236] **결과**

[0237] **ITF3756 표적 참여: 증가된 튜불린 아세틸화.**

[0238] ITF3756에 의한 HDAC6 저해를 확인하기 위해, 모든 희생 시점(1시간, 4시간, 18시간 및 24시간)에서 동물의 비장을 수집하였다. 튜불린 아세틸화 및 총 튜불린은 웨스턴 블로팅에 의해 검출되었다.

[0239] 종양을 보유한 동물은 마지막 투여 후 다양한 시점에서 희생되었다. 비장을 수집하고 총 비장 세포 현탁액을 제조하였다. 펠릿화된 세포를 용해시켜 전기영동에 의해 분리된 총 단백질 추출물 해동을 얻었다. 튜불린과 아세틸-튜불린은 특이적 항체를 사용한 웨스턴 블로팅 후 검출되었다.

[0240] 도 21은 튜불린 아세틸화가 빠르게 발생했음을 나타낸다. 마지막 처리 1시간 후, 조사된 동물은 4시간까지 유지되는 강한 증가를 보였다. 세척 시간이 길어지면 튜불린 아세틸화가 감소했지만 18시간 후에도 여전히 높고 일정하였다. 세척 24시간 후 얻은 결과는 튜불린의 아세틸화가 여전히 검출 가능하지만, 3마리 중 1마리의 동물이 아세틸-튜불린의 기본 수준을 가지고 있기 때문에 분석된 모든 동물에서 검출되지는 않은 것으로 나타났다.

[0241] **항-PD-1 및 ITF3756 처리**

[0242] 항 PD-1 면역 요법은 특히 전임상 및 임상 연구 둘 모두에서 입증된 바와 같이 이질적인 반응을 보이다. 이러한 이질성은 면역계 자극에 대한 단일 대상체의 반응에 따라 달라진다. ITF3756의 면역 의존성 항종양 활성과 일치하여, 본 발명자들은 항 PD-1 처리 동물과 유사한 이질적인 반응을 발견하였다.

[0243] 두 처리 모두 종양 감소가 다른 세 그룹의 동물을 식별할 수 있었다(도 22 및 도 23):

[0244] · 처리에 반응하지 않은 동물(도 22의 ITF3756 1; 도 23의 항 PD-1 a)

[0245] · 10일차에 비해 종양이 강력하거나 완전히 감소한 동물(도 22의 ITF3756 2; 도 23의 항 PD-1 b)

[0246] · 처리 시작 시 종양 질량이 안정적이거나 종양 질량(75 mm^3)보다 약간 높은 동물(도 22의 ITF3756 3, 도 23의 항 PD-1 c). 상관관계 분석을 위해, 종양 부피가 75 mm^3 이하인 이러한 그룹의 동물만 고려하였다.

[0247] **MMP9의 하향 조절과 IRF6 및 CD40의 상향 조절은 반응자와 상관관계가 있다.**

[0248] M2 표현형을 가진 종양 촉진 대식세포는 특이적 마커를 발현하며, 그 중 일부는 표 3에 나타낸 바와 같이 ITF3756으로 처리된 단핵구에서 강력하게 하향 조절된다. MMP9는 이러한 유전자 중 하나이며 따라서 대식세포의 전종양형성 표현형과 연관되어 있다.

[0249] 본 발명자들은 CT26 보유 동물의 종양 미세환경에서 MMP9의 하향 조절이 ITF3756 그룹의 반응자 동물과 유의하게 연관되어 있음을 발견하였다(도 24). 이러한 연관성은 모든 동물을 고려하거나 항 PD-1 그룹 및 상대 대조군을 고려할 때 발생하지 않는다.

[0250] 종양 미세환경에서의 염증을 활성화하고 조절하는 것은 항종양 면역 반응의 적절한 자극에 중요하다. 본 발명자들은 비염증 및 면역 저항성으로부터 염증성 및 면역 내성으로 TME를 리모델링하는 과정에 관여하는 2개의 유전자를 확인하였다. 그 중 하나의 유전자는 인터페론 조절 인자 6(IRF6)이다. IRF6은 고도로 보존된 나선-회전-나선 DNA 결합 도메인과 덜 보존된 단백질 결합 도메인을 공유하는 9개의 전사 인자 계열에 속한다. 대부분의 IRF는 바이러스 감염 후 인터페론의 발현을 조절한다. IRF6은 두개안면 발달과의 연관성으로 더 잘 알려져 있지만, IRF1과 함께 MyD88 신호전달에 역할을 할 수 있다(Honda and Taniguchi, 2006). ITF3756은 인간 단핵구에서 IRF6의 발현을 상향 조절하며, 본 발명자들은 도 25에 나타낸 바와 같이 ITF3756으로 처리한 반응자 동물과 이 상향 조절이 연관되어 있음($p < 0.1$)을 발견하였다.

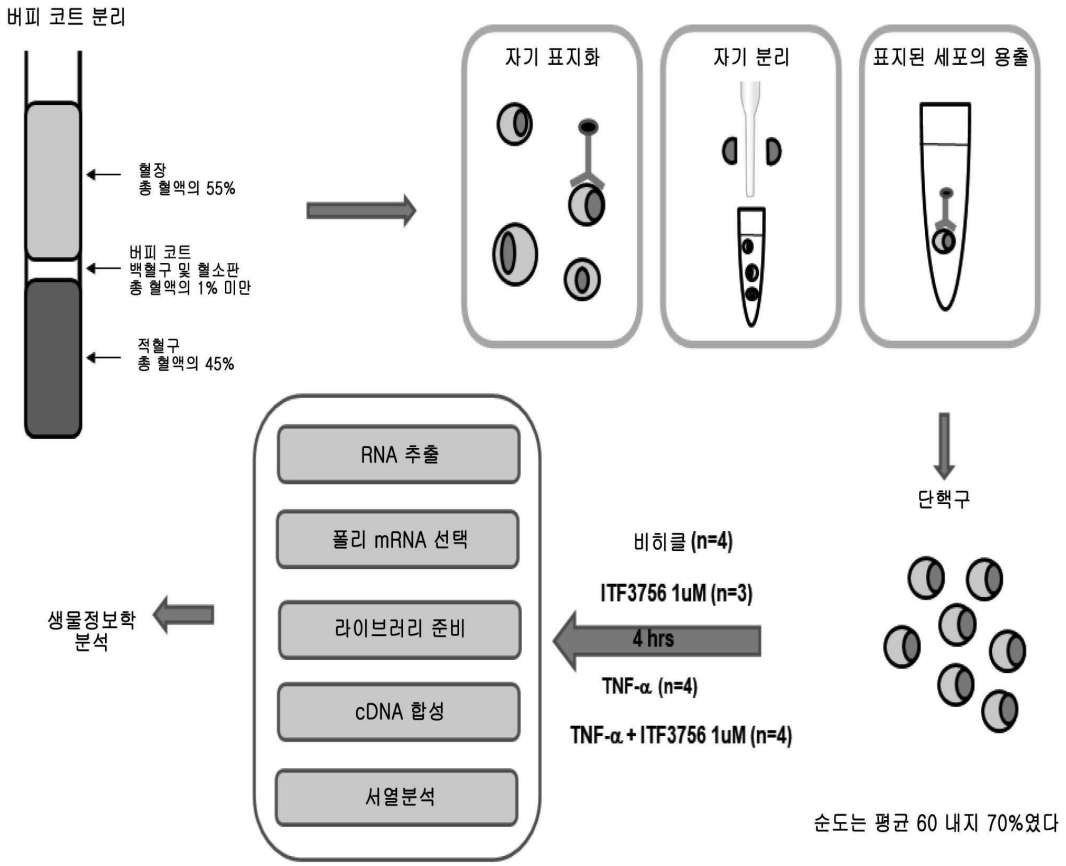
[0251] 놀랍게도, RNAseq 데이터에서 IRF6 수치가 가장 높은 동물은 ITF3756 처리 후 종양이 완전히 감소하였다.

[0252] CD40의 역할은 이전에 간략하게 설명되었다. ITF3756으로 처리한 인간 단핵구는 T 세포 공동 자극 및 항종양 대

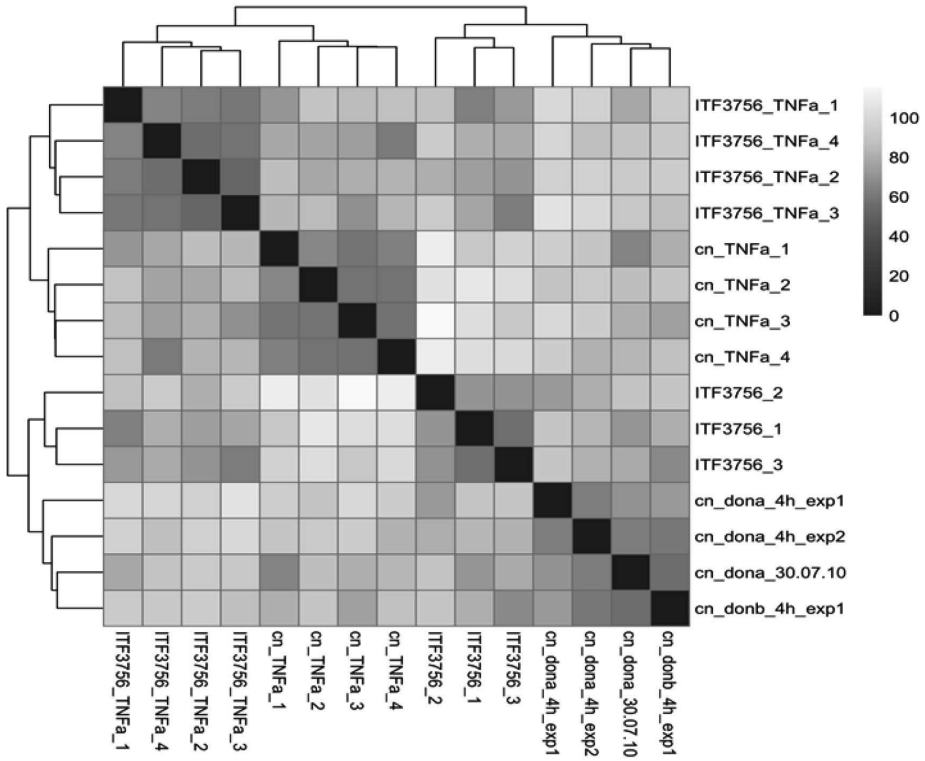
식세포 유도와 직접적으로 연관된 CD40의 유전자 발현 증가를 보여주었다. 이러한 관찰과 일치하여, 본 발명자들은 반응자 마우스가 CD40의 유전자 발현이 유의하게 높다는 것을 발견했다(도 26b). CD40의 경우에도, 모든 동물 및 항 PD-1 항체로 처리된 동물을 고려한 경우 반응자 마우스와의 상관관계는 발견되지 않았다(도 26a, 26c).

도면

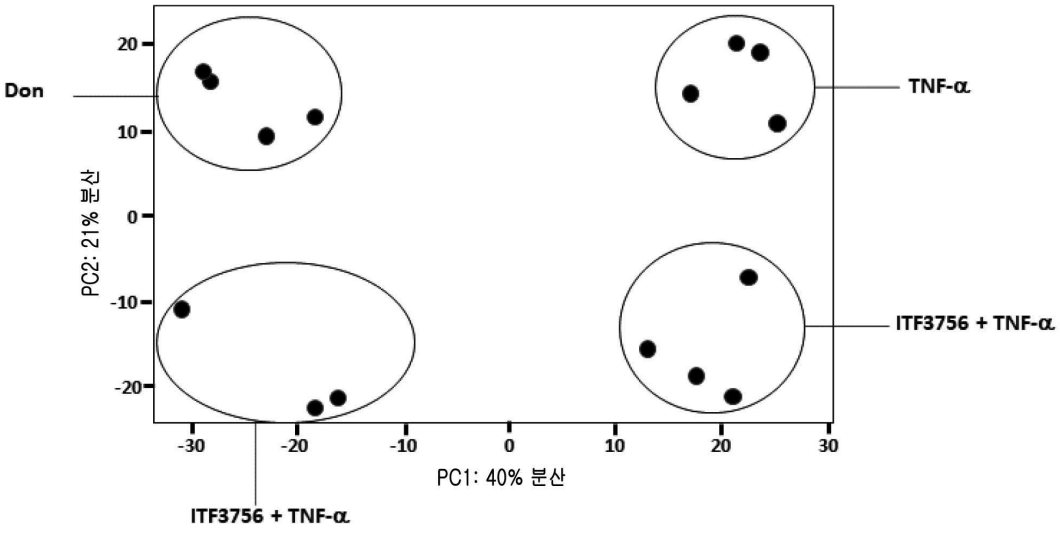
도면1



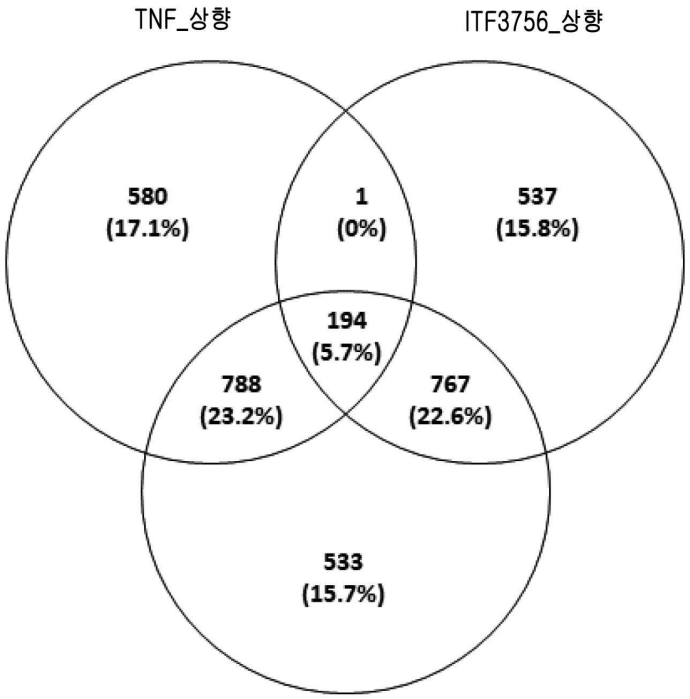
도면2a


ITF3756_TNFa_1
ITF3756_TNFa_4
ITF3756_TNFa_2
ITF3756_TNFa_3
cn_TNFa_1
cn_TNFa_2
cn_TNFa_3
cn_TNFa_4
ITF3756_2
ITF3756_1
ITF3756_3
cn_dona_4h_exp1
cn_dona_4h_exp2
cn_dona_30.07.10
cn_donb_4h_exp1
100
80
60
40
20
0

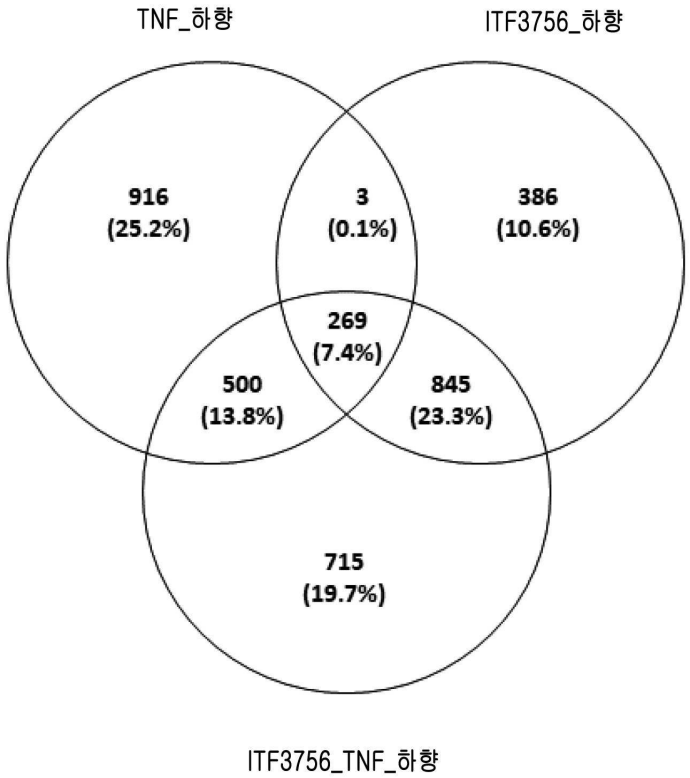
도면2b


Don
TNF-α
ITF3756 + TNF-α
ITF3756 + TNF-α
PC2: 21% 분산
PC1: 40% 분산
20
10
0
-10
-20
-30
-20
-10
0
10
20
30

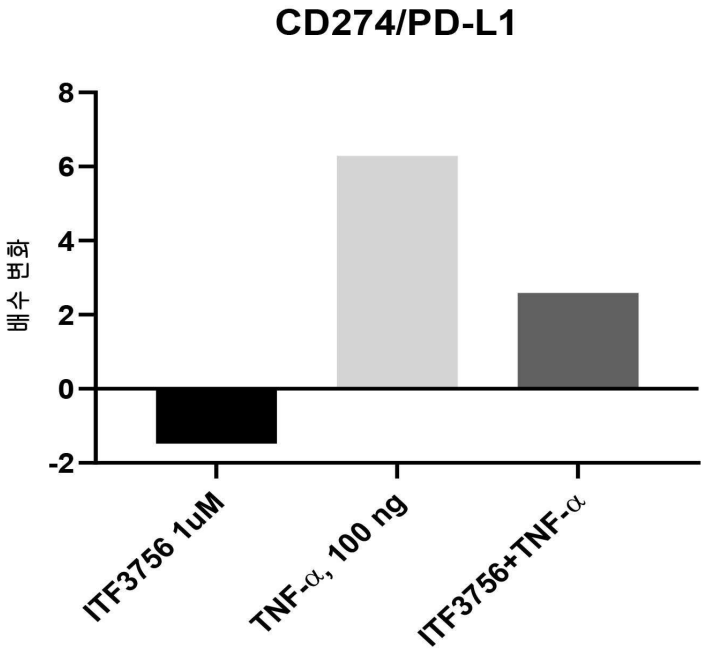
도면3a


TNF_상향
ITF3756_상향
580
(17.1%)
1
(0%)
537
(15.8%)
194
(5.7%)
788
(23.2%)
767
(22.6%)
533
(15.7%)
ITF3756_TNF_상향

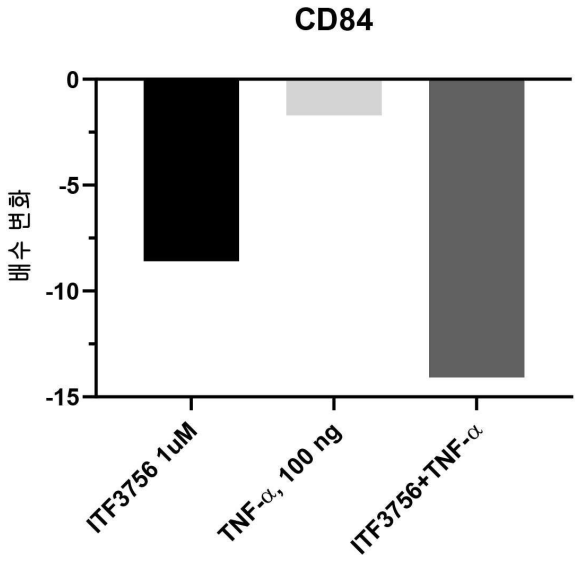
도면3b


TNF_하향
ITF3756_하향
916
(25.2%)
3
(0.1%)
386
(10.6%)
269
(7.4%)
500
(13.8%)
845
(23.3%)
715
(19.7%)
ITF3756_TNF_하향

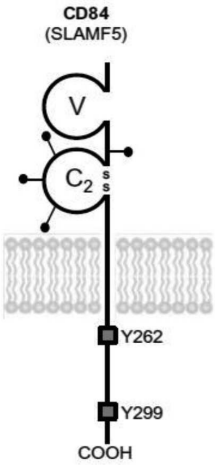
도면4


CD274/PD-L1
배수 변화
8
6
4
2
0
-2
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

도면5a


CD84
배수 변화
0
-5
-10
-15
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

도면5b



도면5c

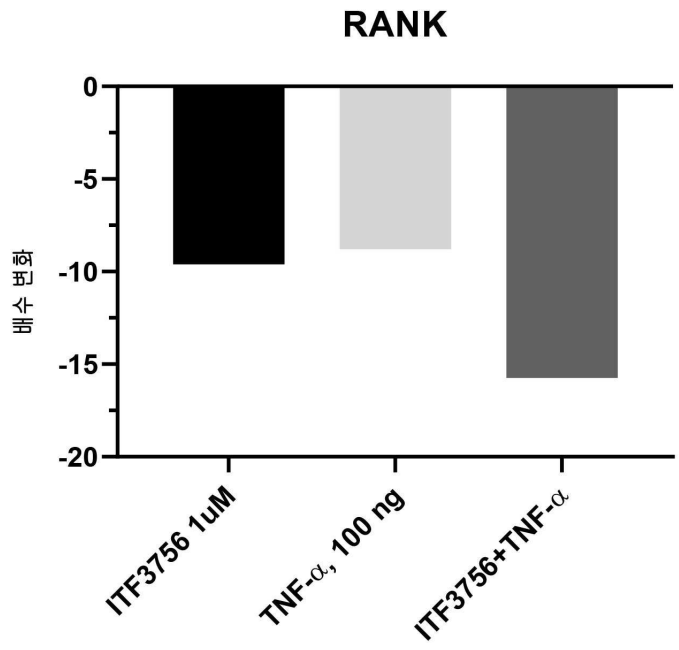
공급원	세포 유형	CD84
골수	HCS	
흉선	DN	
	DP	
	CD4SP	
	CD8SP	
혈액		
림프구	CD4+ 나이브	
	CD4+ 메모리	
	CD8+ 메모리	
	CD8+ 메모리	
	T γ/δ	
	B 나이브	
	B 메모리	
	혈장 세포	
골수 세포	호중구	
	호산구	
	호염기구	
	단핵구	
	단핵구 수시장 세포	
	형질세포양 수지상 세포	
기타 혈액 세포	적혈구	
	혈소판	

양성 세포 (%)

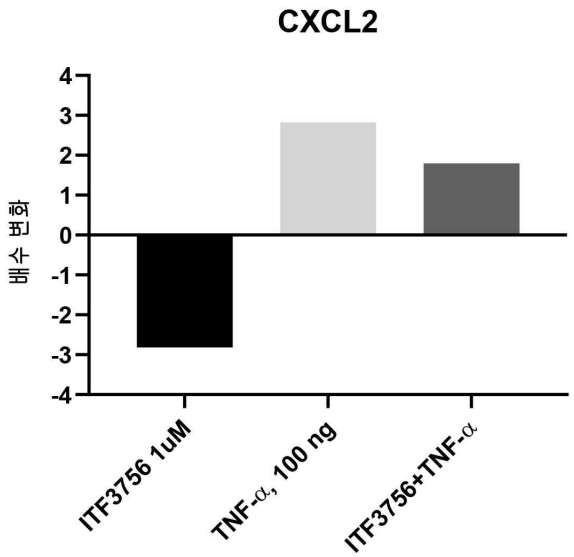
	0-20%
	21-40%
	41-60%
	61-80%
	>81%

Cuenca M et al Clinical Immunology 2019

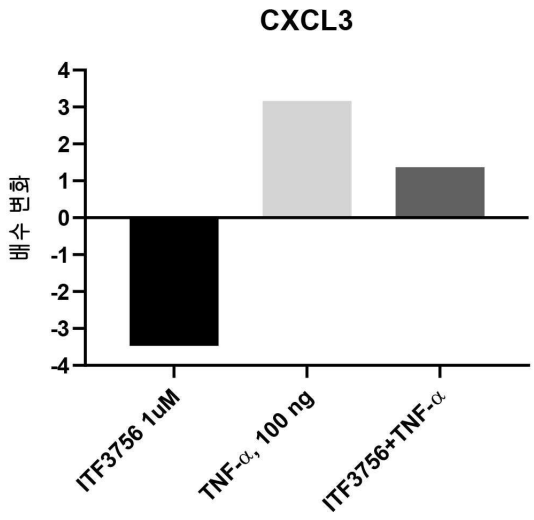
도면6


RANK
0
-5
-10
-15
-20
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

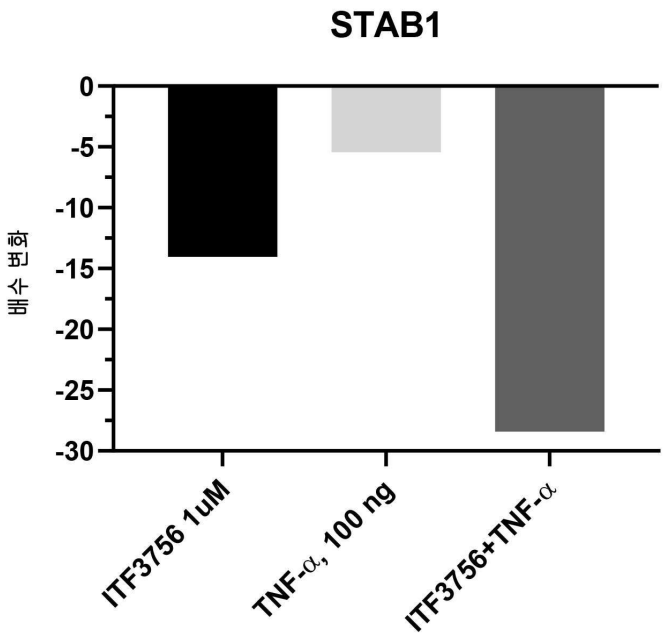
도면7a


CXCL2
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

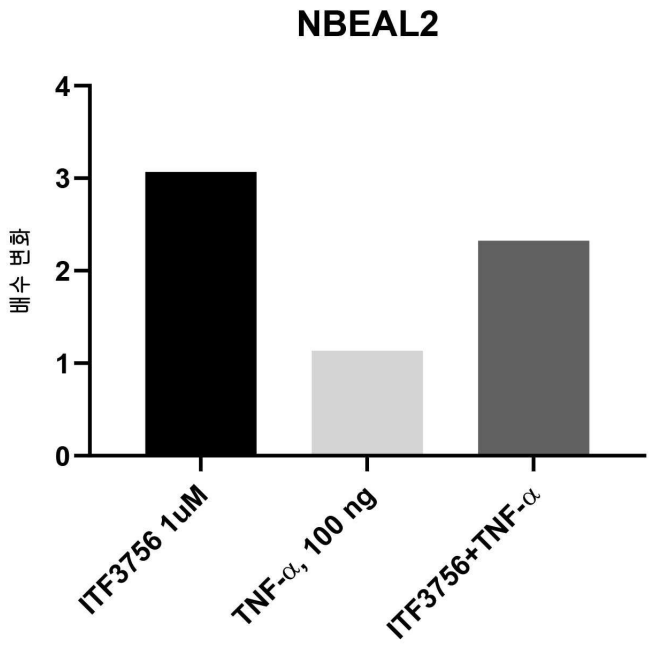
도면7b


CXCL3
배수 변화
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

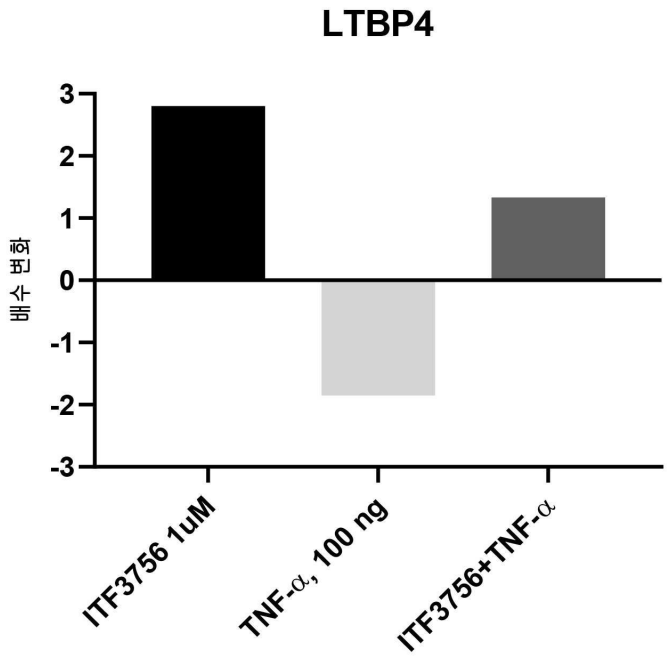
도면8


STAB1
배수 변화
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

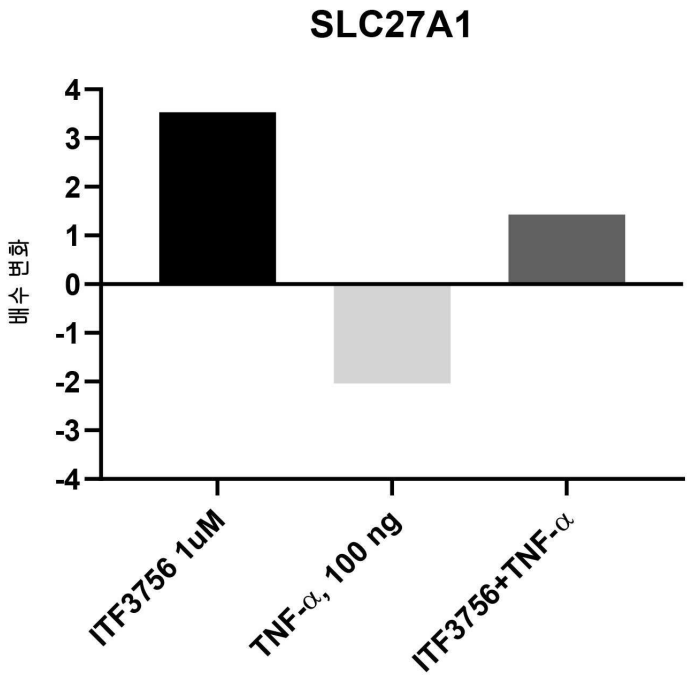
도면9


NBEAL2
배수 변화
4
3
2
1
0
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

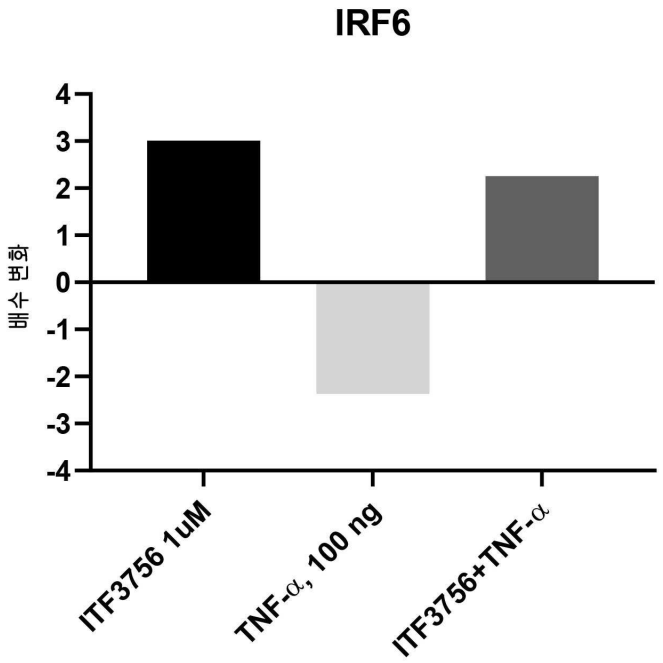
도면10


LTBP4
배수 변화
3
2
1
0
-1
-2
-3
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

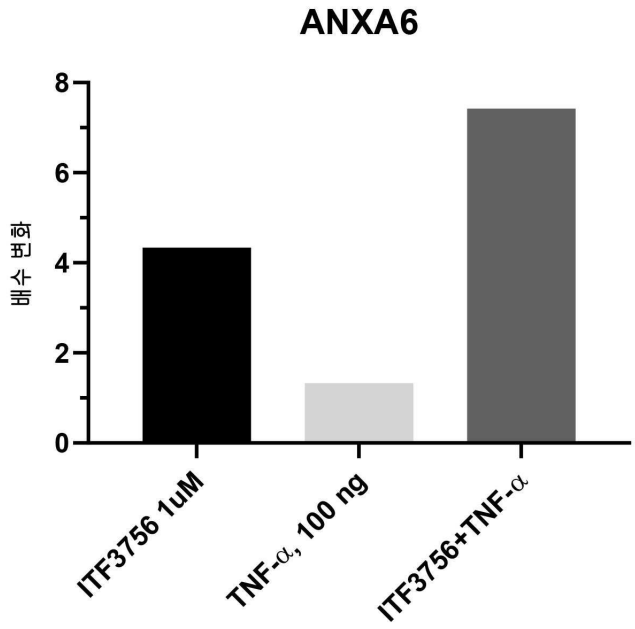
도면11


SLC27A1
배수 변화
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

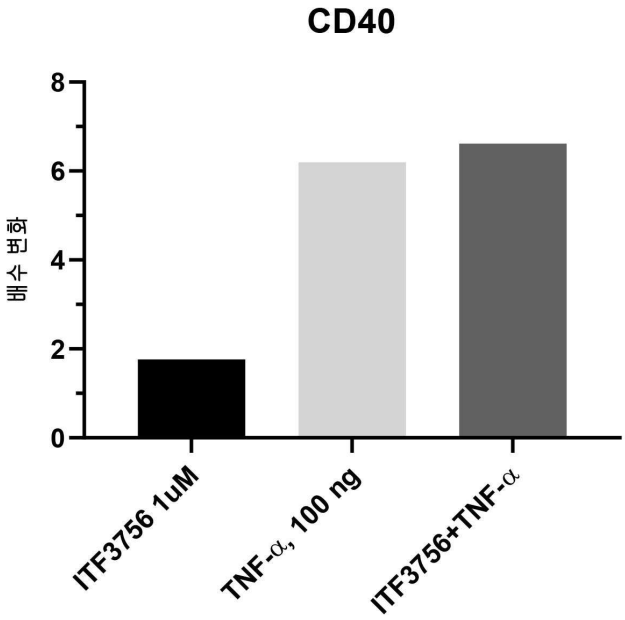
도면12


IRF6
배수 변화
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

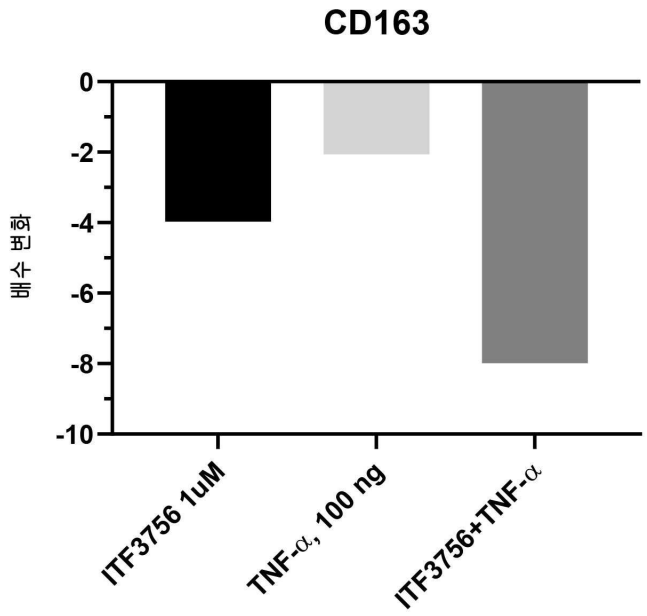
도면13


ANXA6
8
6
4
2
0
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

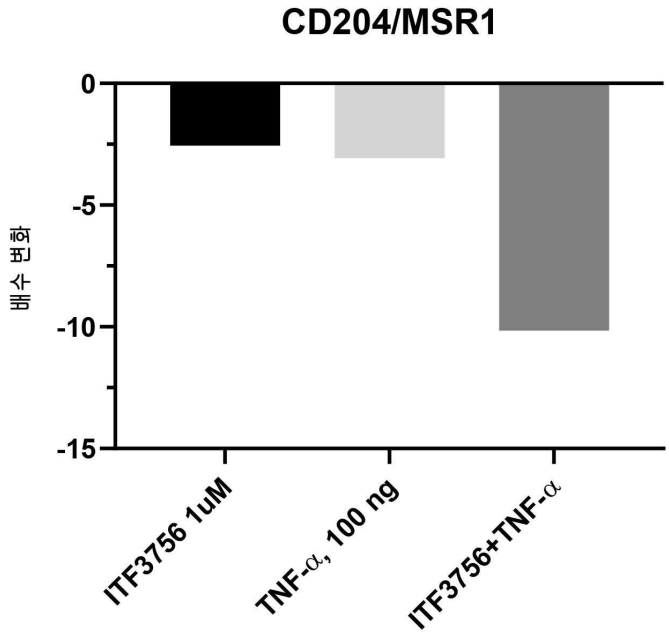
도면14


CD40
8
6
4
2
0
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

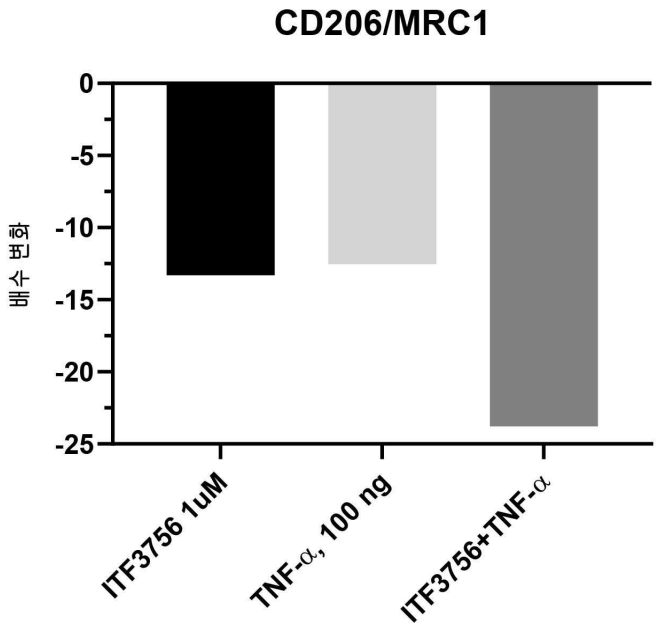
도면15


CD163
0
-2
-4
-6
-8
-10
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

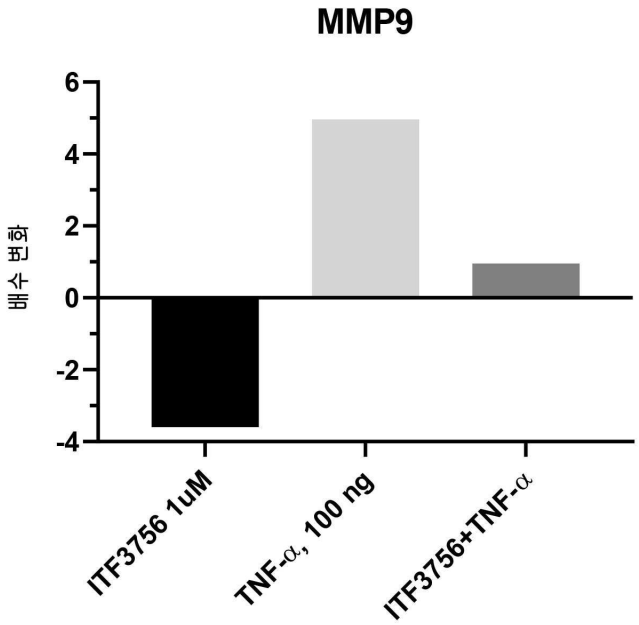
도면16


CD204/MSR1
0
-5
-10
-15
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

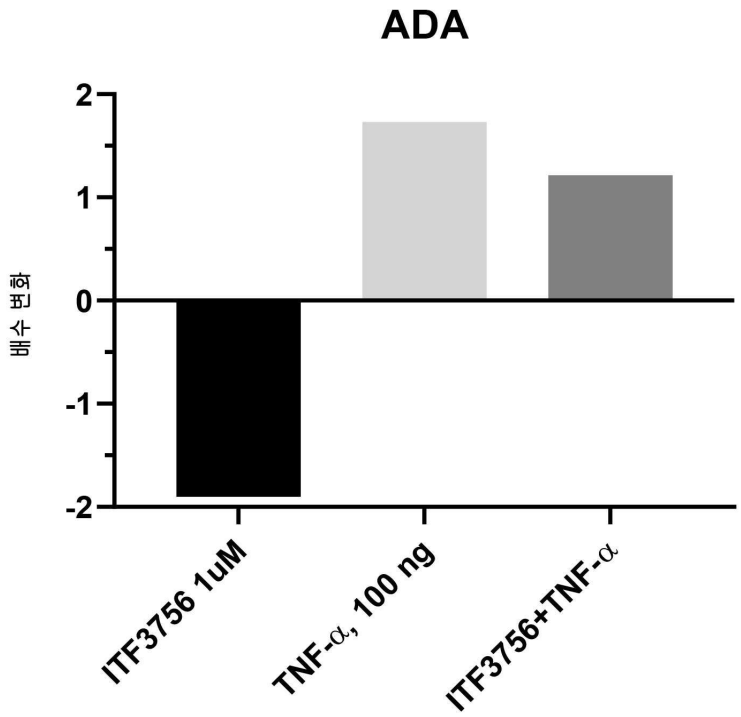
도면17


CD206/MRC1
0
-5
-10
-15
-20
-25
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

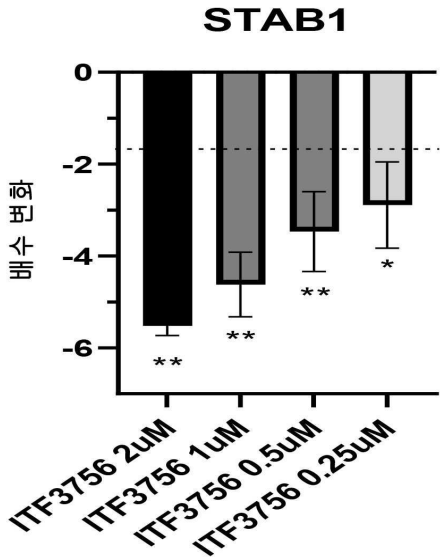
도면18


MMP9
6
4
2
0
-2
-4
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

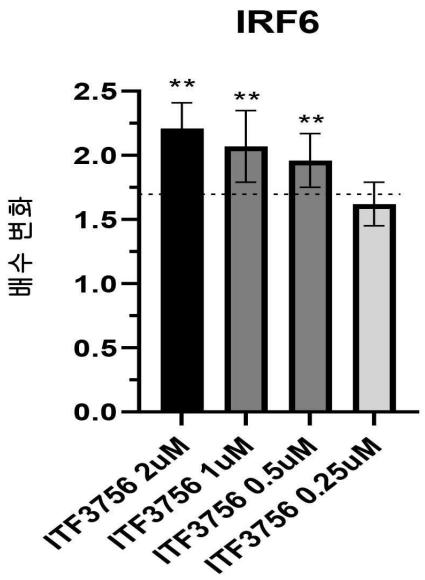
도면19


ADA
2
1
0
-1
-2
배수 변화
ITF3756 1uM
TNF-α, 100 ng
ITF3756+TNF-α

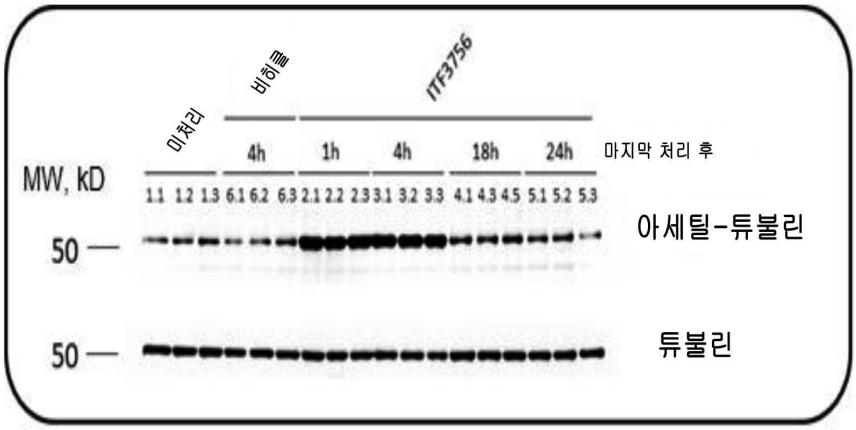
도면20a


STAB1
0
-2
-4
-6
배수 변화
**
**
**
*
ITF3756 2uM
ITF3756 1uM
ITF3756 0.5uM
ITF3756 0.25uM

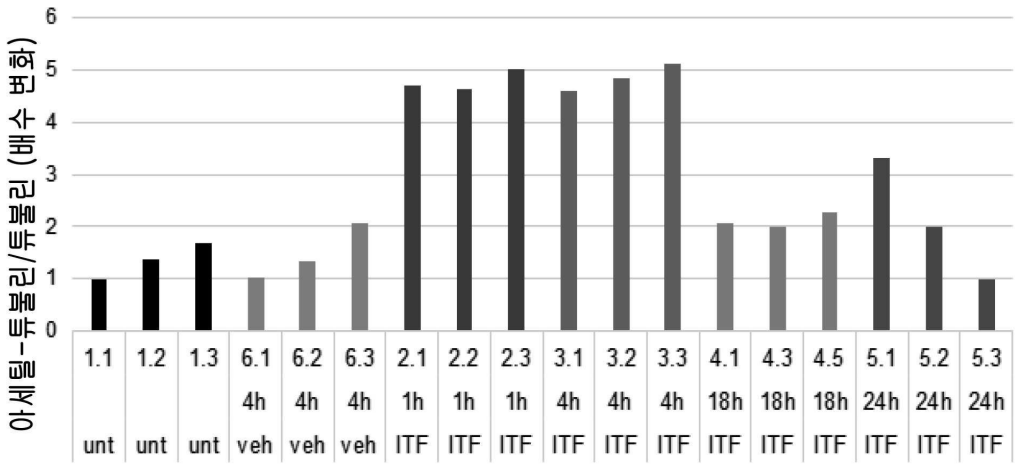
도면20b



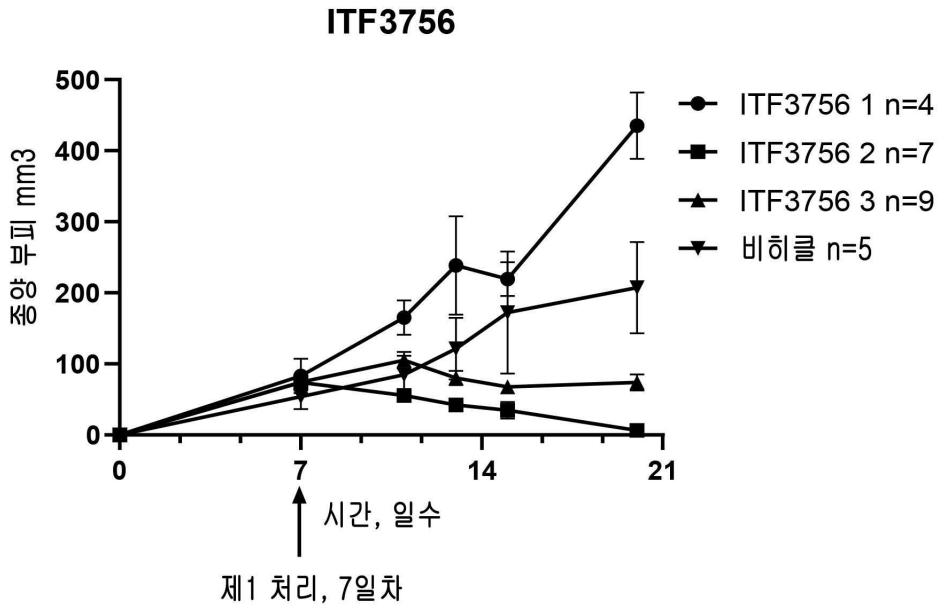
도면21a



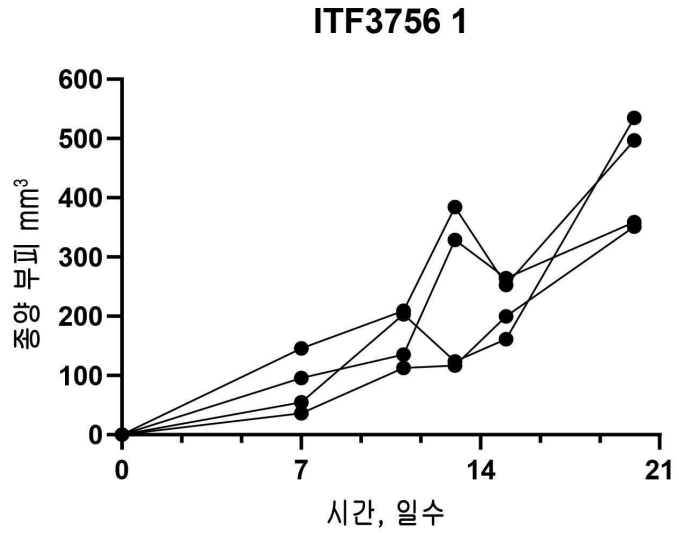
도면21b



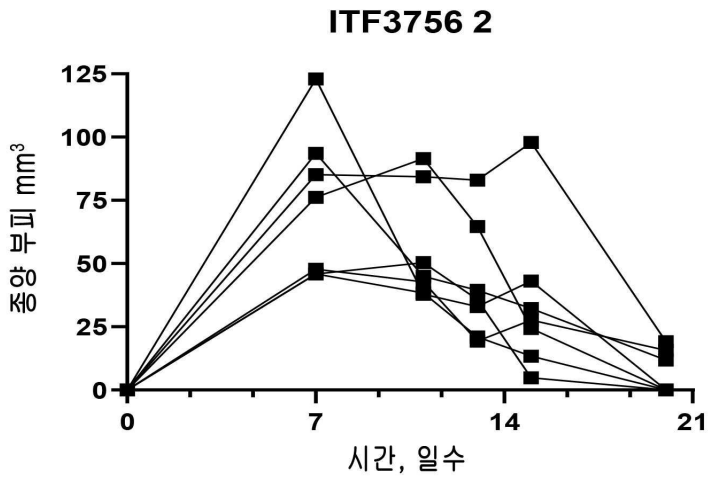
도면22a


ITF3756
종양 부피 mm3
500
400
300
200
100
0
0
7
14
21
시간, 일수
제1 처리, 7일차
ITF3756 1 n=4
ITF3756 2 n=7
ITF3756 3 n=9
비히클 n=5

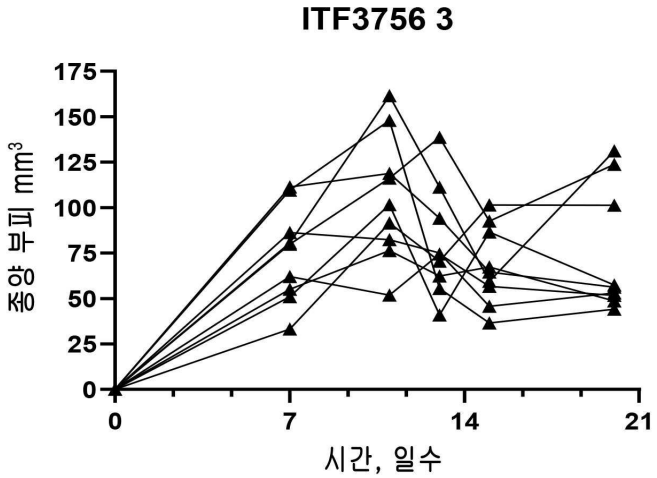
도면22b


ITF3756 1
종양 부피 mm³
600
500
400
300
200
100
0
0
7
14
21
시간, 일수

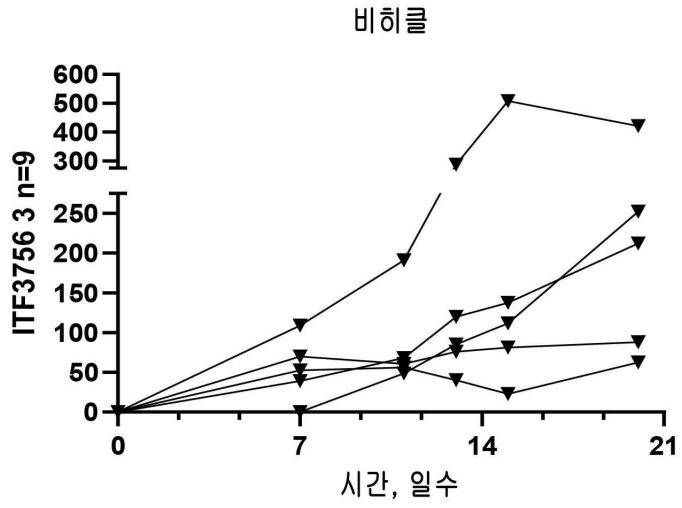
도면22c



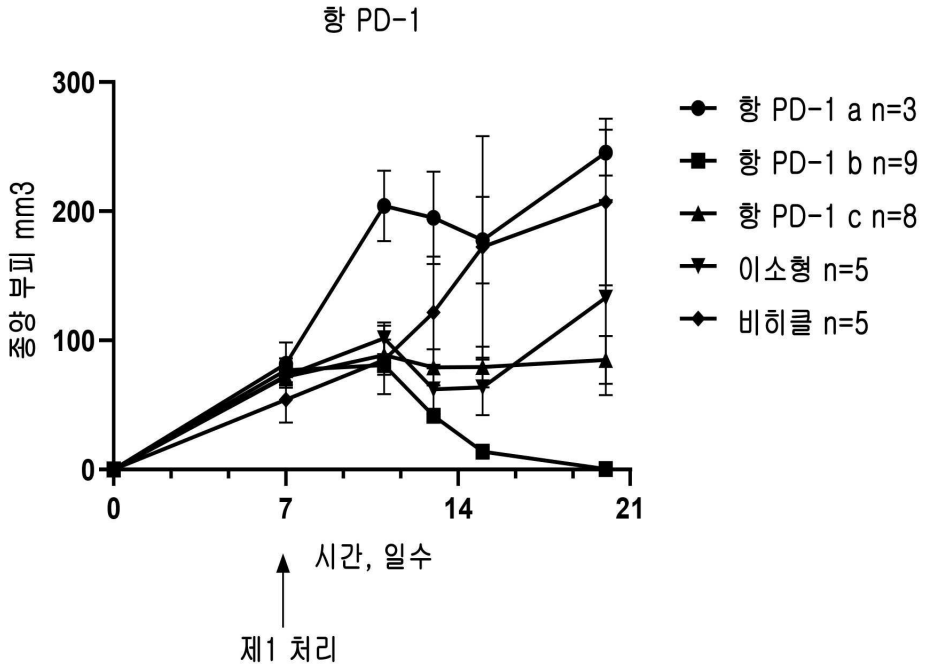
도면22d



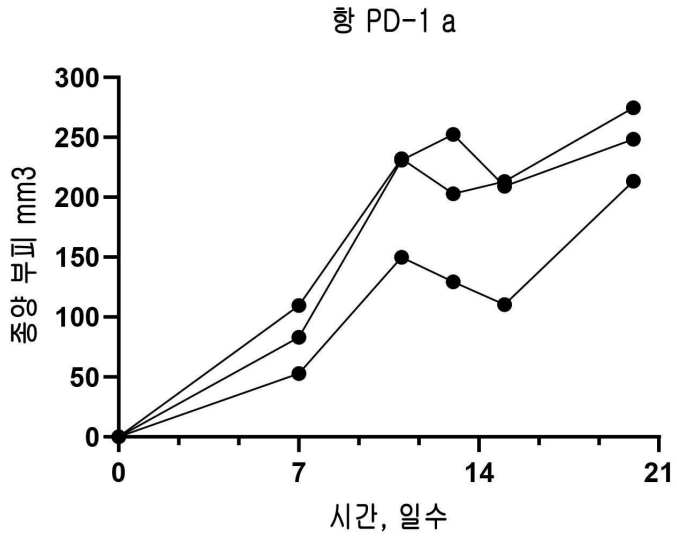
도면22e



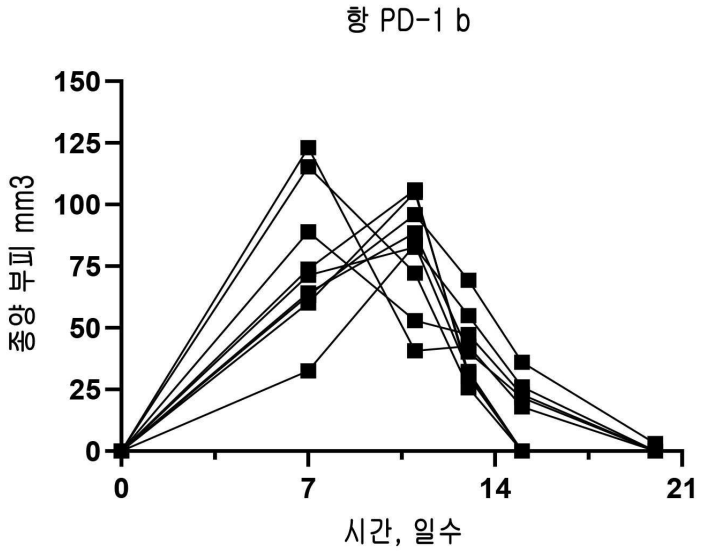
도면23a


항 PD-1
종양 부피 mm3
300
200
100
0
0
7
14
21
시간, 일수
제1 처리
항 PD-1 a n=3
항 PD-1 b n=9
항 PD-1 c n=8
이소형 n=5
비히클 n=5

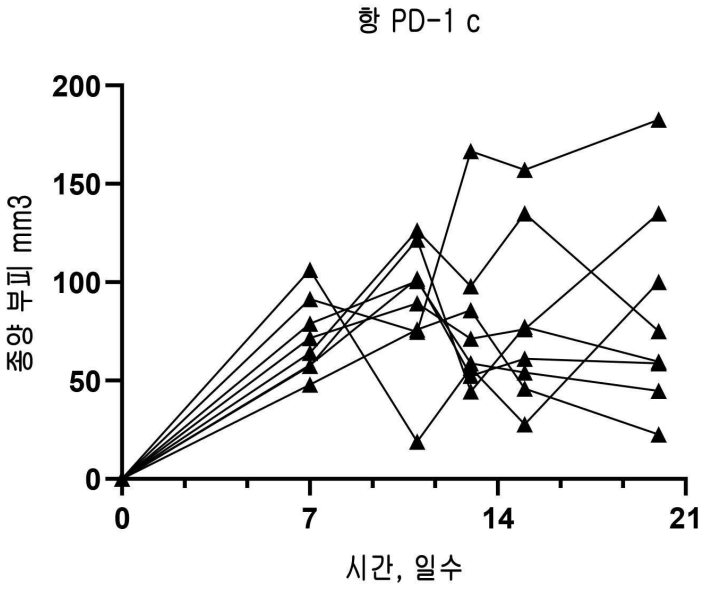
도면23b


항 PD-1 a
종양 부피 mm3
300
250
200
150
100
50
0
0
7
14
21
시간, 일수

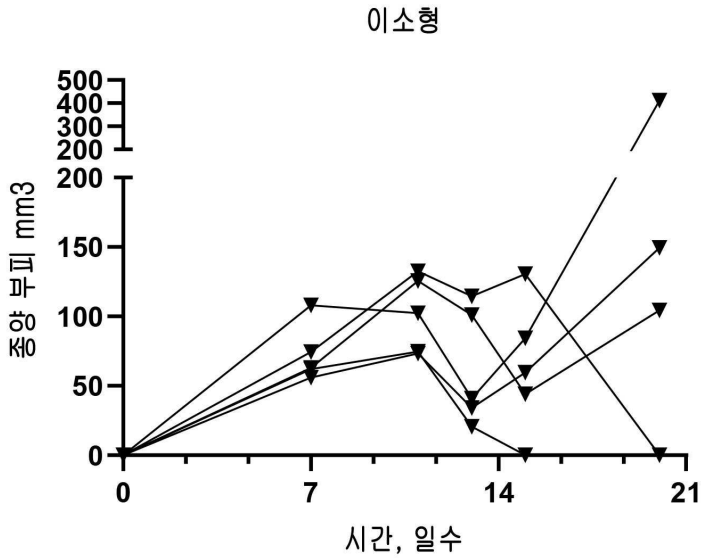
도면23c


항 PD-1 b
종양 부피 mm3
150
125
100
75
50
25
0
0
7
14
21
시간, 일수

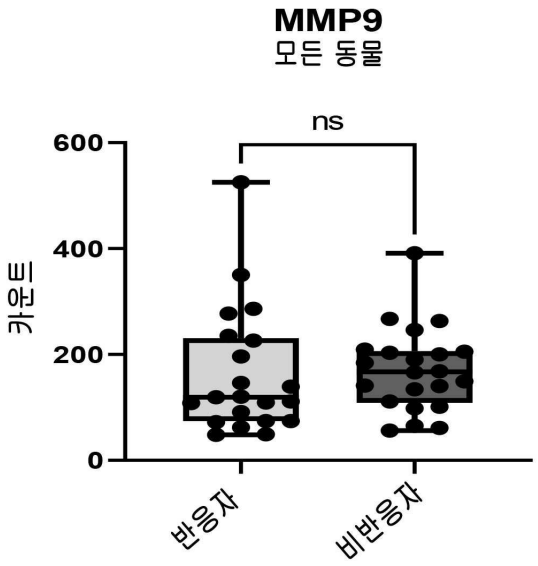
도면23d


항 PD-1 c
종양 부피 mm3
200
150
100
50
0
0
7
14
21
시간, 일수

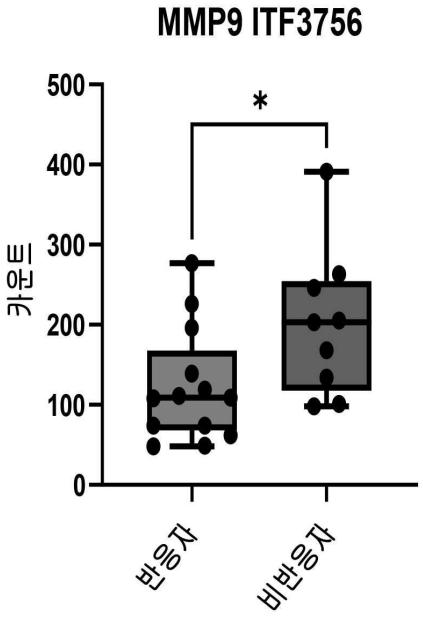
도면23e


이소형
500
400
300
200
200
150
100
50
0
종양 부피 mm3
0
7
14
21
시간, 일수

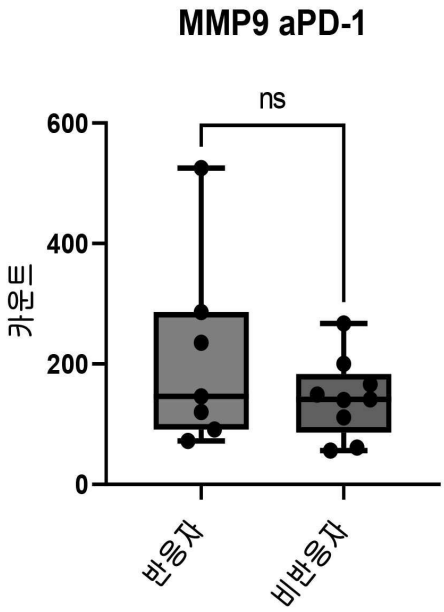
도면24a


MMP9
모든 동물
ns
600
400
200
0
카운트
반응자
비반응자

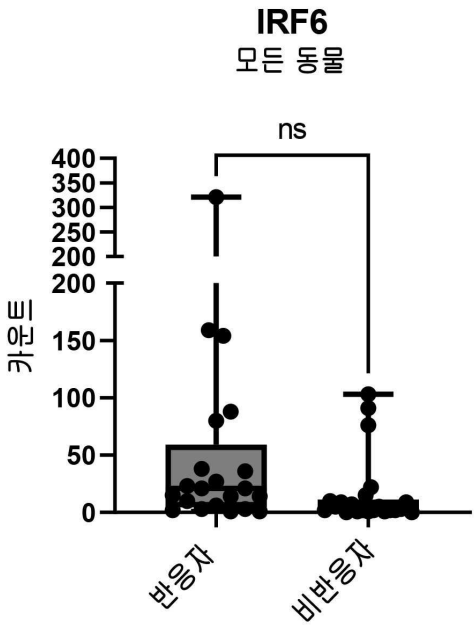
도면24b


MMP9 ITF3756
*
500
400
300
200
100
0
카운트
반응자
비반응자

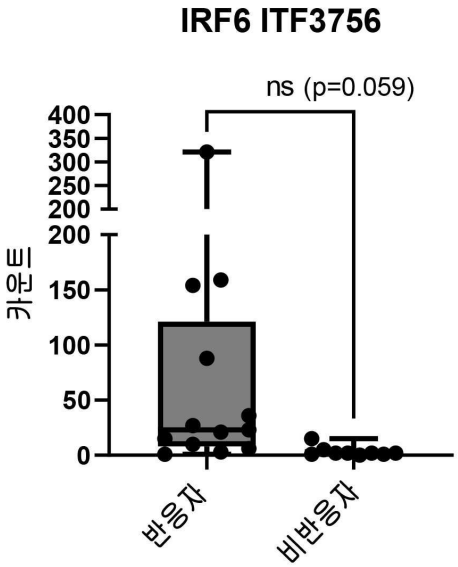
도면24c


MMP9 aPD-1
ns
600
400
200
0
카운트
반응자
비반응자

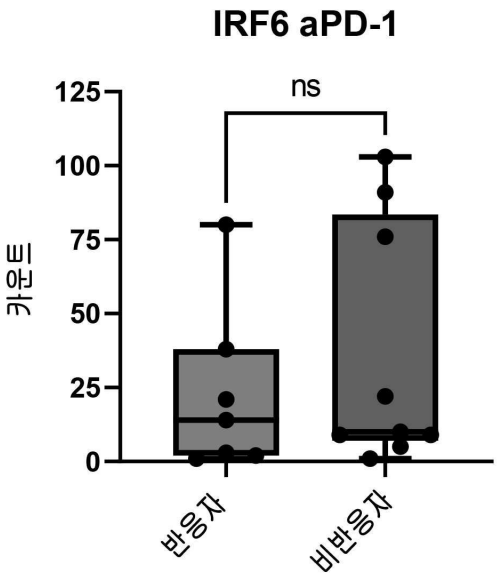
도면25a


IRF6
모든 동물
ns
400
350
300
250
200
200
150
100
50
0
카운트
반응자
비반응자

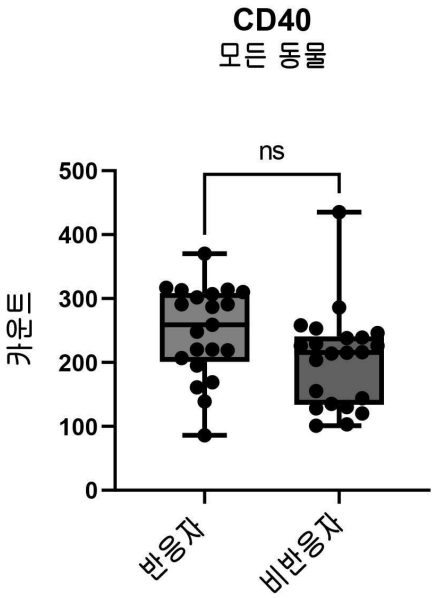
도면25b


IRF6 ITF3756
ns (p=0.059)
400
350
300
250
200
200
150
100
50
0
카운트
반응자
비반응자

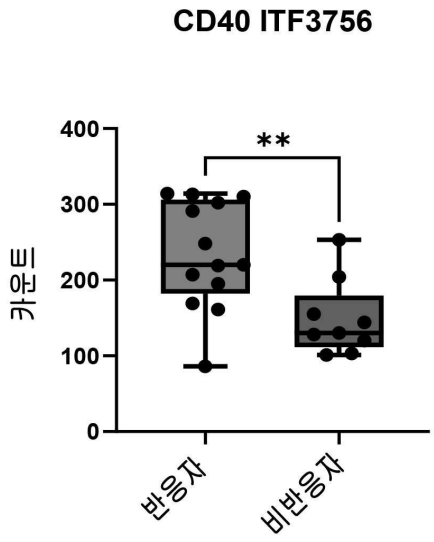
도면25c


IRF6 aPD-1
ns
125
100
75
50
25
0
카운트
반응자
비반응자

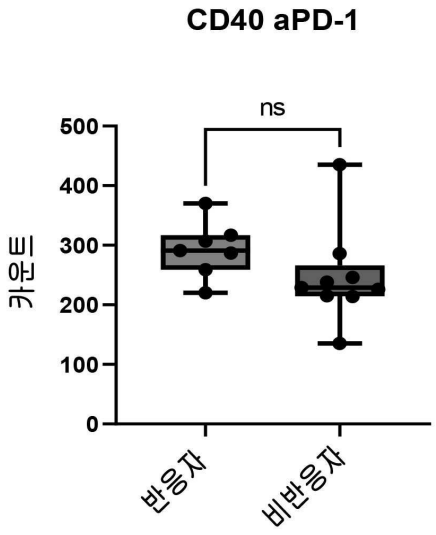
도면26a


CD40
모든 동물
ns
500
400
300
200
100
0
카운트
반응자
비반응자

도면26b


CD40 ITF3756
**
400
300
200
100
0
카운트
반응자
비반응자

도면26c


CD40 aPD-1
ns
500
400
300
200
100
0
카운트
반응자
비반응자